

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада<sup>1</sup>.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



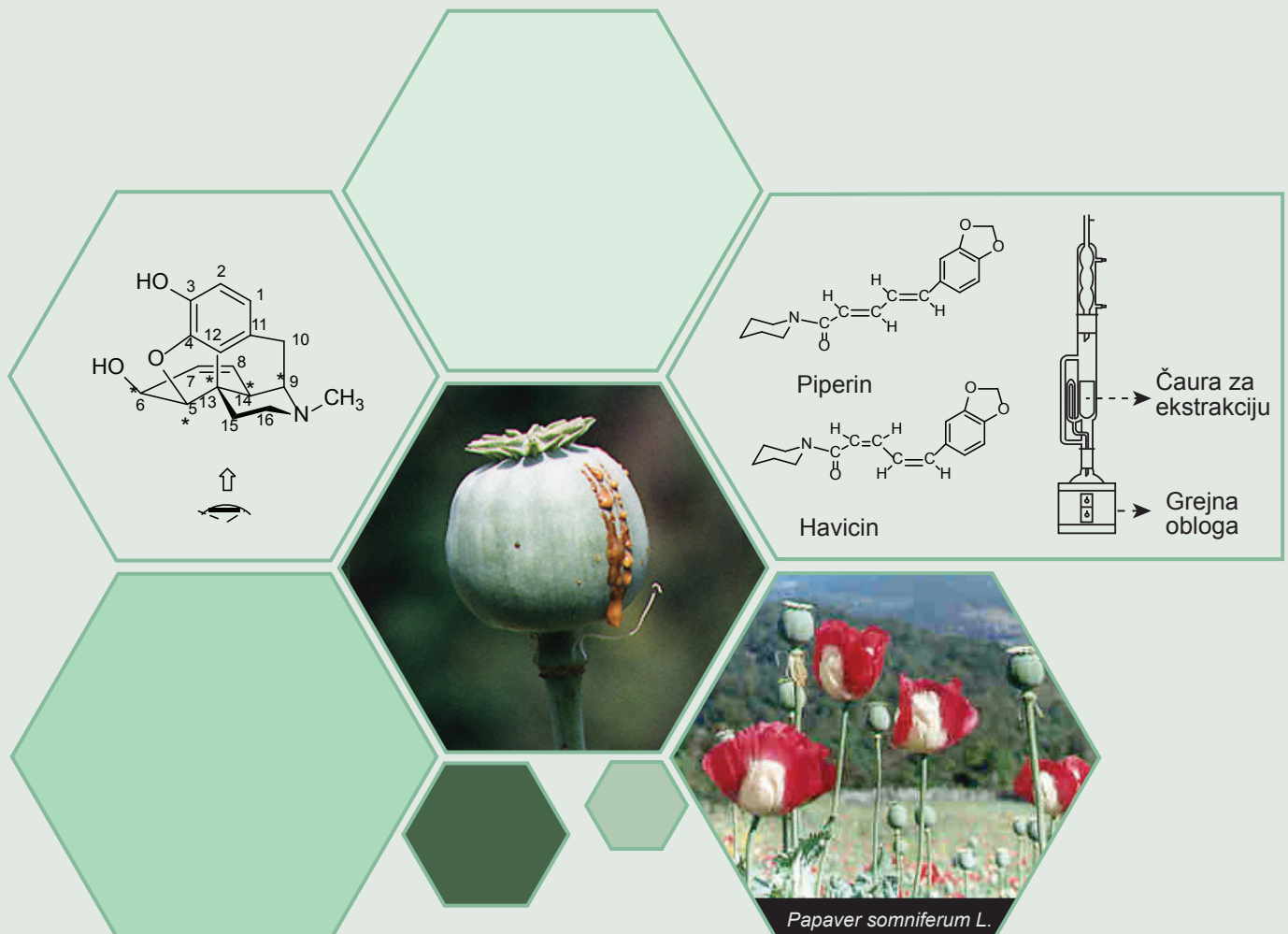
---

<sup>1</sup> Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси [creativecommons.org.rs/?page\\_id=74](https://creativecommons.org.rs/?page_id=74).

Mirjana Popsavin  
Nada Vukojević  
Jovan Hranisavljević

Ivana Kovačević  
Bojana Srećo Zelenović  
Miloš Svirčev

# PRAKTIKUM IZ HEMIJE PRIRODNIH PROIZVODA



The diagram features a central hexagonal cell containing a photograph of a green poppy seed pod. To the left, a chemical structure of a morphine derivative is shown with carbons numbered 1 through 16 and various functional groups (HO, O, N-CH<sub>3</sub>). Below it is a small icon of a poppy seed pod with an upward arrow. To the right, two chemical structures are shown: Piperin and Havicin. Further right is a schematic of a Soxhlet extraction apparatus, with labels for 'Čaura za ekstrakciju' (extraction thimble) and 'Grejna obloga' (heating jacket). At the bottom right, a photograph of a field of red poppies is shown, with the caption 'Papaver somniferum L.' below it.

Chemical structures shown include:  
Morphine derivative (numbered 1-16)  
Piperin  
Havicin  
Extraction apparatus (Čaura za ekstrakciju, Grejna obloga)  
Papaver somniferum L.

*Izdavač*

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad

[www.pmf.uns.ac.rs](http://www.pmf.uns.ac.rs)

*Za izdavača*

dr Milica Pavkov Hrvojević, dekan

*Recenzenti*

dr Gordana Četković, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

dr Ljubica Grbović, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

*Tehnička obrada slika i dizajn korica*

Nada Popsavin

Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, broj 0602-89/6 od 26. februara 2018. godine „Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda“ je prihvaćen kao pomoćni univerzitetski udžbenik za predmet Hemija prirodnih proizvoda za studente treće godine Osnovnih akademskih studija hemije i Osnovnih akademskih studija biohemije.

CIP - Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад

547(075.8)(076)

**PRAKTIKUM iz hemije prirodnih proizvoda** [Elektronski izvor] / Mirjana Popsavin ... [et al.]. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2018

Način dostupa (URL):

[https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/popsavin\\_etc\\_praktikum\\_iz\\_hemije.pdf](https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/popsavin_etc_praktikum_iz_hemije.pdf). - Nasl. sa pristupne stranice. - Opis izvora dana: 27.02.2018. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7031-454-2

1. Попсавин, Мирјана [аутор]

а) Органска хемија – Практикуми

<http://www.vbs.rs/scripts/cobiss?command=DISPLAY&base=COBIB&RID=321492487>



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine

Mirjana Popsavin  
Nada Vukojević  
Jovan Hranisavljević

Ivana Kovačević  
Bojana Srećo Zelenović  
Miloš Svirčev

# **PRAKTIKUM IZ HEMIJE PRIRODNIH PROIZVODA**

## PREDGOVOR

„Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda“ je pomoćni udžbenik, pre svega za studente treće godine hemije i biohemije Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, a takođe i za studente drugih srodnih fakulteta na kojima se izučava Hemija prirodnih proizvoda. Osnovna namena ovog praktikuma je povezivanje teorijskih i praktičnih aspekata nastave, u cilju lakšeg savladavanja gradiva iz pomenutog predmeta, kao i upoznavanje sa osnovnim tehnikama pri radu sa prirodnim proizvodima kao što su izolacija, prečišćavanje i identifikacija prirodnih proizvoda kroz izradu odgovarajućih vežbi koje su detaljno opisane u prvih šest poglavlja. Sedmo poglavlje se odnosi na praktičnu primenu NMR spektroskopije za dokazivanje strukture odabranih prirodnih organskih molekula, odnosno njihovih derivata koji se dobijaju tokom vežbi u prethodnim poglavljima.

Iskreno se zahvaljujemo dr Žiki Lepojeviću i dr Zoranu Zekoviću (Tehnološki fakultet u Novom Sadu), dr Vlatki Vajs i dr Nini Todorović (Hemijski fakultet u Beogradu), kao i dipl. hem. Milojki Knežević (Medicinski fakultet u Novom Sadu) na ukazanoj pomoći pri izboru eksperimentalnih tehnika i odgovarajuće literature za pojedine vežbe.

Posebno se zahvaljujemo recenzentima, dr Ljubici Grbović (vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu) i dr Gordani Četković (redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu) na korisnim sugestijama i uloženom vremenu za pregledanje rukopisa ovog praktikuma.

Nadamo se da će ovaj praktikum dodatno zainteresovati naše studente za izučavanje ovog kursa i da će ih motivisati da nastave da istražuju i proširuju znanje u oblasti prirodnih proizvoda.

Autori

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Ekstrakcija prirodnih proizvoda .....	1
1.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno .....	1
1.1.2. Ekstrakcija tečno-tečno.....	3
1.1.3. Kontinualna ekstrakcija tečno-tečno .....	5
1.2. Pripremanje apsolutnog dietil-etra.....	7
1.3. Hromatografija na tankom sloju .....	8
1.3.1. Opšta uputstva za izvođenje hromatografije na tankom sloju (TLC).....	8
2. ACETOGENINI.....	12
2.1. Flavonoidi.....	12
2.1.1. Izolovanje apigenina i apigenin-7-O-β-D-glukopiranozida iz jezičastih delova cveta kamilice ...	12
2.1.2. Izolovanje flavonoidnih pigmenata hromatografskim metodama .....	14
2.1.3. Izolovanje biohanina A iz dijetetskog proizvoda <i>Oestrofact E</i> .....	16
2.1.4. Izolovanje naringina iz kore grejpfruta .....	18
2.2. Antocijani .....	21
2.2.1. Promena boje antocijana u zavisnosti od pH sredine.....	22
3. IZOPRENOIDI I FENILPROPANI .....	25
3.1. Etarska ulja.....	26
3.1.1. Ekstrakcija etarskih ulja pomoću lako isparljivih rastvarača.....	27
3.1.2. Ispitivanje etarskog ulja pitome nane.....	28
3.1.3. Ispitivanje etarskog ulja cimeta .....	32
3.1.4. Izolovanje anetola iz anisa .....	35
3.1.5. Izolovanje karvona i limonena iz etarskog ulja kima .....	37

3.1.6.	Dokazivanje prisustva keto-grupe u molekulu kamfora .....	39
3.2.	Feromoni .....	41
3.3.	Karotenoidi.....	44
3.3.1.	Razdvajanje pigmenata hloroplasta adsorpcionom hromatografijom na koloni .....	45
3.3.2.	Razdvajanje pigmenata hloroplasta adsorpcionom hromatografijom na hartiji.....	48
3.3.3.	Izolovanje likopena iz paradajza .....	50
3.4.	Steroidi .....	53
3.4.1.	Hemijska transformacija holesterola u $\Delta^4$ -holesten-3-on.....	55
3.4.2.	Izolovanje ergosterola iz kvasca.....	60
3.4.3.	Dobijanje vitamina D <sub>2</sub> .....	63
3.4.4.	Identifikacija vitamina D <sub>2</sub> hromatografijom na tankom sloju.....	64
3.4.5.	Estrogeni hormoni .....	66
3.4.6.	Žučne kiseline.....	71
4.	ALKALOIDI .....	74
4.1.	Izolovanje alkaloida iz biljnog materijala .....	74
4.1.1.	Izolovanje piperina iz crnog bibera .....	75
4.1.2.	Izolovanje kofeina iz čaja .....	77
5.	SEKUNDARNE REAKCIJE U BIOSINTEZI PRIRODNIH PROIZVODA .....	79
5.1.	Građenje ketonskih tela.....	79
5.1.1.	Dokazivanje ketonskih tela u urinu po Legalu .....	79
6.	UGLJENI HIDRATI.....	81
6.1.	Ksilani .....	81
6.2.	Izolovanje i derivatizacija D-ksiloze iz šapurika .....	82
6.2.1.	Ekstraktivna hidroliza ksilana kukuruznih šapurika .....	83
6.2.2.	Sinteza 1,2:3,5-di-O-cikloheksiliden- $\alpha$ -D-ksilofuranoze .....	84



7.	ANALIZA NMR SPEKTARA PRIRODNIH PROIZVODA I DERIVATA .....	85
7.1.	1,2:3,5-Di-O-cikloheksiliden- $\alpha$ -D-ksilofuranoza ( <b>1</b> ) .....	85
7.2.	Apigenin ( <b>2</b> ) .....	90
7.3.	Piperin ( <b>3</b> ) .....	95
7.4.	Mentol ( <b>4</b> ) .....	98
7.5.	$\Delta^4$ -Holesten-3-on ( <b>5</b> ) .....	101
7.6.	Ergosterol ( <b>6</b> ) .....	104
7.7.	Kamfor ( <b>7</b> ) i oksim kamfora ( <b>8</b> ) .....	108
8.	LITERATURA .....	117

## 1. UVOD

### 1.1. Ekstrakcija prirodnih proizvoda

Ekstrakcija je postupak koji se često koristi pri izolovanju prirodnih proizvoda. Pod ekstrakcijom se u hemiji podrazumeva izdvajanje nekog sastojka iz pojedinih delova biljaka, životinjskih organa ili iz složenih reakcionih smesa. Može se izvoditi na različite načine, u zavisnosti od toga u kakvom se obliku nalazi supstanca u izvornom materijalu (slobodna – rastvorena ili suspendovana, vezana za odgovarajuće ćelijske elemente i dr.). Kao rezultat ekstrakcije biljnih ili životinjskih organa dobija se ekstrakt – najčešće složena smesa jedinjenja rastvorena u rastvaraču korišćenom za ekstrakciju. Ovako dobijeni sirovi ekstrakt se prečišćava ponovljenom ekstrakcijom, upotrebom specifičnih rastvarača. U zavisnosti od vrste polaznog materijala ili sirovog ekstrakta, kao i od konzistencije eventualno uparenog ostatka (*upareni ekstrakt*), ekstrakcija može biti dvojaka:

1. Ekstrakcija iz smese čvrstih supstanci – *čvrsto-tečno*
2. Ekstrakcija iz smese supstanci u rastvoru – *tečno-tečno*

#### 1.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno

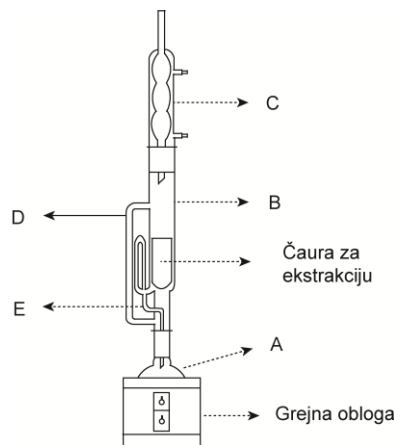
Ekstrakcijom smese čvrstih supstanci pomoću odgovarajućeg rastvarača dolazi do izdvajanja rastvorenih jedinjenja od nerastvornog materijala. Ovaj tip ekstrakcije se uvek primenjuje kod izolovanja prirodnih proizvoda iz izvornih materijala – biljnih delova, odnosno životinjskih organa i tkiva. Na ovaj način se dobija sirovi ekstrakt koji, pored željenog prirodnog proizvoda, sadrži smesu pratećih jedinjenja (jedinjenja srodne strukture ili slične rastvorljivosti u primenjenom ekstrakcionom sredstvu). U nekim slučajevima materijal za ekstrakciju sadrži sastojke koji su na sobnoj temperaturi tečne ili uljaste konzistencije. Ovakve primere srećemo pri ekstrakciji *etarskih ulja* iz odgovarajućih sirovina, obično cvetnih delova biljaka, kao i pri ekstrakciji *uljastih lipidnih sastojaka semena biljaka* (vitamina, ulja i sl.). Međutim, pošto je polazni materijal koji se ekstrahuje u osnovi čvrsta materija, onda ove slučajeve svrstavamo u sistem *čvrsto-tečno*.

Ekstrakcija smese čvrstih supstanci može da se izvodi na sobnoj temperaturi ili uz zagrevanje. Jednostavna ekstrakcija čvrstih supstanci sastoji se u potapanju usitnjenog prirodnog materijala

u organski rastvarač ili u vodu, na sobnoj temperaturi, sa ili bez mešanja. Nakon višečasovne ekstrakcije, ekstrakt se odvaja od nerastvornih materija filtracijom.

Pri ekstrakciji *čvrsto-tečno* uz zagrevanje, cela operacija se izvodi u balonu sa povratnim hladnjakom, uz ključanje smese određeno vreme, nakon čega se ekstrakt odvoji od nerastvornih materija filtracijom.

U cilju potpunog izdvajanja željenog proizvoda obično nije dovoljna jednokratna ekstrakcija, već je pomenutu operaciju potrebno ponoviti više puta (*višestruka ekstrakcija*). Višestruka ekstrakcija se može izvoditi *diskontinualno* (jednostavnim ponavljanjem gore pomenutih operacija) ili *kontinualno*, u aparaturnama specijalno konstruisanim za ovu namenu. Najpoznatija aparaturna za kontinualnu ekstrakciju čvrstih materija je *ekstraktor po Soksletu (Soxhlet, Slika 1.1)*.



Slika 1.1. Aparatura za kontinualnu ekstrakciju po Soksletu.

Ekstrakcija pomoću Sokslet-ovog aparata izvodi se tako što se polazni materijal stavi u čauru za ekstrakciju (u nedostatku originalne čaure koristi se vrećica od filter hartije), koja se stavi u telo ekstraktora (B), a ekstrakciono sredstvo (rastvarač) se stavi u balon (A). Balon se zagreva u vodenom kupatilu ili pomoću termostatirane grejne obloge, pri čemu rastvarač iz balona (A) isparava, a njegove pare prolaze kroz cev (D) i kondenzuju u hladnjaku (C). Kondenzat kaplje na čauru, natapa je i sakuplja u telu ekstrakatora (B) sve dok nivo tečnosti ne stigne na prevojnu tačku prelivne cevčice (E), pri čemu usled zakona o spojenim sudovima sifonira u balon noseći ekstrahovane rastvorene supstance. Tokom daljeg zagrevanja iz balona (A) isparava samo

rastvarač. Proces punjenja i pražnjenja čaure kondenzatom ponavlja se naizmenično, sve vreme dok rastvarač u balonu (A) ključa.

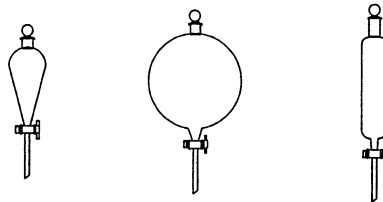
Kraj ekstrakcije se utvrđuje tako što se uzorak od nekoliko kapi tečnosti iz tela ekstraktora (pre sifoniranja) ispari na sahatnom staklu u struji toplog vazduha. Ukoliko se nakon isparavanja ekstrakcionog sredstva ne može registrovati suvi, odnosno uljasti ostatak, ekstrakcija se prekida.

### 1.1.2. Ekstrakcija tečno-tečno

U ovom slučaju razlikujemo *tečnost koju ekstrahujemo* i *tečno ekstrakciono sredstvo*. Pojam *tečnost koju ekstrahujemo* obuhvata, pored rastvora čvrstih i tečnih supstanci, disperzne sisteme tečne konzistencije, kao što su smese čvrstih supstanci u tečnosti (suspenzije) i sistemi dve tečnosti koje se ne mešaju (emulzije).

Ekstrakcija *tečno-tečno* može se izvoditi *diskontinualno* ili *kontinualno*.

Diskontinualna ekstrakcija se obično primenjuje za vodene rastvore ili suspenzije, pri čemu se koriste levkovi za odvajanje koji mogu biti različitog oblika (Slika 1.2).



Slika 1.2. Različiti oblici levkova za odvajanje.

Ekstrakcija supstanci iz vodenih rastvora ili suspenzija izvodi se pogodnim organskim rastvaračima koji se ne mešaju sa vodom (dietil-etar, hloroform, metilen-hlorid, etil-acetat, benzen i dr.).

Pre početka ove operacije levak za odvajanje se stavi u prsten odgovarajuće veličine koji je pričvršćen za stativ. U levak se prvo sipa rastvor odnosno suspenzija za ekstrakciju (1/2

zapremine levka), a zatim se doda ekstrakciono sredstvo (1/4 zapremine levka). Levak se zatvori originalnim staklenim čepom, prihvati se u ruke tako što se palcem desne ruke pridržava čep, dok se slavina pridržava prstima leve ruke, vodeći računa da izlivna cev bude okrenuta na gore, pa se u tom položaju blago mućka. U početku se mućkanje vrši oprezno, uz povremeno otvaranje slavine, sve dok se parcijalni pritisci i naponi pare tečnosti ne izjednače. Kada se pritisci izjednače, levak se dalje snažno mućka u toku 2–3 minuta, a zatim se (zatvoren) ostavi da miruje u ležištu prstena, pri čemu se odvajaju slojevi tečnosti različitih gustina.

Ako je donji sloj tečnost koju ekstrahujemo (najčešće vodeni rastvor), ona se ispušta kroz izlivnu cev, a gornji (organski) sloj se uvek izliva kroz gornji otvor levka. Donji sloj se vrati ponovo u levak i ekstrakcija se ponovi sa svežim ekstrakcionim sredstvom. Postupak ekstrakcije se ponavlja najmanje 2–3 puta. Ovo je slučaj kada se, na primer, vodeni rastvor (suspencija) ekstrahuje dietil-etrom.

Međutim, u slučaju kada se ekstrakcija izvodi sa rastvaračem koji ima veću gustinu od rastvora iz koga se ekstrahuje supstanca, tada će ekstrakt biti donji sloj, koji se ispušta kroz donju izlivnu cev dok će se gornji sloj zadržati u levku za odvajanje. Nakon dodatka svežeg ekstrakcionog sredstva, ekstrakcija se ponavlja. Ovo je primer kada se vodeni rastvor (suspencija) ekstrahuje hloroformom.

Ponekad se dešava da rastvor supstance nakon ekstrakcije (ekstrakt) predstavlja donji sloj iako bi se, na osnovu specifične težine rastvarača, očekivalo da bude u gornjem sloju. Razlog ovome je povećana specifična težina rastvora u odnosu na čist rastvarač, zbog velike koncentracije rastvorenih supstanci. Pošto se ovakva promena teško vizuelno uočava, najsigurnije je izvršiti test tako što se mala proba (oko 1 ml) iz gornjeg sloja prebaci u epruvetu sa vodom (1 ml). Ako se nakon toga u epruveti nagradi emulzija, praćena odvajanjem slojeva, gornji sloj predstavlja ekstrakt, a ukoliko se tečnosti u epruveti mešaju, gornji sloj je vodeni rastvor koji ekstrahujemo.

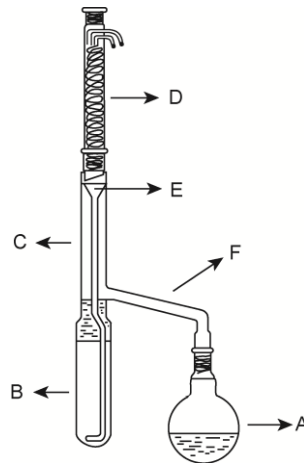
Kraj ekstrakcije se može proveriti isparavanjem male količine ekstrakta na sahatnom staklu, kao što je to već ranije opisano. Pri diskontinualnoj ekstrakciji vodenih rastvora sa organskim rastvaračima često nastaju emulzije, pri čemu ne dolazi do jasnog odvajanja slojeva. Nagrađene emulzije se mogu razbiti promenom pH sredine (dodatkom baze ili kiseline), ispljavanjem vodenog sloja (sa NaCl), dodavanjem nekoliko kapi amil-alkohola ili dužim stajanjem. Emulzija se ponekad može razbiti i blagim mešanjem sa staklenim štapićem, kao i prođuvavanjem vazduha kroz cevčicu zaronjenu do dna suda sa emulzijom.

**PAŽNJA:** Tokom ekstrakcije sa lako zapaljivim rastvaračima kao što je dietil-etar, u prostoriji i bližoj okolini ne sme biti prisutan otvoreni plamen (plamenici), ne sme se koristiti grejalica i rešo sa užarenim spiralnim žicama!

---

### 1.1.3. Kontinualna ekstrakcija tečno-tečno

Kontinualna ekstrakcija se koristi kod ekstrakcija tečnosti na povišenim temperaturama i izvodi se u *kontinualnim ekstraktorima* (Slika 1.3).

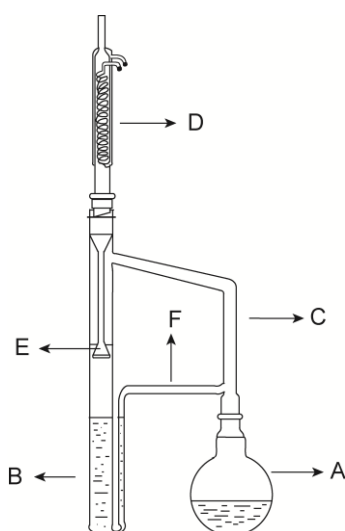


Slika 1.3. Aparatura za kontinualnu tečno-tečnu ekstrakciju sa rastvaračima lakšim od vode.

Postupak za kontinualnu ekstrakciju tečnosti se sastoji u tome što se rastvarač, tj. ekstrakciono sredstvo sipa u balon (A), a tečnost koja se ekstrahuje u posudu B, pri čemu se ona puni maksimalno do 2/3 od ukupne zapremine. Rastvarač u balonu (A) se zagreva na temperaturi ključanja, pri čemu njegove pare prolaze kroz staklenu kolenastu cev (F), dolaze do hladnjaka (D) gde se kondenzuju. Kondenzovana tečnost, preko levka (E) koji je na donjem kraju snabdeven sinterovanom pločicom, prolazi kroz rastvor koji se ekstrahuje i preko kolenaste cevi (F) se vraća u balon (A). Proces se ponavlja sve dok se ekstrakcija ne završi. Ekstrakciono sredstvo sa supstancom se nalazi u balonu (A). Kraj ekstrakcije detektuje se ispitivanjem ekstrakta u balonu (B) na sahatnom staklu, kao što je već opisano.

Prednost kontinualne ekstrakcije je u tome što se supstanca ekstrahuje sa malom količinom ekstrakcionog sredstva.

Aparatura prikazna na Slici 1.3. primenjuje se za kontinualnu ekstrakciju sa rastvaračima lakšim od vode. Balon (A) sadrži organski rastvarač dok telo ekstraktora (B) sadrži rastvor koji se ekstrahuje i nešto organskog rastvarača. Pri zagrevanju balona (A) pare rastvarača, preko kolenaste cevi (C), dolaze u hladnjak (D) kondenzuju se i preko sinterovane pločice (E) raspršuju se u vodeni rastvor iz kojeg, krećući se na niže, ekstrahuju rastvorene supstance. Kada se dostigne prelivni nivo (F) deo ekstrakta presifonira u balon (A).



Slika 1.4. Aparatura za kontinualnu tečno-tečnu ekstrakciju sa rastvaračima težim od vode.

Kada se za ekstrakciju tečnosti koriste rastvarači teži od vode, aparatura za ekstrakciju je nešto izmenjena (Slika 1.4). U balon (A) se sipa organski rastvarač (npr.  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  ili  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), dok se u telo ekstraktora (B) doda vodeni rastvor koji se ekstrahuje zajedno sa malom količinom organskog rastvarača. Pri zagrevanju balona, pare rastvarača preko kolenaste cevi (C) stižu u hladnjak (D) gde se kondenzuju. Kondenzat se preko sinterovane pločice (E) raspršuje u sitne kapljice koje prolaze kroz vodeni rastvor i vrše ekstrakciju. Kada visina donjeg (organskog) sloja dostigne prelivni nivo (F), deo organskog rastvora (ekstrakta) presifonira u balon. Ciklus se ponavlja više puta, a na kraju ekstrakcije najveći deo lipofilnih organskih supstanci iz vodenog rastvora prelazi u organski rastvarač, tj. u balon (A).

## 1.2. Pripremanje apsolutnog dietil-etra

### PRIBOR:

1. Levak za odvajanje (500 ml)
2. Erlenmajeri (2 x 500 ml)
3. Levak
4. Filter hartija
5. Aparatura za destilaciju

---

**PAŽNJA:** Posuđe koje se koristi za sušenje i destilaciju dietil-etra mora biti potpuno suvo!

---

### REAGENSI:

1. Dietil-etar (komercijalni)
2. Gvožđe (II)-sulfat
3. Zasićen rastvor kalcijum-hlorida
4. Anhidrovani kalcijum-hlorid

### POSTUPAK:

Dietil-etar (300 ml) i zasićeni vodeni rastvor gvožđe(II)-sulfata (15 ml) blago se mučkaju u levku za odvajanje a potom se slojevi odvoje. Ovim postupkom se uklanjaju peroksidi na čije prisustvo ukazuje promena boje vodenog rastvora (iz zelene u žutu). Postupak se ponavlja sve dok rastvor soli ne prestane da menja boju. Dietil-etar se, zatim, ispira vodom, nakon čega se donji (vodeni) sloj odbaci. Potom se dietil-etarski sloj mučka sa zasićenim rastvorom  $\text{CaCl}_2$  (20 ml), pri čemu se uklanjaju tragovi alkohola. Dietil-etarski sloj se odvoji, prenese u suv erlenmajer i suši anhidrovanim  $\text{CaCl}_2$  (150 g). Nakon nekoliko dana, dietil-etar se procedi preko običnog levka i destiluje ( $t_k = 34,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Nakon destilacije dietil-etar se čuva iznad metalnog natrijuma.

---

**PAŽNJA:** Za vreme prečišćavanja i destilacije dietil-etra, u prostoriji i bližoj okolini ne sme biti prisutan otvoreni plamen (plamenici), niti koristiti grejalice i rešoi.

---



### **1.3. Hromatografija na tankom sloju**

Hromatografija je zajednički naziv za metode pomoću kojih se razdvajaju smese jedinjenja, a koje se zasnivaju na specifičnim sposobnostima adsorpcije pojedinih komponenata na čvrstim nosačima, kao što su silika-gel, aluminijum-oksidi, škrob, celuloza i drugo.

Hromatografija na tankom sloju je veoma jednostavna i pogodna metoda kojom se smese, bilo u mikro ili semi-preparativnim količinama, brzo razdvajaju na osnovne komponente. Ova metoda se široko primenjuje i za brzo praćenje toka reakcija, pri čemu se dobijaju informacije o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu ispitivanih smesa.

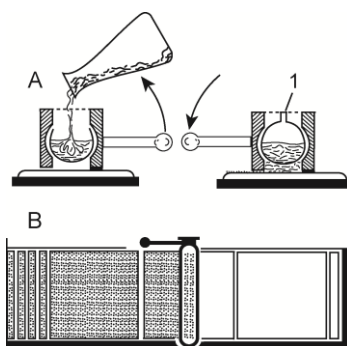
Metoda se sastoji u tome da se staklena ploča prekrije tankim slojem adsorbensa, na primer aluminijum-oksida ili silika-gela, koji sadrži vezivno sredstvo (obično gips). Sloj adsorbensa se aktivira sušenjem, a zatim se na ploču 1,5 cm od donje i 1 cm od bočne ivice nanosi rastvor smese koju treba razdvojiti. Ploča se zatim stavi uspravno u hromatografsku kadu koja sadrži rastvarač za razvijanje hromatograma. Rastvarač se brzo penje duž tankog sloja dejstvom kapilarnih sila, pri čemu pokreće sastojke smese različitim brzinama, zavisno od njihovog afiniteta prema adsorbensu, odnosno mobilnoj fazi (sistemu za razvijanje). Supstance koje se jače vezuju za adsorbens putuju sporije, dok supstance koje se bolje rastvaraju u tečnoj fazi putuju brže. Razdvojene komponente, ukoliko nisu obojene, čine se vidljivim prskanjem sa odgovarajućim hromogenim reagensom. Alternativno, hromatogram se može detektovati i pod svetlošću UV lampe, ukoliko supstance koje se razdvajaju sadrže hromoforne grupe. Pored pomenutih načina detekcije, ploče se mogu prskati razblaženom sumpornom kiselinom (1:1) uz naknadno zagrevanje, pri čemu se razdvojene komponente pojavljuju na hromatogramu kao ugljenisane ili tamno obojene mrlje.

#### **1.3.1. Opšta uputstva za izvođenje hromatografije na tankom sloju (TLC)**

##### **Pripremanje ploča**

Staklene ploče pre nanošenja adsorbensa moraju biti besprekorno čiste. U tom cilju ploče se prvo peru mekom četkom pod mlazom vode, ostave u hrom-šumpornoj kiselini 3-4 časa, a potom dobro isperu vodom, destilovanom vodom i osuše.

Tanki sloj adsorbensa najlakše se nanosi na staklene ploče pomoću specijalno konstruisanog aplikatora (Slika 1.5). Danas postoje aplikatori različite konstrukcije, ali svima im je zajedničko da imaju ravnu podlogu za poravnavanje staklenih ploča i klizni razastirač za nanošenje kašaste suspenzije adsorbensa u obliku tankog sloja.

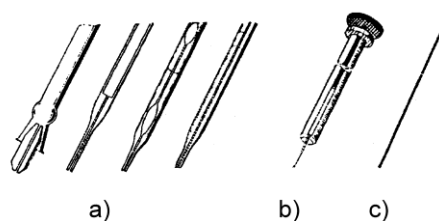


Slika 1.5. Pripremanje ploča za TLC pomoću aplikatora.

Pet staklenih ploča (20 × 20 cm) postavljaju se na podlogu, vodeći računa da čvrsto prijanjaju jedna uz drugu. Suspenzija silika-gela (40 g u 55–60 ml destilovane vode) snažno se mučka u zatvorenom erlenmajeru tokom 20–30 sekundi i izlije u klizni razastirač; ovaj se ravnomerno pomera iznad ploča duž metalnih ivičnih nosača razastirajući suspenziju adsorbensa u tankom sloju na ploče. Posle kraćeg vremena, potrebnog za inicijalno očvršćavanje sloja adsorbensa, ploče se odvajaju pomoću tanke špatule, smiču se sa podloge aplikatora i stavljaju u policu za sušenje. Nakon sušenja na vazduhu i sobnoj temperaturi u toku 2 časa, ploče se aktiviraju u sušnici na temperaturi od 120–160 °C u toku 1 h. Nakon sušenja, policica sa aktiviranim pločama se čuva u eksikatoru do upotrebe. U nedostatku aplikatora, nanošenje tankog sloja adsorbensa se može izvesti na sledeći način: odgovarajuća količina kašaste suspenzije adsorbensa izliva se na ploče pojedinačno i raspoređuje pažljivim, ravnomernim ručnim pomeranjem ploče. Nakon sušenja na vazduhu i aktiviranja u sušnici, ploča je pripremljena za upotrebu.

### **Nanošenje uzorka**

Duž paralelnih ivica ploče, vrhom zašiljene olovke tačkasto se označe startne pozicije na rastojanju od 2,5 cm od donje ivice. Duž zamišljene startne linije, 2,5 cm od bočnih ivica i na međusobnom rastojanju od najmanje 2 cm, nanose se rastvori uzoraka za hromatografiju. Uzorci se nanose pomoću mikropipete, šprica ili staklene kapilare (Slika 1.6).



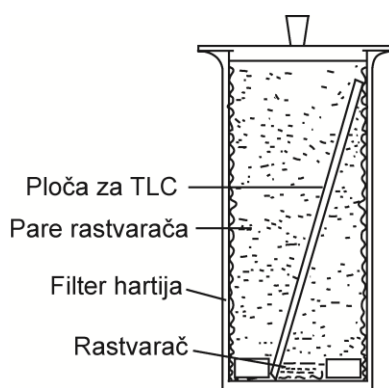
Slika 1.6. Pribor za nanošenje uzoraka na TLC: (a) mikropirete, (b) špric, (c) staklena kapilara.

Startne mrlje bi trebalo da budu prečnika od oko 2–3 mm. Na 1 cm od gornjeg dela ploče obeleže se ivice, na isti način kao i startna linija. To je rastojanje do koga treba da putuje rastvarač.

### Razvijanje hromatograma

U staklenu kadu (22 × 22 × 7,5 cm) se sipa razvijač za hromatografiju (100 ml), a uz šire unutrašnje zidove komore se stavi filter hartija (18 × 18 cm) natopljen razvijačem, koja se drži uz zidove površinskim naponom i ubrzava zasićenje vazduha u kadi parama rastvarača. Pripremljena hromatografska ploča se stavi u komoru uspravno, oslanjajući se na jednu stranu (Slika 1.7).

Kada razvijač pređe put od 10 cm (15–25 minuta), skine se poklopac sa komore, izvadi ploča i ostavi da se osuši na vazduhu.



Slika 1.7. Razvijanje hromatograma.

### **Izazivanje hromatograma**

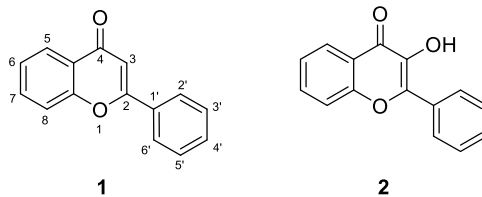
Ukoliko se hromatogram izaziva hromatogenim reagensima ili sumpornom kiselinom, ploče se prskaju pomoću staklene prskalice, snabdevene gumenom vazdušnom pumpicom. Hromatogram se obavezno prska u digestoru, jer se formiraju aerosoli koji su štetni po zdravlje. Način izazivanja boje nakon prskanja hromatograma razlikuje se od slučaja do slučaja, mada se to najčešće postiže zagrevanjem isprskane ploče, na temperaturi koja zavisi od vrste reagensa. Na primer, kod upotrebe razblažene sumporne kiseline (1:1) isprskane ploče se zagrevaju u sušnici na 110 °C.

## 2. ACETOGENINI

Acetogenini biogenetski nastaju iz poliketo-metilenskih prekursora, ili iz poliketo nizova koji se kombinuju sa fenilpropanima. Značajnu grupu acetogenina heterociklične strukture sa kiseonikom kao heteroatomom čine *flavonoidi* i *antocijani*. To su biljni pigmenti koji se nalaze u cvetnim delovima biljaka, kao i u plodovima voća.

### 2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su žuti pigmenti koji se u biljnom svetu javljaju u slobodnom stanju ili kao glikozidi. Jedinjenja ove grupe sadrže *hromonov* sistem prstenova. Strukturne varijacije u heterocikličnom prstenu hromonovog sistema, naime prisustvo ili odsustvo  $\Delta^{2,3}$  dvostruke veze i hidroksilne grupe na C-3, od znatnog su uticaja na osobine flavonoida. Tako na primer, boja ovih jedinjenja zavisi od prisustva odnosno odsustva hidroksilne grupe na C-3: Flavon (**1**) je bezbojan a flavonol (**2**) je žute boje (Šema 2.1).

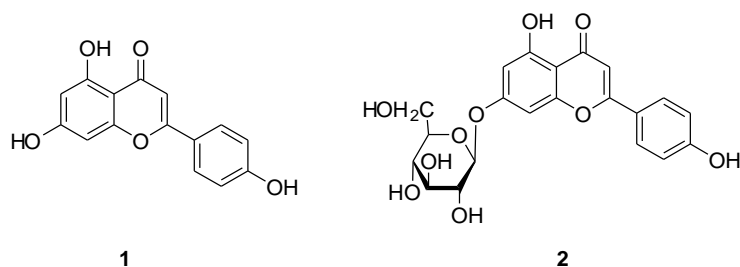


Šema 2.1. Strukture flavona (**1**) i flavonola (**2**).

#### 2.1.1. Izolovanje apigenina i apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozida iz jezičastih delova cveta kamilice

Cvet kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) sadrži veliki broj biološki aktivnih komponenti. Pored isparljivih sastojaka (lipofilne komponente) koje imaju izraženo antiseptičko i antiflogističko delovanje, cvet kamilice sadrži i neisparljive komponente (hidrofilne komponente) koje imaju spazmolitičko delovanje. Od neisparljivih sastojaka kamilice od značaja su flavonski derivati, od kojih su najvažniji apigenin i apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, čije su strukture prikazane na

Šemi 2.2. Apigenin i njegov glukozid nisu nađeni u tubularnim delovima cveta kamilice, dok je njegovo prisustvo u jezičastim delovima cveta značajno. Ispitivanja su pokazala da apigenin pokazuje 7–9 puta jače spazmolitičko delovanje u poređenju sa svojim glukozidom.



Šema 2.2. Strukture apigenina (1) i njegovog 7-O-β-D-glukopiranozida (2).

#### PRINCIP RADA:

Ekstrakcija flavonoida iz biljnog materijala izvodi se pomoću razblaženog etanola, a prisustvo apigenina i apigenin-7-O-β-D-glukopiranozida u jezičastim delovima cveta kamilice dokazuje se hromatografijom na tankom sloju silika-gela GF<sub>254</sub>. Staklene pločice (7,5 × 2,5 cm) sa slojem silika-gela (0,1–0,2 mm) aktiviraju se na 120 °C u toku 30 minuta.

#### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (2 × 20 ml)
2. Levak za filtraciju
3. Filter hartija
4. Stativ sa klemom
5. Magnetna mešalica sa jezgrom (0,5 cm)

**IZVOR FLAVONOIDA:** Samlevena, na vazduhu osušena droga,\* prosejana kroz sito veličine otvora 0,5 mm

#### REAGENSI:

1. Etanol
2. Etil-acetat
3. Metanol

---

\* Termin droga, u najširem smislu, označava osušen i usitnjen biljni materijal.

4. Sumporna kiselina (1:1)
5. Silika-gel 60 F<sub>254</sub>, TLC-aluminijumske pločice (ili staklene TLC pločice)
6. Gvožđe(III)-hlorid

#### **POSTUPAK:**

U balon sa okruglim dnom (20 ml) stavi se odmerena količina osušene droge (0,03–0,04 g) i doda se 70% etanol (10 ml). Suspenzija se energično meša na sobnoj temperaturi u toku 1 h, a zatim ekstrakt odvoji od droge filtracijom preko kvantitativne filter hartije. Rastvarač se udalji na rotacionom vakuum uparivaču pod smanjenim pritiskom. Merenjem mase zaostalog ulja odredi se prinos (%) sirovog ekstrakta u odnosu na polaznu drogu. Ostatak se rastvori u minimalnoj zapremini etanola (0,5 ml) i nanese na aluminijumsku pločicu (ili staklenu) prevučenu slojem silika-gela. Pored startne mrlje ispitivanog uzorka nanose se rastvori standardnih uzoraka ispitivanih flavona (rastvori apigenina i apigenin-7-*O*-β-*D*-glukopiranozida). Radi identifikacije apigenina, flavoni se razdvajaju hromatografski u sistemu rastvarača etil-acetat/MeOH 1:1 (ili benzen-etilmetilketon-metanol (5,5:3:1,5)). Po završenom razvijanju hromatograma (front rastvarača treba da bude udaljen 2 mm od vrha pločice), hromatogram se suši na vazduhu ili fenom. Posmatranjem hromatograma pod UV lampom ( $\lambda=254$  nm) identifikuju se i oviče mrlje apigenina, odnosno apigenin-7-*O*-β-*D*-glukopiranozida. Na osnovu rastojanja središta ovičenih mrlja od startne pozicije ( $I_a$ ) i rastojanja fronta razvijaača i startne pozicije ( $I_r$ ) odredi se  $R_f$  vrednost za apigenin [ $R_{f(a)}$ ], odnosno za apigenin-7-*O*-β-*D*-glukozid [ $R_{f(a.g.)}$ ]. Posle izazivanja hromatograma sumpornom kiselinom (1:1) pojavljuju se žute mrlje pojedinih flavonoida.

### **2.1.2. Izolovanje flavonoidnih pigmenata hromatografskim metodama**

#### **PRINCIP RADA:**

Preparativno izolovanje apigenina i apigenin-7-*O*-β-*D*-glukopiranozida iz jezičastih delova cveta kamilice izvodi se u tri faze:

1. Dobijanje sirovog ekstrakta droge
2. Oslobođanje flavonoidnih pigmenata pratećih komponenti hromatografijom na koloni
3. Razdvajanje flavonoidnih pigmenata preparativnom tankoslojnom hromatografijom.

**PRIBOR:**

1. Baloni sa okruglim dnom (1 × 250 ml; 2 × 50 ml)
2. Kolona za hromatografiju dužine 15–20 cm, prečnika 1,5 cm
3. Sinterovani levak B4
4. Staklene ploče za preparativnu hromatografiju (20 × 20 cm; 5 kom.)
5. Čaše (2 × 25 ml)

**IZVOR PIGMENATA:** Jezičasti delovi cveta kamilice

**REAGENSI:**

1. Etanol
2. MN Poliamid SC6 za hromatografiju na koloni
3. Kieselgel 60 GF<sub>254</sub>
4. Natrijum-hlorid
5. Benzen
6. Metanol

**POSTUPAK:**

**Dobijanje sirovog ekstrakta kamilice:**

U balon sa okruglim dnom (250 ml) izmeri se osušena droga (5 g) i doda se 70% etanol (100 ml). Suspenzija se energično meša u toku 2 časa, a zatim se ekstrakt odvoji od droge filtracijom preko kvalitativne filter hartije. Postupak se ponovi, a sirovi ekstrakti spoje i upare na rotacionom vakuum uparivaču.

**Hromatografija na koloni MN-Poliamid SC6:**

Vodena suspenzija adsorbensa (MN Poliamid SC6 za hromatografiju na koloni; 8 g) sipa se u kolonu i nakon sleganja adsorbensa nanese se rastvor uzorka koji je pripremljen na sledeći način: na upareni sirovi ekstrakt doda se 10% vodeni rastvor NaCl (20 ml) i rezultujuća smesa se zagreva na temperaturi ključanja u toku 2 minuta. Žuti rastvor se odlije u čašu a čvrst ostatak se ponovo tretira sa 10% rastvorom NaCl (10 ml). Spojeni ekstrakti se nanesu na kolonu. Kolona se prvo eluira destilovanom vodom (2 × 25 ml), a zatim 95% EtOH koji se dodaje u porcijama od po 10 ml. Svetlo-žuto obojene frakcije koje sadrže flavonoidne pigmente upare se na rotacionom vakuum uparivaču.

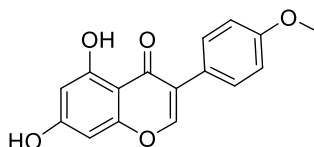


### Razdvajanje flavonoidnih pigmenata preparativnom tankoslojnom hromatografijom

Uparene etanolne frakcije sa kolone rastvore se u etanolu (1 ml) i nanesu se na preparativne ploče silika-gela GF<sub>254</sub> (5 kom) poprečno, u vidu tanke trake. Na 1 cm od ivice ploče nanose se standardni rastvori apigenina i apigenin-7-O-β-D-glukozida u obliku tačaka koje se suše fenom. Hromatogram se dva puta uzastopno razvije u sistemu benzen-metanol (4:1). Ploče se osuše fenom, a zatim se pod UV lampom obeleže zone koje imaju iste R<sub>f</sub> vrednosti kao standardi. Zone koje sadrže čiste komponente pažljivo se sastružu u čaše, a zatim se adsorbovani flavonoidi ekstrahuju energičnim mešanjem se metanolom (2 × 20 ml). Suspenzija se filtrira kroz guč B-4, filtrat upari, a ostatak tretira metilen-hloridom (2 × 5 ml) i ponovo filtracijom odvoje nerastvorene neorganske materije. Bistri filtrat se upari pri čemu zaostaje čist flavonoid, koji se osuši u vakuum sušnici i izmeri.

#### 2.1.3. Izolovanje biohanina A iz dijetetskog proizvoda *Oestrofact E*

Fitoestrogen biohanin A je *O*-metilovani apigenin (Šema 2.3). Ovaj izoflavon se izoluje iz crvene deteline (*Trifolium pretense*) i dokazano je da ima selektivnu estrogenu aktivnost ali slabiju od dejstva prirodnih i sintetskih estrogena.



Biohanin A

Šema 2.3.

Strukturna sličnost između fitoestrogena i prirodnih estrogena omogućava ovim molekulima da blago mimikiraju dejstvo estrogena, a ponekad deluju kao antagonisti prirodnih estrogena. Kakvo će dejstvo ispoljiti na organizam zavisi od količine estrogena koje proizvodi sam organizam i koliko se estrogena već nalazi vezano za ćelijske receptore. Kada je nivo prirodnih estrogena u organizmu nizak, ispoljavaće se estrogena aktivnost fitoestrogena nakon njihovog vezivanja za slobodne receptore. U suprotnom, kada su nivoi prirodnih estrogena u organizmu

visoki, fitoestrogeni se takmiče sa endogenim estrogenima za iste receptore i vezivanjem za njih ispoljavaju slabiji efekat od onog koji bi inače ostvarili endogeni estrogeni. Ovako se u organizmu pomoću fitoestrogena koriguje aktivnost endogenih estrogena. Dijetetski preparat biljnog porekla koji ima visok sadržaj fitoestrogena u preparatu može pomoći ženama u prelaznom dobu, pomažući u regulaciji poremećene hormonske ravnoteže.

**PRINCIP RADA:**

Ekstrakcija flavonoida iz farmaceutskog proizvoda *Oestrofact E* koji sadrži 40% suvog ekstrakta cveta crvene deteline izvodi se pomoću smese etil-acetat/izopropanol 7:3, a prisustvo biohanina A dokazuje se hromatografijom na tankom sloju silika-gela GF<sub>254</sub>.

**PRIBOR:**

1. Balon sa okruglim dnom (25 ml)
2. Kolona prečnika 1 cm za filtraciju preko celitnog stuba
3. Stativ sa klemom
4. Magnetna mešalica sa jezgrom (0,5 cm)

**IZVOR FLAVONOIDA:** Tri kapsule farmaceutskog preparata *Oestrofact E*

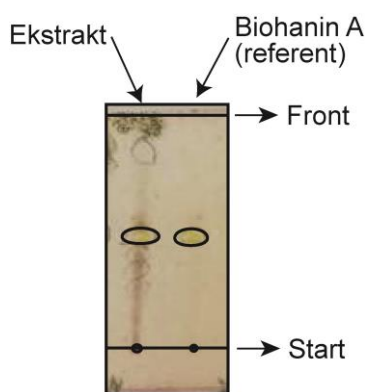
**REAGENSI:**

1. Izopropanol
2. Etil-acetat
3. Metilen-hlorid
4. Sumporna kiselina (1:1)
5. Silika-gel 60 F<sub>254</sub>, TLC-aluminijumske pločice (ili staklene TLC pločice)
6. Celit
7. Standardni uzorak biohanina A
8. Hloroform

**POSTUPAK:**

U balon sa okruglim dnom (25 ml) stavi se odmerena količina sastojka tri kapsule preparata *Oestrofact E* (0,89–0,90 g) i doda se smesa etil-acetat/izopropanol 7:3 (10 ml). Suspenzija se energično meša na sobnoj temperaturi u toku 1 h, a zatim ekstrakt odvoji od nerastvornog dela ceđenjem kroz kolonu koja sadrži suspenziju celita u metilen-hloridu (visina 1,5 cm nakon sleganja). Rastvarač se udalji na rotacionom vakuum uparivaču pod smanjenim pritiskom.

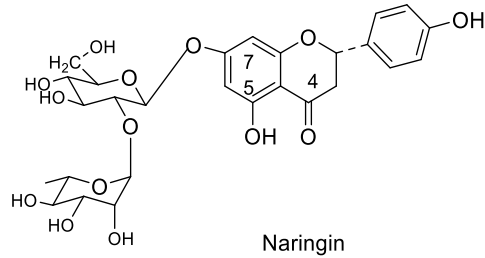
Merenjem mase zaostalog ulja odredi se prinos (%) sirovog ekstrakta u odnosu na polaznu drogu. Ostatak se rastvori u minimalnoj zapremini metilen-hlorida (0,5 ml) i nanese na aluminijumsku pločicu (ili staklenu) prevučenu slojem silika-gela. Pored startne mrlje ispitivanog uzorka nanosi se rastvor standardog uzorka biohanina A. Radi identifikacije biohanina A, komponente ekstrakta se hromatografski razdvajaju u sistemu rastvarača  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  12:1 ili  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5:1. Po završenom razvijanju hromatograma (front rastvarača treba da bude udaljen 2 mm od vrha pločice), hromatogram se suši na vazduhu ili fenom. Posmatranjem hromatograma pod UV lampom ( $\lambda=254$  nm) identifikuje se, a zatim oiviči mrlja biohanina A i odredi joj se  $R_f$  vrednost. Posle izazivanja hromatograma sumpornom kiselinom (1:1) pojavljuju se žute mrlje pojedinih flavonoida (Slika 2.1).



Slika 2.1.

#### **2.1.4. Izolovanje naringina iz kore grejpfruta**

Suđerasti unutrašnji deo grejpfruta se uglavnom sastoji od celuloze, ugljenih hidrata, flavonoida, amino-kiselina i vitamina. Prisutni flavonoid se naziva naringin (Šema 2.4) i odgovoran je za gorak ukus. U sok od grejpfruta se dodaje hidrolitički enzim naringinaza koji hidrolizuje naringin do aglikona naringenina koji nije gorak.



Šema 2.4.

### PRINCIP RADA:

Naringin se ekstrahuje vrelom vodom iz kore grejpfurta zajedno sa malom količinom pektina. Rekrystalizacijom iz izopropanola se dobija čist naringin dihidrat.

### PRIBOR:

1. Čaše (2 × 400 ml)
2. Balon sa okruglim dnom (2 × 250 ml)
3. Bihnerov levak
4. Silika-gel 60 F<sub>254</sub>, TLC-aluminijumske pločice (ili staklene TLC pločice)

**IZVOR PIGMENATA:** Kora grejpfruta

### REAGENSI:

1. Celit
2. Izopropanol
3. Sumporna kiselina (1:1)
4. Standardni uzorak biohanina A
5. Celit

### POSTUPAK:

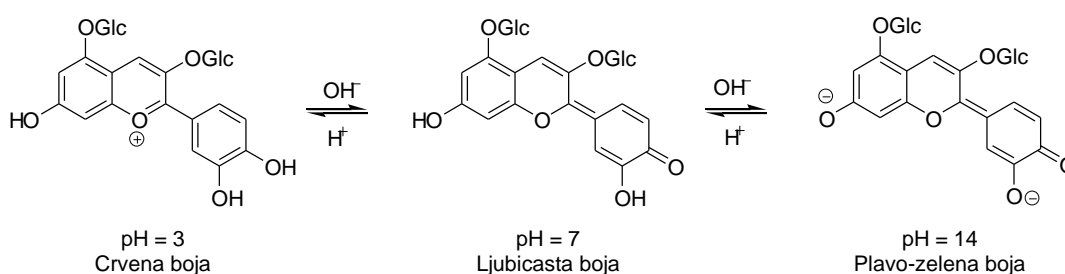
Usitnjena kora grejpfruta se stavi u čašu, prelije sa 4 dela vode i zagreva na 90 °C u toku 5 minuta. Vodeni ekstrakt se odvoji filtracijom i filtrat sačuva. Dva dela vode se dodaju na čvrsti ostatak i ekstrakcija ponovi na 80 °C i odmah filtrira. Kombinovani ekstrakti se prokuvaju sa 1% celitom, procede preko filter hartije i upare na 1/9 originalne zapremine i sve ostavi u frižideru da kristališe kao oktahidrat (tt 83 °C, igle). Kristali se rastvore u 100 ml ključalog izopropanola i rastvor se vreo filtrira. Filtrat se potom zagreje do tačke ključanja da bi se inicirala kristalizacija, potom se ohladi, filtrira preko Bihnerovog levka i ispere sa hladnim izopropanolom. Dobija se

naringin dihidrat (171 °C, igle). Naringin se takođe može rekristalisati iz male količine ključale vode. Nekoliko kristala naringenina se rastvori u izopropanolu (može i pre kristalizacije) i nanese na aluminijsku ili staklenu TLC pločicu. Nakon razvijanja hromatograma u sistemu razvijачa hloroform/MeOH 3:1, posmatranjem hromatograma pod UV lampom ( $\lambda=254$  nm) uočava se UV aktivna mrlja, koja se nakon izazivanja sa  $H_2SO_4$  (1:1) boji u žuto a potiče od izolovanog naringenina.

## 2.2. Antocijani

Antocijani se takođe javljaju u prirodi kao glikozidi a njihovom hidrolizom se dobijaju obojeni aglikoni *antocijanidini*. Nalaze se u cvetnim delovima biljaka i u plodovima voća, gde čine spektar boja u intervalu *crveno-ljubičasto-plavo*. Ovu raznolikost boja u biljkama prvi su objasnili Willstätter i saradnici. Ona se javlja kao posledica različite pH vrednosti sredine i koncentracije mineralnih soli u ćelijskoj tečnosti biljnog tkiva, što je i eksperimentalno dokazano.

Po hemijskom sastavu antocijani su supstitujsani derivati antocijanidina benzopirilijum strukture. Prisustvo benzopirilijum strukture u molekulu antocijana uslovljava njihovo amfoterno ponašanje. Drugim rečima, struktura, pa i boja antocijana zavise od pH sredine (Šema 2.5).



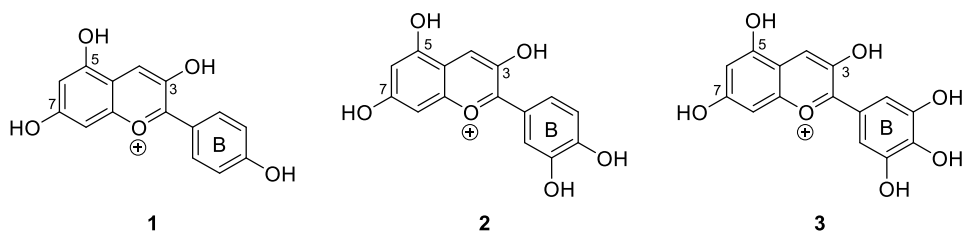
Šema 2.5. Promena strukture i boje antocijana u zavisnosti od pH.

Iz Šeme 2.5. se vidi da jedinjenja hinoidne strukture pokazuju ljubičastu boju; struktura oksonijum jona je prisutna pri pH 3 i pokazuje crvenu boju; plava boja na pH 11 može se pripisati jonizaciji hidroksilne grupe na hinoidnom prstenu.

Prirodni antocijanidini se mogu klasifikovati u tri grupe:

1. Pelargonidini (1)
2. Cijanidini (2)
3. Delfinidini (3)

Zajednička karakteristika svih antocijanidina je da obavezno sadrže hidroksilne grupe u položajima C-3, C-5 i C-7, a njihove međusobne razlike uslovljava broj i položaj hidroksi- ili metoksi- grupa u 2-fenil prstenu (B) (Šema 2.6).



Šema 2.6. Strukture pelargonidina (1), cijanidina (2) i delfinidina (3).

### 2.2.1. Promena boje antocijana u zavisnosti od pH sredine

#### PRINCIP RADA:

Antocijani se iz plodova voća ekstrahuju vodom. Dodavanjem fosfatnih pufera u vodeni rastvor antocijana menja se pH vrednost, a samim tim i boja rastvora.

#### PRIBOR:

1. Čaša (250 ml)
2. Menzura (100 ml)
3. Stakleni levak
4. Filter hartija
5. Stalak za epruvete
6. Epruvete (18 komada; obeležene brojevima 1–18)
7. Pipete graduisane (5 × 1 ml; 5 × 5 ml; 5 × 10 ml)
8. Univerzalna indikatorska hartija

**IZVOR ANTOCIJANA:** Plodovi maline ili jagode

#### REAGENSI:

1. Dinatrijum-fosfat (0,15 M)
2. Hlorovodonična kiselina (0,1 M)
3. Kalijum-monofosfat (0,15 M)

4. Kalijum-trifosfat (0,15 M)
5. Natrijum-hidroksid (10%)
6. Gvožđe(III)-hlorid
7. Metanol

#### POSTUPAK:

Plodovi maline (15 g) preliju se vodom (100 ml) i sadržaj zagreva uz blago ključanje u toku 15 minuta, pri čemu se ekstrahuju biljni pigmenti. Smesa se filtruje preko nabrane filter hartije u menzuru, a zatim se zapremina ekstrakta dovede do 100 ml. Iz ovako pripremljenog ekstrakta u obeležene epruvete se odmeri, pomoću pipete, po 2 ml rastvora, a zatim se u epruvete pojedinačno dodaju odgovarajući puferski rastvori pripremljeni kao što je prikazano u Tabeli 2.1.

Iz Tabele 2.1. vidi se da pH vrednost varira u intervalu od 2,1–14,0, što uslovljava promenu boje antocijana u epruvetama 1–18. Pri tome se crvena boja javlja u epruvetama 1–9, u kojima se pH kreće od 2,1–6,8, što ukazuje da se u pomenutim epruvetama antocijani javljaju u obliku katjona. Epruveta 10 sa pH 7 pokazuje ljubičastu boju, koja je karakteristična za osnovnu boju antocijana. Plavo-zelenu boju pokazuje epruveta 18, u kojoj je pH 14, koja je karakteristična za antocijane u anjonskom obliku.

Tabela 2.1.

Broj epruvete	0,1 M HCl (ml)	0,15 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)	0,15 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	0,15 M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (ml)	10% NaOH (ml)	pH
1	9,5	0,5	-	-	-	2,1
2	0,5	9,5	-	-	-	3,6
3	-	10,0	-	-	-	4,7
4	-	9,5	0,5	-	-	5,6
5	-	9,0	1,0	-	-	5,9
6	-	8,0	2,0	-	-	6,2
7	-	7,0	3,0	-	-	6,5
8	-	6,0	4,0	-	-	6,6
9	-	5,0	5,0	-	-	6,8
10	-	4,0	6,0	-	-	7,0
11	-	3,0	7,0	-	-	7,2
12	-	2,0	8,0	-	-	7,4
13	-	1,0	9,0	-	-	7,7
14	-	4,5	-	5,5	-	8,0
15	-	5,0	-	5,0	-	9,8
16	-	3,0	-	7,0	-	10,7
17	-	-	3,0	7,0	-	11,2
18	-	-	-	-	10,0	14,0



### **Reverzibilna promena boje (strukture) antocijana usled promene pH**

U epruvetu broj 16, u kojoj je sredina alkalna pa su antocijani plavo-zelenu obojeni, dokapava se razblažena HCl (1:1) do pH 2–3, pri čemu se boja rastvora menja u crvenu.

### **Feri-hloridni test**

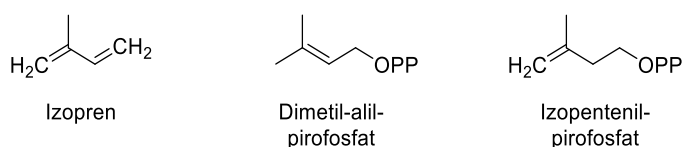
Prisustvo slobodnih fenolnih grupa kod antocijana dokazuje se bojenom reakcijom sa gvožđe(III)-hloridom.

U epruvetu sa vodenim ekstraktom maline (1–2 ml) doda se rastvor gvožđe(III)-hlorida u metanolu (1 ml). Pri tome nastaje kompleks ljubičaste boje.

### 3. IZOPRENOIDI I FENILPROPANI

Izoprenoidi obuhvataju veliku grupu prirodnih proizvoda biljnog i životinjskog porekla, sa karakterističnim empirijskim formulama, kojima je zajedničko da ukupan broj C-atoma u molekulu predstavlja celobrojan umnožak broja pet. Ova karakteristika izoprenoidnih jedinjenja dovela je do postulacije *izoprenskog pravila* (Ružička, 1938. god.), koja determiniše izoprenoidnu strukturu kao strukturu u kojoj je uvek prisutan celobrojni umnožak jedne *izoprenske jedinice* sa pet C-atoma kao što je na primer *izopren* (Šema 3.1.).

Izoprensko pravilo posledica je činjenice da u biosintezi svih izoprenoida učestvuje zajednički biosintetički prekursor – *izopentenil-pirofosfat* i *dimetil-alil-pirofosfat* koji sadrže pet C-atoma (Šema 3.1).



Šema 3.1.

Međutim, u toku biosinteze neki strukturni oblici izoprenoida (na primer *steroidi*) mogu izgubiti izvestan broj C-atoma, tako da definitivno ne odgovaraju izoprenskom pravilu. Stoga je za klasifikaciju u grupu izoprenoida bitnije postojanje zajedničkog biogenetskog prekursora nego striktno podudaranje sa izoprenskim pravilom. Izoprenoidi se mogu podeliti u dve osnovne grupe i to na *terpenoide* i *steroide*.

*Terpenoidi* su najvećim delom rasprostranjeni u biljnom svetu. Glavni izvor terpenoida su isparljiva ili *etarska ulja* (ranije su nazivana i *esencijalna ulja*). Tokom XIX veka utvrđene su strukture mnogih sastojaka etarskih ulja biljaka. Utvrđeno je da su mnogi među njima nezasićeni ugljovodonici empirijske formule C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> i dato im je ime *terpeni*, koje je izvedeno iz reči *terpentin* i *alken*. Pored ugljovodonika u etarskim uljima su nađeni i alkoholi, ketoni, kiseline i estri, pa je cela grupa označena imenom *terpenoidi*. Prema sadržaju izoprenskih jedinica terpenoidi se dele na: *mono-*, *seskvi-*, *di-*, *tri-*, *tetra-* i *politerpene*. Unutar ovih grupa zasnovanih na broju C<sub>5</sub>-jedinica, terpeni se dele u podgrupe na osnovu broja prisutnih

prstenova u njihovim strukturama na: *mono-, bi-, tri-, tetra- i pentaciklične*. Empirijske formule terpenoida su u potpunoj saglasnosti sa izoprenskim pravilom.

Aromatična jedinjenja koja sadrže benzenov prsten, *fenilpropani (fenilpropanoidi)*, se takođe često nalaze u etarskim uljima. Naziv fenilpropani potiče iz njihove strukture, aromatične fenil grupe i trougljeničnog propenskog repa cimetne kiseline. Po strukturi predstavljaju različite klase organskih jedinjenja koja se sintetizuju iz fenilalanina i tirozina u biosintetskom putu nastajanja šikimi kiseline. Fenilpropani su veoma rasprostranjeni u biljnom svetu gde često predstavljaju strukturne komponente raznih polimera, omogućavajući biljkama zaštitu od UV zračenja, od životinja koji se hrane biljkama i patogenima.

### **3.1. Etarska ulja**

Etarska ulja se javljaju u različitim organima biljaka (cvetu, voćnim plodovima, listu, korenu, semenu i stablu). Ova ulja nastaju u zelenim delovima biljaka i sa njenim sazrevanjem se transportuju u druga tkiva, naročito u cvetne delove. Biljni sekret koji se izlučuje kroz pore nekih biljaka sastavljeni su od smola i etarskih ulja, a nazivaju se *uljne smole*. Međutim, prava uloga esencijalnih ulja u biljkama nije poznata, a pretpostavlja se da su to ekskretorni proizvodi, sekret koji privlačenje insekata (radi oplodnje) ili mogu imati i nutritivnu vrednost za samu biljku.

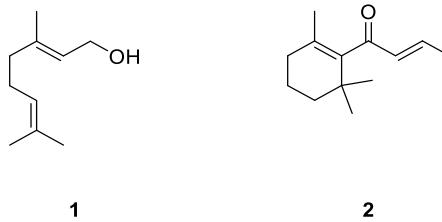
Etarska ulja se danas dobijaju destilacijom sa vodenom parom, ekstrakcijom pomoću lako isparljivih rastvarača ili presovanjem. Prva metoda se koristi za dobijanje relativno stabilnih ulja (kao što je pepermint ulje), druga metoda se koristi za dobijanje finih ulja (ružino ulje), dok se poslednja metoda koristi za proizvodnju ulja koja se nalaze u kori voćnih plodova (narandža, limun i drugo).

Etarska ulja imaju široku primenu u kozmetici, mada su neka od njih u novije vreme zamenjena sintetičkim proizvodima. Značajna je i njihova primena u medicini, bilo radi korekcije mirisa ili zbog fiziološkog dejstva. Među etarskim uljima naročito značaj ima terpentini, ulje iz četinarova roda *Pinus*, koje se koristi u nizu industrijskih grana kao rastvarač i kao sirovina za sintezu različitih molekula, pre svega kamfora.

### 3.1.1. Ekstrakcija etarskih ulja pomoću lako isparljivih rastvarača

#### PRINCIP RADA:

Ekstrakcija pomoću lako isparljivih rastvarača koristi se za dobijanje etarskih ulja iz cvetnih latica ruže, jorgovana i dr. Prinosi ovih ulja zavise od temperature na kojoj se vrši ekstrakcija, od vremena trajanja ekstrakcije, upotrebljenog rastvarača, kao i od kvaliteta cveta. Glavne komponente etarskog ulja ruže su geraniol (**1**) i  $\beta$ -damaskon (**2**; Šema 3.2).



Šema 3.2. Strukture geraniola (**1**) i  $\beta$ -damaskona (**2**).

#### PRIBOR:

1. Aparat za ekstrakciju po Soksletu
2. Baloni sa okruglim dnom (1 × 500 ml; 1 × 100 ml)
3. Bihnerov levak
4. Vakuum boca
5. Vodeno kupatilo
6. Grejna obloga/magnetna mešalica
7. Stativ sa klemama
8. Ekstrakciona čaura ili filter hartija za izradu čaure

**IZVOR ETARSKOG ULJA:** Osušeni cvet ruže ili ljubičice (100 g)

#### REAGENSI:

1. Petroletar (frakcija 40–60 °C)
2. 95% Etanol

## **POSTUPAK:**

Cvetne latice stave se u ekstrakcionu čauru koja se smesti u telo ekstraktora. U balon od 500 ml se sipa petroletar (200 ml) pa se Soksletov aparat kompletira. Balon se, zatim, zagreva na vodenom kupatilu u toku 2,5 h. Posle završene ekstrakcije ekstrakt se koncentruje na rotacionom vakuum uparivaču do uljastog ostatka koji se potom rastvori u 95% etanolu. Etanolni rastvor se ostavi u frižideru u toku 24 h, za koje vreme se izdvoji talog biljnih voskova. Talog se odvoji preko Bihnerovog levka, a alkoholni filtrat se prebaci u balon od 100 ml i upari na rotacionom vakuum uparivaču. Dobija se oko 50 mg etarskog ulja.

### **3.1.2. Ispitivanje etarskog ulja pitome nane**

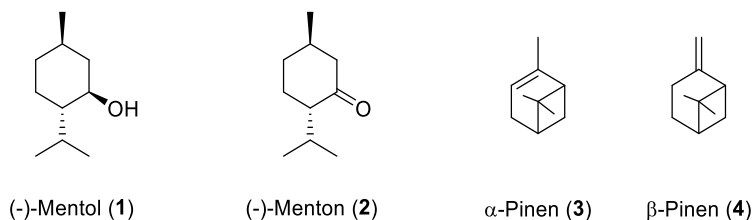
Pitoma nana (*Mentha piperita L.*) je jedna od najznačajnijih lekovitih biljaka koja se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Najvažniji sastojak droge je etarsko ulje čiji sadržaj varira od 1 do 3%, a u manjem procentu sadrži i tanine, flavonoide, gorke materije i dr. Kvalitet nane se ocenjuje prema sadržaju etarskog ulja, kao i prema sadržaju pojedinih komponenti u njemu. Za određivanje ukupnog sadržaja etarskog ulja u drogi uobičajeno se primenjuje metod destilacije sa vodenom parom, dok se za određivanje najvažnijih komponenti etarskog ulja primenjuju volumetrijske i spektrofotometrijske metode.

Destilacijom pomoću vodene pare dobija se etarsko ulje koje sadrži lako isparljive (lipofilne) sastojke. Princip destilacije sa vodenom parom zasniva se na Daltonovom zakonu, po kome je ukupan pritisak pare iznad smeše tečnosti koje se međusobno ne mešaju ( $P$ ) jednak zbiru parcijalnih pritisaka pojedinačnih komponentata te smeše [vode ( $P_V$ ) i ulja ( $P_E$ )]:

$$P = P_V + P_E$$

Stoga je temperatura ključanja smeše niža od temperature ključanja svake pojedinačne komponente.

Tokom ovog postupka dolazi u većoj ili manjoj meri do transformacije pojedinačnih sastojaka ulja pod uticajem toplote, vode i organskih kiselina koje su prisutne u biljci. Vodena para tokom destilacije sprečava pristup vazdušnog kiseonika i štiti ulje od oksidacije, ali pospešuje hidrolitičku razgradnju (npr. etarskih komponenti).



Šema 3.3. Strukture najvažnijih komponenti etarskog ulja pitome nane.

Sveže destilovano etarsko ulje pitome nane je bistra bezbojna ili slabo žućkasta tečnost, veoma prijatnog mirisa i ukusa, koje hladi i osvežava. Hemijskom analizom je utvrđeno da ono sadrži preko 100 različitih supstanci. Glavna komponenta je monociklični, monoterpenski alkohol mentol (**1**; Šema 3.3) koji se u etarskom ulju javlja slobodan ili u obliku estara sirćetne, odnosno izovalerijanske kiseline. Od drugih monoterpena u etarskom ulju se takođe nalaze i menton (**2**),  $\alpha$ -pinen (**3**),  $\beta$ -pinen (**4**) i drugi.

#### PRINCIP RADA:

Etarsko ulje se iz droge izoluje destilacijom sa vodenom parom, pri čemu se destilat ekstrahuje u sloju heksana. Nakon sušenja i uparavanja heksanskog rastvora, zaostaje etarsko ulje čiji se sadržaj u biljnom materijalu odredi gravimetrijski i izrazi u procentima.

Sadržaj mentola u etarskom ulju određuje se spektrofotometrijski, nakon građenja obojenog kompleksa sa *p*-dimetilaminobenzaldehidom u koncentrovanoj sumpornoj kiselini. Kalibraciona kriva se dobija merenjem apsorbance standardnih rastvora mentola u koncentracionom intervalu 0,016 – 0,08 mg/cm<sup>3</sup>, na 510 nm. Pri tome se dobija linearna zavisnost, što znači da za pomenuti interval koncentracija važi Lambert-Beer-ov zakon.

Osnovne komponente etarskog ulja pitome nane kvalitativno se dokazuju hromatografijom na tankom sloju silika-gela, uz detekciju hromatograma pomoću rastvora vanilina u koncentrovanoj sumpornoj kiselini.

#### PRIBOR:

1. Aparatura za destilaciju etarskog ulja sa vodenom parom (Slika 3.1)
2. Balon sa okruglim dnom (10 ml)
3. Odmerne tikvice (6 × 10 ml; 2 × 100 ml; 1 × 50 ml; 1 × 25 ml)

4. Graduisane pipete (2 × 1 ml; 2 × 5 ml)
5. Menzura (100 ml)
6. Spektrofotometar
7. Stalak sa epruvetama

**POLAZNI MATERIJAL:** Osušeni i sprášeni nadzemni delovi pitome nane u cvetu

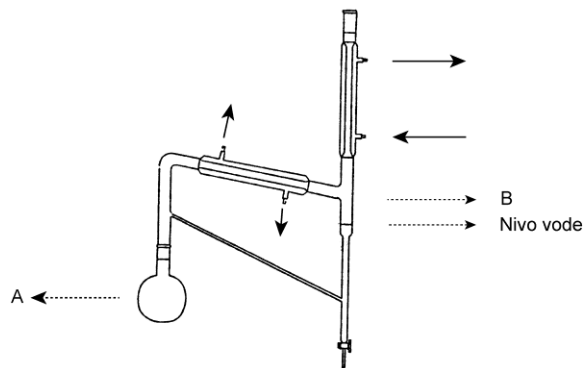
**REAGENSI:**

1. Sveže pripremljeni 0,1% rastvor *p*-dimetilaminobenzaldehida u cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
2. Sveže pripremljeni 3% rastvor vanilina u cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
3. Heksan
4. Komercijalni uzorak mentola p.a. kvaliteta
5. Etanol (95%)
6. Anhidrovani Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
7. Koncentrovana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**POSTUPAK:**

**Određivanje sadržaja etarskog ulja destilacijom sa vodenom parom**

Izolovanje etarskog ulja iz nane se izvodi u aparaturi za destilaciju sa vodenom parom koja je prikazana na Slici 3.1.



Slika 3.1. Aparatura za destilaciju etarskih ulja sa vodenom parom.

Samlevana droga (10 g) se prenese u balon za destilaciju (A), u koji se zatim doda voda (400 ml). Nastavak (B) se dopuni vodom do označenog nivoa, a zatim se u isti nastavak doda heksan (2

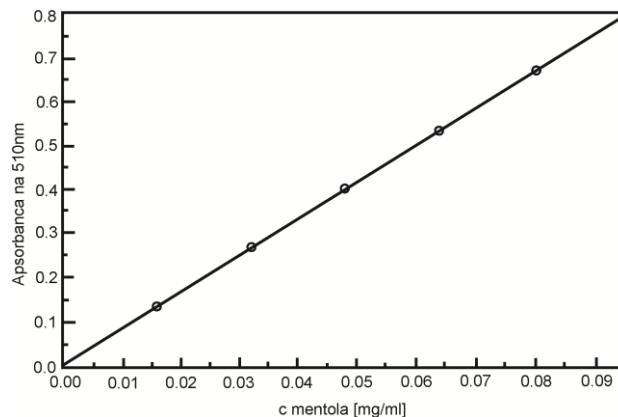
ml). Sadržaj balona se zagreva na temperaturi ključanja u toku 2,5 h, pri čemu se destilat sakuplja u nastavku (B) a ulje se izdvaja u rastvoru heksana. Nakon završene destilacije i hlađenja, prvo se kroz slavinu nastavka (B) ispusti vodeni rastvor, a zatim se heksanski rastvor ispusti u suhu epruvetu. Organska faza se suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrira u suv balon (10 ml) koji je prethodno izmeren na analitičkoj vagi. Heksan se udalji destilacijom, a balon sa etarskim uljem se ponovo izmeri na analitičkoj vagi. Razlika u masi između punog i praznog balona predstavlja ukupnu količinu etarskog ulja u 10 g biljnog materijala.

Izračuna se procentni sadržaj etarskog ulja u drogi (g/100 g).

### Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja mentola u etarskom ulju nane

#### Izrada kalibracione krive

U odmerni sud od 100 ml stavi se (-)-mentol (0,1600 g) i rastvori se u 95% etanolu (50 ml) a zatim dopuni do crte istim rastvaračem. Od ovako pripremljenog rastvora mentola odmeri se 5 ml i prenese se u odmerni sud od 100 ml, razblaži etanolom (20 ml) i dopuni do crte destilovanom vodom. Od ovog rastvora odmeri se 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2,0 ml u odmerne tikvice od 10 ml. U prve četiri probe se doda smeša etanol-voda (4:1; v/v) do ukupne zapremine od 2 ml. Koncentracija mentola u dobijenim rastvorima iznosi: 0,016, 0,032, 0,048, 0,064 i 0,080 mg/ml. U svaku probu se, zatim, doda po 3 ml 0,1%-nog rastvora *p*-dimetilaminobenzaldehida u cc  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i ostavi se na sobnoj temperaturi 10 minuta, pri čemu se razvija crveno-narandžasta boja. Ovim rastvorima se odredi apsorbanca na 510 nm, u odnosu na slepu probu koja sadrži 3 ml reagensa i 2 ml vode. Na osnovu izmerenih vrednosti konstruiše se kalibraciona kriva zavisnosti apsorbanca od koncentracije mentola (Slika 3.2).



Slika 3.2. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja mentola u etarskom ulju.



### **Određivanje sadržaja mentola u etarskom ulju**

U odmerni sud od 25 ml stavi se etarsko ulje (0,2000 g) i dopuni do crte sa 95% etanolom. Dobijeni rastvor etarskog ulja (0,5 ml) se prenese u odmerni sud od 50 ml, razblaži 95% etanolom (12,5 ml) i dopuni do crte destilovanom vodom. Odmerenoj probi od 2 ml ovog rastvora se doda sveže pripremljeni rastvor *p*-dimetilaminobenzaldehida u cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 ml) i energično promućka. Nakon 10 minuta izmeri se apsorbance rastvora na 510 nm u odnosu na slepu probu. Na osnovu izmerene apsorbance, iz kalibracione krive se odredi koncentracija mentola u etarskom ulju.

Sadržaj mentola u etarskom ulju, u procentima (*X*), izračunava se iz sledećeg izraza:

$$X = (c \times 50 \times 25 \times 100) / (0,5 \times a)$$

pri čemu je: *c* ... Koncentracija u probi koja je očitana sa kalibracione krive [g/cm<sup>3</sup>]

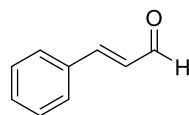
*a* ... Odvaga etarskog ulja

### **Kvalitativna analiza etarskog ulja nane metodom hromatografije na tankom sloju**

Pomoću hromatografije na tankom sloju silika-gela u sistemu rastvarača benzen/etil-acetat (95:5; v/v) mogu se identifikovati glavni sastojci etarskog ulja, uz standarde mentola i mentona. Izazivanje hromatograma se vrši sa 3% rastvorom vanilina u koncentrovanoj sumpornoj kiselini i zagrevanjem na 110 °C. Na kraju se odrede R<sub>f</sub> vrednosti mentola i mentona.

### **3.1.3. Ispitivanje etarskog ulja cimeta**

Cimet je začim koji se dobija iz kore vrste zimzelenog drveta roda *Cinnamomum*. Cimet se dominantno koristi kao aromatični začim i aditiv za ukus u mnogim kuhinjama sveta. Aroma i ukus cimeta potiču iz njegovog etarskog ulja čija je glavna komponenta fenilpropanoid cinamilaldehyd (Šema 3.4).



Cinamil-aldehyd

Šema 3.4.

### PRINCIP RADA:

Etarsko ulje se dobija destilacijom sa vodenom parom. Nakon ekstrakcije etarskog ulja metilen-hloridom cinamil-aldehyd se identifikuje tankoslojnom hromatografijom.

### PRIBOR:

1. Aparatura za destilaciju etarskog ulja sa vodenom parom
2. Balon sa okruglim dnom (2 × 100 ml)
3. Erlenmajer (100 ml)
4. Levak za odvajanje (250 ml)
5. Aluminijske ili staklene TLC pločice

**POLAZNI MATERIJAL:** Komerrijalni cimeti u prahu

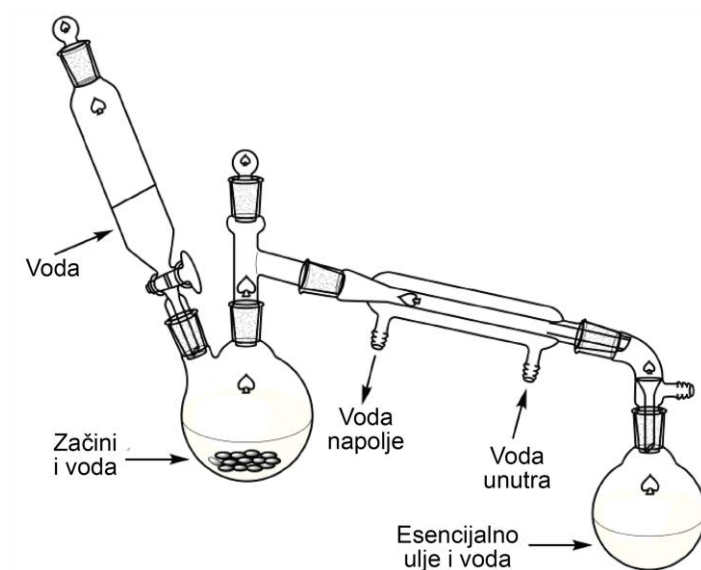
### REAGENSI:

1. Metilen-hlorid
2. Petroletar
3. Aceton

### POSTUPAK:

#### Određivanje sadržaja etarskog ulja cimeta destilacijom sa vodenom parom

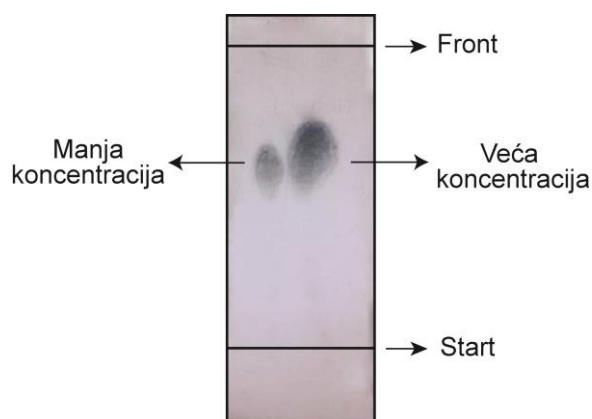
Mleveni cimeti (oko 3–3,5 g) se stavi u dvogrli balon od 100 ml, doda se voda (oko 50 ml) i destiluje (Slika 3.3). Nakon što se skupi oko 25 ml destilata, doda se još 25 ml vode u destilacioni sud preko levka za dokapavanje. Nakon što se skupi još 20 ml destilata, destilat se prenese u levak za odvajanje odakle se ekstrahuje metilen-hloridom (3 × 30 ml). Organski sloj se osuši anhidrovanim natrijum-sulfatom i upari u prethodno izmerenom balonu. Nakon uparavanja izračuna se prinos etarskog ulja cimeta.



Slika 3.3. Aparatura za destilaciju sa vodenom parom.

### Identifikacija cinamil-aldehida tankoslojnom hromatografijom

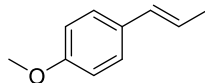
Izolovano etarsko ulje cimeta se rastvori u 1 ml metilen-hlorida i nanese na aluminjumsku ili staklenu TLC pločicu koja se potom razvije u sistemu petroletar/acetone 7:3 (Slika 3.4). Pločica se prvo posmatra pod UV lampom, pa se mrlje izazovu prskanjem sa  $H_2SO_4$  (1:1) i zagrevanjem na rešou.



Slika 3.4. TLC pločica etarskog ulja cimeta. Mrlja potiče od cinamil-aldehida.

### 3.1.4. Izolovanje anetola iz anisa

Anis (*Pimpinella anisum*) je biljka iz porodice Apiaceae, koja raste u mediteranskoj regiji i jugozapadnoj Aziji. Koristi se kao začin. Ukus potiče od etarskog ulja čija je glavna komponenta fenilpropanoid anetol (Šema 3.5). Miriše na Bronhi bombone.



Anetol

Šema 3.5.

#### PRINCIP RADA:

Etarsko ulje se dobija destilacijom sa vodenom parom. Nakon ekstrakcije etarskog ulja metilen-hloridom anetol se identifikuje tankoslojnom hromatografijom i potom izoluje kao čista supstanca preparativnom TLC.

#### PRIBOR:

1. Aparatura za destilaciju etarskog ulja sa vodenom parom
2. Balon sa okruglim dnom (2 × 100 ml)
3. Erlenmajer (100 ml)
4. Levak za odvajanje (250 ml)
5. Aluminijske ili staklene TLC pločice
6. Preparativne TLC ploče
7. Kada za razvijanje ploča

**POLAZNI MATERIJAL:** Komerrijalni anis

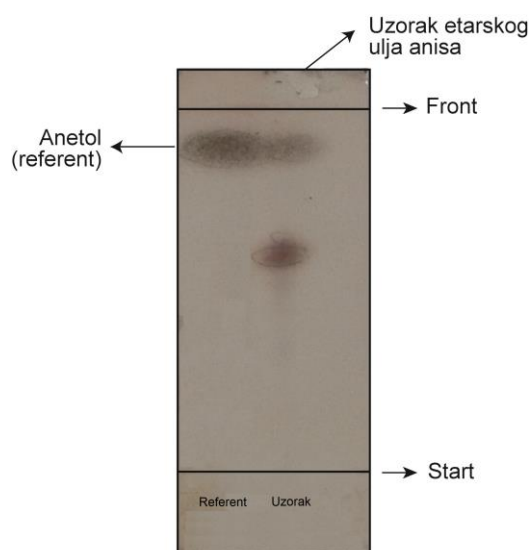
#### REAGENSI:

1. Metilen-hlorid
2. Petroletar
3. Aceton

## POSTUPAK:

### Određivanje sadržaja etarskog ulja anisa destilacijom sa vodenom parom

Mleveni anis (oko 3–3,5 g) se stavi u dvogrli balon od 100 ml, doda se voda (oko 50 ml) i započne se destilacija (Slika 3.3). Nakon što se skupi oko 25 ml destilata, doda se još 25 ml vode u destilacioni sud (preko levka za dokapavanje) i nastavi destilacija. Nakon što se skupi dodatnih 20 ml destilata, destilat se prenese u levak za odvajanje, gde se ekstrahuje metilen-hloridom (3 × 30 ml). Organski sloj se osuši anhidrovanim natrijum-sulfatom i upari u prethodno izmerenom balonu. Nakon uparavanja izračuna se prinos etarskog ulja anisa. Izolovano etarsko ulje anisa se rastvori u 1 ml metilen-hlorida i nanese na aluminjumsku ili staklenu TLC pločicu koja se potom razvije u sistemu petroletar/acetone 7:3 (Slika 3.5). Pločica se prvo posmatra pod UV lampom, pa se mrlje izazovu prskanjem sa  $H_2SO_4$  (1:1) i zagrevanjem na rešou.



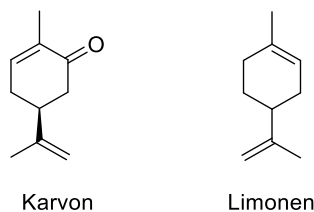
Slika 3.5. TLC pločica etarskog ulja anisa.

### Izolovanje anetola preparativno tankoslojnom hromatografijom

Etarsko ulje se rastvori u metilen-hloridu i nanese na preparativne TLC ploče (oko 7 mg po ploči). Hromatogrami se razvijaju jednom u sistemu rastvarača petroletar/acetone 9:1 i osuše. Pod UV lampom se obeleži nepolarna UV aktivna zona, silika-gel se sastruže, prenese u kolonu za hromatografiju i eluira etil-acetatom u prethodno izmerenom balonu. Identitet i čistoća anetola se proveravaju snimanjem IR spektra.

### 3.1.5. Izolovanje karvona i limonena iz etarskog ulja kima

Kim (*Carum carvi*) je biljka iz porodice Apiaceae, koja raste u zapadnoj Aziji, Evropi i Sjevernoj Americi. Koristi se kao začim zbog arome i ukusa koji potiču od etarskog ulja čiji su glavni sastojci terpeni karvon i limonen (Šema 3.6).



Šema 3.6.

#### PRINCIP RADA:

Etarsko ulje se dobija destilacijom sa vodenom parom. Nakon ekstrakcije etarskog ulja metilen-hloridom limonen i karvon se identifikuju tankoslojnom hromatografijom i potom izoluju kao čiste supstance kolonskom fleš hromatografijom na silika-gelu.

#### PRIBOR:

1. Aparatura za destilaciju etarskog ulja sa vodenom parom
2. Balon sa okruglim dnom (2 × 100 ml)
3. Erlenmajer (100 ml)
4. Levak za odvajanje (250 ml)
5. Aluminijske ili staklene TLC pločice
6. Kolona za hromatografiju
7. Epruvete

**POLAZNI MATERIJAL:** Komercijalni kim

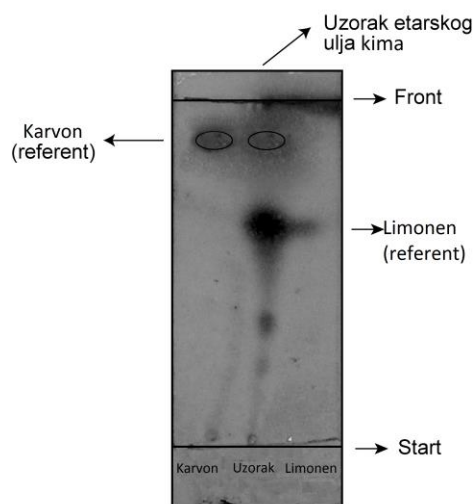
#### REAGENSI:

1. Metilen-hlorid
2. Petroletar
3. Aceton

## POSTUPAK:

### Određivanje sadržaja etarskog ulja kima destilacijom sa vodenom parom

Mleveni kim (oko 3–3,5 g) se stavi u dvogrlni balon od 100 ml, doda se voda (oko 50 ml) i započne se destilacija (Slika 3.3). Nakon što se skupi oko 25 ml destilata, doda se još 25 ml vode u destilacioni sud (preko levka za dokapavanje) i nastavi destilacija. Nakon što se skupi dodatnih 20 ml destilata, destilat se prenese u levak za odvajanje gde se ekstrahuje metilen-hloridom (3 × 30 ml). Organski sloj se osuši anhidrovanim natrijum-sulfatom i upari u prethodno izmerenom balonu. Nakon uparavanja izračuna se prinos etarskog ulja kima. Izolovano etarsko ulje kima se rastvori u 1 ml metilen-hlorida i nanese na aluminijumsku ili staklenu TLC pločicu koja se potom razvije u sistemu petroletar/acetone 7:3 (Slika 3.6). Pločica se prvo posmatra pod UV lampom, pa se mrlje izazovu prskanjem sa  $H_2SO_4$  (1:1) i zagrevanjem na rešou.



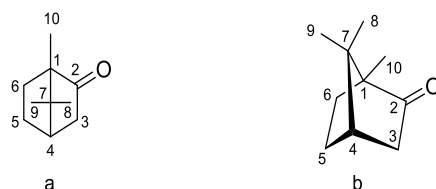
Slika 3.6. TLC pločica etarskog ulja kima.

### Izolacija karvona i limonena fleš hromatografijom

Pripremi se kolona za fleš hromatografiju (prečnika 15 mm) tako što se prvo stavi pamučna vata pa kvarcni pesak i stub od 13 cm silika-gela. Stub se formira eluentom (petroletar/acetone 95:5) i etarsko ulje nanese na vrh stuba. Skupljaju se frakcije u epruvete od 5 ml a sadržaj frakcija prati tankoslojnom hromatografijom. Sa kolone prvo eluira nepolarniji karvon pa polarniji limonen. Frakcije u kojima se nalazi karvon se koncentruju u prethodno izmeren balon, a isto to se uradi i sa frakcijama limonena. Nakon uparavanja, računaju se prinosi karvona i limonena u etarskom ulju.

### 3.1.6. Dokazivanje prisustva keto-grupe u molekulu kamfora

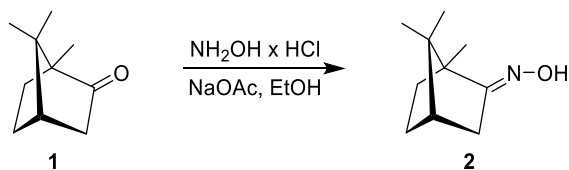
Kamfor je biciklični monoterpen koji je u većim količinama prisutan u kamforovom ulju koje se dobija iz kamforovog drveta destilacijom sa vodenom parom. Kamforovo drvo raste u Kini i Japanu. U novije vreme, kamfor se sve više dobija sintezom. Kamfor se koristi kao insekticid (sredstvo protiv moljaca), a u medicini i farmaciji je našao primenu kao sredstvo za pročišćavanje disajnih puteva, a primenjuje se i prilikom masaže mišića. Strukturu kamfora karakteriše bornanski biciklični sistem i prisustvo keto grupe na C-2 (Šema 3.7).



Šema 3.7. Struktura kamfora: a) projekciona formula; b) konformaciona formula.

#### PRINCIP RADA:

Dokazivanje prisustva keto-grupe u molekulu kamfora (**1**) izvodi se bazno katalizovanom kondenzacijom ovog jedinjenja sa hidrosilamin-hidrohloridom, pri čemu se dobija odgovarajući ketoksim (**2**; Šema 3.8).



Šema 3.8. Dobijanje ketoksima (**2**) iz kamfora (**1**).

#### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (2 × 10 ml)
2. Stakleni levak
3. Filter hartija
4. Magnetna mešalica sa jezgrom



**REAGENSI:**

1. Kamfor
2. 95% Etanol
3. Natrijum-acetat
4. Metilen-hlorid
5. Petroletar (frakcija 40–60 °C)
6. Hidroksilamin-hidrohlorid

**POSTUPAK:**

Rastvoru kamfora (**1**; 0,064 g; 0,42 mmola) u etanolu (3 ml) doda se natrijum-acetat (0,124 g; 11,5 mmola) i hidroksilamin-hidrohlorid (0,103 g; 1,5 mmola). Rezultujuća suspenzija se meša na sobnoj temperaturi u toku 24 časa. Reakciona smesa se, zatim, upari na rotacionom vakuum uparivaču, a ostatak se ekstrahuje metilen-hloridom (2 × 10 ml). Nerastvorne soli se odvoje filtracijom, a bistar filtrat se upari na rotacionom vakuum uparivaču pri čemu zaostaje čvrsta kristalna masa sirovog ketoksima **2**. Rekrystalizacijom iz petroletra, dobija se čist proizvod **2**, u vidu belih kristala, *t*<sub>m</sub> 118–119 °C; razvijač za TLC: toluen/etil-acetat 49:1.

## 3.2. Feromoni

Feromon (grč. φέρω phero - nositi + hormon iz grč. ὁρμή - podsticaj) su organska jedinjenja koja izlučuju neki životinjski organizmi i koja izazivaju specifičan odziv drugih pripadnika iste vrste. Zbog toga se ove supstance mogu smatrati i specifičnim hemijskim „glasnicima“, tj. sredstvima za međusobno komuniciranje jedinki unutar pojedinih životinjskih vrsta. Postoje naučni dokazi da se sve životinje u određenom stepenu koriste feromonima.

Feromoni insekata učestvuju u mnogim njihovim aktivnostima. Prema vrsti aktivnosti u kojoj učestvuju, feromoni se mogu podeliti na: polne (atraktanti), agregacione, markere i alarmirajuće feromone. Po svojoj hemijskoj strukturi feromoni pripadaju različitim klasama organskih jedinjenja. Mogu biti ugljovodonici, alifatični i aromatični alkoholi, aldehidi, složeni estri, kao i jedinjenja karbociklične i heterociklične strukture.

S obzirom na to da su u prirodi prisutni u malim količinama, pojedinim feromonskim predstavnicima je veoma teško odrediti strukturu. Nekim insektima je dovoljno **30 molekula** određenog feromona da privuku drugog pripadnika svoje vrste. Zbog toga se delovanje ovakvih feromonskih supstanci ubraja u najneobičnije primere biološke aktivnosti. Dokazano je da se neke vrste insekata odazivaju na smesu više različitih jedinjenja, pri čemu nijedna čista komponenta ne pokazuje feromonsku aktivnost (sinergističko delovanje). Isto tako, čak i minimalna promena međusobnog odnosa komponenti u smesi može da izazove gubitak feromonske aktivnosti date smese.

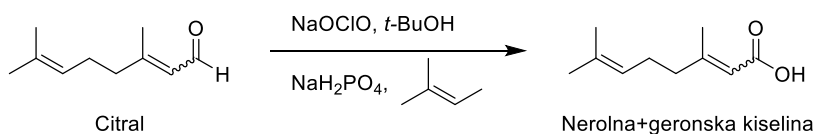
### **Nasonov feromon**

Nasonov (alternativno Nasanov) feromon oslobađaju pčele radilice da bi se „istraživači hrane“ mogli orijentisati pri povratku u svoju koloniju ili košnicu. Pčele takođe ispuštanjem ovog feromona obeležavaju biljke koje sadrže nektar. Radi širenja svog mirisa, pčele podižu svoj abdomen koji sadrži Nasonovu žlezdu i ispuštaju ovaj feromon uz snažno razmahivanje krila. Nasonov feromon sadrži veći broj različitih terpena kao što su geraniol, nerolna kiselina, citral i geronska kiselina.

Smesu citrala i odgovarajućih kiselina koriste pčelari da bi privukli roj pčela u košnicu.

### PRINCIP RADA:

Radi dobijanja sintetičkog Nasonovog feromona, citral se oksiduje do odgovarajućih kiselina (Šema 3.9).



Šema 3.9. Dobijanje sintetskog Nasonovog feromona.

### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (10 ml)
2. Magnetna mešalica sa jezgrom (0,7 cm)
3. Levak za odvajanje (250 ml)
4. pH hartija

### REAGENSI:

1. Citral
2. *t*-Butil-alkohol
3. Natrijum-hlorit
4. Natrijum-dihidrogenfosfat
5. 2-Metil-2-buten
6. Hlorovodonična kiselina
7. Dietil-etar

### POSTUPAK:

Citral (3 g, 0,02 mol) se rastvori u *t*-butil-alkoholu (25 ml) i 2-metil-2-butenu (8,4 ml). U rastvor se u kapima i uz intenzivno mešanje dodaje rastvor koji se sastoji od natrijum-hlorita (3,62 g, 0,04 mol), natrijum-dihidrogenfosfata (3,6 g, 0,03 mol) i vode (18 ml). Svetložuta reakciona smesa se meša na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon isteka reakcionog vremena volatilne komponente se uklone na rotacionom vakuum uparivaču. U ostatak se doda voda (40 ml), pH se

podesi na 3 sa HCl (1:1), a zatim se vrši ekstrakcija dietil-etrom (3 × 30 ml). Kombinovani dietil-etarski ekstrakti se isperu vodom (50 ml) i osuše. Nakon uparavanja se dobija smesa nerolne i geronske kiseline u obliku svetložutog ulja.

**Kvalitativna analiza sintetizovane smese nerolne i geronske kiseline hromatografijom na tankom sloju**

Pomoću hromatografije na tankom sloju silika-gela u sistemu rastvarača cikloheksan/acetone 2,6:2 mogu se identifikovati citral kao i proizvodi reakcije nerolna i geronska kiselina. Izazivanje hromatograma se vrši sa sumpornom kiselinom (1:1) i zagrevanjem na 110 °C. Na kraju se odrede  $R_f$  vrednosti na TLC pločici.

### 3.3. Karotenoidi

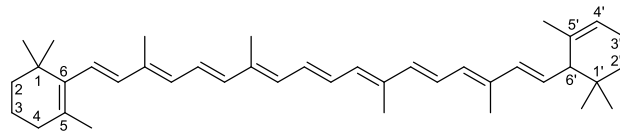
Karotenoidi su žuto, crveno ili narandžasto obojeni pigmenti koji se nalaze u biljkama i u životinjskoj masti. Oni se još nazivaju i *lipohromni pigmenti*, jer se rastvaraju u mastima. Ime su dobili po tome što su prvi put izolovani iz šargarepe (*Daucus carota*).

Saglasno svojoj strukturi, karotenoidi su formalno derivati *izoprena*. Molekuli karotenoida sadrže veći broj konjugovanih dvostrukih veza, koje uslovljavaju njihovu boju. Mogu se podeliti u četiri osnovne grupe:

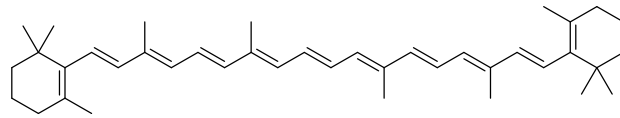
1. *Ugljovodonici (karoteni) – rastvorni u petroletru*
2. *Keto- i hidroksi derivati karotena (ksantofili) – rastvorni u MeOH, EtOH i Me<sub>2</sub>CO*
3. *Karotenoidne kiseline – rastvorne u MeOH, EtOH i Me<sub>2</sub>CO*
4. *Ksantofilni estri – rastvorni u petroletru.*

Izdvajanje karotenoida iz odgovarajućih materijala zasniva se na različitoj rastvorljivosti u alkoholu i petroletru. Ekstrakcija iz biljnog materijala najčešće se izvodi sa petroletrom, etanolom ili acetonom, u zavisnosti od toga koju grupu jedinjenja treba izolovati. Nakon ekstrakcije ekstrakti se radi definitivnog frakcionisanja nanose na kolonu punjenu neutralnim Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivitet II po Brockmannu), MgO, CaCO<sub>3</sub> ili Ca(OH)<sub>2</sub>.

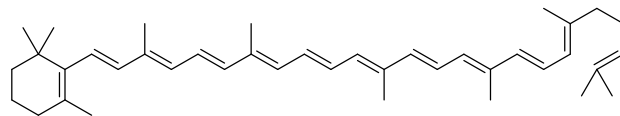
**Karoteni.** Poznata su tri izomerna karotena:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karoten (*Šema 3.10*).  $\alpha$ -Karoten (**1**) je nađen u šargarepi, kokosovim orasima i pitomom kestenu.  $\beta$ -Karoten (**2**) se prvenstveno nalazi u šargarepi, kao i u paprici i zelenom lišću (industrijski se ekstrahuje iz trave).  $\gamma$ -Karotena (**3**) ima najviše u plodovima kajsije.



$\alpha$ -Karoten (1)



$\beta$ -Karoten (2)



$\gamma$ -Karoten (3)

Šema 3.10.

Karoteni su značajni zbog toga što se u jetri viših kičmenjaka transformišu u vitamin A (*provitamini*). Dvostruke veze iz prstena  $\beta$ -karotena konjugovane su sa susednim dvostrukim vezama u lancu. Ovakav konjugovani položaj dvostrukih veza je od fiziološkog značaja, jer samo od ove  $\beta$ -jononske strukture može nastati vitamin A. Drugi karoteni ( $\alpha$ -karoten i  $\gamma$ -karoten) pokazuju samo 50% aktivnosti  $\beta$ -karotena, jer u molekulu sadrže samo jedan  $\beta$ -jononski prsten.

### 3.3.1. Razdvajanje pigmenata hloroplasta adsorpcionom hromatografijom na koloni

#### PRINCIP RADA:

Razdvajanje pigmenata hloroplasta postiže se hromatografijom na koloni punjenoj smesom adsorbensa  $\text{Al}_2\text{O}_3$ - $\text{Na}_2\text{SO}_4$ - $\text{MgO}$  3:2:1 (18 g). Pigmenti se adsorbuju na adsorbens uparavanjem aceton/petroletarskog ekstrakta u prisustvu minimalne količine (1 g) adsorbensa. Dobijeni suvi ostatak nanosi se na kolonu, a karoteni se selektivno eluiraju, kao najmanje polarni pigmenti, pomoću smese petroletar/toluen (1:1), dok se zeleni pigmenti hloroplasta eluiraju acetonom.

**PRIBOR:**

1. Porcelanski avan sa tučkom
2. Vakuum boca
3. Stakleni levak
4. Filter hartija
5. Epruvete
6. Kolona (20 × 2 cm)
7. Balon sa okruglim dnom (50 ml)

**IZVOR PIGMENATA:** Trava ili lišće spanaća

**REAGENSI:**

1. Petroletar (frakcija 40–70 °C)
2. Aceton
3. Neutralni Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (aktivitet II po Brockmannu)
4. Anhidrovani Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
5. Magnezijum-oksidi (za hromatografiju)
6. Toluen (ili benzen)

**POSTUPAK:**

Ekstrakcija pigmenata hloroplasta se izvodi trituracijom (gnječenjem) biljnog materijala (5 g) sa smesom acetona i petroletra (30 ml; 1:1), u porcelanskom avanu, u prisustvu kvarcnog peska (0,5 g). Ovu operaciju treba izvoditi brzo zbog fotosenzibilnosti ekstrahovanih pigmenata. Dobijena kaša se filtruje kroz kvalitativnu filter hartiju postavljenu na stakleni levak i ekstrakt hvata u balon koji sadrži 1 g adsorbensa (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-MgO 3:2:1). Rastvarač se zatim otpari pomoću rotacionog vakuum uparivača, ostatak u balonu osuši kodestilacijom sa tolueom (2 × 10 ml) i nanese na prethodno pripremljenu kolonu, vodeći računa da iznad stuba adsorbensa ostane 2–3 ml rastvarača. Zatim se uključi vodena vakuum pumpa (umeren vakuum, jer petroletar ima visok napon pare) i tek kada se nivo rastvarača snizi na nekoliko milimetara od površine adsorbensa, doda se eluent za hromatografiju (petroletar/toluen 1:1). Ovaj sistem razvijača selektivno eluira najmanje polarni β-karoten, dok ostali (polarniji) pigmenti hloroplasta ostaju adsorbovani pri samom vrhu stuba adsorbensa. Kraj eluiranja karotena kontroliše se proverom boje rastvora koji se nalazi u staklenoj cevi iznad slavine (nakon njenog zatvaranja). Ako je pomenuti rastvor bezbojan, u kolonu se dodaje aceton kojim se eluiraju polarniji pigmenti hloroplasta. Frakcije β-karotena se upare na rotacionom vakuum uparivaču, a ostatak

rastvori u petroletru (1 ml). Ovako dobijenom rastvoru određuje se intenzitet boje (na kolorimetru) i uporedi sa rastvorom standarda azobenzena. Sadržaj karotena izračunava se na sledeći način:

1 ml petroletarskog rastvora karotena koji po intenzitetu boje odgovara standardnom rastvoru azobenzena u petroletru (100 mg/10 ml) sadrži 0,00235 mg karotena.

Količina ( $P$ ) u mg/100 g biljnog materijala dobija se iz sledećeg izraza:

$$P = ((0,00235 \times P_1)/(n \times P_2)) \times 100$$

Pri čemu je:

$P$  .... mg karotena u 100 g biljnog materijala

$P_1$  ... Broj podeoka na skali kolorimetra za standardni rastvor azobenzena (10 mg/ml)

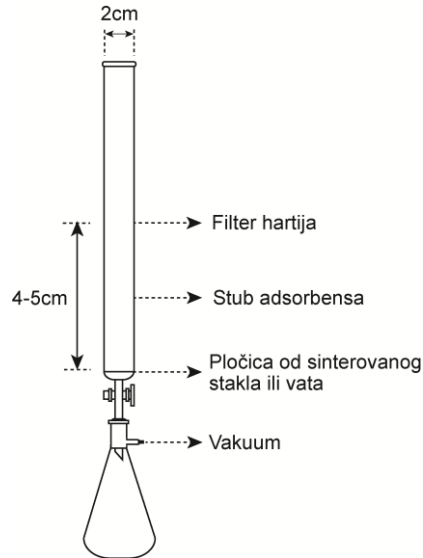
$P_2$  ... Broj podeoka na skali kolorimetra za eluirani petroletarski ekstrakt karotena

$n$  .... Odvaga uzorka (g)

#### **PRIPREMA KOLONE ZA HROMATOGRAFIJU:**

Sinterovana pločica na dnu kolone za hromatografiju prekrije se filter hartijom čiji prečnik odgovara prečniku kolone. Ukoliko kolona nema sinterovanu pločicu, u prostor iznad slavine stavi se sloj vate, a na nju filter hartija. Na hartiju se nanese praškasta smesa adsorbensa i rasporedi staklenim štapićem, a sabijanje stuba adsorbensa potpomaže se primenom vakuuma. Visina formiranog stuba treba da iznosi 4–5 cm. Kada se postigne željena visina stuba, na vrh stuba se takođe stavlja filter hartija, a zatim se zidovi kolone i stub adsorbensa isperu sa 15–20 ml petroletra. Petroletar se slobodno ispušta iz kolone u erlenmajer, sve dok se nivo tečnosti ne snizi na nekoliko milimetara iznad gornje površine stuba. Erlenmajerova tikvica se zameni vakuum bocom (Slika 3.7). Na ovaj način, kolona je pripremljena za rad.





Slika 3.7. Aparatura za adsorpcionu kolonsku hromatografiju.

### 3.3.2. Razdvajanje pigmentata hloroplasta adsorpcionom hromatografijom na hartiji

#### PRINCIP RADA:

Iz pogodnog biljnog materijala acetonom se ekstrahuju pigmenti hloroplasta, koji se potom razdvajaju hromatografijom na hartiji, uzlaznom tehnikom.

#### PRIBOR:

1. Porcelanski avan sa tučkom
2. Stakleni levak za filtraciju sa sinterovanom pločicom
3. Kada za hromatografiju
4. Hartija za hromatografiju ili kvantitativna filter hartija
5. Makaze
6. Graduisana pipeta (1 ml)
7. Fen

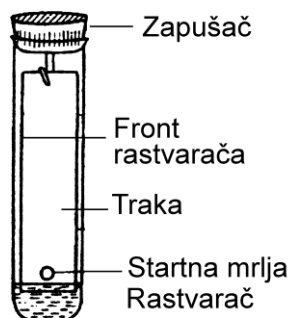
**IZVOR PIGMENATA:** Lišće spanaća ili repe

### REAGENSI:

1. Petroletar (frakcija 40–70 °C)
2. Ligroin (petroletar; frakcija 80–110 °C)
3. Aceton

### POSTUPAK:

Pigmenti se ekstrahuju acetonom (25 ml), uz trituraciju biljnog materijala (5 g) u porcelanskom avanu, kao u prethodnoj vežbi. Dobijena kaša se filtruje kroz kvalitativnu filter hartiju, a ostatak na levku se nekoliko puta ispere acetonom. U cilju razdvajanja pigmenata, hromatografska hartija (ili filter hartija) se iseče u trake dimenzija 25 × 5 cm. Na jednoj strani trake, na 3 cm od kraja, obeleži se startna linija, duž koje se nanese oko 0,1–0,2 ml ekstrakta. Uzorak se nanosi pažljivo, vodeći računa da nakon nanošenja celokupne količine rastvora startna mrlja ostane određenog pravilnog oblika.\* Gornji kraj trake pričvrsti se za poklopac komore za hromatografiju i stavi u kadu ili zatvorenu epruvetu, tako da donji kraj hartije bude uronjen u rastvarač oko 1 cm, pri čemu se startna mrlja nalazi iznad nivoa rastvarača (Slika 3.8).



Slika 3.8. Razvijanje hromatograma.

Kao razvijač koristi se smesa: ligroin/petroletar/aceton (4:1:1). Potpuno razdvajanje pigmenata postiže se razvijanjem hromatograma u toku 10–20 minuta. Pošto su pigmenti obojeni, po završetku hromatografije raspoznaju se jasno izražene zone, raspoređene po određenom redosledu saglasno njihovoj polarnosti (Slika 3.9).

---

\*Nakon svakog nanošenja acetonskog ekstrakta na hromatogram, mrlja se mora osušiti fenom.



### **PRINCIP RADA:**

Komercijalni koncentrat paradajza dehidriše se metanolom, a likopen ekstrahuje smesom petroletar/metanol iz koje naknadno kristališe. Likopen se lako izomerizuje u rastvoru, čak i na sobnoj temperaturi, dok kristalni likopen ne podleže izomerizaciji. Međutim, kristalni likopen podleže autooksidaciji, pa se mora čuvati u inertnoj atmosferi i u tami.

### **PRIBOR:**

1. Erlenmajer sa brušenim čepom (1000 ml)
2. Bihnerov levak
3. Vakuum boca (1000 ml)
4. Filter hartija
5. Levak za odvajanje (1000 ml)
6. Balon sa okruglim dnom (50 ml)
7. Stativ sa prstenom
8. Epruvete (2 kom.)

**IZVOR LIKOPENA:** Komercijalni koncentrat paradajza

### **REAGENSI:**

1. Metanol
2. Petroletar
3. Anhidrovani natrijum-sulfat
4. Benzen
5. Hloroform
6. Antimon (III)-hlorid

### **POSTUPAK:**

Koncentrat paradajza (50 g), 90% aq metanol (50 ml) i petroletar (50 ml) snažno se mućkaju u toku 15 minuta u zatvorenom erlenmajeru sa brušenim čepom (magnetna mešalica). Suspenzija se filtrira preko Bihnerovog levka, filtrat sačuva a talog vrati u erlenmajer i mućka sa 90% aq metanolom (50 ml) i petroletrom (50 ml) u toku 15 minuta. Suspenzija se filtrira, filtrati se spoje i prenesu i levak za odvajanje, pri čemu se uočavaju dva sloja: gornji tamno crveni (petroletarski) sloj i donji (metanolni) narandžaste boje, Metanolni sloj se dovoji, a petroletarski sloj se ispere vodom (50 ml) i osuši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Nakon sušenja, rastvarač se udalji na rotacionom vakuum uparivaču, pri čemu zaostaje tamno-crveno ulje koje se tretira dva puta sa

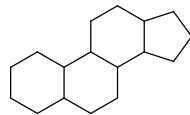
benzenom (tretiranje benzenom se sastoji u rastvaranju uljastog ostatka i uparavanja rastvora do konzistencije sirupa). Dobijeno ulje se rastvori u 2 ml benzena i zagreje do ključanja, a zatim se doda topao metanol (3–4 ml), pri čemu se izdvajaju crveni kristali likopena.

**Bojene reakcije likopena:**

1. Likopen rastvoren u cc  $\text{H}_2\text{SO}_4$  daje plavu boju.
2. Hloroformski rastor likopena sa antimon (III)-hloridom daje plavu boju koja je nepostojana i brzo se gubi.

### 3.4. Steroidi

Prirodna jedinjenja koja u strukturi sadrže *ciklopentanoperhidrofenantrenski* sistem prstenova nazivaju se *steroidi* (Šema 3.12).



Ciklopentanoperhidrofenantren

Šema 3.12. Osnova strukture steroidnih molekula.

Biogenetski, steroidi pripadaju izoprenoidima jer je njihov prekursor takođe izopentenil-pirofosfat. Međutim, u kasnijim fazama biosinteze steroidni intermedijeri gube nekoliko C-atoma, pa stoga empirijske formule steroida ne odgovaraju izoprenskom pravilu.

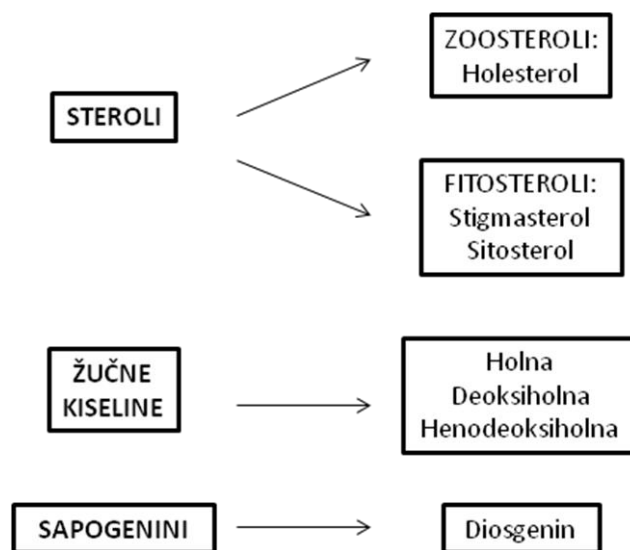
Steroidi su rasprostranjeni u prirodi, kako u životinjskom tako i u biljnom svetu. Prema njihovoj strukturi i biološkoj aktivnosti steroidi se dele na:

1. sterole
2. žučne kiseline
3. srčane glikozide
4. saponine
5. steroidne alkaloidne
6. steroidne hormone i
7. vitamine D-grupe

Najznačajnija steroidna jedinjenja s obzirom na njihovu primenu u medicini, su steroidni hormoni i vitamin D. Mnoga druga steroidna jedinjenja imaju značajnu ulogu u medicinskoj terapiji, mada se u celini primenjuju u manjem obimu, kao što su srčani glikozidi (stimulatori rada srca) i žučne kiseline (digestivna sredstva i dr.). Isto tako, hemijskim transformacijama nekih prirodnih steroida dobijeni su molekuli sa izmenjenim, ili sa znatno izraženijim biološkim aktivnostima. Industrijska proizvodnja steroidnih hormona pre 1940. godine bila je zasnovana na ekstrakciji iz životinjskih žlezda i urina. Postupci za ekstrakciju su nedovoljno efikasni, zametni i skupi. Razvoj hemije steroida otvorio je nove puteve za dobijanje steroidnih hormona,

zasnovane na njihovoj sintezi iz pogodnih steroidnih jedinjenja, a u novije vreme čak i na totalnoj sintezi, polazeći iz jednostavnih organskih jedinjenja.

Za proizvodnju fiziološki aktivnih steroidnih molekula najčešće se koriste prirodni steroli, žučne kiseline i sapogenini, čiji su predstavnici prikazani na Šemi 3.13.



Šema 3.13. Fiziološki aktivni steroidni molekuli se najčešće proizvode iz prirodnih sterola, žučnih kiselina i sapogenina.

Grupa vitamina D, koju, strogo uzevši, ne karakteriše prisustvo integralnog ciklopentanoperhidrofenantrenskog sistema prstenova, zbog svoje biogenetske veze sa steroidima, kao i zbog biološkog dejstva koje je po mehanizmu slično delovanju steroidnih hormona, smatra se steroidnom grupom jedinjenja.

Medicinska primena vitamina D<sub>3</sub> u lečenju rahitisa ima dugu predistoriju. Premda je riblje ulje bilo preporučivano za lečenje rahitisa još u XIX veku, tek početkom dvadesetih godina XX veka postaje evidentno prisustvo vitamina D<sub>3</sub> kao aktivne komponente. Uporedo sa ovim saznanjem, razvija se i saznanje o ulozi UV zračenja i sunčeve svetlosti u lečenju rahitisa kod dece.

U periodu od 1927–1928. godine konstatovano je da se supstanca koja pokazuje antirahitične osobine može dobiti ozračivanjem ergosterola UV zracima. Ova supstanca danas je poznata kao vitamin D<sub>2</sub> ili ergokalciferol. Tako je ergosterol postao značajna sirovina za dobijanje vitamina D<sub>2</sub>. Međutim, komparativna biološka ispitivanja pokazala su da vitamin D<sub>2</sub> nije tako efikasan kao što je riblje ulje za neke životinjske vrste. Ovo saznanje iniciralo je dalja istraživanja koja su pokazala da se supstanca sa antirahitičnim dejstvom može dobiti i ozračivanjem 7-

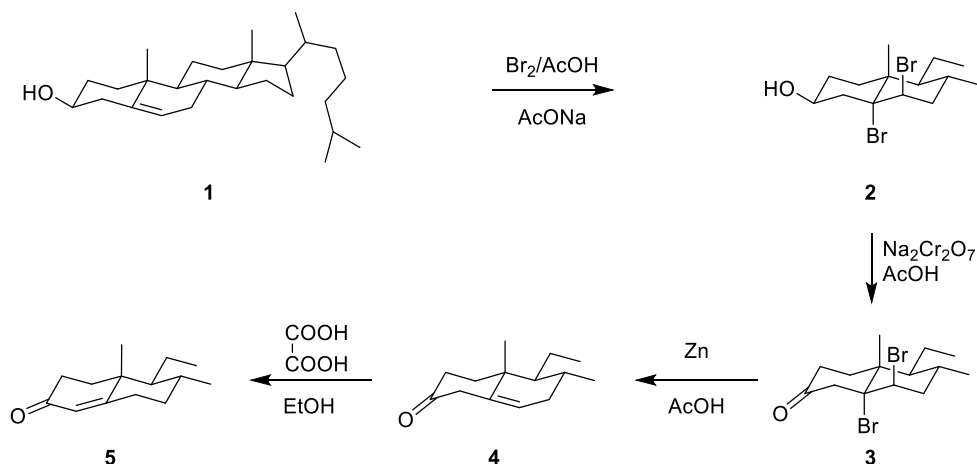
dehidroholesterola. Utvrđeno je da proizvod nastao ozračivanjem 7-dehidroholesterola, danas poznat kao vitamin D<sub>3</sub> ili holekalciferol, po svojoj strukturi odgovara aktivnoj supstanci iz ribljeg ulja. U novije vreme dostupne količine holesterola prevashodno se koriste za dobijanje vitamina D<sub>3</sub>.

### 3.4.1. Hemijska transformacija holesterola u $\Delta^4$ -holesten-3-on

Pristutvo  $\Delta^4$ -3-keto-funkcije karakteristično je za pojedine androgene, gestagene i kortikosteroidne hormone. Većina steroidnih jedinjenja koja se koriste za sintezu ovih steroidnih hormona (holesterol, stigmasterol, diosgenin i dr.) sadrže 3-hidroksi- $\Delta^5$ -funkciju, koja se relativno lako transformiše u konjugovani keton. Stoga je ova transformacija obavezna etapa pri sintezi navedenih hormona.

#### PRINCIP RADA:

Pre oksidacije C-3 hidrokislne grupe holesterola (**1**) hromnom kiselinom, potrebno je zaštititi  $\Delta^5$ -dvostruku vezu, što se postiže bromovanjem holesterola pri čemu se dobija 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholestanol (**2**). Oksidacijom intermedijera **2** dobija se 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholestanon (**3**) koji se zatim debromuje pomoću cinka, pri čemu se dobija  $\Delta^5$ -holesten-3-on (**4**). Nezasićeni keton **4** lako se izomerizuje u konjugovani  $\Delta^4$ -holesten-3-on (**5**) u prisustvu katalitičkih količina kiselina ili baza. U ovom slučaju, izomerizacija se izvodi zagrevanjem ketona **4** u alkoholnom rastvoru oksalne kiseline (Šema 3.14).



Šema 3.14. Transformacija holesterola (**1**) u  $\Delta^4$ -holesten-3-on (**5**).



## Sinteza 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholesterola (2)

### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (100 ml)
2. Erlenmajer (100 ml)
3. Povratni hladnjak
4. Bihnerov levak
5. Vakuum boca
6. Stakleni štapić
7. Vodeno kupatilo
8. Ledeno kupatilo
9. Stativ sa klemama
10. Magnetna mešalica sa jezgrom

### REAGENSI:

1. Holesterol
2. Apsolutni dietil-etar
3. Sirćetna kiselina (glacijalna)
4. Natrijum-acetat (anhidrovani)
5. Brom

### POSTUPAK:

Holesterol (5,00 g, 12,93 mmol) se stavi u balon sa okruglim dnom i rastvori se u apsolutnom dietil-etru (40ml)<sup>†</sup>. Rastvor broma se priprema odvojeno na sledeći način: natrijum-acetat (0,36 g, 4,39 mmol) i glacijalna sirćetna kiselina (62 ml) mešaju se u erlenmajeru dok se sav natrijum-acetat ne rastvori a potom se doda brom (2,26 g, 14,14 mmol). Ovako pripremljen rastvor broma dodaje se uz mešanje u dietil-etarski rastvor holesterola pri čemu se formira žuti talog. Smesa se ohladi na ledenom kupatilu a potom se filtrira preko Bihnerovog levka. Talog se na levku ispira sirćetnom kiselinom dok filtrat ne postane bezbojan. Dobijeni 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -holesterol suši se na sobnoj temperaturi, na vazduhu. Prinos je 5–6 g (60–70%). Razvijlač za TLC: cikloheksan/acetan 4:1.

---

<sup>†</sup>Ukoliko je potrebno rastvor se zageva na vodenom kupatilu, uz povratni hladnjak, do potpunog rastvaranja holesterola, a zatim se rastvor ohladi do sobne temperature.

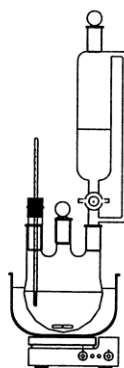
## Sinteza 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholestan-3-ona (3)

### PRIBOR:

1. Trogrli balon sa okruglim dnom (500 ml)
2. Levak za dokapavanje (100 ml)
3. Magnetna mešalica sa jezgrom
4. Termometar
5. Vakuum boca
6. Stativ sa klemama
7. Ledeno kupatilo
8. Bihnerov levak
9. Filter hartija

### REAGENSI:

1. 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Dibromholesterol
2. Sirćetna kiselina (glacijalna)
3. Natrijum-dihromat
4. Metanol



Slika 3.10. Aparatura za dobijanje jedinjenja 3.

### POSTUPAK:

U trogrli balon sa okruglim dnom, koji je snabdeven magnetnom mešalicom, levkom za dokapavanje i termometrom (Slika 3.10) stavi se 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholesterol (5,00 g, 9,15 mmol) i

sirćetna kiselina (70 ml). Suspenzija se meša 10 minuta na vodenom kupatilu (25–30 °C). U levak za dokapavanje nalije se topao rastvor (oko 90 °C) natrijum-dihromata (2,66 g, 10,15 mmol) u glacijalnoj sirćetnoj kiselini (66 ml) koji se dokapava u malim porcijama uz neprekidno mešanje u toku 10 minuta. Reakcija je egzotermna pa se temperatura reakcione smeše mora održavati u intervalu 55–58 °C (povremenim hlađenjem pomoću ledenog kupatila). Tri do pet minuta nakon završenog dodavanja rastvora dihromata, celokupan 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dibromholesterol prelazi u rastvor. Mešanje se zatim prekida i reakciona smesa ostavi u ledenom kupatilu 10 minuta, pri čemu se izdvoje kristali dibromketona **3**. Mešanje se nastavi bez hlađenja, pri čemu se temperatura koja je u međuvremenu pala na +10 °C podigne na 25 °C. U reakcionu smesu se doda 25 ml vode i smesa ohladi na ledenom kupatilu na 15 °C. Kristali se odvoje filtriranjem preko Bihnerovog levka, isperu se sa 10 ml metanola, suše 20 minuta u vakuumu i ponovo isperu sa 10 ml svežeg metanola. Prinos dibromketona **3** je 5,5 g (70%), a tt 73–75 °C. Razvijlač zaTLC: cikloheksan/aceton 4:1.

### **Sinteza $\Delta^5$ -holesten-3-ona (4)**

#### **PRIBOR:**

1. Trogri balon sa okruglim dnom (250 ml)
2. Balon sa okruglim dnom (100 ml)
3. Magnetna mešalica sa jezgrom
4. Termometar
5. Erlenmajer (250 ml)
6. Levak za odvajanje (250 ml)
7. Bihnerov levak
8. Vakuum boca
9. Filter hartija
10. Univerzalna indikatorska hartija
11. Stativ sa klemama
12. Stativ sa prstenom
13. Ledeno kupatilo

#### **REAGENSI:**

1. Dietil-etar
2. Piridin

3. Glacijalna sirćetna kiselina
4. Anhidrovani natrijum-sulfat
5. Cink u prahu
6. Vodeni rastvor natrijum-hidrogenkarbonata (10% w/v)

#### POSTUPAK:

5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Dibromholestan-3-on (5,00 g, 5,19 mmol), dietil-etar (70 ml) i glacijalna sirćetna kiselina (0,8 ml) stave se u trogri balon snabdeven magnetnim jezgrom i termometrom. Suspenzija se hladi uz mešanje na ledenom kupatilu i kada temperatura dostigne 0–5 °C doda se cink u prahu (0,17 g). Reakcija debromovanja je egzotermna, pa se temperatura reakcione smeše mora održavati na 15–20 °C. Nakon 5 minuta doda se druga porcija cinka u prahu (1,61 g, 2,46 mmol) i mešanje nastavi u toku sledećih 10 minuta, a zatim se uz neprekidno mešanje doda piridin (4 ml), pri čemu se talože nagrađene soli cinka. Smesa se filtrira preko Bihnerovog levka, a talog ispere dietil-etrom. Bezbojni filtrat se prenese u levak za odvajanje i ispira vodom (2 × 10 ml), a zatim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata, do potpune neutralizacije sirćetne kiseline, što se utvrđuje pomoću univerzalne indikatorske pH hartije. Dietil-etarski ekstrakt se prenese u erlenmajer i suši anhidrovanim natrijum-sulfatom. Nakon sušenja, dietil-etarski rastvor se prenese u balon i koncentruje na rotacionom vakuum uparivaču do zapremine od oko 30 ml, a zatim mu se doda metanol (15 ml). Rastvor se ostavi na sobnoj temperaturi, pri čemu se izdvajaju kristali  $\Delta^5$ -holesten-3-ona (**4**). Kristali se odvoje filtracijom preko Bihnerovog levka, a zatim se suše na vazduhu, na sobnoj temperaturi. Prinos  $\Delta^5$ -holesten-3-ona (**4**) je 2,5–3 g (60–70%), tt 124–129 °C. Razvijač za TLC: cikloheksan/aceton 4:1 (pločiva se razvija dva puta).

### Sinteza $\Delta^4$ -Holesten-3-ona (**5**)

#### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (100 ml)
2. Povratni hladnjak
3. Kalcijum-hloridna cev
4. Bihnerov levak
5. Vakuum boca
6. Filter hartija
7. Stativ sa klemama
8. Magnetna mešalica sa jezgrom

## 9. Vodeno kupatilo

### REAGENSI:

1.  $\Delta^5$ -Holesten-3-on
2. Anhidrovana oksalna kiselina
3. Etanol

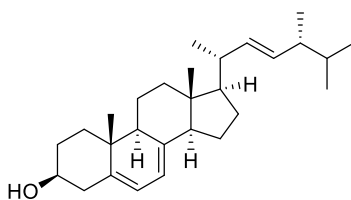
### POSTUPAK:

U balon sa okruglim dnom snabdevenim povratnim hladnjakom i kalcijum–hloridnom cevi, stavi se  $\Delta^5$ -holesten-3-on (5,00 g, 13,00 mmol), anhidrovana oksalna kiselina (0,5 g, 5,55 mmol) i etanol (40 ml). Reakciona smesa se zagreva na vodenom kupatilu sve dok se sadržaj ne rastvori (oko 15 minuta), a zatim se zagrevanje nastavi sledećih 10 minuta. Po završenom zagrevanju smesa se ostavi na sobnoj temperaturi u toku 1 h, pri čemu se izdvajaju kristali. Ako se u predviđenom vremenu ne izdvoje kristali, kristalizacija se inicira inokulacijom („pelcovanjem“) sa kristalima  $\Delta^4$ -holesten-3-ona (**5**), ili trljanjem zidova balona staklenim štapićem. Kristali se odvoje filtriranjem preko Bihnerovog levka, pri čemu se dobija oko 4,5 g (90%) čistog proizvoda **5**, tt 81–82 °C.

Čistoća dobijenog proizvoda se proverava hromatografijom na tankom sloju silika-gela, upoređivanjem sa standardnom supstancom **5**, u sistemu rastvarača toluen/etil-acetat 4:1. Holestenon **5** ima veću  $R_f$  vrednost od holesterola zbog manje polarnosti keto grupe u odnosu na alkoholnu.

### 3.4.2. Izolovanje ergosterola iz kvasca

Predstavnik mikosterola koji se nalazi u kvascu, plesnima (*Aspergillus niger*, *Neurospora*), lišajevima i mnogim gljivičnim mikroorganizmima je ergosterol (**1**, Šema 3.15). Tarnet je još 1889. godine prvi put izolovao ergosterol iz glavnice raži (koja se razvija kada se neoplođeni cvet raži zarazi gljivicom *Claviceps purpurea*). Ergosterol je bela kristalna supstanca, kristališe u zavisnosti od rastvarača sa jednim ili više molekula vode, pa mu tačka topljenja zavisi od postupka kristalizacije. Nerastvoran je u vodi ali se dobro rastvara u mnogim organskim rastvaračima kao što su etanol, dietil-etar, benzen, hloroform i drugi.



Ergosterol (1)

Šema 3.15.

Prisustvo konjugovanog dienskog sistema u prstenu B ergosterola omogućilo je njegovu upotrebu za fotohemijsko dobijanje ergokalciferola (vitamina D<sub>2</sub>). Za tu svrhu, ergosterol se dobija izolovanjem iz kvasca.

#### PRINCIP RADA:

Ergosterol se dobija alkalnom ekstrakcijom iz svežeg kvasca, a zatim prečišćava rekristalizacijom iz 60% etanola ili iz smese acetona i dietil-etera.

#### PRIBOR:

1. Balon sa okruglim dnom (1 × 500 ml, 1 × 100 ml)
2. Libigov kondenzator
3. Bihnerov levak
4. Vakuum boca
5. Filter hartija
6. Stativ sa klemama
7. Magnetna mešalica sa jezgrom
8. Vodeno kupatilo
9. Silikonska mast
10. Epruvete (2 kom.)
11. Stalak za epruvete

**IZVOR ERGOSTEROLA:** Svež pekarski kvasac

#### REAGENSI:

1. 95% Etanol
2. Dietil-etar

3. Aceton
4. Kalijum-hidroksid
5. Hloroform
6. Trihlorsirćetna kiselina (90%)
7. Bromovodonična kiselina (20% rastvor u hloroformu)

#### **POSTUPAK:**

U balon sa okruglim dnom koji je snabdeven sa povratnim hladnjakom stavi se usitnjen pekarski kvasac (100 g), etanol (200 ml) i kalijum-hidroksid (20 g)<sup>‡</sup>. Reakciona smesa se zagreva na ključalom vodenom kupatilu u toku 6 h a zatim se filtrira preko Bihnerovog levka. Talog se vrati u balon i ponovo ekstrahuje alkoholnim rastvorom kalijum-hidroksida (3,5 g KOH u 125 ml EtOH) u toku 2 h, a zatim se talog odvoji filtriranjem. Alkoholni ekstrakti se spoje i upare na rotacionom vakuum uparivaču do 2/3 početne zapremine. Koncentrovani rastvor se ostavi u frižideru u toku 24 h, pri čemu se formiraju kristali ergosterola. Dobijeni kristali se odvoje filtriranjem preko Bihnerovog levka i prečiste kristalizacijom iz dietil-etra zagrejanog do ključanja, ili iz smese acetona i dietil-etra (3:1), pri čemu se ergosterol dobija u vidu igličastih kristala. Prinos ergosterola 0,15 g (0,15%), a tt 164 °C. Razvijač za TLC: cikloheksan/aceton 7:3.

#### **Bojene reakcije ergosterola:**

**Rosenheimova reakcija:** U epruveti se rastvori nekoliko suvih kristala ergosterola u hloroformu (1 ml) i doda nekoliko kapi 90% trihlorsirćetne kiseline. Dobija se crvena boja koja stajanjem prelazi u plavu. Ovom reakcijom se dokazuje dienski sistem ergosterola.

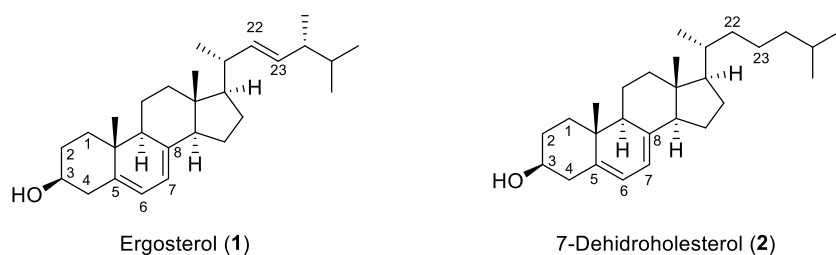
**Hausseler-Branchlieva reakcija:** Nekoliko kristala ergosterola se stavi u epruvetu, doda se glacijalna sirćetna (1 ml) i bromovodonična kiselina (2 ml). Rastvor se boji zeleno.

---

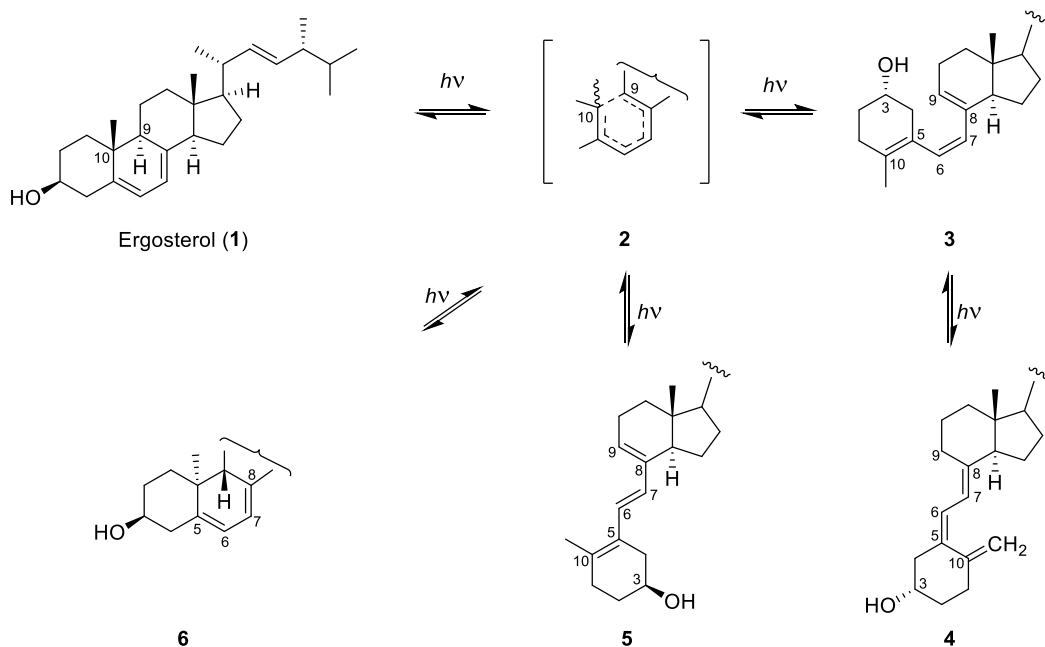
<sup>‡</sup> Brušeni deo hladnjaka treba premazati tankim slojem silikonske masti, da bi se izbeglo izdvajanje čvrstog kalijum-hidroksida na kontaktu između ovog dela hladnjaka i grlića balona, što vodi prekomernom zaptivanju i otežava odvajanje hladnjaka.

### 3.4.3. Dobijanje vitamina D<sub>2</sub>

Vitamin D<sub>2</sub> gradi se fotohemijskom transformacijom sterola sa konjugovanim  $\Delta^{5,7}$ -dienskim sistemom u prstenu B. Pojedini vitamini iz grupe D razlikuju se po strukturi bočnog niza, odnosno po strukturi njihovih prekursora – *provitamina*. Prekursori najvažnijih vitamina D grupe, ergokalciferola (D<sub>2</sub>) i holekalciferola (D<sub>3</sub>), su ergosterol (**1**) i 7-dehidroholesterol (**2**, Šema 3.16).



Šema 3.16.



Šema 3.17. Fotohemijska transformacija ergosterola (**1**).



Fotohemijsku transformaciju ergosterola objasnio je Velluz još 1955. godine. Naime, pri ozračivanju ergosterola UV zracima, preko aktivnog intermedijera **2** nastaje ravnotežna smesa lumisterola (**6**), tahisterola (**5**) i previtamina D<sub>2</sub> (preergokalciferola, **3**). Previtamin D<sub>2</sub> (**3**) se transformiše u vitamin D<sub>2</sub> (**4**) termičkim sigmatropnim premeštanjem (*Šema 3.17*).

#### **PRINCIP RADA:**

Dietil-etarski rastvor ergosterola izloži se dejstvu UV zraka u toku nekoliko minuta, pri čemu istovremeno dolazi do blagog zagrevanja, pa nastaju tahisterol (**5**) i vitamin D<sub>2</sub> (**4**), kao glavni reakcioni proizvodi, koji se mogu identifikovati hromatografski.

#### **PRIBOR:**

1. Balon sa okruglim dnom od kvarcnog stakla
2. Libigov kondenzator
3. Kalcijum-hloridna cev
4. Stativ sa klemama
5. UV lampa

#### **REAGENSI:**

1. Ergosterol
2. Apsolutni dietil-etar

#### **POSTUPAK:**

Ergosterol (5 mg) i apsolutni dietil-etar (20 ml) stave se u balon sa okruglim dnom koji je snabdeven povratnim hladnjakom i kalcijum-hloridnom cevi i izlože UV zračenju u toku 8 minuta. Nakon ozračivanja dietil-etarski rastvor se analizira hromatografijom na tankom sloju silika-gela.

### **3.4.4. Identifikacija vitamina D<sub>2</sub> hromatografijom na tankom sloju**

#### **PRINCIP RADA:**

Vitamin D<sub>2</sub> može se identifikovati u ozračenom uzorku ergosterola tankoslojnom hromatografijom na silika-gelu. Pored vitamina D<sub>2</sub> hromatogram pokazuje i mrlju tahisterola.

**PRIBOR:**

1. Aluminijska (ili staklena) TLC pločica
2. Kada za hromatografiju
3. Erlenmajer sa brušenim čepom
4. Staklene kapilare

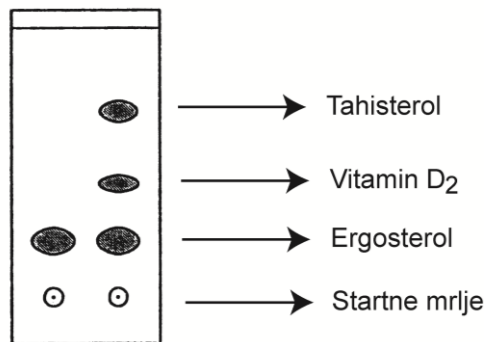
**IZVOR VITAMINA D<sub>2</sub>:** Ozračeni dietil-etarski rastvor ergosterola

**REAGENSI:**

1. Dietil-etar
2. Cikloheksan
3. Aluminijske TLC pločice
4. Sumporna kiselina (1:1)

**POSTUPAK:**

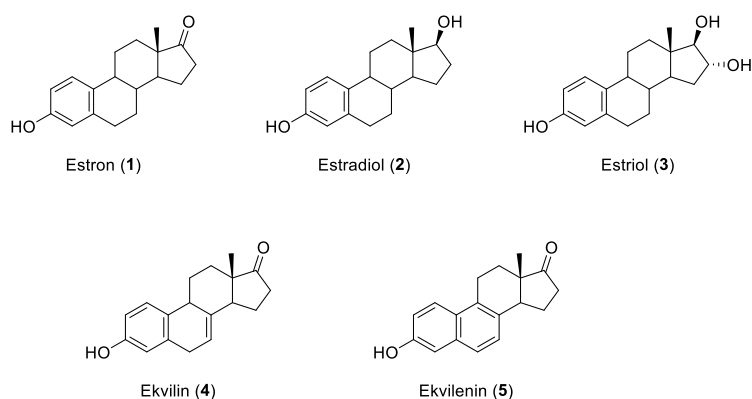
Dietil-etarski rastvor ergosterola, prethodno ozračen UV zracima, nanosi se na aluminijsku TLC pločicu. Kao referentna supstanca, pored reakcione smese, nanosi se uzorak ergosterola (dietil-etarski rastvor ergosterola koji nije ozračen). Hromatogram se razvija u sistemu rastvarača cikloheksan/dietil-etar 1:1. Hromatogram se izaziva prskanjem sa sumpornom kiselinom (1:1) a zatim zagreva u sušnici, pri čemu se javljaju tamno-smeđe mrlje ergosterola, vitamina D<sub>2</sub> i tahisterola (Slika 3.11).



Slika 3.11. TLC pločica ergosterola ozračenog UV zracima.

### 3.4.5. Estrogeni hormoni

C-18 Steroidni hormoni nastaju uglavnom u folikulima jajnika za vreme menstrualnog ciklusa. Svi estrogeni su derivati ugljovodonika estrana. Opšta strukturna karakteristika ove grupe je aromatičnost prstena A, pa je stoga C<sub>3</sub>-OH grupa fenolnog karaktera. Pored toga, zbog aromatične strukture prestena A estrogeni nemaju angularnu metil grupu na C-10. Najvažniji estrogeni su: estron (1), estradiol (2) i estriol (3; Šema 3.18).



Šema 3.18. Predstavnici estrogenih hormona.

Pored navedenih, u urinu gravidnih kobila (*equus* – latinski, konj) otkrivena su još dva estrogena hormona: *ekvilin* (4) i *ekvilenin* (5; Šema 3.18). Ovi steroidni hormoni nalaze se u urinu u obliku glukuronida i sulfatnih estara, pa se zato uzorak urina, u cilju dobijanja estrogena, hidrolizuje pre ekstrakcije rastvaračima.

#### ODREĐIVANJE ESTRIOLA U GRAVIDITETU PO ITTRICH-U

##### PRINCIP VEŽBE:

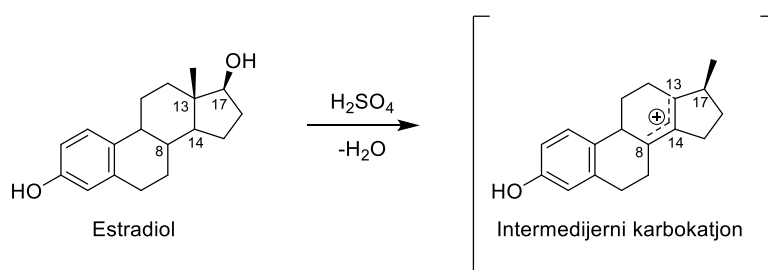
Ittrich-ovom metodom se određuju ukupni estrogeni u urinu. S obzirom na to da se 90% estrogena nalazi u obliku estrogenih konjugata, sadržaj estrogenih hormona se izražava preko estriola. Metoda se sastoji iz sledećih faza:

1. Kisela hidroliza razblaženog uzorka urina (koji sadrži sulfate i glukuronide estrogena).

2. Izvođenje Kober-ove reakcije sa koncetrovanom sumpornom kiselinom i hidrohinonom.
3. Ekstrakcija formiranog kompleksa sa *p*-nitrofenolom u hloroformu.
4. Centrifugiranje na 2000 o/min i odvajanje Kober-ovih interferirajućih hromogena vakuum aspiracijom.
5. Spektrofotometrijsko određivanje dobijenog ružičasto obojenog kompleksa na tri talasne dužine (500, 540 i 580 nm) uz obaveznu Allen-ovu korekciju. (Allen-ova korekcija podrazumeva: zbir vrednosti apsorbance na 500 i 580 nm se deli sa dva i oduzima od vrednosti apsorbance na 540 nm).

Metoda je brza i relativno jednostavna, a dovoljno je precizna da predstavlja jedan od glavnih indikatora stanja fetusa u trudnoći sa visokim rizikom, u kojem je nagli pad estrogena najosetljiviji parametar za otkrivanje fetalnog distresa.

Mogući mehanizam Kober-ove reakcije prikazan je na primeru estradiola (Šema 3.19). U prvoj fazi verovatno dolazi do eliminacije hidroksilne grupe sa C-17 nakon prethodnog protonovanja. Intermedijerno formirani karbonijum jon podleže anjonotropnom premeštanju angularne metil grupe sa C-13 na C-17. Karbonijum jon inicira premeštanje hidridnog anjona sa C-14 pri čemu se pozitivno naelektrisanje premešta na C-14. Na isti način se tercijarni karbonijum jon može premestiti na C-8, nakon migracije H-8 na susedni C-14 položaj. Ovakve migracije pozitivnog naelektrisanja moguće su i u reverzibilnom smislu.



Šema 3.19. Mogući mehanizam Kober-ove reakcije na primeru estradiola.  
Formiranje intermedijernog karbokatjona.

U slučaju estrona prvo se verovatno redukuje karbonilna grupa na C-17 hidrohinonom pri čemu nastaje estradiol.

**PRIBOR:**

1. Epruvete
2. Pipete (1 i 5 ml)
3. Spektrofotometar

**REAGENSI:**

1. Rastvor *p*-nitrofenola u hloroformu (2 g *p*-nitrofenola rastvoriti u 100 ml hloroforma)
2. Hidrohinon
3. Koncetrovana sumporna kiselina

**POSTUPAK:**

Izmeri se 24-časovna diureza (urin trudnice poznate odmaklosti trudnoće) i od toga za rad uzme 1 ml urina i razblaži sa 4 ml destilovane vode. U epruvetu (18 × 180 mm) se izmeri 20 mg hidrohinona i doda 0,5 ml razblaženog urina. U rastvor se zatim doda 0,97 ml koncetrovane sumporne kiseline, sadržaj epruvete promućka i zagreva na ključalom vodenom kupatilu u toku 40 minuta. Sadržaj epruvete se ohladi na ledenom kupatilu u toku 3 minuta, a zatim se u rastvor doda 1,5 ml destilovane vode. Epruveta se blago promućka, a zatim se ponovo hladi u toku dodatna 3 minuta. Nakon toga, u rastvor se doda 2,5 ml 2% *p*-nitrofenola. Epruveta se zatvori gumenim čepom, sadržaj intezivno promućka i prenese u kivetu za centrifugiranje. Centrifugiranjem na 2000 o/min u toku 2 minuta odvajaju se dva sloja. Gornji (vodeni sloj) se odvoji aspiracijom u vakuumu, ili se donji (hloroformski) sloj prenese u spektrofotometrijsku kivetu pomoću Pasterove pipete. Merenje se izvodi uz hloroform kao slepu probu, na 500, 540 i 580 nm.

**IZRAČUNAVANJE REZULTATA:**

$$x = (A \times F \times dU)/M$$

pri čemu je:

- |           |  |
|-----------|--|
| <i>x</i>  | koncetracija estriola u $\mu\text{mol}/dU$ |
| <i>A</i>  | korigovana vrednost apsorbance             |
| <i>F</i>  | faktor standardne krive (336 vrednost)     |
| <i>M</i>  | Molekulska masa estriola (288,4)           |
| <i>dU</i> | 24-časovna diureza (1250 ml)               |

Dobijeni rezultati se upoređuju sa referentnim vrednostima hormona u graviditetu (Tabela 3.1). Koeficijent F se određuje iz standardne krive koja se dobija koristeći poznate koncentracije estriola uz pripremanje sveže količine rastvora *p*-nitrofenola.

**Tabela 3.1.** Referentne vrednosti hormona u graviditetu.

Nedelja graviditeta	Estriol ( $\mu\text{mol/dU}$ )
Do 10 nedelja	3,4–17,3
10–12 nedelja	6,9–27,7
12–14 nedelja	13,8–38,1
14–16 nedelja	17,3–41,6
16–18 nedelja	20,8–55,4
18–20 nedelja	20,8–62,4
20–22 nedelja	31,2–86,6
22–24 nedelja	34,6–104,0
24–26 nedelja	41,6–121,3
26–28 nedelja	48,5–131,8
28–30 nedelja	52,0–145,6
30–32 nedelja	62,4–156,0
32–34 nedelja	83,2–159,5
34–36 nedelja	97,0–166,4
36–38 nedelja	107,4–167,0
38–40 nedelja	110,9–170,0

Trudnoća traje 10 lunarnih meseci (9 kalendarskih), odnosno 40 nedelja.

### Konstrukcija kalibracione krive za određivanje estriola

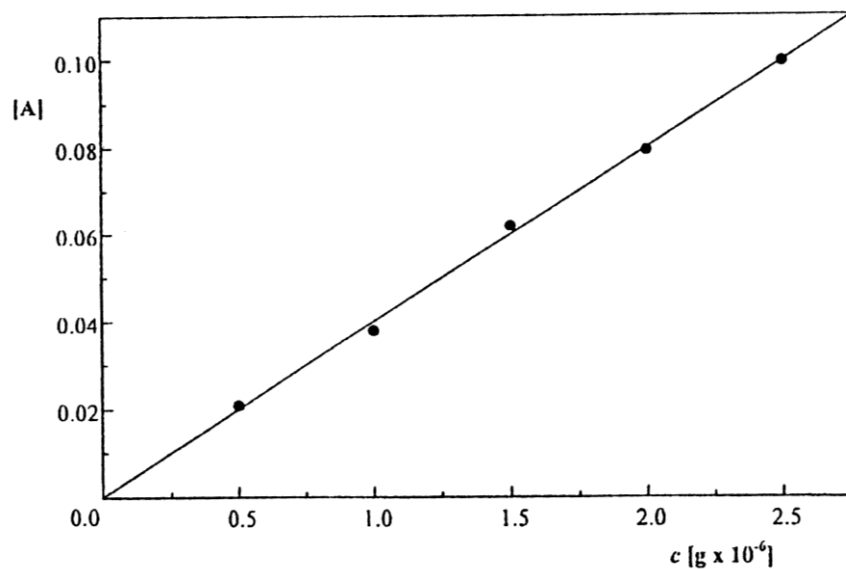
Osnovni standardni rastvor estriola se priprema rastvaranjem 10 mg estriola u apsolutnom metanolu, u odmernom sudu od 100 ml. Radni standardni rastvor estriola se dobija kad se 10 ml osnovnog standarda razblaži apsolutnim etanolom do 100 ml. Od standardnog rastvora otpipetiraju se određene zapremine rastvora estriola i prebace se u obeležene epruvete (Tabela 3.2).

Odmereni rastvori estriola upare se do suva zagrevanjem epruveta na ključalom vodenom kupatilu. Nakon uparavanja etanola, epruvete se ohlade u eksikatoru, a ostatku u epruvetama doda se po 20 mg hidrohina i po 1 ml razblažene sumporne kiseline (6,8 ml cc  $\text{H}_2\text{SO}_4$  razblaži se sa 13,2 ml destilovane vode). Rastvori se zagrevaju na ključalom vodenom kupatilu u toku 40 minuta. Nakon hlađenja na ledenom kupatilu u toku 3 minuta u svaku epruvetu se doda po 1,5 ml destilovane vode, i nakon 3 minuta po 2,5 ml 2%-nog rastvora *p*-nitrofenola u hloroformu.

Sadržaj epruveta se promućka, donji (organski) sloj se pomoću Pasterove pipete prenese u kivetu za spektrofotometriju i odrede apsorbance na 500, 540 i 580 nm. Kalibraciona kriva (Slika 3.12) konstruiše se tako što se na ordinatu nanose vrednosti apsorbance posle Allen-ove korekcije, a na apscisu se nanosi koncentracija estriola. Faktor krive (F) odgovara količniku koncentracije standarda ( $C_x$ ) i korigovane vrednosti apsorbance ( $A_x$ ):  $F = C_x/A_x$ .

**Tabela 3.2.** Rastvori estriola za konstrukciju kalibracione krive.

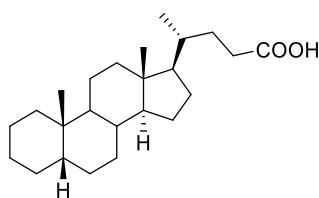
Broj epruvete	Zapremina rastvora estriola (ml)	Količina estriola ( $\text{g} \times 10^{-6}$ )
1	0,05	0,5
2	0,10	1,0
3	0,15	1,5
4	0,20	2,0
5	0,25	2,5
6	0,40	4,0
7	0,50	5,0
8	0,60	6,0



Slika 3.12. Kalibraciona kriva za određivanje estriola.

### 3.4.6. Žučne kiseline

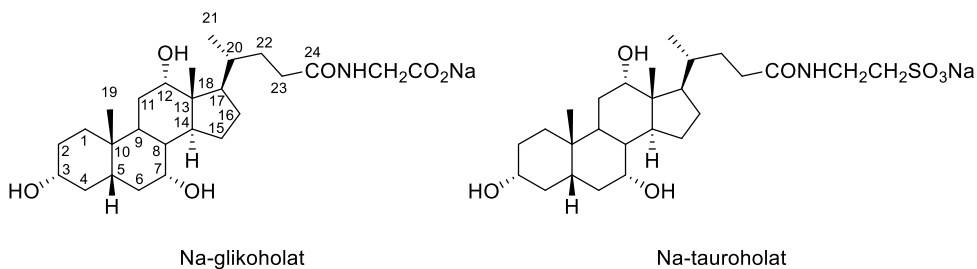
Žuč iz jetre teče u žučnu kesu, odakle se po potrebi izliva u *duodenum* zajedno sa sekretom pankreasa. Pored pigmenata, holesterola i lecitina, žuč sadrži i žučne kiseline. Prirodne žučne kiseline su derivati holanske kiseline (Šema 3.20) koja nije prisutna u žuči. Žučne kiseline iz žuči sisara konjugovane su sa glicinom ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) i taurinom ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ).



Holanska kiselina

Šema 3.20.

**Holna kiselina** je  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksiholanska kiselina i predstavlja najdominantniju kiselinu u čovekovoj i goveđoj žuči, kao i u žuči drugih kičmenjaka. Konjugovana sa glicinom zove se glikoholna, a sa taurinom tauroholna kiselina. Oba pomenuta konjugata u žuči su prisutna u obliku odgovarajućih natrijumovih soli tzv. „konjugovanih“ žučnih kiselina koje se nazivaju i žučne soli (Šema 3.21).



Na-glikoholat

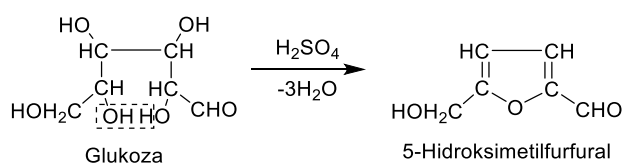
Na-tauroholat

Šema 3.21.



## DOKAZIVANJE ŽUČNIH KISELINA

Za kvalitativno dokazivanje žučnih kiselina obično se primenjuje Pettenkoffer-ova reakcija, kao i proba smanjenja površinskog napona. Kod Pettenkoffer-ove reakcije saharoza se pri dejstvu koncentrovane sumporne kiseline hidrolizuje i prevodi u hidroksimetilfurfural koji sa žučnim kiselinama daje obojeno kompleksno jedinjenje (Šema 3.22).



Šema 3.22. Pettenkoffer-ova reakcija.

Proba smanjenja površinskog napona zasniva se na emulgacionim osobinama konjugovanih žučnih kiselina, koje se ponašaju kao površinski aktivne materije. Pošto je ova proba veoma osetljiva, žučne kiseline se na ovaj način mogu dokazati i pri velikom razblaženju (1:120.000).

### PRIBOR:

1. Epruvete
2. Kapalice
3. Špatula

### REAGENSI:

1. Goveđa ili svinjska žuč
2. 10% rastvor saharoze
3. Koncentrovana sumporna kiselina

### POSTUPAK:

**Pettenkoffer-ova reakcija:** U epruvetu se sipa 1 ml žuči i razblaži sa 4 ml destilovane vode. U ovaj rastvor se doda 1–2 kapi vodenog rastvora saharoze, pa se sadržaj epruvete energično promućka. Nakon toga, uz zid epruvete se pažljivo dodaje 1–2 ml cc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na granici između dva rastvora formira se crveno-ljubičasti prsten.

**Proba smanjenja površinskog napona:** U jednu epruvetu se sipa 10 ml destilovane vode a u drugu 5 ml žuči i 5 ml destilovane vode. Epruvete se ohlade na ledenom kupatilu (10–15 °C). Na površinu tečnosti u obe epruvete se zatim sipa malo sumpornog praha. U epruveti sa destilovanom vodom sumpor ostaje na površini, dok se u epruveti sa rastvorom žuči taloži na dno, kao posledica smanjenja površinskog napona vode pod uticajem žučnih kiselina.

## **4. ALKALOIDI**

Alkaloidi su prirodna organska jedinjenja sa manje ili više izraženim baznim karakterom. Obavezno sadrže azot i često imaju veoma složenu molekulsku strukturu. S obzirom na to da pokazuju fiziološku aktivnost, primenjuju se u medicini kao lekovi, a često se zloupotrebljavaju kao opojna sredstva za uživanje. Alkaloidi se u prirodi nalaze uglavnom u biljkama i to u različitim delovima (listu, korenu, kori ili semenu). Obično se nalaze u obliku soli, a ređe kao slobodne baze. Sadržaj alkaloida u biljkama varira i zavisi od lokaliteta, godišnjeg doba, kao i od postupka čuvanja i skladištenja biljnih delova koji sadrže alkaloide.

### **4.1. Izolovanje alkaloida iz biljnog materijala**

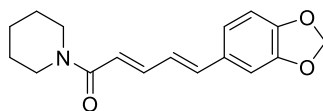
Postupak izolovanja alkaloida u velikoj meri zavisi od vrste biljnog materijala, kao i od njegovih hemijskih osobina. Postupak izolovanja obično počinje usitnjavanjem delova biljaka u kojima se alkaloidi nalaze, a zatim se usitnjeni biljni materijal ekstrahuje u cilju izdvajanja željenih supstanci. Ekstrakcija se može izvoditi na nižoj ili povišenoj temperaturi, u zavisnosti od termičke stabilnosti prisutnih alkaloida. Obično se biljni materijal prvo ekstrahuje razblaženim kiselinama, kao što su hlorovodonična, sumporna ili sirćetna (pri čemu se alkaloidi prevode u odgovarajuće soli), ili alkoholima (metanolom ili etanolom). Ekstrakcija se na sobnoj temperaturi obično izvodi 24–48 h, a zatim se nerastvorni deo odvaja filtriranjem. Kiseli ekstrakti se zatim tretiraju natrijum-karbonatom, kalcijum-hidroksidom, natrijum-hidroksidom ili amonijum-hidroksidom, pri čemu se alkaloidi izdvajaju u obliku slobodnih baza. Iz vodenog rastvora, suspenzije ili emulzije, alkaloidi se mogu izdvojiti ekstrakcijom hloroformom ili dietil-etrom, a ponekad i destilacijom sa vodenom parom.

Ako alkaloid destiluje sa vodenom parom, onda se izoluje iz biljnog materijala tako što se usitnjeni delovi biljke tretiraju sa bazama, a zatim se dobijeni alkalni ekstrakt destiluje sa vodenom parom. Tako se, na primer, dobija nikotin iz lišća duvana. Destilat se zatim ekstrahuje pogodnim organskim rastvaračem, koji se nakon sušenja udalji destilacijom u vakuumu, pri čemu se dobija ostatak koji obično predstavlja smesu alkaloida.

Iz ovako dobijene smese alkaloidi se identifikuju specifičnim reakcijama ili hromatografskim metodama, a mogu se razdvojiti apsorpcionom hromatografijom na koloni aluminijum-oksida, odnosno silika-gela. Ako se alkaloidi međusobno razlikuju po baznosti, složene smese se mogu razdvojiti i preparativnom hromatografijom na koloni jonskih izmenjivača, ili frakcionim taloženjem iz nevodnih rastvora, selektivnim građenjem soli sa razblaženim mineralnim kiselinama.

#### 4.1.1. Izolovanje piperina iz crnog bibera

Piperin (**1**, Šema 4.1) pripada grupi *piperidinskih alkaloida* i prisutan je u plodovima različitih vrsta bibera (*Piper nigrum*, *Piper longum*). Prvi put je izolovan iz plodova *Piper famochoni* i *Piper chaba*. Uzrok je ljutog ukusa bibera. To je žuta kristalna supstanca,  $t_f$  129 °C, slabo rastvoran u vodi, a lako u organskim rastvaračima.



Piperin (1)

Šema 4.1.

#### PRINCIP RADA:

Piperin iz crnog bibera se izoluje ekstrakcijom sa etanolom. Koncentrovani alkoholni ekstrakt oslobađa se pratećih primesa dodatkom rastvora kalijum-hidroksida, nakon čega kristališe čist alkaloid.

#### PRIBOR:

1. Aparatura za ekstrakciju po Soksletu
2. Bihnerov levak
3. Vakuum boca (500 ml)
4. Filter hartija
5. Baloni sa okruglim dnom (100 ml i 250 ml)
6. Vodeno kupatilo

7. Magnetna mešalica sa jezgrom
8. Stativ sa klemama
9. Epruveta
10. Aluminijska (ili staklena) TLC pločica
11. Kada za hromatografiju

**IZVOR PIPERINA:** Biber u prahu (*Piper nigrum*)

**REAGENSI:**

1. 95% Etanol
2. 10% Vodeni rastvor kalijum-hidroksida
3. 1,3,5-Trinitrobenzen
4. Benzen/metanol (7,5:2,5)
5. Dragendorf-ov reagens (pripremanje: bazni bizmut-nitrat (0,85 g) se rastvori u smesi vode (40 ml) i glacijalne sirćetne kiseline (10 ml), a zatim se doda rastvor kalijum-jodida (8 g/ 20 ml vode)).

**POSTUPAK:**

Samleveni biber (10 g) se stavi u čauru za ekstrakciju koja se postavi u telo Sokslet-ovog ekstraktora. U balon ekstraktora sipa se 95% etanol (150 ml) i aparatura zagreva na ključalom vodenom kupatilu u toku 2 h. Ekstrakt se koncentruje na rotacionom vakuum uparivaču do zapremine od 20 ml. Uparenom ekstraktu se doda vodeni rastvor kalijum-hidroksida (10 ml), a izdvojene čvrste primese odvoje dekantovanjem. Bistar alkoholni rastvor ostavi se u toku noći, pri čemu se izdvoje žuti kristali piperina. Prinos piperina iznosi 0,2–0,3 g (0,2–0,3%), a  $t_f$  125–126 °C.

Čistoća izolovanog proizvoda proverava se hromatografijom na tankom sloju silika-gela. Pločica se razvija u smesi benzen/metanol 3:1, a hromatogram izaziva Dragendorf-ovim reagensom.

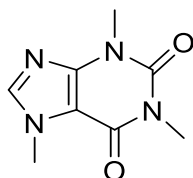
**Bojene reakcije piperina:**

1. Kristali piperina se uz zagrevanje rastvore u EtOH. Nakon dodavanja nekoliko kapi cc  $H_2SO_4$  rastvor postaje crvene boje. Pažljivim dodavanjem vode rastvor se ponovo obezbojava.

2. Kristali piperina se uz zagrevanje rastvore u EtOH. Nakon dokapavanja cc HNO<sub>3</sub> boja rastvora postaje žuto-zelena, brzo prelazi u narandžastu i na kraju i intenzivno crvenu.

#### 4.1.2. Izolovanje kofeina iz čaja

Prirodni alkaloid kofein (Šema 4.2) je po strukturi derivat purina (odnosno trimetilksantin), koji se dobija iz zrna kafe (*Coffea arabica*, w = 2%) i listova čaja (*Thea chinensis*). U manjim količinama sadrže ga i druge biljke (npr. cola-orah i kakao). Dodaje se veštačkim pićima (npr. Koka-kola).



kofein

Šema 4.2.

Kofein se smatra za najčešće korišćenu farmakološki aktivnu supstancu na svetu. Kofein je jedan od prirodnih psihostimulanasa, supstanci koje utiču na centralni nervni sistem. Nekoliko šoljica kafe ili (pravog) čaja na dan ima pobuđujuće dejstvo na naš organizam, prouzrokuje jasniji i brži tok misli, smanjuje pospanost i povećava budnost. U svom čistom obliku javlja u obliku belih kristala, bez mirisa i gorkog ukusa. Može se naći u različitim količinama u plodovima, lišću i plodovima nekih biljaka, u kojima deluje kao prirodni pesticid koji paralizuje i ubija određene insekte koji se hrane tim biljkama.

Napomene:

Glavni sastojak lišća čaja je celuloza. Budući da je ona nerastvorna u vodi, neće smetati prilikom izolovanja kofeina. Osim celuloze i kofeina, u čaju se nalaze i tanini kao i produkti njihove hidrolize kao npr. galna kiselina. Oni su rastvorni u vodi, pa ih od kofeina odvajamo ekstrakcijom. Za ekstrakciju može poslužiti hloroform, ali u tom slučaju pri jačem mućkanju u levku za odvajanje nastaje sloj emulzije koji se teško razdvaja. Zato se kao ekstrakciono sredstvo pre bira metilen-hlorid koji dopušta i malo jače protresanje levka za odvajanje.

**PRINCIP RADA:**

U cilju izolacije kofeina iz čaja, prvo se vrši ekstrakcija vrelom vodom pa metilen-hloridom jer je kofein bolje rastvoran u metilen-hloridu od drugih komponenti kao što su tanini, amino-kiseline, saponini, pigmenti i dr. Kofein se potom dodatno prečišćava kristalizacijom.

**PRIBOR:**

1. Staklena čaša (250 ml)
2. Magnetna mešalica sa jezgrom
3. Levak za odvajanje (250 ml)
4. Balon sa okruglim dnom (100 ml)

**IZVOR KOFEINA:** Zeleni čaj (kesice)

**REAGENSI:**

1. Metilen-hlorid
2. 6M Natrijum-hidroksid
3. Kofein
4. Aceton
5. Petroletar
6. Etanol

**POSTUPAK:**

Četiri kesice zelenog čaja se stave u čašu od 250 ml i preliju ključalom vodom (100 ml). Sve to se meša 10 minuta na magnetnoj mešalici, pa potom ohladi na ledenom kupatilu, kesice se ocede i filtrat prenese u levak za odvajanje (250 ml). Ekstrakcija se vrši metilen-hloridom (4 × 30 ml). Organske faze se dva puta isperu sa 6M vodenim NaOH (30 ml) i potom vodom (100 ml). Organska faza se osuši anhidrovanim natrijum-sulfatom i upari u prethodno izmerenom balonu (100 ml). Suvi ostatak se rastvori u minimalnoj količini acetona i potom se polako dodaje petroletar do zamućenja. Nakon izvesnog vremena kristališe kofein. Matični lug se odvoji i izračuna prinos kofeina po kesici čaja. Čistoća kofeina se proverava tankoslojnom hromatografijom upoređivanjem sa standardom kofeina i snimanjem IR spektra. Razvijač za pločicu je metilen-hlorid/etanol 9:1.

## 5. SEKUNDARNE REAKCIJE U BIOSINTEZI PRIRODNIH PROIZVODA

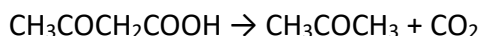
Hemijske transformacije pojedinih jedinjenja u živoj ćeliji odigravaju se izuzetno lako zbog specifičnog rasporeda i velike reaktivnosti pojedinih funkcionalnih grupa u datim molekulima. Takve reakcije se nazivaju *spontane reakcije* i uglavnom se odigravaju bez prisustva enzima. Primer jedne spontane reakcije je i dekarboksilovanje  $\beta$ -keto-kiselina.

### 5.1. Građenje ketonskih tela

Najteži poremećaj metabolizma ugljenih hidrata javlja se kada organizam ne može da obezbedi energiju degradacijom glukoze. U tom slučaju energija se dobija uglavnom razgradnjom skladišnih lipida, što je praćeno nagomilavanjem tzv. *ketonskih tela* (acetosirćetne kiseline i acetona) u organizmu. Ovakav poremećaj međusubnog odnosa katabolizma lipida i ugljenih hidrata praćen je prvo povećanjem ketonskih tela u krvi (*ketonemija*), a zatim i u urinu (*ketonurija*).

#### 5.1.1. Dokazivanje ketonskih tela u urinu po Legalu

Ketonska tela se u urinu dokazuju preko acetona. Direktni prekursor acetona je acetosirćetna kiselina, koja kao i sve  $\beta$ -keto-kiseline, lako podleže dekarboksilovanju, pri čemu se dobija aceton.

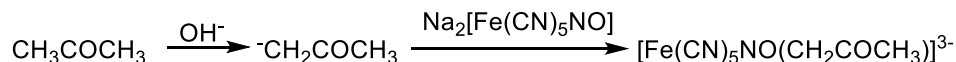


#### PRINCIP METODE:

Dokazivanje acetona u urinu po Legalu zasniva se na reakciji acetosirćetne kiseline, odnosno acetona s natrijum-nitroprusidom u alkalnoj sredini pri čemu se gradi ljubičasto obojeni



kompleks. Pozitivnu reakciju takođe daju i metaboliti salicilne kiseline i aspirina. Aceton se ovom metodom ne detektuje u urinu zdravih osoba. Međutim, test može biti negativan i kod obolelih osoba, ukoliko je uzorak urina star ili ako sadrži visoke koncentracije  $\beta$ -hidroksibutirata.



**PRIBOR:**

1. Epruveta
2. Staklena kapalica

**REAGENSI:**

1. Vodeni rastvor natrijum-nitroprusida  $\{\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \times \text{H}_2\text{O}\}$ ;  $c = 838 \text{ mmol/l}$
2. Glacijalna sirćetna kiselina
3. Amonijak

**UZORAK:** Urin

**POSTUPAK:**

U 5 ml urina doda se nekoliko kapi sveže pripremljenog rastvora Na-nitroprusida, oko 1 ml glacijalne sirćetne kiseline i sadržaj epruvete se promućka. Zatim se uz zid epruvete polako doda nekoliko mililitara amonijaka, tako da se obrazuje jasna granica između amonijaka i rastvora u epruveti. Ukoliko uzorak urina sadrži aceton, na granici dve tečne faze javiće se ljubičasti prsten.

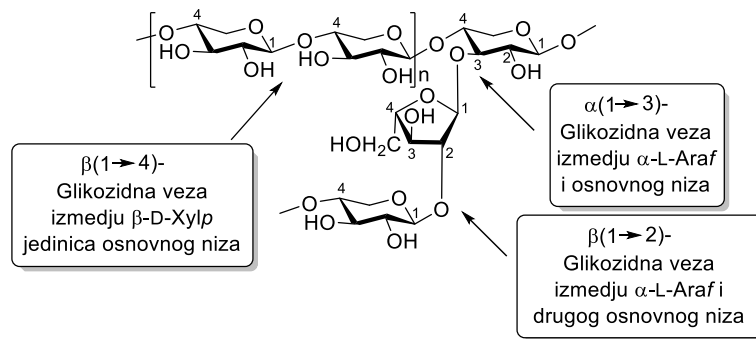
**TUMAČENJE REZULTATA:**

Pozitivna reakcija na aceton u urinu ukazuje na *ketonuriju* (odnosno ketonemiju) koja je najčešće posledica poremećaja metabolizma ugljenih hidrata. Tako na primer, ketonurija se može javiti kao posledica *Diabetes mellitus*-a („šećerne bolesti“), koji je obavezno praćen *glikozurijom* (povećanom koncentracijom glukoze u urinu). Pored toga, ketonurija se javlja i kod drugih stanja kod kojih se energetske potrebe organizma podmiruju povećanom razgradnjom skladišnih triglicerola, na primer, kod pothranjivanja (tzv. *nulta dijeta*). Međutim, u svim ovim slučajevima ketonurija nije praćena glikozurijom.

## 6. UGLJENI HIDRATI

### 6.1. Ksilani

Ksilani su polisaharidi iz grupe hemiceluloza, a sastoje se iz molekula ksilopiranoze koji su međusobno povezani  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnom vezom. Osnovni strukturni elementi ksilana su pretežno linearni nizovi relativno malih molekulskih masa i najčešće sadrže do 200 monosaharidnih jedinica. Pored  $\beta$ -D-ksilopiranoze sadrže i malu količinu  $\alpha$ -L-arabinofuranoze, koja je najčešće locirana na neredukujućem kraju niza i vezana je  $\alpha(1\rightarrow2)$  ili  $\alpha(1\rightarrow3)$  glikozidnom vezom. Pored toga, u ksilanu iz semena nekih žitarica prisutan je neterminalni  $\alpha$ -L-arabinofuranozil ostatak. Tako na primer, ksilan iz ljuske ječma sastoji se iz linearno raspoređenih molekula  $\beta$ -D-ksilopiranoze ( $\beta$ -D-Xylp), koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnom vezom, dok se u tačkama račvanja nalaze molekuli  $\alpha$ -L-arabinofuranoze ( $\alpha$ -L-Araf) koji povezuju osnovne nizove vezani  $\alpha(1\rightarrow3)$ , odnosno  $\beta(1\rightarrow2)$ , glikozidnim vezama (Šema 6.1).



Šema 6.1. Glikozidne veze u strukturi ksilana.

Pored pentoza, ksilani u svom sastavu često sadrže i D-glukuronsku kiselinu, koja može biti slobodna, metilovana ili acetilovana (Šema 6.2). Glukuronska kiselina je za osnovni niz takođe vezana  $\alpha(1\rightarrow2)$  ili  $\alpha(1\rightarrow3)$  glikozidnom vezom.

Ksilani su prisutni praktično u svim višim biljkama i zajedno sa celulozom i ligninom izgrađuju ćelijske zidove većine kopnenih biljaka.



3. Vakuum boca (1000 ml)
4. Grejna obloga (za balon od 1000 ml)
5. Libigov kondenzator

**IZVOR KSILANA:** Samlevene kukuruzne šapurike (1,25–0,125 mm)

**REAGENSI:**

1. Vodeni rastvor NaOH (1%)
2. Razblažena H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
3. Cikloheksanon
4. Kalcijum-karbonat
5. Aktivni uglj
6. Dietil-etar
7. *n*-Heksan
8. Etanol

### **6.2.1. Ekstraktivna hidroliza ksilana kukuruznih šapurika**

Suspenzija samlevenih šapurika (85 g) u 1% vodenom rastvoru NaOH (500 ml) zagreva se u balonu od 1000 ml uz blago ključanje u toku 2,5 h. Rastvor se odvoji filtracijom preko celita a talog se ispira vrelom vodom, sve dok filtrat ne postane bezbojan. Ispran talog se re-suspenduje u 7% vodenom rastvoru sumporne kiseline (500 ml) i zagreva na temperaturi ključanja u toku 2,5 h. Talog se odvoji filtriranjem preko celita, a filtrat se neutrališe čvrstim kalcijum-karbonatom. Izdvojeni kalcijum-sulfat se odvoji filtriranjem, a filtrat se obezboji zagrevanjem sa aktivnim ugljem. Bistar filtrat se upari na rotacionom vakuum uparivaču, pri čemu zaostaje sirova D-ksiloza kao žuti viskozni sirup (23,7 g, 27%).

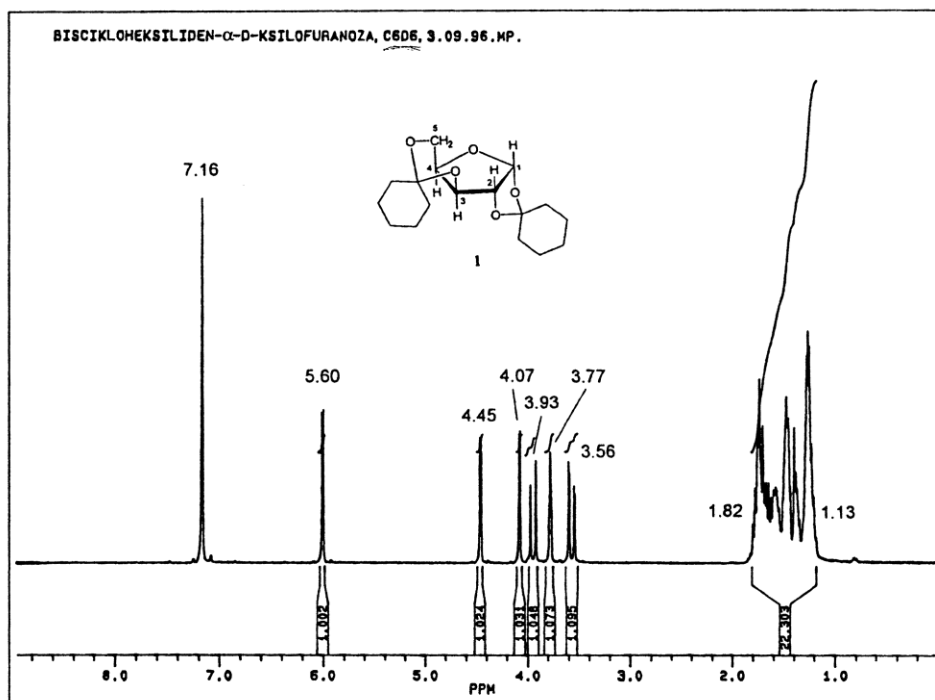
### 6.2.2. Sinteza 1,2:3,5-di-O-cikloheksiliden- $\alpha$ -D-ksilofuranoze

Suspenziji sirove D-ksiloze (10 g) u dietil-etru (55 ml) i cikloheksanonu (20 ml) postepeno i uz mešanje se dodaje koncentrovana sumporna kiselina (1,5 ml). Reakciona smesa se meša na sobnoj temperaturi u toku 24 h. Nakon odvajanja vodenog sloja u levku za odvajanje, dietil-etarski sloj se neutrališe čvrstim Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dietil-etarski rastvor se upari na rotacionom vakuum uparivaču, pri čemu zasotaje sirovi proizvod **1** (Šema 6.3), koji kristališe iz *n*-heksana. Rekrystalizacijom iz 80% vodenog etanola dobija se čist proizvod **1** (7,5 g) u obliku belih igličastih kristala, *tt* 101 °C (TLC heksan/aceton 7:3).

## 7. ANALIZA NMR SPEKTARA PRIRODNIH PROIZVODA I DERIVATA

### 7.1. 1,2:3,5-Di-*O*-cikloheksiliden- $\alpha$ -D-ksilofuranoza (1)

U protonskom NMR spektru jedinjenja **1** (Slika 7.1.1) u intervalu 3,4–6,0 ppm prisutna je grupa signala sa ukupnim integralom<sup>§</sup> od pet vodonikovih atoma (5 H), koji potiču od rezonance skeletnih protona iz furanoznog prstena.

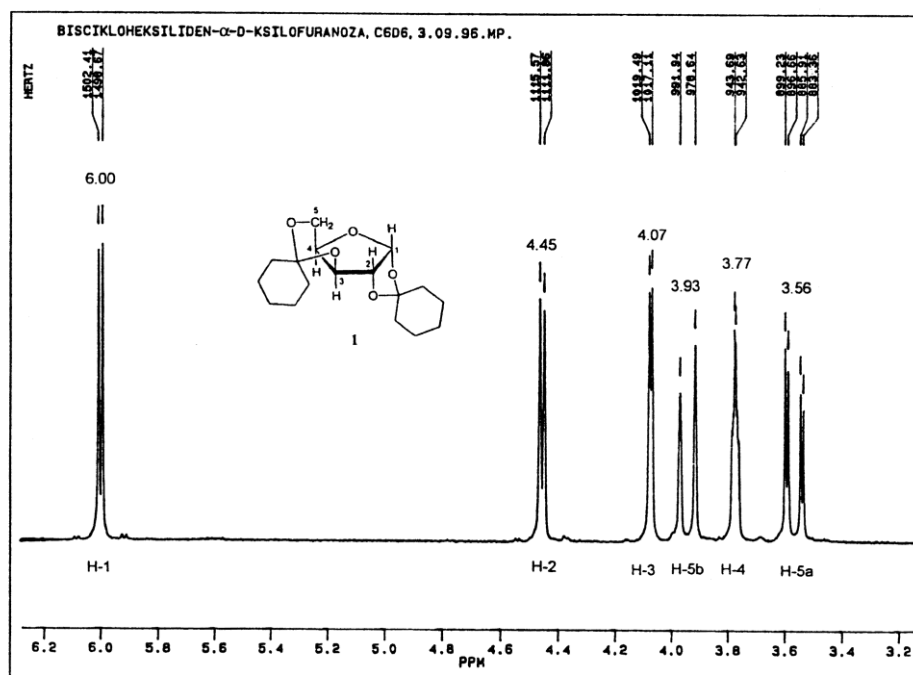


Slika 7.1.1. 250 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektar jedinjenja **1** snimljen u C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

Grupa signala u oblasti 1,13–1,82 ppm odgovara rezonanci protona iz dve cikloheksilidenske grupe. U datom molekulu ima 20 ovakvih protona, a nešto veća vrednost integrala najverovatnije je posledica prisustva tragova vode u primenjenom deuterisanom rastvaraču (deuterisani benzen, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) čiji protoni takođe apsorbuju u ovoj oblasti. Signal na 7,16 ppm potiče od rezonance protona iz benzena, neizbežne primese u komercijalnom C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

<sup>§</sup> Integral (relativni međusobni odnos hemijski različitih protona) prikazan je bročano ispod svakog signala

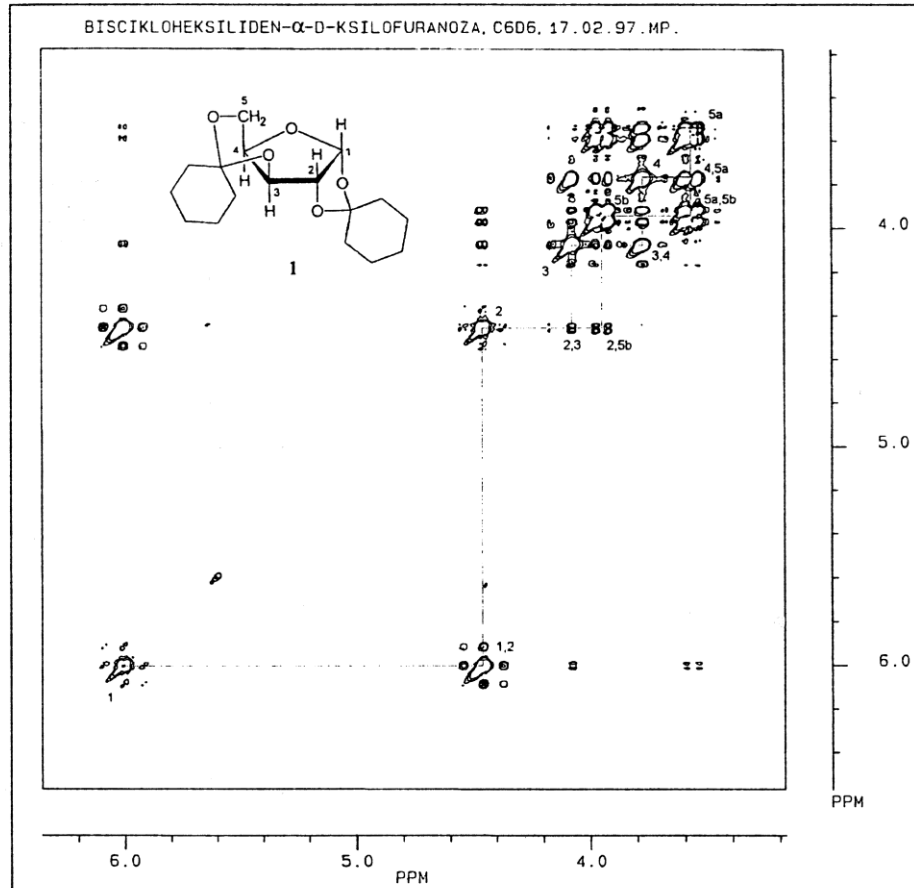
Tumačenje (asignaciju)  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **1** (Slika 7.1.1) najpogodnije je započeti od signala na 6,0 ppm (1 H) koji potiče od rezonance acetalnog protona (H-1). Ovaj proton je najlakše identifikovati po tome što apsorbuje u oblasti niskih vrednosti magnetnog polja (njegovom signalu odgovara najveće hemijsko pomeranje), jer je vezan za najelektronegativniji anomerni C-atom.



Slika 7.1.2. Deo  $^1\text{H}$  NMR Spektra jedinjenja **1** proširen u regionu skeletnih protona.

Sledeća faza analize sastoji se u posmatranju oblika signala, radi uočavanja multiplleta koji su u međusobnoj vezi preko spinskog uzajamnog dejstva. Tako na primer, dublet na 6,0 ppm (1 H) ima intenzivniji desni pik, dok dublet na 4,45 ppm pokazuje pojačani intenzitet levog pika (Slika 7.1.2). To ukazuje da su odgovarajući protoni skalarno spregnuti, jer njihovi signali imaju oblik "krova". Međusobno skalarno sprežanje takođe je lako uočljivo i među protonima koji pokazuju signale na 4,07 i 3,77 ppm (H-3 i H-4), odnosno između protona sa signalima na 3,56 i 3,93 ppm (H-5a i H-5b). Tačnija potvrda o skalarnom sprežanju dobija se iz numeričke vrednosti takozvane konstante sprežanja (konstante kuplovanja) koja se označava simbolom  $J$  i predstavlja razliku između hemijskih pomeranja pojedinih linija multiplleta izraženu u hercima (Hz). Signali na 3,93 (d, *dublet*) i 3,56 ppm (dd, *dublet-dubleta*) nedvosmisleno odgovaraju protonima sa C-5 (H-5a i H-5b), na šta ukazuje velika vrednost konstante kuplovanja ( $J_{5a,5b}=13,3$  Hz), karakteristična za

sprezanje geminalnih protona. Pomenuta vrednost za  $J_{5a,5b}$  određuje se iz multiplleta na 3,56 ppm (razlika između vrednosti hemijskih pomeranja prve i treće linije izražena u Hz).



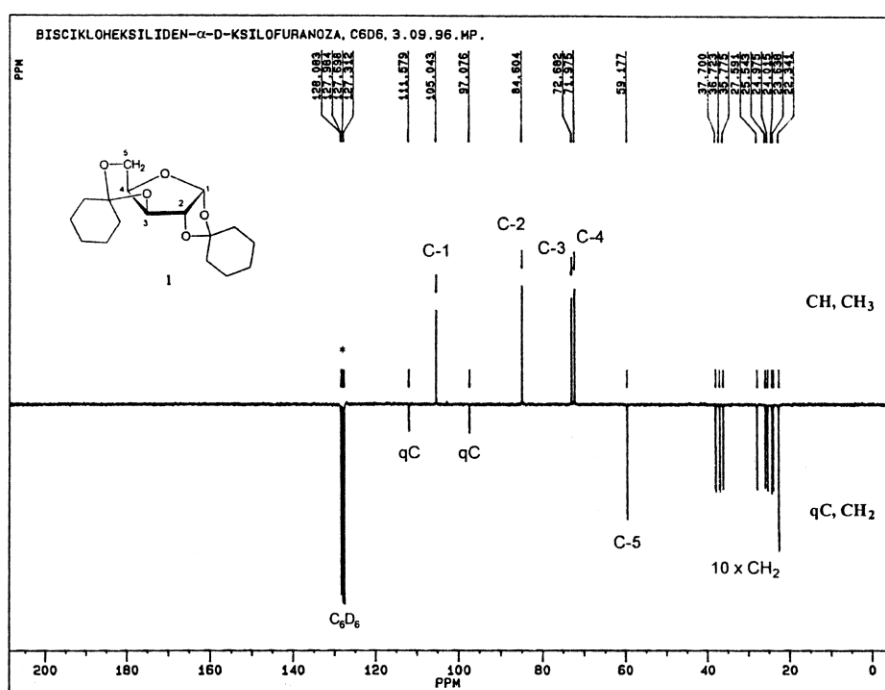
Slika 7.1.3. 2D COSY NMR Spektar jedinjenja **1** (predstavljen  $^1\text{H}/^1\text{H}$  konturnom mapom).

Na Slici 7.1.3. prikazan je 2D COSY spektar jedinjenja **1** kojim se potpuno asignira protonski NMR spektar, jer daje kompletnu sliku skalarno spregnutih protona. Signali raspoređeni na dijagonali konturne mape odgovaraju prvoj projekciji pikova iz jednodimenzionalnog  $^1\text{H}$  NMR spektra, pri čemu su vrednosti hemijskih pomeranja za odgovarajuće signale prikazane na apscisi i na ordinati. Korelacioni signali koji definišu skalarno spregnute protone locirani su na zamišljenim linijama koje seku dijagonalu pod pravim uglom i raspoređeni su na istom rastojanju sa obe strane dijagonale. Pomenuta konturna mapa (Slika 7.1.3) pokazuje intenzivne korelacione signale između H-1 i H-2, H-3 i H-4, H-4 i H-5a, H-5a i H-5b, što ukazuje na značajno skalarno sprezanje između ovih protona. U spektru se takođe javljaju i korelacioni signali



slabijeg intenziteta između H-2 i H-3, odnosno između H-4 i H-5b koji ukazuju na malo skalarno sprezanje između ovih protona, koje nije bilo moguće registrovati ni iz raširenog 1D NMR spektra. Mala vrednost konstante kuplovanja ( $J \leq 1$  Hz) ukazuje da odgovarajući vicinalni protoni zaklapaju diedarski ugao od oko  $80^\circ$ .

Na Slici 7.1.4. prikazan je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **1** koji je (kao i svi naredni primeri) snimljen tako da su signali C-atoma sa *neparnim* brojem vezanih H-atoma ( $\text{CH}_3$  i CH) usmereni *iznad* bazne linije, dok su signali C-atoma sa *parnim* brojem H-atoma ( $\text{CH}_2$  i kvaternerni) orijentisani *ispod* bazne linije.

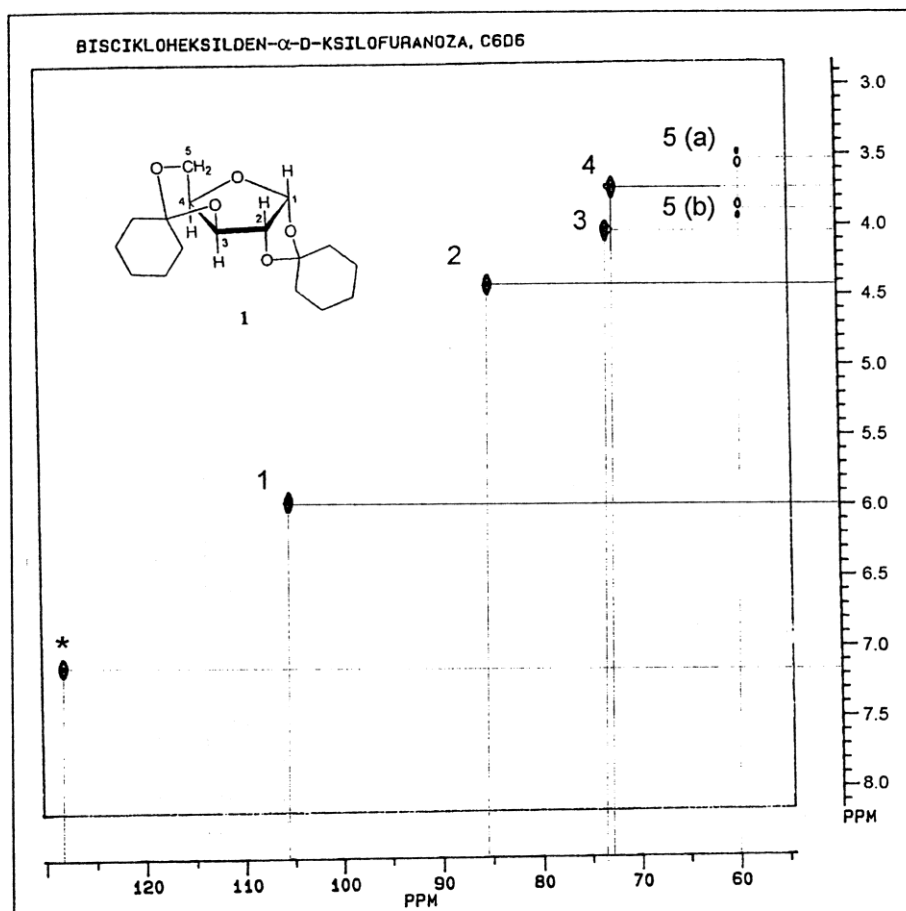


Slika 7.1.4. 65.2 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektar jedinjenja **1**.

Asignacija  $^{13}\text{C}$  NMR spektra jedinjenja **1** može se izvršiti pomoću 2D  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  korelacionog dijagrama koji povezuje hemijska pomeranja C-atoma ( $\delta_{\text{C}}$ , na apscisi) sa hemijskim pomeranjima H-atoma ( $\delta_{\text{H}}$ , na ordinati) na osnovu direktnog  $^1J_{\text{C,H}}$  sprežanja (Slika 7.1.5).

Prema tome, unakrsni signali na dvodimenzionalnoj  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HETCOR mapi predstavljaju korelaciju između hemijskih pomeranja direktno vezanih H- i C-atoma. Nakon prethodne asignacije protonskog NMR spektra lako se asignira  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jednostavnim horizontalno-vertikalnim povezivanjem sredine unakrsnog pika sa odgovarajućim vrednostima na apscisi,

odnosno na ordinati. Na taj način se očitava hemijsko pomeranje C-atoma za koji je vezan H-atom čije je hemijsko pomeranje dato na ordinati.

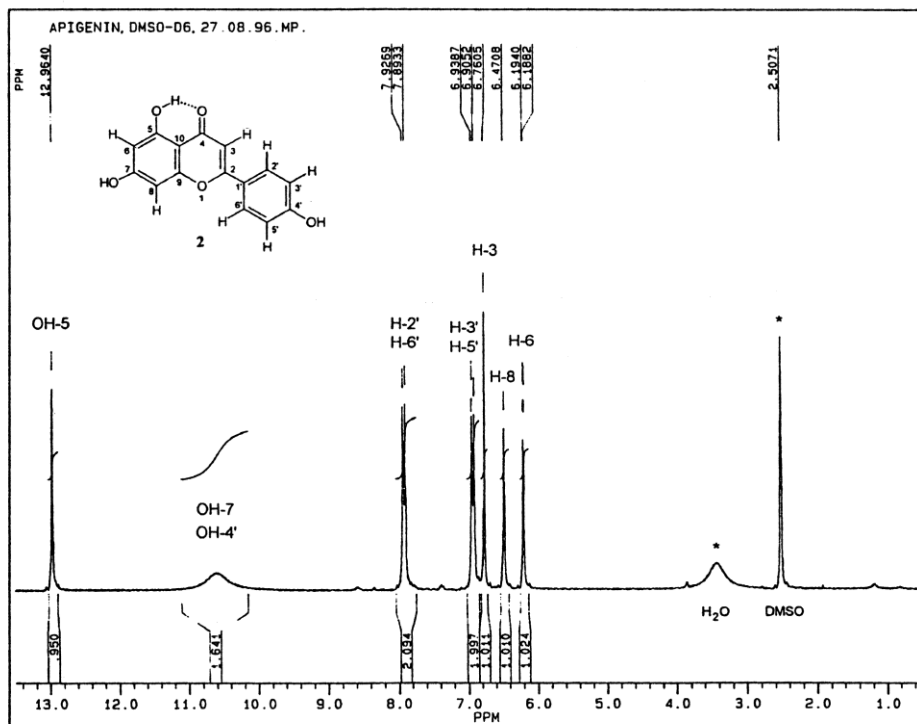


Slika 7.1.5. 2D HETCOR NMR Spektar jedinjenja 1 (predstavljen  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  konturnom mapom).

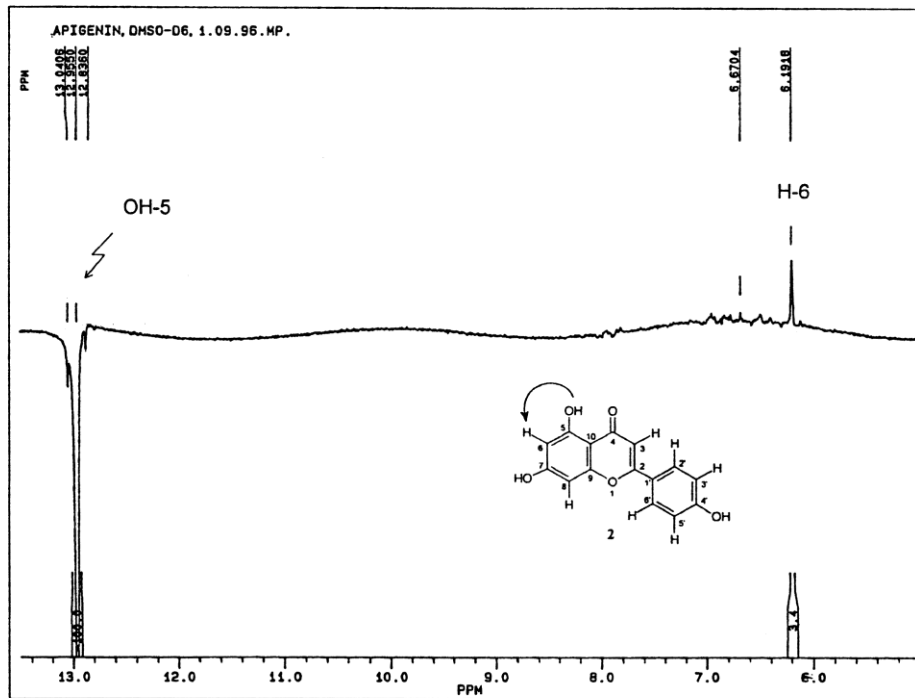
## 7.2. Apigenin (2)

Na Slici 7.2.1. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar flavonoida apigenina (**2**). U ovom slučaju asignaciju je najpogodnije započeti od signala na 12,96 ppm koji sigurno potiče od protona iz hidroksilne grupe sa C-5. Ovaj signal (OH-5) ima najveće hemijsko pomeranje zbog intramolekulske vodonične veze sa C-4 karbonilnom grupom.

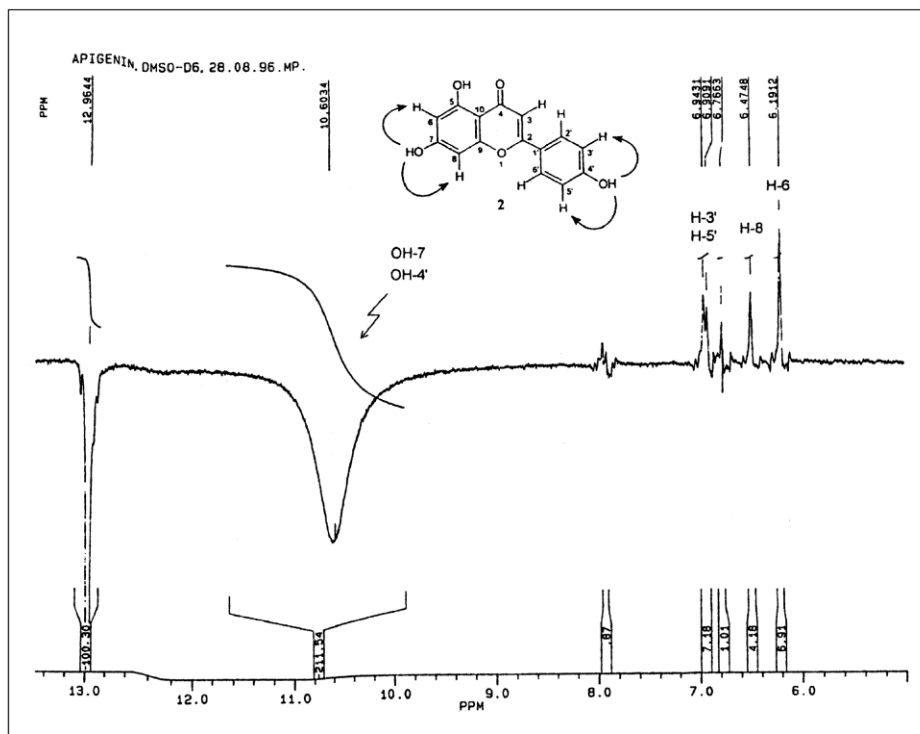
Za asignaciju H-6 primenjena je metoda diferencijalne *NOE* spektroskopije koja se, u najkraćem, sastoji u snimanju protonskog NMR spektra uz istovremeno ozračivanje jednog protona njegovom sopstvenom rezonantnom frakvencom. Pri tome dolazi do povećanja intenziteta signala prostorno bliskih protona, dok signali udaljenih protona ostaju istog intenziteta kao u normalom spektru (Nuklearni Overhauserov Efekat - *NOE*). Oduzimanjem normalnog protonskog spektra od *NOE* spektra dobija se diferencijalni *NOE* spektar koji sadrži samo signale protona koji su vezani za različite C-atome a nalaze se u neposrednoj prostornoj blizini (na rastojanju manjem od 4 Å). Na Slici 7.2.2. prikazan je rezultat *NOE* eksperimenta uz ozračivanje OH-5, pri čemu se povećava intenzitet signala za H-6.



Slika 7.2.1. 250 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektar apigenina (**2**) snimljen u DMSO- $d_6$ .



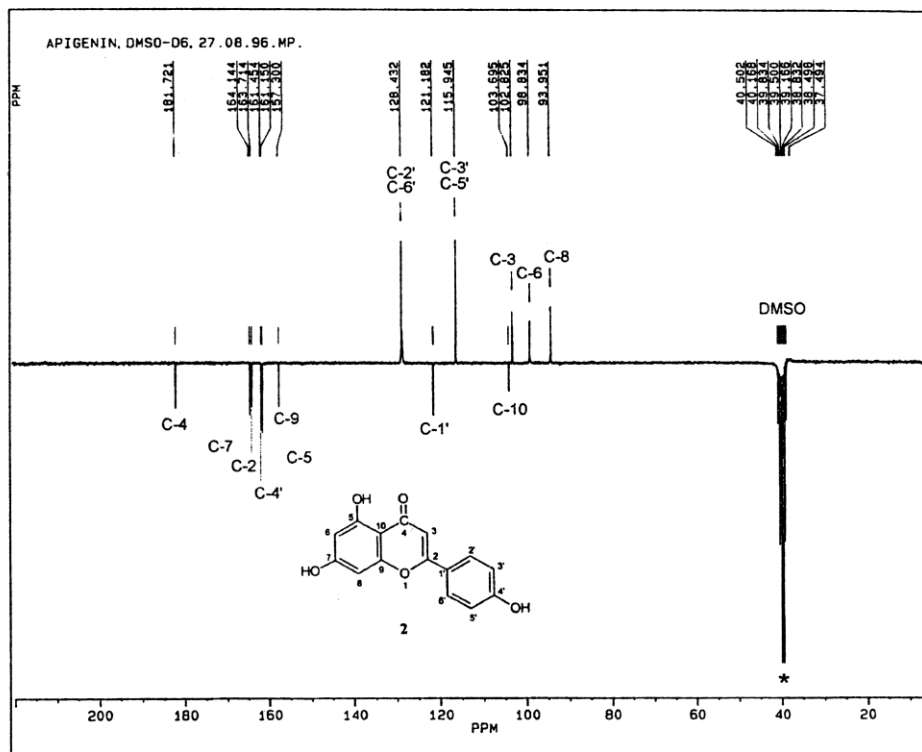
Slika 7.2.2. Diferencijalni  $NOE$   $^1H$  NMR spektar jedinjenja **2**, dobijen nakon ozračivanja OH-5.



Slika 7.2.3. Diferencijalni  $NOE$   $^1H$  NMR spektar jedinjenja **2**, dobijen nakon ozračivanja OH-4' i OH-7'.

U drugom *NOE* eksperimentu sa apigeninom (Slika 7.2.3), nakon ozračivanja proširenog signala na 10,6 ppm (OH-4' i OH-7) ponovo se povećava intenzitet signala na 6,19 ppm (H-6), odnosno signala na 6,47 (H-8) i 6,92 (2 H, H-3' i H-5'). Na osnovu hemijskog pomeranja signala, kao i uzimajući u obzir konstantu kuplovanja  $J=8,5$  Hz, može se pouzdano zaključiti da pomenuti signal lociran na 6,92 ppm potiče od rezonance *orto*-kuplovanih aromatičnih protona (H-3' i H-5'). Mala vrednost konstante spreznja kod H-6 i H-8 signala ( $J\approx 1$  Hz) potiče od njihovog *meta*-kuplovanja. Prema tome, dublet na 7,91 ppm ( $J=8,5$  Hz) odgovara rezonanci H-2' i H-6', dok singlet na 6,76 ppm potiče od vinilnog protona (H-3), koji u poređenju sa H-6 i H-8, ima najveći intenzitet zbog odsustva skalarnog spreznja.

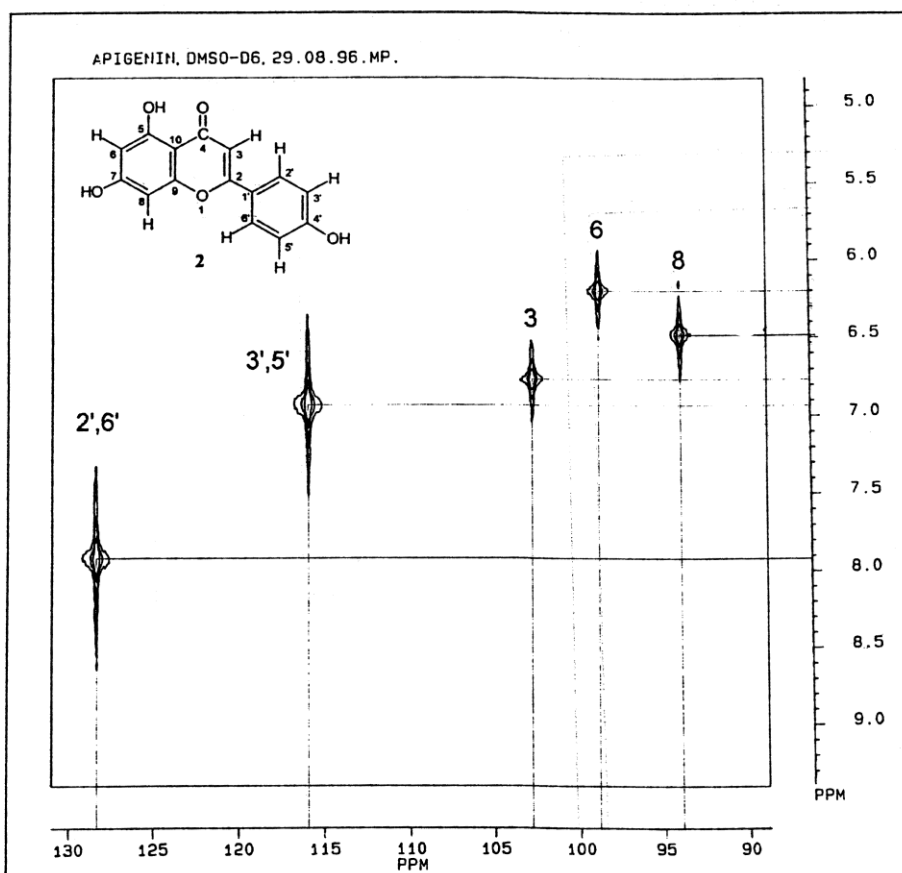
Nakon potpune asignacije protonskog NMR spektra, može se pristupiti i asignaciji  $^{13}\text{C}$  NMR spektra apigenina (Slika 7.2.4) pomoću dvodimenzionalnog  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  korelacionog dijagrama koji je prikazan na Slici 7.2.5.



Slika 7.2.4. 62.5 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektar apigenina (2) snimljen u DMSO- $d_6$ .

Asignacija se može započeti sa metinskim C-atomima koji u  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  korelacionom dijagramu daju unakrsne pikove direktno povezanih H- i C-atoma (Slika 7.2.5).

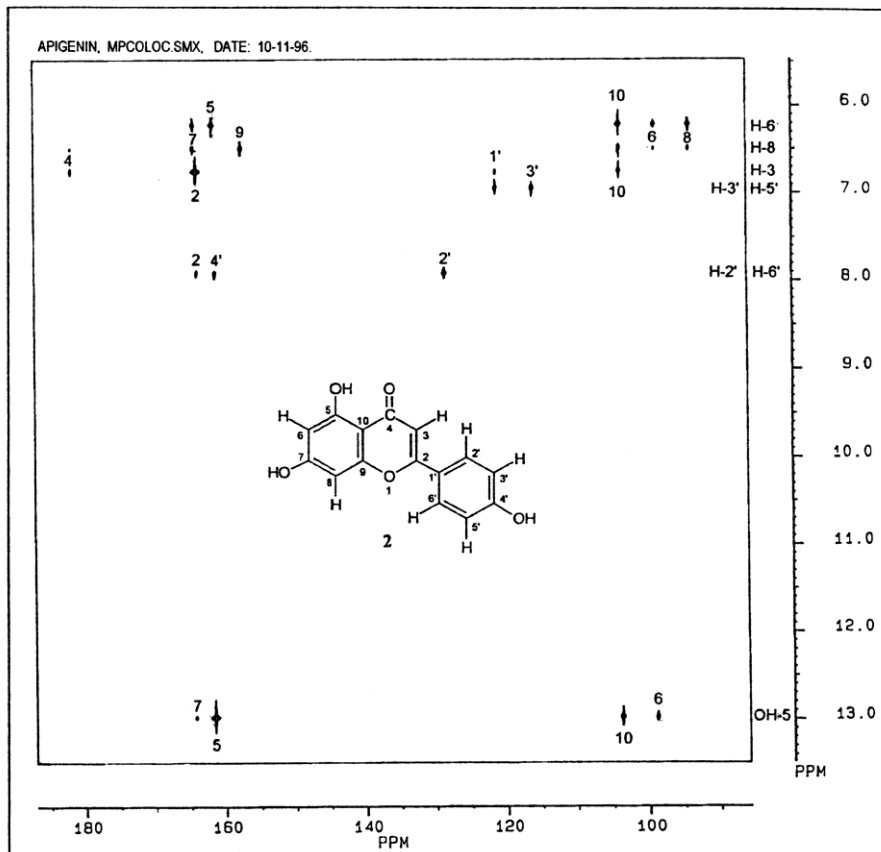
Signali kvaternernih C-atoma lako se identifikuju iz jednodimenzionalnog  $^{13}\text{C}$  NMR spektra po tome što su, u odnosu na baznu liniju, orijentisani u suprotnom smeru od signala C-atoma sa neparnim brojem protona (Slika 7.2.4). Signal sa najvećim hemijskim pomeranjem (181,7 ppm) pripada C-atomu iz karbonilne grupe.



Slika 7.2.5. 2D HETCOR NMR Spektar jedinjenja 2 (predstavljen  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  konturnom mapom).

Asignacija preostalih kvaternernih C-atoma može se izvršiti posebnom hetero-korelacionom tehnikom kojom se povezuju H-atomi i C-atomi preko više veza (*COLOC* tehnika). Kao i kod običnog *HETCOR* dijagrama, na ordinati *COLOC* mape (Slika 7.2.6) nalaze se hemijska pomeranja protona, dok su na apscisi hemijska pomeranja C-atoma.

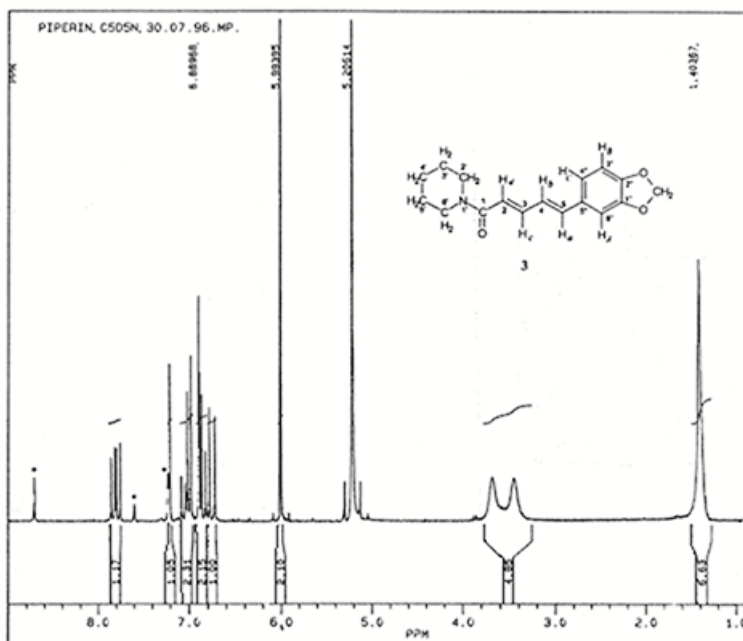
U slučaju apigenina, najviši red korelacionih pikova ukazuje na sprezanje H-6 sa C-8, C-6, C-10, C-5 i C-7, dok drugi red povezuje H-8 sa C-8, C-6, C-10, C-9, C-7 i C-4. Treći red pikova proističe iz interakcija H-3 sa C-10, C-1', C-2 i C-4. Protoni H-3' i H-5' inter-reaguju sa C-3' i C-1' što se jasno vidi iz četvrtog reda, dok je peti red pikova posledica interakcija H-6' i H-2' sa C-2', C-4' i C-2. Konačno, šesti red korelacionih pikova potiče od interakcija OH-5 sa C-6, C-10, C-5 i C-7 atomima.



Slika 7.2.6. 2D  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  Heterokoleraciona mapa apigenina (2) dobijena COLOC tehnikom.

### 7.3. Piperin (3)

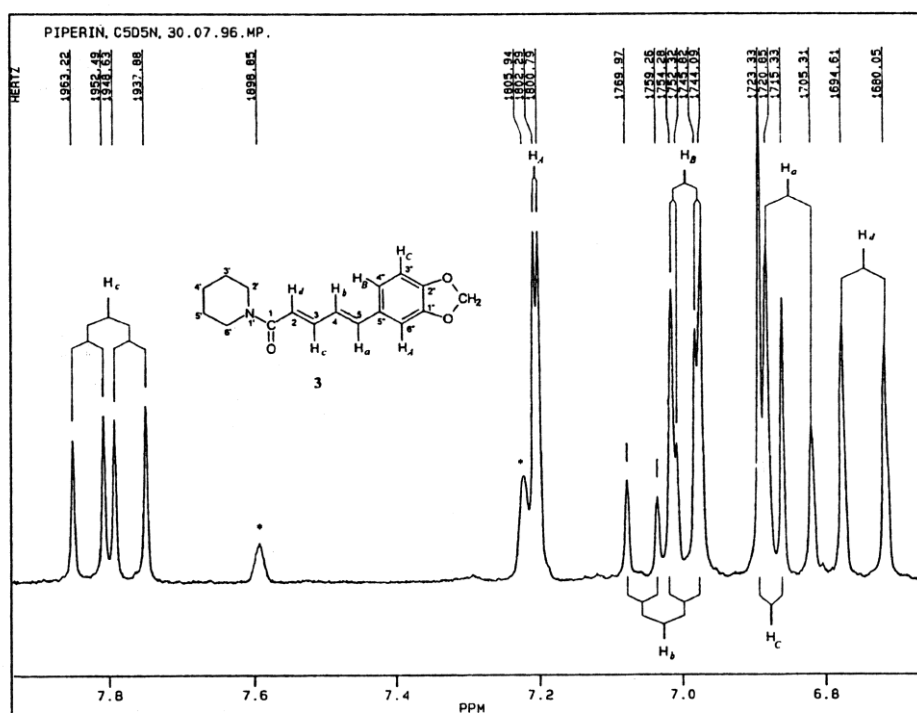
U  $^1\text{H}$  NMR spektru alkaloida piperina (**3**; Slika 7.3.1) na 1,4 ppm javlja se signal koji odgovara rezonanci protona iz tri metilenske grupe piperidinskog prstena ( $2 \times \text{H-3}'$ ,  $2 \times \text{H-4}'$  i  $2 \times \text{H-5}'$ ). Signali protona iz metilenskih grupa pored atoma azota ( $2 \times \text{H-2}'$  i  $2 \times \text{H-6}'$ ) javljaju se u oblasti nešto slabijeg magnetnog polja, na 3,41 i 3,66 ppm, dok singlet na 5,97 ppm, (2 H) potiče od rezonance protona iz metilenske acetalne funkcije. Signal acetalne metilenske grupe ima najveće hemijsko pomeranje u odnosu na signale ostalih  $\text{CH}_2$ -grupa zbog prisustva dva elektronegativna kiseonikova atoma na  $\alpha$ -C-atomu. U oblasti od 6,5–7,9 ppm (7 H) javljaju se signali vinilnih i aromatičnih protona. Ovaj karakteristični deo  $^1\text{H}$  NMR spektra prikazan je izdvojeno na Slici 7.3.2.



Slika 7.3.1. 250 MHz  $^1\text{H}$  NMR spektar piperina (**3**) snimljen u piridinu- $d_5$ .

Potpuna asignacija metinskih protona vezanih za nezasićene C-atome može se izvršiti na osnovu odgovarajućih konstanti kuplovanja. Dublet (1 H) sa najmanjim hemijskim pomeranjem (6,72 ppm) odgovara vinilnom protonu  $\text{H}_d$  sa konstantom kuplovanja  $J_{d,c}=14,6$  Hz. Sledeći dublet (6,85 ppm) potiče od  $\text{H}_a$  i takođe se odlikuje velikom konstantom kuplovanja,  $J_{a,b}=15,5$  Hz.



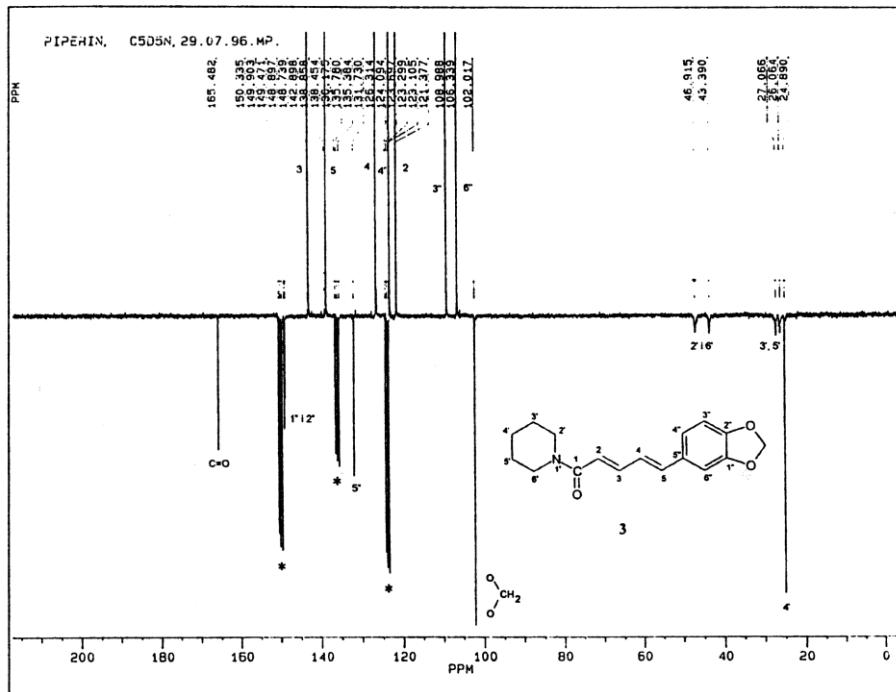
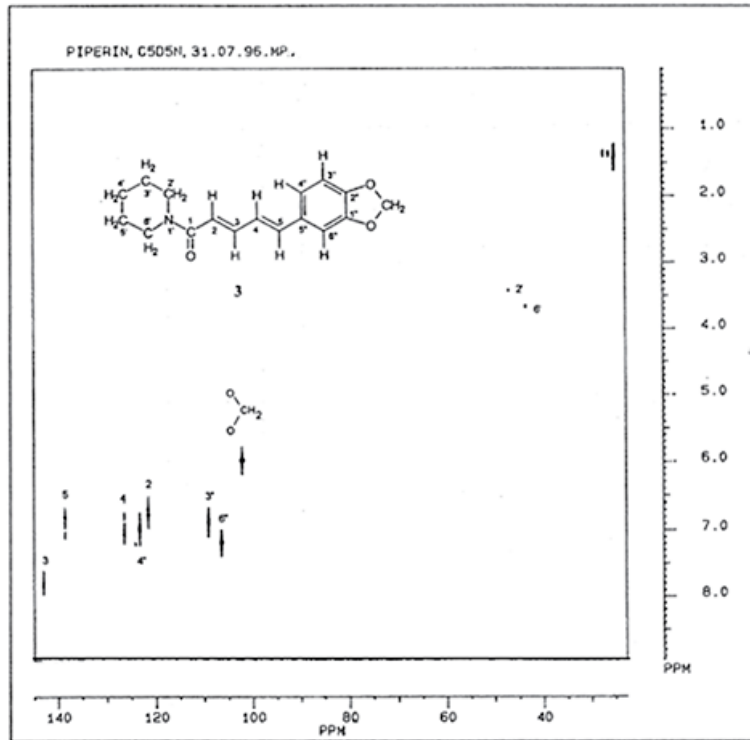


Slika 7.3.2.  $^1\text{H}$  NMR Spektar piperina (**3**) raširen u regionu aromatičnih i vinilinih protona (6,7–7,9 ppm).

Dublet na 6,87 ppm sa konstantom sprezanja  $J_{B,C}=8,5$  Hz odgovara rezonanci aromatičnog protona  $H_C$ . Signal aromatičnog protona  $H_B$  javlja se kao dublet-dubleta (6,99 ppm), jer pored kuplovanja sa  $H_C$ , takođe stupa i u daljinske spinske interakcije sa  $H_A$ , na šta ukazuje relativno mala konstanta sprezanja,  $J_{A,B}=1,5$  Hz. Signali vinilnog protona  $H_b$  (7,02 ppm) delimično su preklapljeni sa signalima aromatičnog  $H_B$ , međutim i pored ovog preklapanja jasno se može uočiti njegova multiplentnost (dd) sa konstantama kuplovanja  $J_{a,b}=15,5$  Hz i  $J_{b,c}=10,7$  Hz. Dublet na 7,19 ppm odgovara aromatičnom protonu  $H_A$ , dok dublet-dubleta sa najvećim hemijskim pomeranjem (7,79 ppm) potiče od vinilnog protona  $H_c$ . Velike vrednosti konstanti kuplovanja vinilnih protona ukazuju na *trans* konfiguraciju obe dienske dvostruke veze piperina.

Potpuna asignacija  $^{13}\text{C}$  NMR spektra jedinjenja **3** ostvarena je pomoću 2D HETCOR konturne mape (Slika 7.3.3), a prikazana je na  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (Slika 7.3.4).

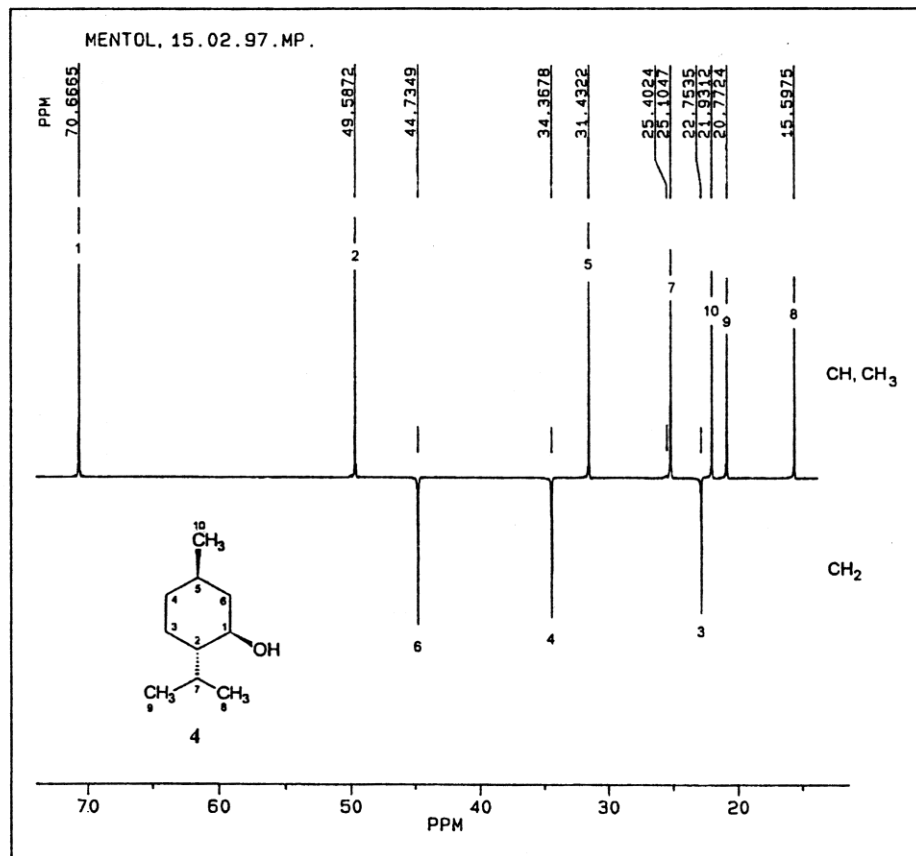
Signal na 131,7 ppm potiče od kvaternernog C-atoma iz aromatičnog prstena za koji je vezan dienski niz, dok bliski signali na 148,7 i 148,9 ppm potiču od preostala dva kvaternerna C-atoma za koje su vezani O-atomi acetalne funkcije. Karbonilni C-atom iz amidne funkcije, prema očekivanju, ima najveće hemijsko pomeranje i lociran je na 165,4 ppm.



Slika 7.3.4. 62.5 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektar piperina (3).

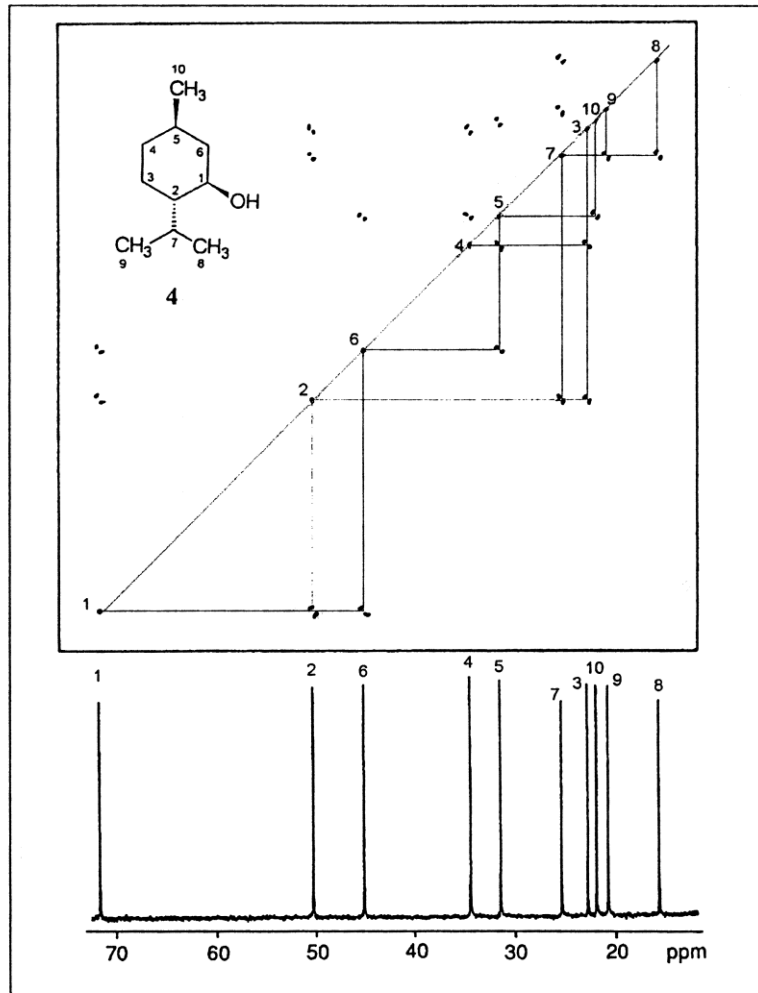
## 7.4. Mentol (4)

Na primeru mentola prvo je prikazana alternativna metoda asignacije običnog  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (Slika 7.4.1) primenom višepulsne tehnike *INADEQUATE* koja se zasniva na detekciji homonuklearnog  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  sprezanja direktno vezanih C-atoma. Ovako asigniran  $^{13}\text{C}$  NMR spektar zatim može poslužiti za potpunu asignaciju odgovarajućeg  $^1\text{H}$  NMR spektra pomoću 2D homo- i hetero-korelacionih tehnika.



Slika 7.4.1. 62.5 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektar mentola (4) snimljen u  $\text{CDCl}_3$ .

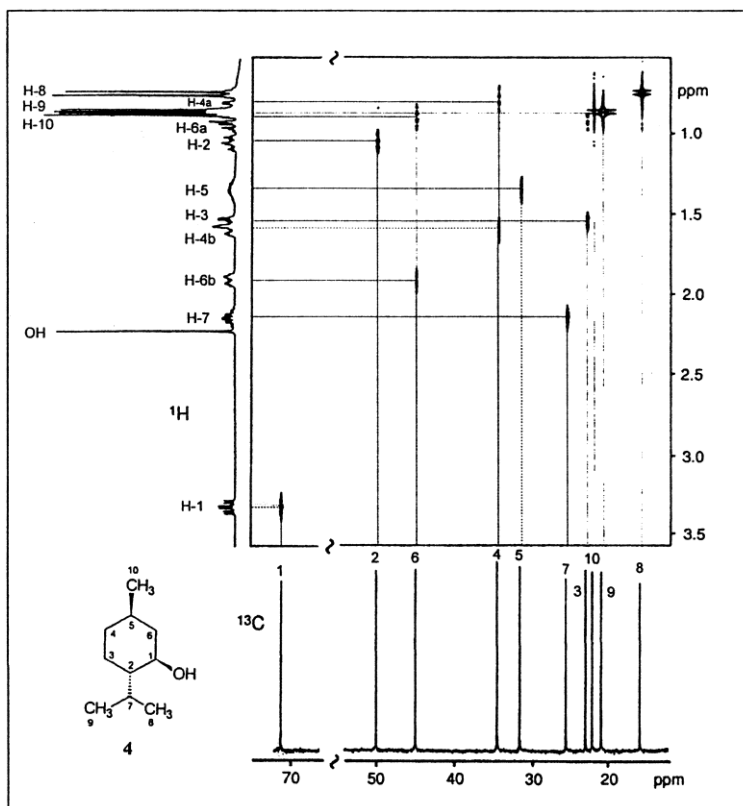
Na Slici 7.4.2. prikazan je  $^{13}\text{C}$  *INADEQUATE* spektar mentola, snimljen u  $\text{CDCl}_3$ , u kojem su svi korelacioni pikovi dubleti zbog  $^1J$  kuplovanja susednih  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  atoma.



Slika 7.4.2.  $^{13}\text{C}$  INADEQUATE NMR Spektar mentola ( $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$  korelacioni dijagram).

Asignacija započinje sa signalom na 71,0 ppm koji odgovara ugljniku C-1. S obzirom na to da je jedino ovaj C-atom vezan za elektronegativni supstituent (OH), njegov signal je pomeren u oblast najnižeg magnetnog polja (tj. javlja se pri najvećim ppm vrednostima) u odnosu na signale ostalih C-atoma. Atom C-1 je skalarno spregnut sa susednim C-2 i C-6, pa se na taj način identifikuju signali na 49,6 i 44,7 ppm. Tercijarni C-2 ugljenikov atom spinski sadejstvuje sa C-1, C-7 i C-3, što dalje omogućuje određivanje hemijskih pomeranja i identifikaciju C-7 (25,1 ppm) i C-3 (22,7 ppm). C-6 Atom osim sa C-1, skalarno je spregnut i sa C-5, kojem odgovara signal na 31,4 ppm. Pomoću ovog signala, horizontalno-vertikalnim povezivanjem, zatim se određuju hemijska pomeranja za C-4 i C-10 (34,4 i 21,9 ppm) koji su skalarno spregnuti sa C-5. Atom C-7

osim sa C-2, spinski sadejstvuje i sa C-8, odnosno sa C-9 iz diastereotopnih metil grupa, kojima odgovaraju signali na 15,6 i 20,8 ppm.

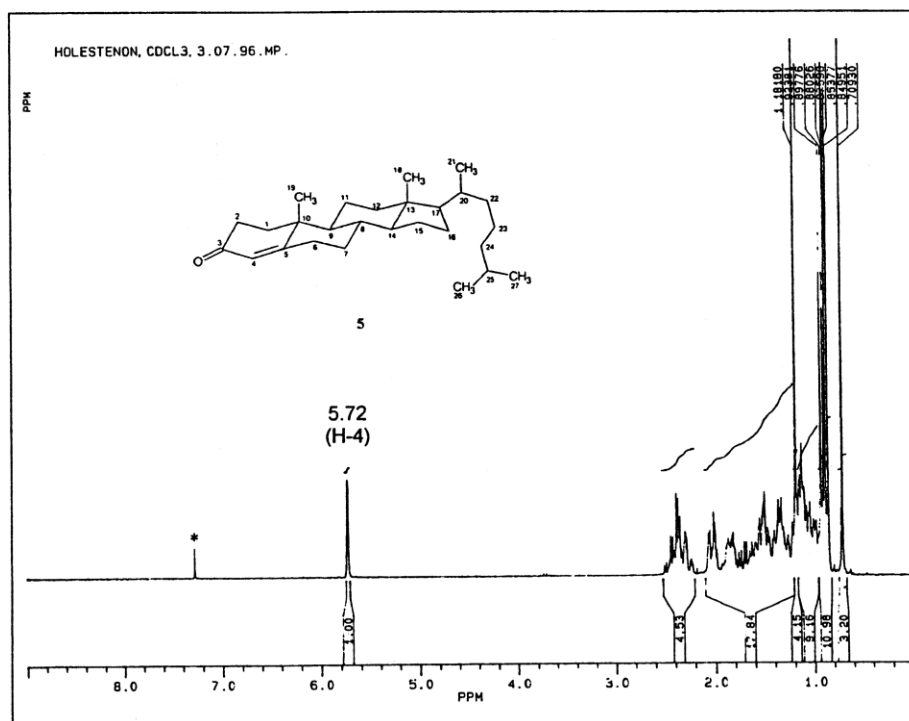


Slika 7.4.3. 2D HETCOR NMR Spektar jedinjenja 4 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  korelaciona mapa).

Na Slici 7.4.3. prikazan je hetero-korelacioni spektar mentola preko jedne C-H veze, kojim se određuju hemijska pomeranja, a samim tim se i identifikuju svi signali u  $^1\text{H}$  NMR spektru, na osnovu prethodne asignacije skeletnih C-atoma *INADEQUATE* tehnikom.

7.5.  $\Delta^4$ -Holesten-3-on (5)

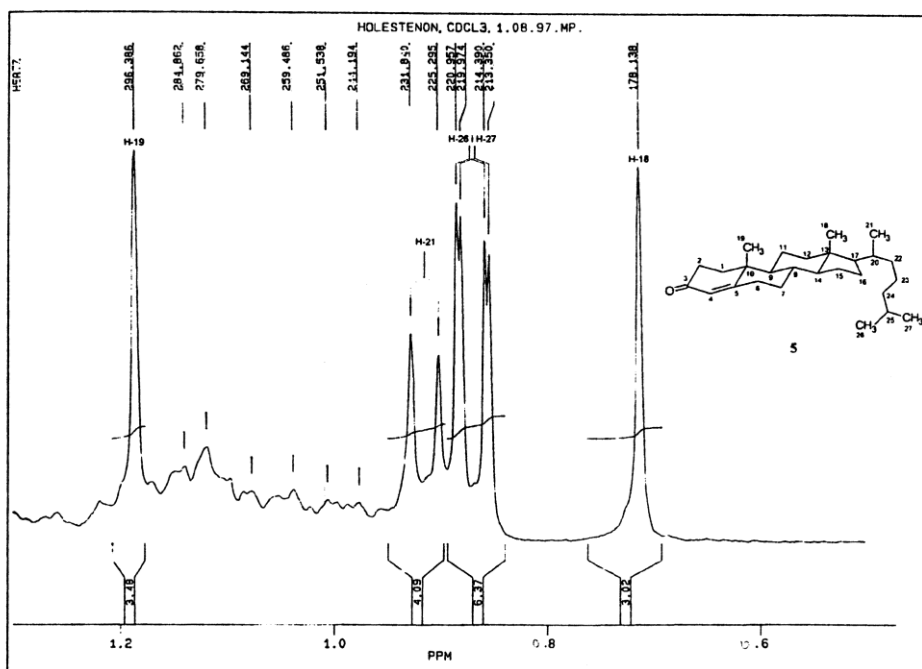
U  $^1\text{H}$  NMR spektru jedinjenja **5** (Slika 7.5.1), u oblasti niskih vrednosti magnetnog polja (5,72 ppm) javlja se samo signal od H-4, a njegovo veliko hemijsko pomeranje u odnosu na ostale signale posledica je prisustva elektronegativne funkcionalne grupe na C-3 i  $sp^2$  hibridizovanog C-4 atoma.



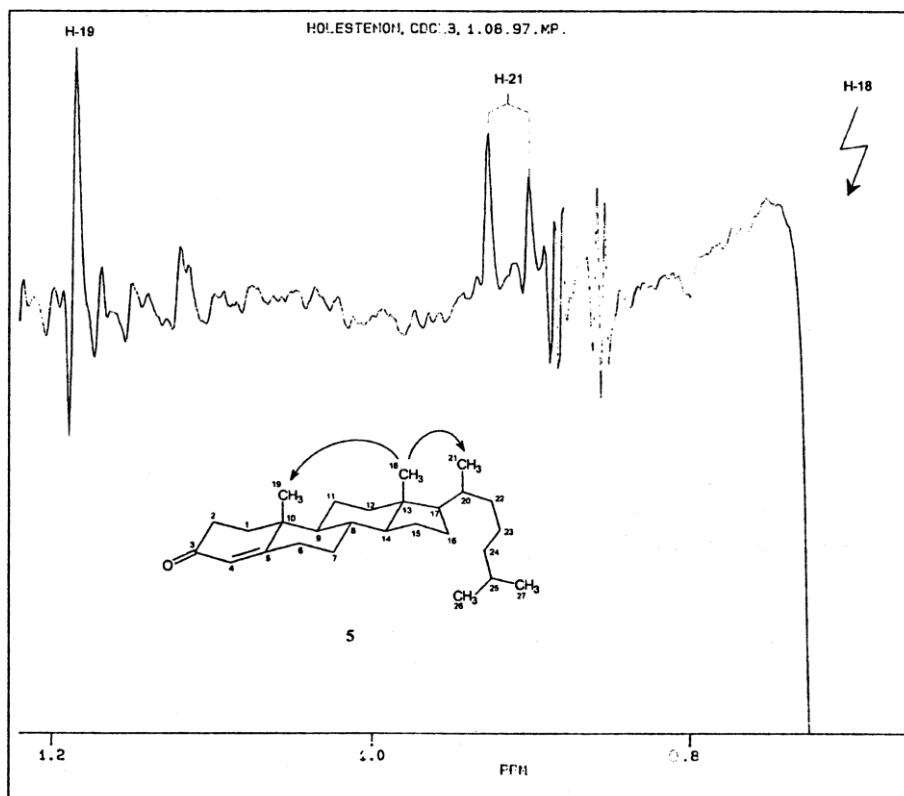
Slika 7.5.1. 250 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektar jedinjenja **5** snimljen u  $\text{CDCl}_3$ .

Molekul **5** sadrži pet metil grupa, čiji protoni apsorbuju u oblasti visokih vrednosti magnetnog polja, što je jasnije prikazano u raširenom  $^1\text{H}$  NMR spektru na Slici 7.5.2.

Signali angularnih C-18 i C-19 metil grupa međusobno se razlikuju po hemijskim pomeranjima (1,18 i 0,71 ppm), a s obzirom na to da na susednim  $\alpha$ -C-atomima nema protona, javljaju se kao singleti. Signali preostale tri metil grupe (C-21, C-26 i C-27) imaju bliska hemijska pomeranja (0,91, 0,87 i 0,867 ppm) i javljaju se kao dubleti zbog spinskih interakcija sa  $\alpha$ -vodonikovim atomima ( $J=6,6$  Hz).

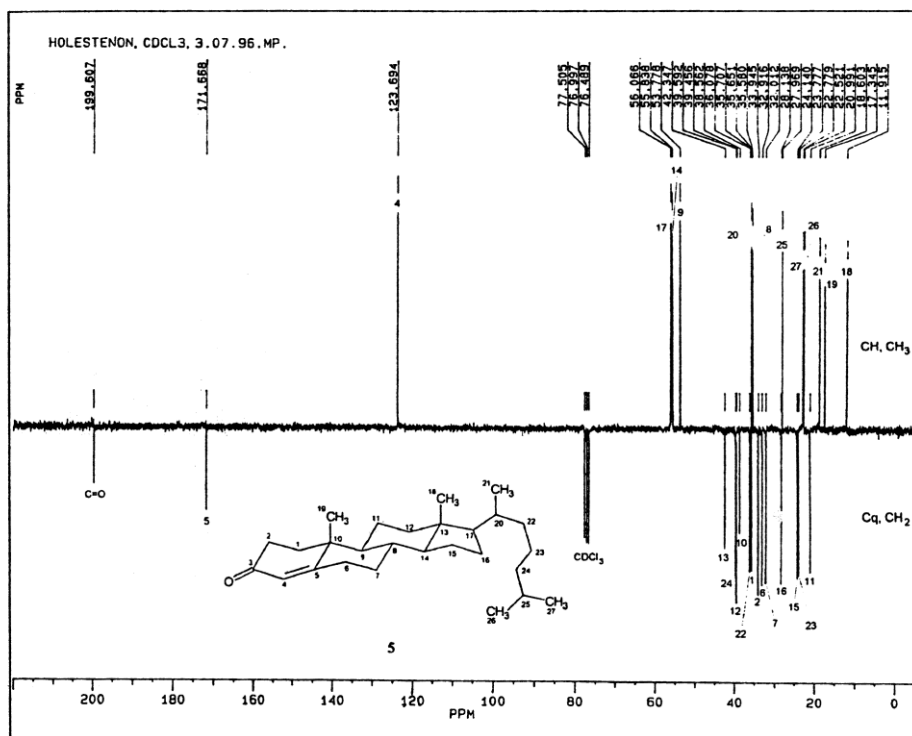


Slika 7.5.2. Deo  $^1\text{H}$  NMR Spektra jedinjenja **5** raširen u regionu 0,5–1,3 ppm.



Slika 7.5.3. Diferencijalni NOE  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja **5**, dobijen nakon ozračivanja H-18.

Potpuna asignacija protona pomenutih metil grupa ostvorena je pomoću NOE eksperimenta (Slika 7.5.3). Naime, ozračivanjem signala metil grupe na 0,71 ppm istovremeno se povećava intenzitet singleta na 1,18 ppm i dubleta na 0,91 ppm, što dokazuje da singlet na 0,71 ppm odgovara C-18 angularnoj metil grupi jer je jedino ona dovoljno bliska, kako C-19, tako i C-21 metil grupi.



Slika 7.5.4. 62.5 MHz <sup>13</sup>C NMR Spektar jedinjenja 5 snimljen u CDCl<sub>3</sub>.

Imajući u vidu činjenicu da hemijsko pomeranje C-atoma u <sup>13</sup>C NMR spektru zavisi od broja direktno vezanih H-atoma ( $\delta \text{CH}_3 < \delta \text{CH}_2 < \delta \text{CH} < \delta \text{C}$ ), od njegove hibridizacije [ $\delta \text{C} (\text{sp}^3) < \delta \text{C} (\text{sp}) < \delta \text{C} (\text{sp}^2)$ ], kao i od sternih i elektronskih efekata susednih supstituenata, asignacija <sup>13</sup>C NMR spektra jedinjenja 5 (Slika 7.5.4) može se započeti na sledeći način: signali za C-18, C-19, C-21, C-26 i C-27 imaju najmanja hemijska pomeranja i javljaju se 12,0, 17,4, 18,7, 22,5 i 22,8 ppm. Najveće sterne interakcije trpi angularna C-18 metil grupa (sa C-19 i C-21), pa je stoga C-18 najviše ekraniran, odnosno elektronska gustina u njegovoj okolini je povećana. Signal koji odgovara C-11 atomu takođe se javlja u oblasti jakog magnetnog polja (21,0 ppm) jer 1,3-di-



aksijalne interakcije angularnih C-18 i C-19 metil grupa sa H-11 povećavaju elektonsku gustinu na C-11.

Najveće hemijsko pomeranje ima C-atom karbonilne grupe koji se javlja na 199,6 ppm. Pored toga, u oblasti slabijeg magnetnog polja (123,7 i 171,7 ppm) javljaju se i signali olefinskih C-atoma (C-4 i C-5), pri čemu signal sa većim hemijskim pomeranjem (171,7 ppm) odgovara kvaternernom ugljenikovom atomu (C-5). Tercijarni ugljenikovi atomi steroidnog skeleta imaju veće hemijsko pomeranje od C-atoma metilenskih grupa, što se jasno vidi iz položaja signala za C-9, C-14 i C-17 koji se javljaju na 53,8, 55,8 i 56,1 ppm. Izuzetak je signal za C-8 koji je pomenen u oblasti veće vrednosti magnetnog polja (35,6 ppm) zbog sternih interakcija C-18 i C-19 angularnih metil grupa sa H-8.

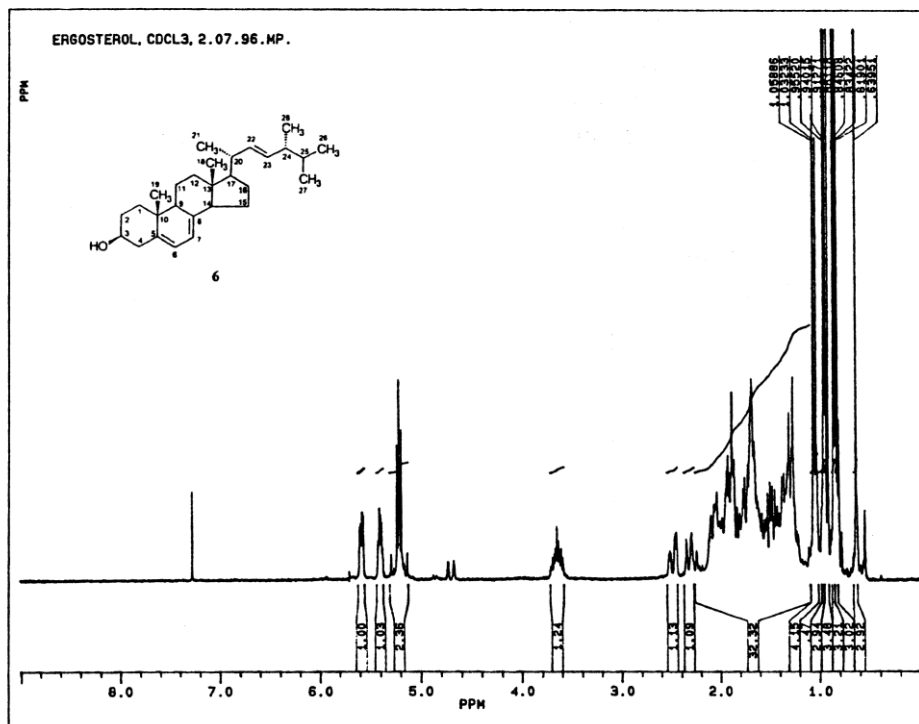
## 7.6. Ergosterol (6)

U protonskom NMR spektru ergosterola (**6**; Slika 7.6.1), u oblasti slabijeg magnetnog polja, prisutna su četiri izdvojena signala [3,65 (1 H), 5,11-5,30 (2 H), 5,40 (1 H) i 5,58 (1 H)] koji odgovaraju rezonanci H-atoma vezanih za najelektronegativnije C-atome (C-3, C-6, C-7, C-22 i C-23).

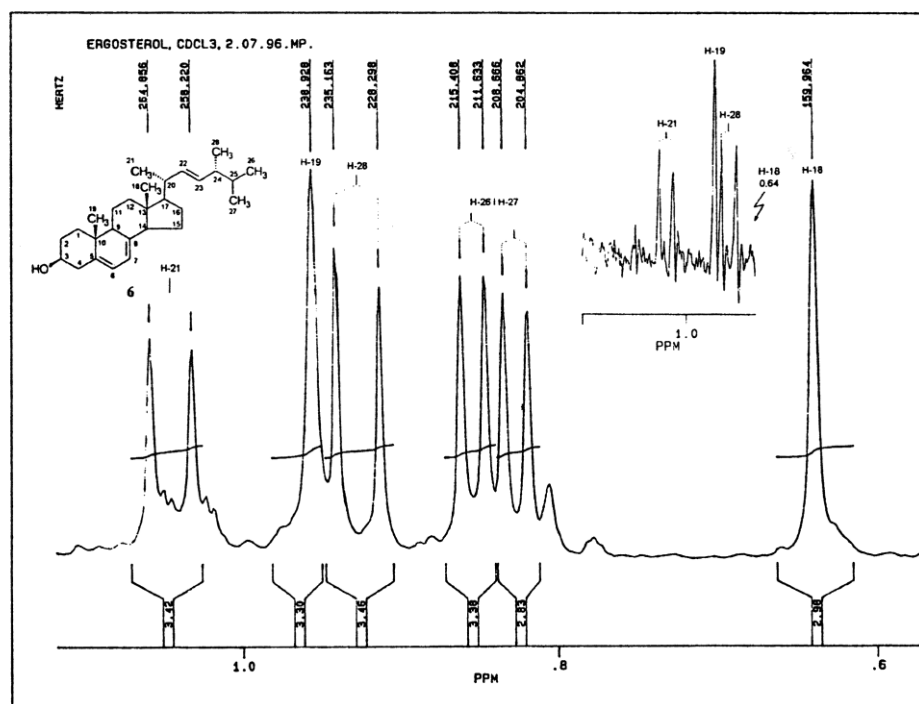
Najsloženiji multiplet, koji je lociran na 3,65 ppm, potiče od rezonance H-3, a eksperimentom *homo*-dekuplovanja\*\* lako je utvrđeno da susedni H-4 apsorbuje na 2,25 ppm. Alilno sprezanje između H-4 i H-6 dalje omogućuje identifikaciju signala H-6 koji pokazuje najveće hemijsko pomeranje (5,58 ppm). Vrednost veće konstante kuplovanja iz ovog multipleta (5,2 Hz) identična je sa većom konstantom sprezanja kod multipleta na 5,4 ppm, pa je na taj način lociran i signal za H-7. Prema tome, preostali multiplet koji je lociran u intervalu 5,11–5,30 ppm sigurno potiče od vinilnih protona (H-22 i H-23) iz bočnog niza ergosterola.

---

\*\* Tehnika *homo*-dekuplovanja u najkraćem obuhvata snimanje spektra uz istovremeno ozračivanje jednog od protona njegovom sopstvenom frekvencom. Ovako dobijeni spektar ne pokazuje signal ozračenog protona, dok se multipleti susednih protona pojednostavljaju zbog odsustva skalarnog sprezanja sa ozračenim protonom. Na taj način, lako se identifikuju svi signali koji se međusobno jasno razlikuju po hemijskom pomeranju.



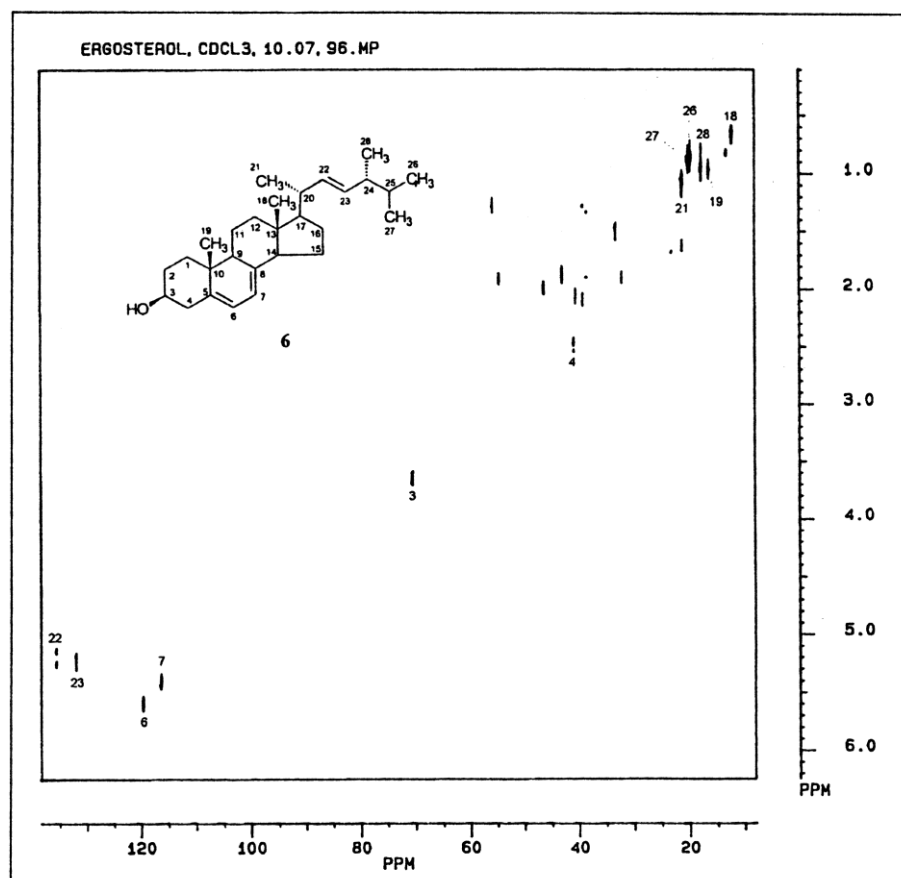
Slika 7.6.1. 250 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektar jedinjenja 6 snimljen u CDCl<sub>3</sub>.



Slika 7.6.2. Deo <sup>1</sup>H NMR spektra jedinjenja 6 raširen u regionu 0,6–1,2 ppm. U gornjem desnom delu slike prikazan je diferencijalni NOE <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 6, dobijen nakon ozračivanja H-18.

Na Slici 7.6.2. prikazan je deo spektra u oblasti visokih vrednosti magnetnog polja, u kojoj se javljaju signali koji odgovaraju protonima svih pet metil grupa prisutnih u strukturi **6**. Dubleti na 0,83 i 0,85 ( $J=3,8$  Hz), odnosno na 0,92 ( $J=6,9$  Hz) i na 1,04 ppm ( $J=6,7$  Hz) potiču od metil grupa sa metinskih C-atoma, dok singleti na 0,65 i 0,95 ppm potiču od angularnih metil grupa sa kvaternernih C-atoma.

Jednim *NOE* eksperimentom i upoređivanjem spektra ergosterola sa spektrom holestanola izvršena je potpuna asignacija ovog dela protonskog NMR spektra. Naime pri ozračivanju protona angularne metil grupe na 0,64 ppm povećava se intenzitet singleta na 0,95 ppm i dubleta na 0,92, odnosno na 1,04 ppm. To znači da singlet na 0,64 ppm potiče od C-18 angularne metil grupe, pošto je jedino ona dovoljno prostorno bliska sa angularnom C-19 metil grupom, odnosno sa C-21 i C-28 metil grupama. Samim tim dubleti na 0,83 i 0,85 ppm potiču od C-26 i C-27 metil grupa. Rezultat ovog *NOE* eksperimenta prikazan je u gornjem desnom delu spektra na Slici 7.6.2. Na osnovu *HETCOR* mape, koja je prikazana na Slici 7.6.3., lako se asignira većina signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru ergosterola.



Slika 7.6.3. 2D *HETCOR* NMR Spektar jedinjenja **6** ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  korelaciona mapa).



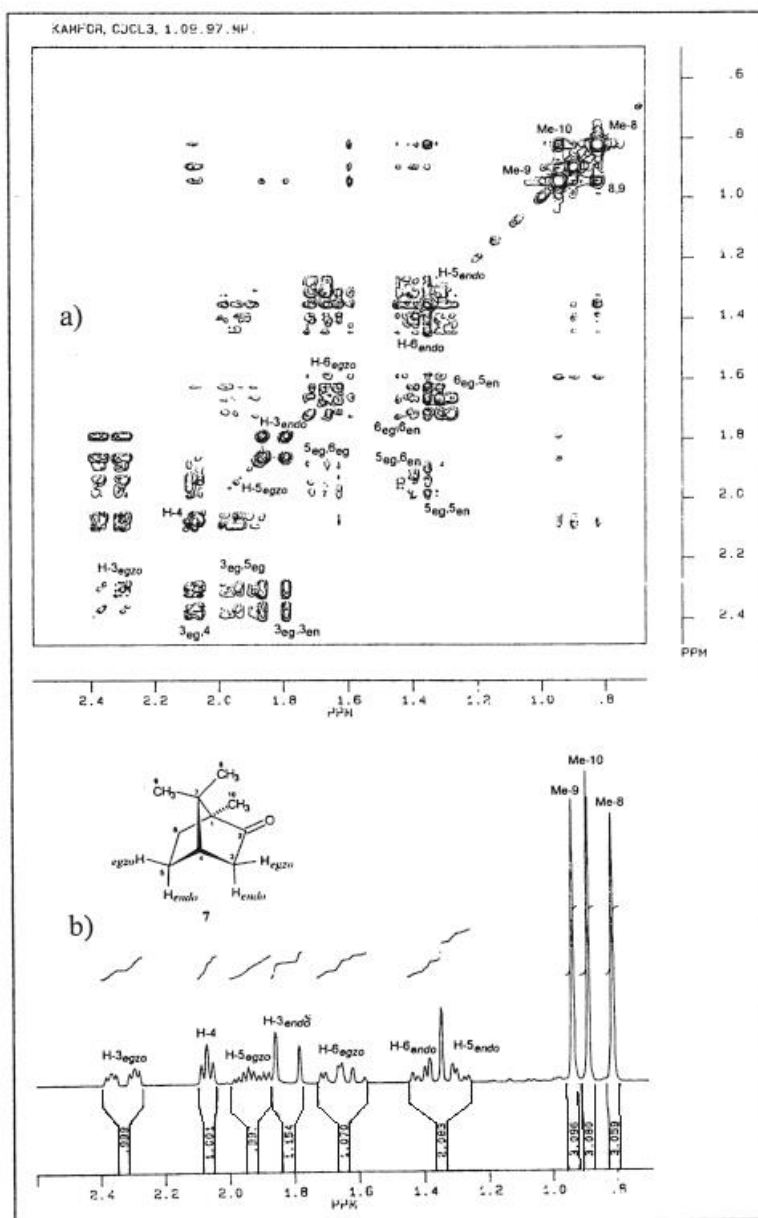
## 7.7. Kamfor (7) i oksim kamfora (8)

Na Slici 7.7.1a. prikazan je  $^1\text{H}$  NMR spektar kamfora u kojem su uočljivi signali od sedam skeletnih protona (1,30–2,40 ppm), kao i tri intenzivna singleta na 0,81, 0,88 i 0,93 ppm (po 3 H svaki) koji su posledica rezonance protona iz tri metil grupe ( $\text{CH}_3\text{-8}$ ,  $\text{CH}_3\text{-9}$  i  $\text{CH}_3\text{-10}$ ).

Asignacija se može započeti na osnovu 2D COSY spektra koji je prikazan na Slici 7.7.1b. Kao polazna osnova za asignaciju protonskog spektra poslužio je uski multiplet na 2,08 ppm (Slika 7.7.1a) koji odgovara H-4 protonu. Ovo je jedini metinski proton u molekulu, koji nema svoj geminalni par, pa stoga ne pokazuje geminalno kuplovanje, koje je obično iznad 10 Hz. Iz 2D COSY korelacione mape (Slika 7.7.1b) uočljivo je H,H spinsko sprezanje ovog signala (2,04 ppm; H-4) sa signalima na 2,33 i 1,93 ppm koji sigurno potiču od H-3<sub>egzo</sub> i H-5<sub>egzo</sub>. Naime, posmatranjem molekularnih modela kamfora, može se primetiti da su jedino C<sub>4</sub>-H i C<sub>3</sub>-H<sub>egzo</sub> (odnosno C<sub>5</sub>-H<sub>egzo</sub>) u povoljnom stereohemijskom odnosu za efektivno vicinalno kuplovanje ( $\tau \neq 90^\circ$ ). S druge strane, torzioni ugao između C<sub>4</sub>-H i preostala dva geminalna para (C<sub>3</sub>-H<sub>endo</sub> i C<sub>5</sub>-H<sub>endo</sub>) iznosi približno  $90^\circ$  pa stoga oni ne pokazuju uzajamne spinske interakcije. Dublet na 1,81 ppm pokazuje veliku konstantu kuplovanja ( $J_{gem}=18,3$  Hz) koja je posledica spinskih interakcija samo sa multiplatom lociranim na 2,33 ppm (Slika 7.7.1a. i 7.7.1b). Prema tome, pomenuti dublet odgovara H-3<sub>endo</sub>, koji zbog svoje prostorne orijentacije ne podleže dodatnim skalarnim sprezanjima, dok multiplet na 2,33 ppm potiče od njegovog geminalnog para (H-3<sub>egzo</sub>). Kao što se sa Slike 7.7.1b. dalje vidi, signal od H-3<sub>egzo</sub> podleže dodatnom daljinskom kuplovanju preko četiri veze (W-geometrije) sa signalom lociranim na 1,93 ppm, koji sigurno potiče od H-5<sub>egzo</sub>, jer je jedino ovaj proton u povoljnom stereohemijskom odnosu za daljinske W-spinske interakcije. Pomenute daljinske interakcije često pokazuju male vrednosti konstante kuplovanja, koje se veoma teško uočavaju u običnom protonskom NMR spektru. Međutim iz 2D COSY spektra mogu se dobiti informacije i o veoma malim kuplovanjima ( $J \sim 0,1$  Hz), posebno ako se odgovarajući protoni jasno razlikuju po svojim hemijskim pomeranjima.

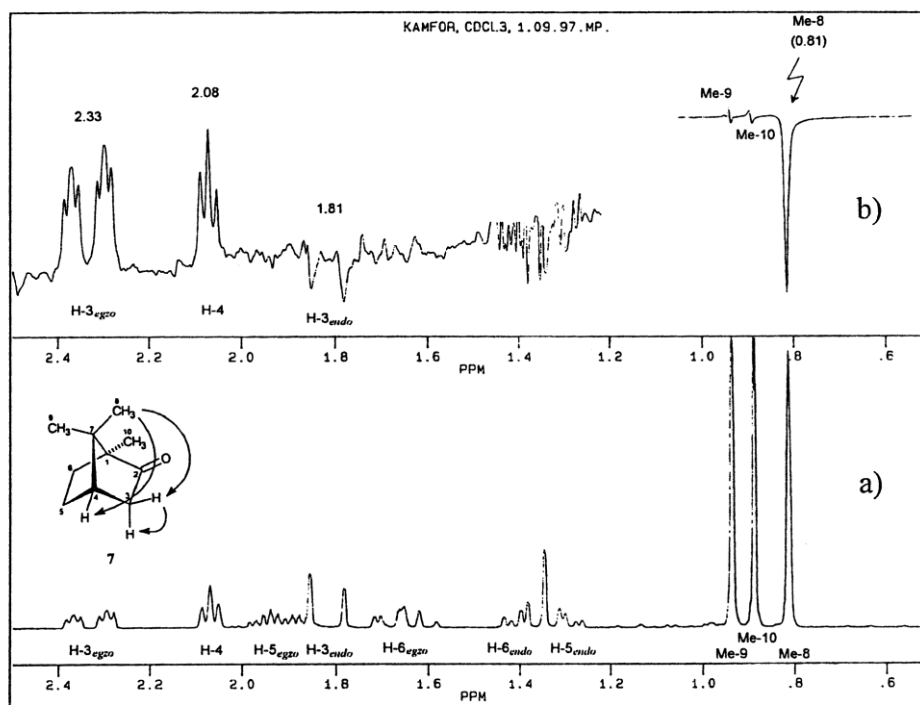
Dokazivanje geminalnih metil grupa kamfora ( $\text{CH}_3\text{-8}$  i  $\text{CH}_3\text{-9}$ ), uspešno je ostvareno na osnovu daljinskog kuplovanja protona preko četiri veze. Naime, na konturnoj mapi u regionu najvećih vrednosti magnetnog polja prisutan je unakrsni pik, označen sa 8,9 (Slika 7.7.1b), koji povezuje singlete na 0,81 i 0,93 ppm. Na ovaj način je dokazano da pomenuti singleti potiču od rezonance protona iz geminalnih metil grupa, jer jedino oni mogu međusobno spinski interreagovati preko 4 veze (W geometrije), dok preostali signal na 0,88 ppm odgovara  $\text{CH}_3\text{-10}$ , Definitivna asignacija geminalnih metil grupa, kao i preostalih skeletnih protona (H-5<sub>endo</sub>, H-

6<sub>egzo</sub> i H-6<sub>endo</sub>) u konformaciono krutom molekulu kamfora izvršena je pomoću dva NOE eksperimenta.



Slika 7.7.1. a) 2D COSY NMR Spektar kamfora (u CDCl<sub>3</sub>); b) 250 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektar kamfora.

Ozračivanjem singleta jedne od geminalnih metil grupa (0,81 ppm) povećava se intenzitet signala od H-3<sub>egzo</sub> i H-4 (Slika 7.7.2b), što nedvosmisleno dokazuje da ozračeni signal potiče od metil grupe koja je orijentisana sa iste strane kao i karbonilna grupa (CH<sub>3</sub>-8). U spektru prikazanom na Slici 7.7.2b. takođe se uočava negativan (indirektan) *NOE* efekat signala lociranog na 1,81 ppm koji potiče od H-3<sub>endo</sub>. Pojava ovakvog *NOE* efekta posledica je uticaja ozračivanja signala CH<sub>3</sub>-8, koji se posredstvom H-3<sub>egzo</sub> indirektno prenosi na H-3<sub>endo</sub> indukujući negativni *NOE* efekat.

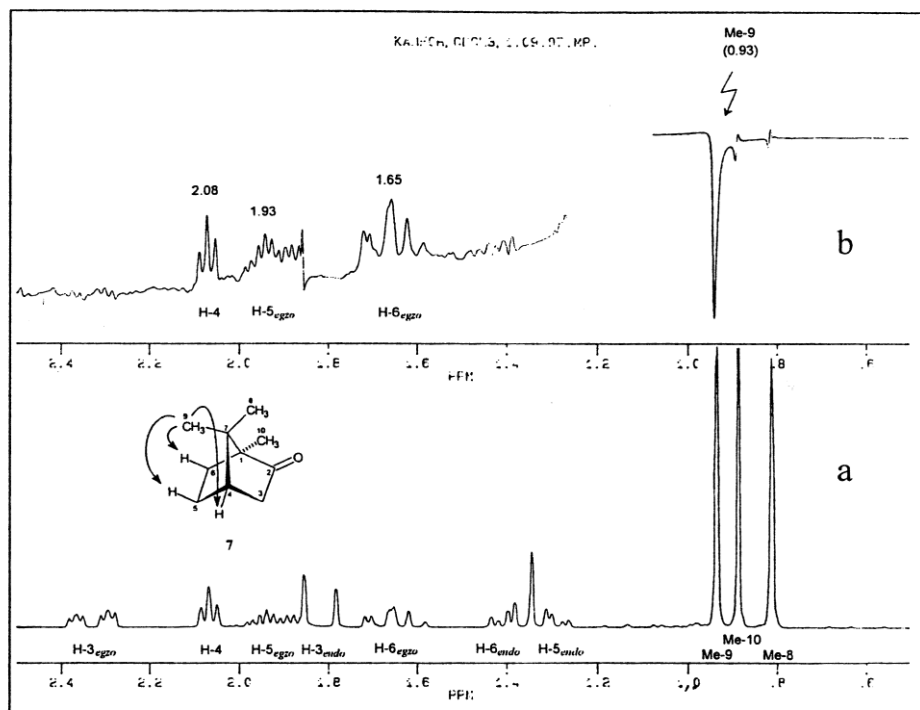


Slika 7.7.2. a) 250 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektar kamfora (u CDCl<sub>3</sub>); b) Diferencijalni *NOE* spektar kamfora snimljen uz ozračivanje signala metil grupa na 0,81 ppm.

Nakon ozračivanja signala druge geminalne metil grupe (0,93 ppm), pored signala za H-4 (2,08 ppm) i H-5<sub>egzo</sub> (1,93 ppm), takođe se povećava intenzitet multipleta na 1,65 ppm (Slika 7.7.3b), za koji je na taj način utvrđeno da potiče od H-6<sub>egzo</sub>. Konačno proizilazi da preostala dva delimično preklapljeni signala odgovaraju rezonanci H-5<sub>endo</sub> (1,30 ppm) i H-6<sub>endo</sub> (1,40 ppm).

Na Slici 7.7.4. prikazan je <sup>13</sup>C NMR spektar kamfora koji je, kao i kod većine prethodnih primera, snimljen uz ozračivanje svih protona, tehnikom *dvostruke rezonance* (takozvano *dekuplovanje širokog opsega*). Pri tome su isključena direktna i daljinska C,H sprezanja (daljinsko C,H

sprezanje odigrava se preko dve ili više veza). Signali u ovom slučaju ne pokazuju multipletnost pa je spektar jednostavniji, ali zato ne pruža dodatne informacije o broju protona na pojedinim ugljenikovim atomima, kao ni odgovarajuće podatke o strukturnim i stereochemijskim osobinama datog molekula. Signali koji su orijentisani na niže (u odnosu na baznu liniju) potiču od metilenskih i kvaternernih C-atoma, dok signali orijentisani gore sadrže neparan broj H-atoma (CH i CH<sub>3</sub> grupe).

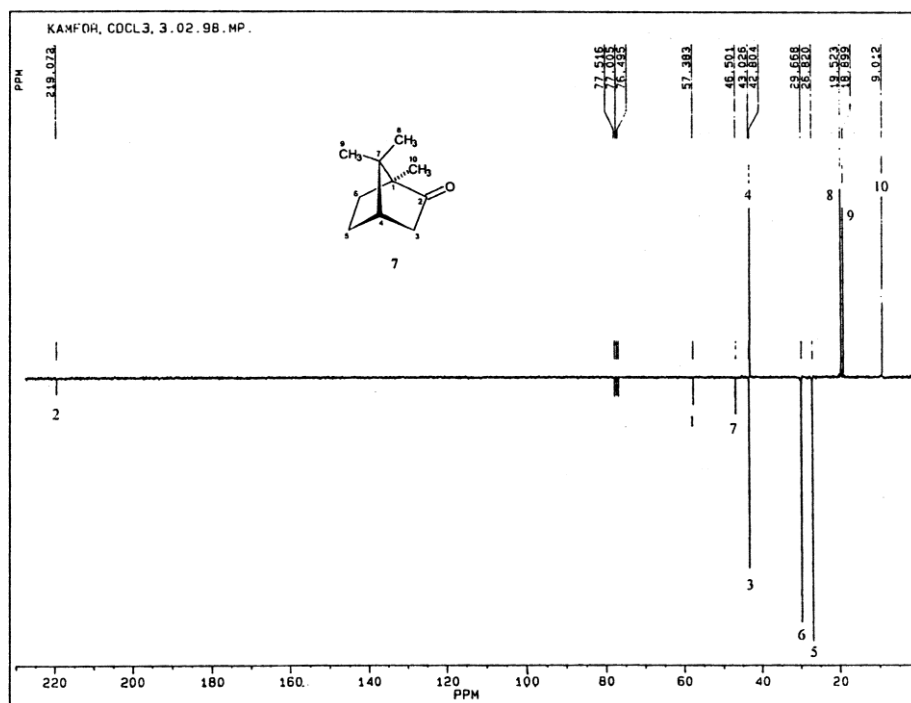


Slika 7.7.3. a) 250 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektar kamfora (7) (u CDCl<sub>3</sub>); b) Diferencijalni NOE spektar kamfora (7) snimljen uz ozračivanje signala metil grupa na 0,93 ppm.

Izdvojeni signal na 219 ppm karakterističan je za karbonilni ugljenik nekonjugovane keto grupe i može se asignirati kao C-2. Assignacija preostalih signala u spektru kamfora može se ostvariti tehnikom selektivnog dekuplovanja protona, tkzv. tehnikom *van-rezonancionog dekuplovanja* (engl. *Off-resonance Decoupling*). U tu svrhu prvo se mora asignirati protonski spektar, a takođe se naknadno mora snimiti i <sup>13</sup>C NMR spektar sa sačuvanim C,H sprežanjem (engl. *Gated Decoupling*). Nakon toga sledi detekcija pojedinih C-atoma koja sastoji se u ozračivanju specifičnih protona njihovom sopstvenom frekvencom, što uslovljava smanjenje multipletnosti signala samo onog C-atoma za koji je taj proton direktno vezan, odnosno koji se skalarno spreže sa ozračenim protonom (selektivno heteronuklearno dekuplovanje). Signal pomenutog



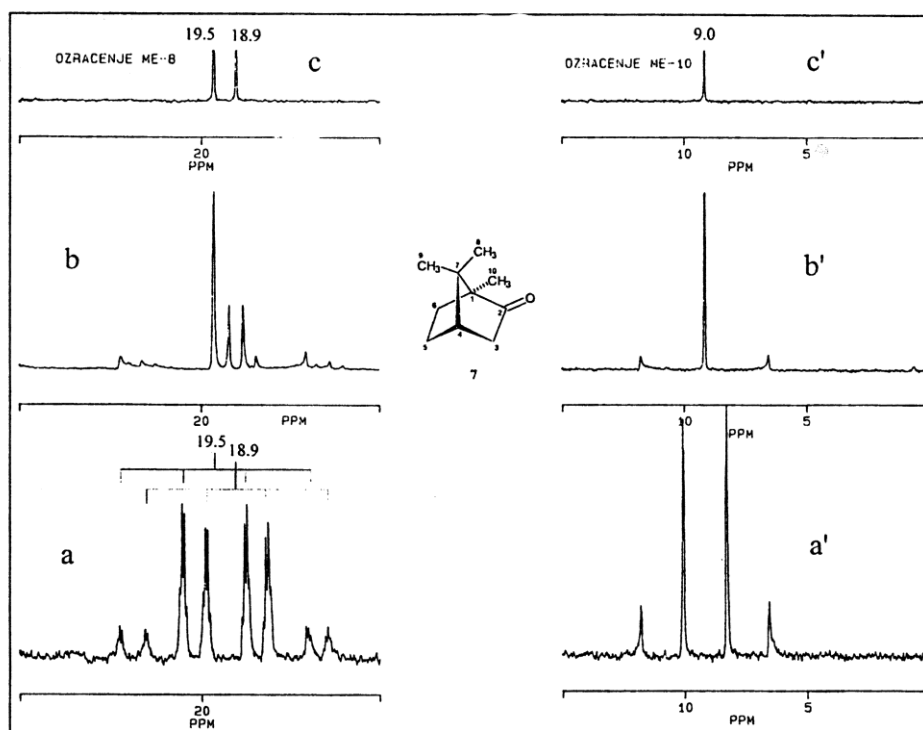
ugljenika, koji se u spektru sa očuvanom multipletnošću prostirao u širokoj oblasti spektra (javljao se kao multiplet), značajno se sužava ili čak prelazi u singlet, ukoliko nema dodatnih vicinalnih ili geminalnih spreznja sa preostalim protonima koji nisu ozračeni. Upoređivanjem selektivno dekuplovanog spektra sa spektrom očuvanog C,H spreznja, lako se identifikuju signali pojedinačnih C-atoma. Na Slici 7.7.5. prikazani su rezultati pomenutih eksperimenata na primeru kamfora (**7**).



Slika 7.7.4. 62.5 MHz <sup>13</sup>C NMR Spektar kamfora (**7**) (u CDCl<sub>3</sub>).

Signali metil grupa locirani su u oblasti visokih vrednosti magnetnog polja i javljaju se kao multipleti u spektrima koji su snimljeni bez dekuplovanja protona (Slika 7.7.5a. i 7.7.5a'). Signal sa najmanjim hemijskim pomeranjem (9,00 ppm) pripada CH<sub>3</sub>-10 jer po multipletnosti odgovara kvartetu dubleta (qd; Slika 7.7.5a'). Kvartetna struktura ovog signala sa odnosom intenziteta pikova od 1:3:3:1 posledica je direktnog C,H spreznja, a saglasno *n+1 pravilu* zaključujemo da tri ekvivalentna protona uzrokuju pomenuto spreznje. Pošto je svaki pik pomenutog kvarteta dodatno pocepan na dublet male konstante spreznja (3 Hz) proizilazi da je C-atom iz CH<sub>3</sub>-10 dodatno daljinski kuplovan sa H-4 preko četiri veze. Definitivna potvrda asignacije signala na 9,0 ppm dobijena je kada su pri detekciji <sup>13</sup>C signala dekuplovani protoni iz CH<sub>3</sub>-10. Pri tome se pomenuti kvartet dubleta transformisao u dublet sa minimalnom konstantom spreznja (<sup>4</sup>J<sub>C,H</sub> =

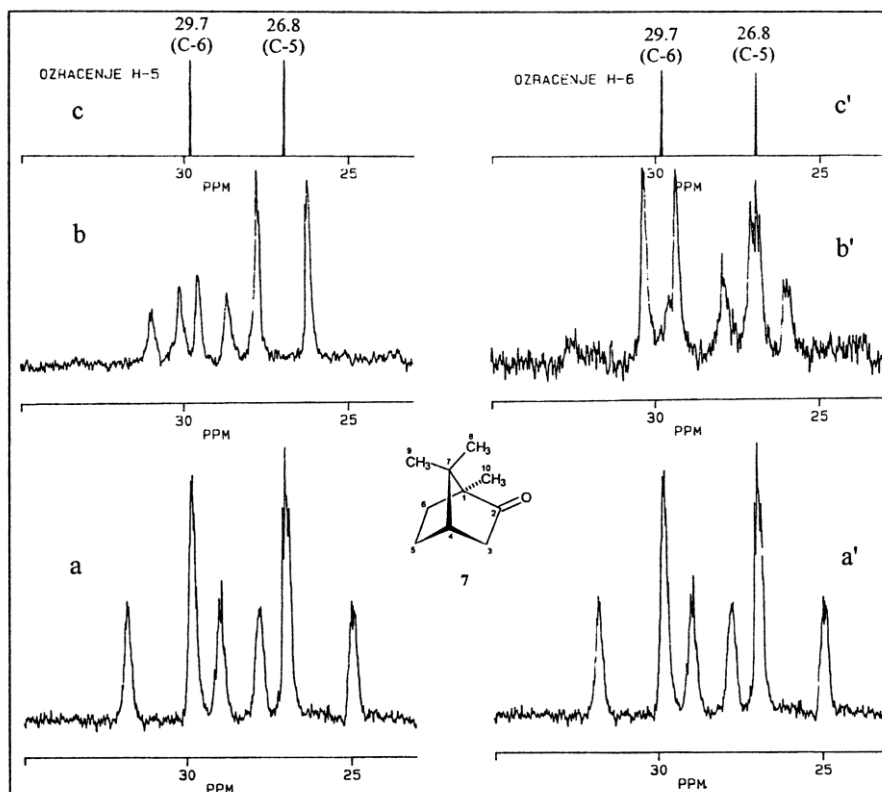
3 Hz; Slika 7.7.5b'). Signali locirani na 18,9 i 19,5 ppm potiču od rezonance C-atoma iz geminalnih metil grupa (CH<sub>3</sub>-9 i CH<sub>3</sub>-8; Slika 7.7.5c) na šta ukazuje njihova multiplentnost vidljiva u spektru snimljenom bez H-dekuplovanja (Slika 7.7.5a). Signali pomenutih metil grupa javljaju se kao kvarteti kvarteta (qq) jer se svaki C-atom direktno spreže sa tri vezana protona (<sup>1</sup>J<sub>C,H</sub>), a takođe se i daljinski kupluje sa tri protona iz geminalne metil grupe (<sup>3</sup>J<sub>C,H</sub> = 6 Hz). Selektivnim ozračivanjem vodonika iz CH<sub>3</sub>-8 pojednostavljuje se signal na 19,5 ppm (Slika 7.7.5b) čime je izvršena asignacija sva tri signala u oblast najviših vrednosti magnetnog polja. Upoređivanjem <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara kamfora (Slike 7.7.1a. i 7.7.4) uočava se da redosled hemijskih pomeranja H-atoma ne prati redosled hemijskih pomeranja za C-atome odgovarajućih metil grupa.



Slika 7.7.5. 62.5 MHz <sup>13</sup>C NMR Spektari kamfora (**7**) snimljeni: a i a'- bez dekuplovanja protona; b – uz ozračivanje CH<sub>3</sub>-8; c i c' – uz dekuplovanje svih protona (tehnikom dvostruke rezonance).

Na Slici 7.7.6. prikazana je asignacija signala lociranih na 29,7 i 26,8 ppm, nakon selektivnog ozračivanja jednog H-5 protona (Slika 7.7.6b), pri čemu se multiplentnost signala na 26,8 ppm smanjuje (C-5), dok ozračivanje jednog H-6 protona uslovljava pojednostavljivanje multiplenta na 29,7 ppm što znači da ovaj signal potiče od C-6 (Slika 7.7.6b'). Preostala tri signala (57,4, 46,5 i

43,0 ppm) koji su orijentisani na dole (qC i CH<sub>2</sub>) mogu se asignirati na osnovu njihovih relativnih intenziteta. Naime, poznato je da se kvaternerni C-atomi najsporije relaksiraju, pa su stoga intenziteti njihovih signala slabiji. U strukturi kamfora osim ugljenika iz keto-grupe postoje još dva takva C-atoma: C-1 i C-7, pa se njima mogu pripisati signali locirani na 57,4 i 46,5 ppm. Preostali najintenzivniji signal (na 43,0 ppm) odgovara CH<sub>2</sub>-3, dok njemu blizak, suprotno



Slika 7.7.6. 62.5 MHz <sup>13</sup>C NMR Spektri kamfora (**7**): a i a' – bez dekuplovanja protona; b – uz ozračivanje H-5; b' – uz ozračivanje H-6; c i c' – uz dekuplovanje svih protona (tehnikom dvostruke rezonance).

orijentisani signal (42,8 ppm) potiče od rezonance CH-4.

Na Slici 7.7.7. prikazan je protonski NMR spektar oksima kamfora (**8**) koji se u odnosu na protonski spektar polaznog jedinjenja **7** razlikuje, između ostalog, po prisustvu širokog pika na 9,15 ppm, koji odgovara rezonanci OH protona iz oksimino funkcije.



Na Slici 7.7.8. prikazan je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar oksima kamfora (**8**). Karakteristična promena u odnosu na spektar polaznog kamfora je da spektar oksima **8**, umesto signala C-atoma iz keto-grupe, sadrži signal lociran na 169,8 ppm koji potiče od rezonance ugljenikovog atoma iz oksimino funkcije (C=N-OH).

## 8. LITERATURA

1. J. Hranisavljević: *Hemija prirodnih proizvoda*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1983.
2. B. Grujić-Injac, S. Lajšić: *Hemija prirodnih proizvoda*, Filozofski fakultet, Niš, 1983.
3. R. Ikan: *Natural Products a Laboratory Guide*, Israel University Press, Jerusalem, 1969.
4. V. Đurđić-Ilić: *Praktični radovi iz hemije prirodnih proizvoda, I deo*, Naučna knjiga, Beograd, 1967.
5. F. L. J. Sixma, H. Wynberg: *Manual of Physical Methods in Organic Chemistry*, John Wiley, New York 1964.
6. Grupa autora: *Organikum - praktikum iz organske hemije*, Naučna knjiga, Beograd, 1972.
7. S. A. Grujić, O. S. Gašić, A. S. Vujkov: *Praktikum iz biohemije*, Naučna knjiga, Beograd, 1968.
8. M. Sarić, R. Kastori, R. Čurić, T. Čupina, I. Gerić, M. Petrović: *Praktikum iz fiziologije biljaka, II izdanje*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1978.
9. M. N. Turčić, N. J. Marjanović, I. F. Jankovits: *Praktikum za vežbe iz analize životnih namirnica*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1976.
10. J. A. Elvidge, P. G. Sammes: *A Course in Modern Techniques of Organic Chemistry, II izdanje*, Butterworths, London, 1966.
11. E. Stahl: *Thin-layer Chromatography, II izdanje*, Springer Verlag, Berlin, 1969.
12. J. Hranisavljević, N. Vukojević: *Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1979.
13. I. Vogel: *A Textbook of Practical Organic Chemistry, V izdanje*, Longman & Wiley, New York, 1989.
14. Ž. Čeković: *Eksperimentalna organska hemija*, Hemijski fakultet, Beograd, 1995.
15. T. O. Safronova, D. M. Popov, T. F. Shevchenko, *Khim. Farm. Zh.*, **1** (1982) 110.
16. G. Kelemen, M. Bálint, Gy. Hegyi, K. Ajtai: *Biokémiai gyakorlatok*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1982.
17. G. Quinkert, E. Egert, Ch. Griesinger: *Aspects of Organic Chemistry*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, 1996.
18. J. F. Kennedy: *Carbohydrate Chemistry*, Clarendon Press, Oxford, 1988.

19. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas: *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, New York, 1970.
20. J. K. M. Sanders, B. K. Hunter: *Modern NMR Spectroscopy (A Guide for Chemists)*, Oxford University Press, Oxford, 1987.
21. J. K. M. Sanders, E. C. Constable, B. K. Hunter: *Modern NMR Spectroscopy. A Workbook of Chemical Problems*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
22. S. M. Milosavljević: *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd, 1994.
23. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz: *A small scale approach to Organic Laboratory Techniques*, 3<sup>rd</sup> Ed. 2011 Brooks/Cole, Cengage Learningm, Belmont, USA.
24. R. Ikan: *Natural products, A laboratory guide*, 2<sup>nd</sup> Ed. 1991, Academic Press, Inc. San Diego, California.

