

# Saponini

---

**Klarić, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:784828>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Petra Klarić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# SAPONINI

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

31. svibnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

11. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. SAPONINI.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Fizikalno-kemijska svojstva .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Klasifikacija .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Triterpenski saponini .....	6
2.2.2. Steroidni saponini .....	9
<b>2.3. Sinteza .....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Biosinteza.....	14
2.3.2. Kemijska sinteza.....	17
<b>2.4. Analiza i izolacija .....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Ekstrakcija .....	19
2.4.2. Reakcije bojenja.....	20
2.4.3. Kromatografija.....	20
<b>2.5. Primjena.....</b>	<b>22</b>
2.5.1. Primjena u medicini .....	22
2.5.2. Komercijalna upotreba .....	23
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXIV</b>



## § Sažetak

Saponini su sekundarni biljni metaboliti koji se tradicionalno dijele na triterpenske i steroidne saponine. Pomnijim proučavanjem stukture možemo ih svrstati u 11 razreda. Nalaze se u raznim biljkama, a mogu ih sintetizirati i neki morski organizmi. U hrani ih prepoznamo po karakterističnim okusima; odgovorni su za gorčinu šparoga i patlidžana, ali i ugodnog, slatkog okusa sladića. Najpoznatiji su po sposobnosti stvaranja pjene u vodenim otopinama zbog čega su se godinama koristili kao sredstva za pranje tijela i odjeće. Njihov puni potencijal prepoznat je u 20. st. kada su zbog bioloških i farmakoloških svojstava našli primjenu u medicini i komercijalnoj upotrebi. Tema su raznih istraživanja gdje se ispituje i proučava njihova biološka aktivnost. Zbog velike potražnje, i problema koje predstavlja izolacija iz biljaka, neprestano se razvijaju nove metode njihove analize i kemijske sinteze.

## § 1. UVOD

Saponini su skupina prirodnih organskih spojeva, glikozida, koji su građeni od jedne ili više šećernih jedinica vezanih za aglikon steroidne ili triterpenske strukture.

Ova skupina bioaktivnih spojeva široko je rasprostranjena u biljkama velike agrokulturne važnosti. Neke od tih biljaka koristile su se kao alternativni sapun što se može primijetiti iz njihovih imena: *Saponaria Officinalis*, *Quillaja Saponaria*, *Sapindus Saponaria*. Naime, ime „saponin“ potječe od latinske riječi *sapo* koja znači sapun. Iako saponine i sapune ne svrstavamo u istu vrstu spojeva, primjenjuju se u identične svrhe već stotinama godina. Kuhanjem biljke saponike (*Saponaria Officinalis*) prala se odjeća, a dobivena otopina toliko je blaga da se njome mogla oprati kosa i tijelo. Danas se upotrebljava za čišćenje osjetljivih tkanina. Sjevernoamerički Indijanci, posebice žene koje su se pripremale za brak, su tijelo prali cvijećem crvenog korijena (*Ceanothus americanus*).<sup>1</sup>

Saponine nalazimo i u namirnicama svakodnevne prehrane: soja, zlatni i crveni grah, grašak, bob, leća, zob, špinat, šparoge, šećerna repa, luk, češnjak, krumpir, batat, paprika, rajčica. Iako je najveći izvor saponina biljno carstvo, mogu ih sintetizirati neke bakterije i morski organizmi poput morskog krastavca (*Holothuroidea*), morske zvijezde (*Asteroidea*) i ježinca (*Echinoidea*).

Sa saponinima se susrećemo svakodnevno i predstavljaju velik dio naše prošlosti, no zanimanje za ove spojeve počelo je tek početkom 20. st. Austrijski farmakolog Ludwig Kofler je 1927. godine objavio knjigu „Die Saponine“ u kojoj daje detaljan uvid u njihova fizikalno-kemijska i ljekovita svojstva. Ubrzo je primijećen ogroman potencijal ovih spojeva te su do 1987. godine riješene strukture više od 350 saponina i 750 triterpenskih glikozida. Pozornost su privukli najviše zbog bioloških i farmakoloških svojstava zbog kojih su se ubrzo našli u komercijalnoj upotrebi.

Svrha ovog rada je predstaviti saponine, upoznati se s njihovim svojstvima i karakterizacijom, prikazati načine sinteze i iznijeti problematiku analize i izolacije.



## § 2. SAPONINI

### 2.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Usljed strukturne složenosti saponini pokazuju razna svojstva od kojih su najpoznatija sposobnost pjenušanja, emulzificiranje i formiranja micela. Ovisno o građi aglikona, razlikuje se topljivost i ostala fizikalna svojstva saponina. Obično su topljivi u organskim otapalima od kojih su neka navedena u tablici 1.

Tablica 1. Fizikalna svojstva odabranih aglikona i saponina.<sup>2</sup>

Spoj	Molekulska formula	Topljivost	Izvor	Molekulska masa (g/mol)	Talište (°C)
<b>Aglikon</b>					
Oleanolna kiselina	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Netopljiva u vodi, topljiva u eteru, alkoholu w=95%, kloroformu, acetonu, metanolu	<i>Quinoa</i>	457	310
Kvilaja kiselina	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	Topljiva u alkoholu, eteru, acetonu, etil acetatu, anhidridu octene kiseline	<i>Quillaja</i>	487	292-293
Diozgenin	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	Topljiv u octenoj kiselini i općenito u organskim otapalima	<i>Dioscorea</i> , batat, piskavica	415	204-207
<b>Saponin</b>					
Glicirizin	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	Topljiv u vrućoj vodi, alkoholu, netopljiv u eteru	Sladić	823	
α-escin	C <sub>55</sub> H <sub>86</sub> O <sub>24</sub>	Topljiv u vodi i metanolu, slabo topljiv u acetonu, netopljiv u eteru	Divlji kesten		225-227
β-escin	C <sub>55</sub> H <sub>85</sub> O <sub>24</sub>	Topljiv u metanolu, slabo topljiv u acetonu, netopljiv u vodi i eteru	Divlji kesten		222-223
Gisofija	C <sub>35</sub> H <sub>61</sub> O <sub>24</sub>	Topljiv u vodi (0,5147g/100mL pri 25°C)	<i>Gypsophia</i>	863	221-227

Saponini se definiraju kao površinski aktivne tvari sa svojstvima nalik deterdžentu. Površinski aktivne tvari smanjuju površinsku napetost vode i na taj način omogućavaju nastajanje pjene. Formiranje stabilne pjene jedna je od temeljnih karakteristika ovih spojeva te se koristi kao indikator prilikom ispitivanja pristutnosti saponina u tvarima. Ipak, metodi valja pristupiti s oprezom jer postoje iznimke koje miješanjem sa vodom neće tvoriti pjenu. Sposobnost i jakost pjenjenja određuje se metodom po O'Dellu. Ovom metodom dobivamo poveznicu između količine nastale pjene i koncentracije saponina. Uočeno je da se najviše pjene saponini koji u strukturi sadrže samo jedan lanac ugljikohidrata, dok se intenzitet smanjuje povećanjem broja ugljikohidratnih jedinica u molekuli.

### Test na saponine

Priprema otopine: Kora drveta *Symplocos racemosa* osuši se i usitni do finog praha. Prah se ekstrahira uz zagrijani petroleter temperature 60-80 °C. Višak otapala se ukloni pomoću rotacijskog uparivača. Osušeni produkt se potom ekstrahira etanolom (w=95%) koji se upari na isti način.

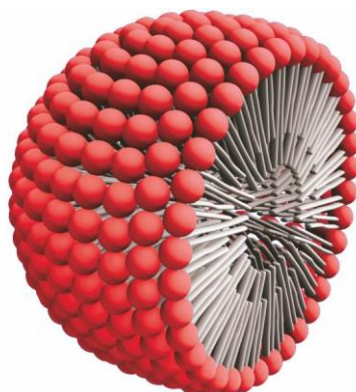
U epruvetu se ulije 1 mL sirovog etanolnog ekstrakta i 20 mL destilirane vode. Epruveta se začepi isnažno trese otprilike 5-10 min, nakon čega se ostavi stajati barem 20 min. Postojana pjena ukazuje na prisutstvo saponina. U epruvetu se ulije 1 mL sirovog ekstrakta i dokapava 1 mL otopine olovova(II) acetata (w=1%). Nastajanje bijelog taloga dokazuje prisutnost saponina.<sup>3</sup>

### Metoda po O'Dellu

U graduirani cilindar od 25 mL ulije je 5 mL 0,01-1% otopine saponina i 5 mL otopine  $K_2PO_4$  koncentracije  $0,06 \text{ mol/dm}^{-3}$ . Sadržaj se snažno trese tijekom 1min i promatra količina nastale pjene.<sup>4</sup>

Za saponine kažemo da su amfipatske molekule jer sadrže hidrofilne i hidrofobne dijelove. Zbog takve kemijske strukture u vodenim otopinama tvore micelle kao što je prikazano na slici 1. Do povezivanja molekula doći će tek iznad kritične micelarne koncentracije (CMC), dok će ispod nje molekule biti slobodne. Povećavanjem koncentracije dolazi do otpuštanja molekula vode iz solvatacijske sfere čime se povećava entropija i čini ovaj proces energijski povoljnijim. Formiranje micelle ovisi o sklonosti nepolarnih skupina da

izbjegavaju vodu i odbijaju polarnih glava. Micele su građene tako da se na površini nalaze polarni šećeri, a u unutrašnjosti nepolaran sapogenin. Veličina i oblik ovisi o vrsti saponina. Struktura aglikona bitno utječe hoće li micela poprimiti kružni oblik ili će biti izdužena. Saponini iz sapunike (*Saponaria Officinalis*) i sojini saponini formiraju micele građene od samo dvije molekule. Suprotno tome, saponini iz kvilaje (*Quillaja Saponaria*) grade velike agregate od čak 50 molekula.<sup>5</sup> Povećavanjem pH vrijednosti i temperature vodene otopine povećava se kritična micelarna koncentracija i broj monomera u miceli.



Slika 1. Prikaz micelle u vodenoj otopini.

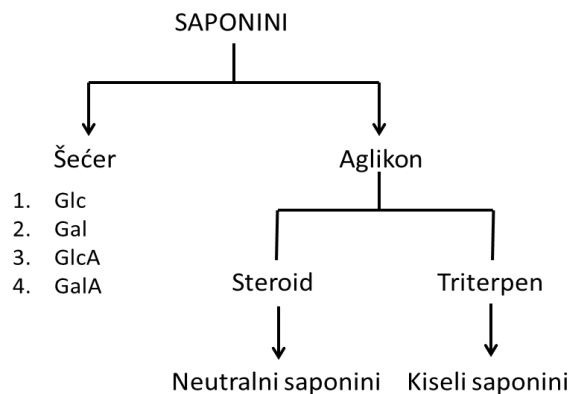
Na površinsku aktivnost saponina utječe njegova struktura, odnosno položaj karboksilne skupine u molekuli. Ukoliko se nalazi na hidrofilnom dijelu, disocira u vodenoj otopini prilikom čega nastaje  $\text{-COO}^-$  anion i postaje polarnija. Na taj način povećavaju topljivost tvari koje inače nisu topljive u vodi.

Skladištenje saponina od velike je važnosti jer su glikozidne veze podložne hidrolizi. Ovisno o tome nalaze li se u kiselim ili bazičnim uvjetima, ili u prisutnosti enzima, dati će različite produkte. Potpunom kiselom hidrolizom dobije se šećer i aglikon, dok djelovanjem baze na O-glikozid nastaje prosapogenin. Stabilni su pri visokim temperaturama te im se biološka aktivnost ne smanjuje običnim kuhanjem. U hrani ih najčešće povezujemo uz gorak okus hrane, premda su neki saponini odgovorni za slatkoću. Mnogi pokazuju hemolitički efekt, svojstvo vezanja kolesterola, pesticidna i fungicidna svojstva te otrovnost za ribe.

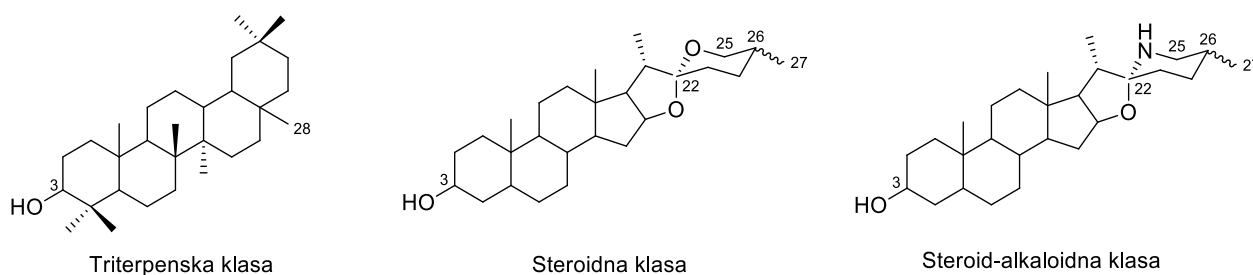
## 2.2. Klasifikacija

Saponini su građeni od šećera i aglikona koji se naziva sapogenin. Prema strukturi sapogenina razlikujemo neutralne saponine koji su derivati steroida, i kisele koji imaju triterpensku strukturu. Najmanju skupinu čine steroidni alkaloidi u čijoj se strukturi nalazi dušik.

Navedene klase saponina prikazane su na slici 2. Detaljnijim proučavanjem strukture aglikona možemo saponine podijeliti u 11 razreda: damarani, tirukalani, lupani, hopani, oleanani, taraksasterani, ursani, cikloartani, lanostani, kukurbitani i steoridi.<sup>6</sup>



Shema 1. Klasifikacija saponina prema sapogeninu.



Slika 2. Prikaz glavne tri klase sapogenina.

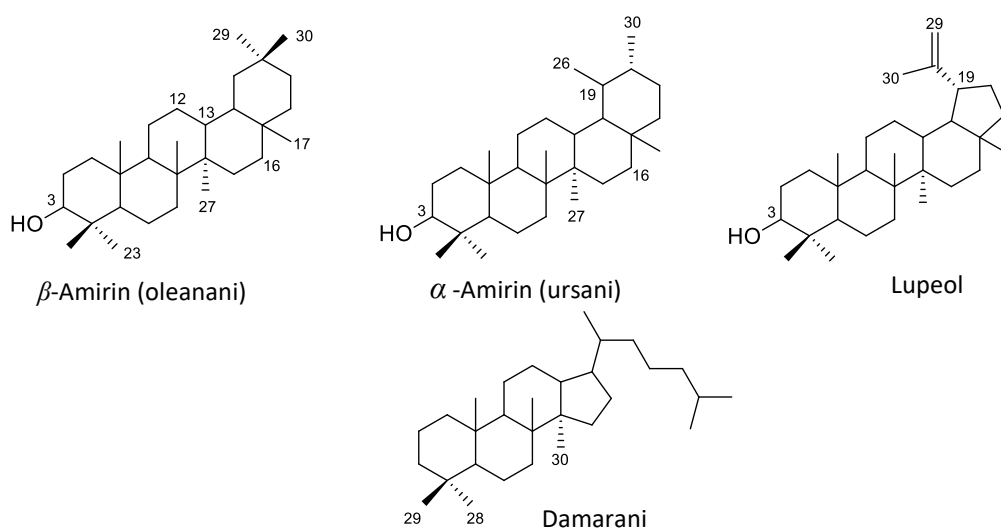
Saharidi su na aglikon vezani glikozidnom vezom, a mogu biti linearnih ili razgranatih struktura. Prema broju vezanih šećera dijelimo ih na mono-, di- i tridezmičke. Monodezmički saponini imaju vezan jedan lanac šećera, obično na C-3 atomu sapogenina. Didezmički imaju dodatan šećer na C-26 kod steroidnih saponina, ili na C-28 atomu povezan esterskom vezom kod triterspenskkih saponina. Hidrolizom šećera vezanog na C-28 atomu didezmičkih saponina dobit ćemo monodezmički, no neće pokazivati njegova svojstva i karakteristike. Tridezmički saponini imaju vezana tri lanca šećera te su izrazito rijetki. Strukture sa više od 3 vezana šećera nazivamo oligozidima. U strukturi saponina obično se nalaze 2-5 jedinice šećera. Klematozid C izoliran iz *Clematis manshurica* (Ranunculaceae) s 11 vezanih šećera poznat je kao saponin sa najviše monosaharidnih jedinica u strukturi.<sup>4</sup> Najčešći monosaharidi koje nalazimo su: D-glukoza (Glc), D-galaktoza (Gal), D-glukuronska kiselina (GlcA),

D-galakturonska kiselina (GalA), D-ksiloza (Xyl), D-fukoza (Fuc), L-ramanoza (Rha), i L-arabinoza (Ara). U morskim organizmima pojavljuju se metilirani i sulfonirani šećeri, dok su u biljkama acilirani.

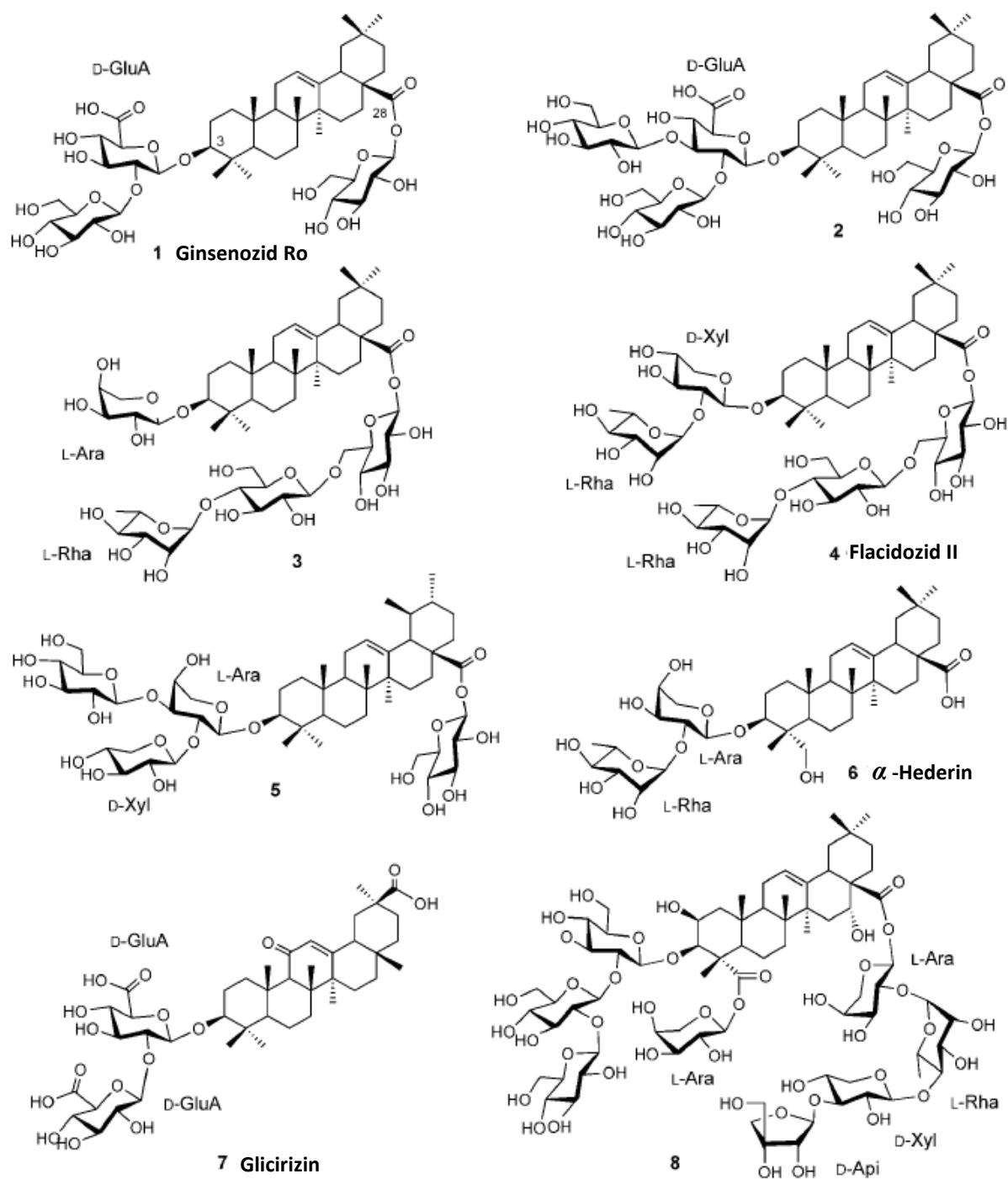
Sapogenini mogu sadržavati jednu ili više nezasićenih veza. Obično su hidroksilirani na C-3 atomu. Određene metilne grupe tijekom biosinteze ili prilikom skladištenja prolaze kroz razne kemijske transformacije što uvelike doprinosi raznolikosti ovih spojeva. Najčešće funkcionalne grupe su  $-CH_3$ ,  $-OH$  i  $-COOH$ .

### 2.2.1. Triterpenski saponini

Triterpenski saponini su glikokonjugati triterpena. Najbrojnija su grupa saponina te ih pretežito nalazimo u dvosupnicama i mahunarkama poput *Leguminosae*, *Araliaceae* i *Caryophyllaceae*.<sup>4</sup> Odlikuju se funkcionalizacijom metilnih grupa na C-23, C-28 i C-30 atomu. Građeni su od tetracikličkih ili pentacikličkih struktura s ukupno 30 ugljikovih atoma. Tetraciklički triterpeni karakteristični su za razred damarana. Pentacikličke sapogenine dijelimo u tri razreda ovisno sadrže li  $\beta$ -amirin,  $\alpha$ -amirin ili lupeol. Navedene strukture nalaze se na slici 3. U prirodi su najzastupljeniji saponini koji sadržavaju  $\beta$ -amirin i čine više od 50% ukupog broja. Oleanolna kiselina najčešći je sapogenin ove klase. Od  $\beta$ -amirina razlikuje se samo po C-17 atomu gdje je metilna skupina oksidirana do karboksilne skupine. Nalazi se u lišću maslina (*Olea europaea*; *Oleaceae*), pupoljcima biljke *Syzgium aromaticum* (*Myrtaceae*), *Viscum album* (*Loranthaceae*) i mnogim drugim.<sup>4</sup> Ostali predstavnici prikazani su na slici 4.



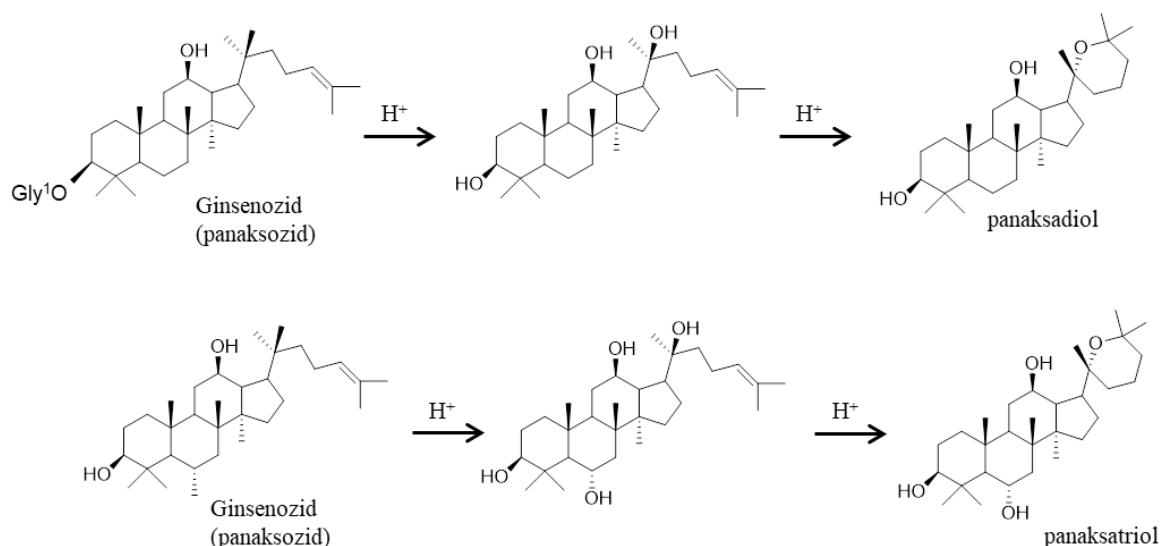
Slika 3. Razredi i strukture pentacikličkih i tetracikličkih triterpenskih saponina.



Slika 4. Predstavnici triterpenskih saponina sa pentacikličkim aglikonima.<sup>7</sup>

Glicirizin se nalazi u korijenu sladića (*Glycyrrhiza glabra*) koji pretežito raste u Europi i središnjoj Aziji. Građen je od  $18\beta$ -gliciretinske i  $O$ - $\beta$ -D-glukoronozil-(1'→2)- $\beta$ -D-glukoronske kiseline. U komercijalnoj formi sastoji se od smjese  $18\alpha$ - i  $18\beta$ -gliciretinske kiseline zbog izomerizacije aglikona tijekom procesa izolacije. Slađi je od saharoze 50-150 puta i često se koristi kako bi prikrrio gorak okus lijekova. Postaje sve veća tema istraživanja zbog protuupalnih, antivirusnih i antikancerogenih svojstava.

Ginseng je korijen biljke roda *Panax* kao što su korejski (*P. ginseng*), kineski (*P. notoginseng*) i američki ginseng (*P. quinquefolius*). Naziv roda postavio je ruski botaničar C. A. Meyer, a dolazi od grčke riječi *pan* što znači sve, i *axos* što znači lijek. Ime vrste izvedeno je iz kineske riječi *jensheng*, a podrazumijeva biljku čiji korijen nalikuje na ljusko tijelo.<sup>8</sup> Iz toga proizlazi da naziv biljke znači „sveljekovita čovjekolika biljka“. U Kini i Rusiji stoljećima se koristio za liječenje anemije, dijabetesa, gastritisa, nesanice i impotencije. U današnje vrijeme klasificira se kao adaptogen kako bi se opisala njegova sposobnost povećanja otpornosti na stres, podizanja razine energije i opću vitalnost organizma. Za navedena svojstva zaslužna je skupina saponina pod nazivom ginsenozidi. Pripadaju grupi damarana i predstavljaju derivate protopanaxadiola i protopanaxatriola. Reakcije hidrolize u kiselim uvjetima, pri čemu se dobije panaksadiol i panaksatriol, prikazane su na shemi 2. Karakterizirano je više od 30 ginsenozida među kojima je Rb<sub>1</sub> najrasprostranjeniji diol, a Rg<sub>1</sub> najčešći triol.<sup>9</sup> Odabrani ginsenozidi i njihove strukture navedeni su u tablici 2.



Shema 2. Reakcije hidrolize ginsenozida do panaksadiola i panaksatriola.

Tablica 2. Opisane strukture odabranih ginsenoziida.

Ginsenzoid	Gly <sup>1</sup>	Gly <sup>2</sup>
<b>Rb<sub>1</sub></b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Glc-Glc-	$\beta 1 \rightarrow 6$ -Glc-Glc
<b>Rb<sub>2</sub></b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Glc-Glc-	$\beta 1 \rightarrow 6$ -Ara-Glc
<b>Rc</b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Glc-Glc-	$\beta 1 \rightarrow 6$ -Ara-Glc
<b>Rd</b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Glc-Glc-	Glc
<b>Re</b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Rha-Glc-	Glc
<b>Rf</b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Glc-Glc-	H
<b>Rg<sub>1</sub></b>	Glc	Glc
<b>Rg<sub>2</sub></b>	$\beta 1 \rightarrow 2$ Rha-Glc-	H

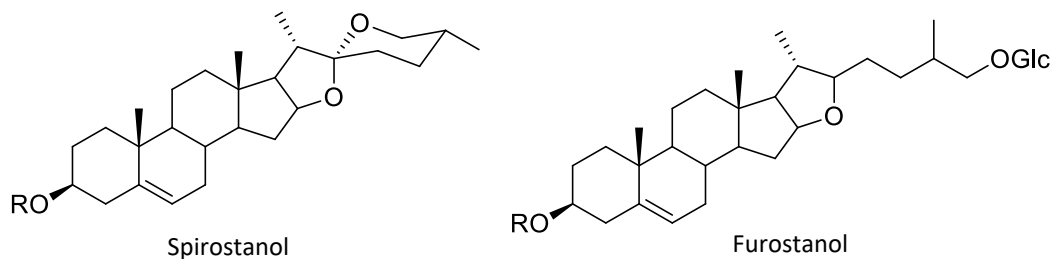
Koncentracija triterpenskih saponina u biljkama velika je u usporedbi s ostalim sekundarnim metabolitima. Korijen jaglaca sarži 5-10% saponina, sladić između 2 i 12% glicirizina, kvilaja do 10% smjese saponina, a divlji kesten 13% escina.<sup>4</sup> Obzirom da se izoliraju iz već hidroliziranih ekstrakata biljki, ne možemo sa sigurnošću znati dolaze li u glikozidnoj formi ili kao slobodni terpeni.

### 2.2.2. Steroidni saponini

Steroidni saponini rjeđi su od triterpenskih te ih nalazimo uglavnom u monosupnicama. Najveći izvor su *Agavaceae*, *Asparagaceae*, *Dioscoreaceae*, *Lilicaceae*, *Amaryllidaceae*, *Bromeliaceae*, *Palmae* i *Scrophulariaceae*.<sup>4</sup> Nastaju oksidativnim cijepanjem triju metilnih

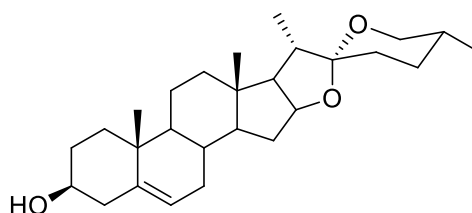


grupa iz zajedničkog međuproducta od 30 C atoma. Aglikone od 27 ugljikovih atoma dijelimo u dvije glavne grupe: spirostane i furostane. Njihove strukture prikazane su na slici 5.

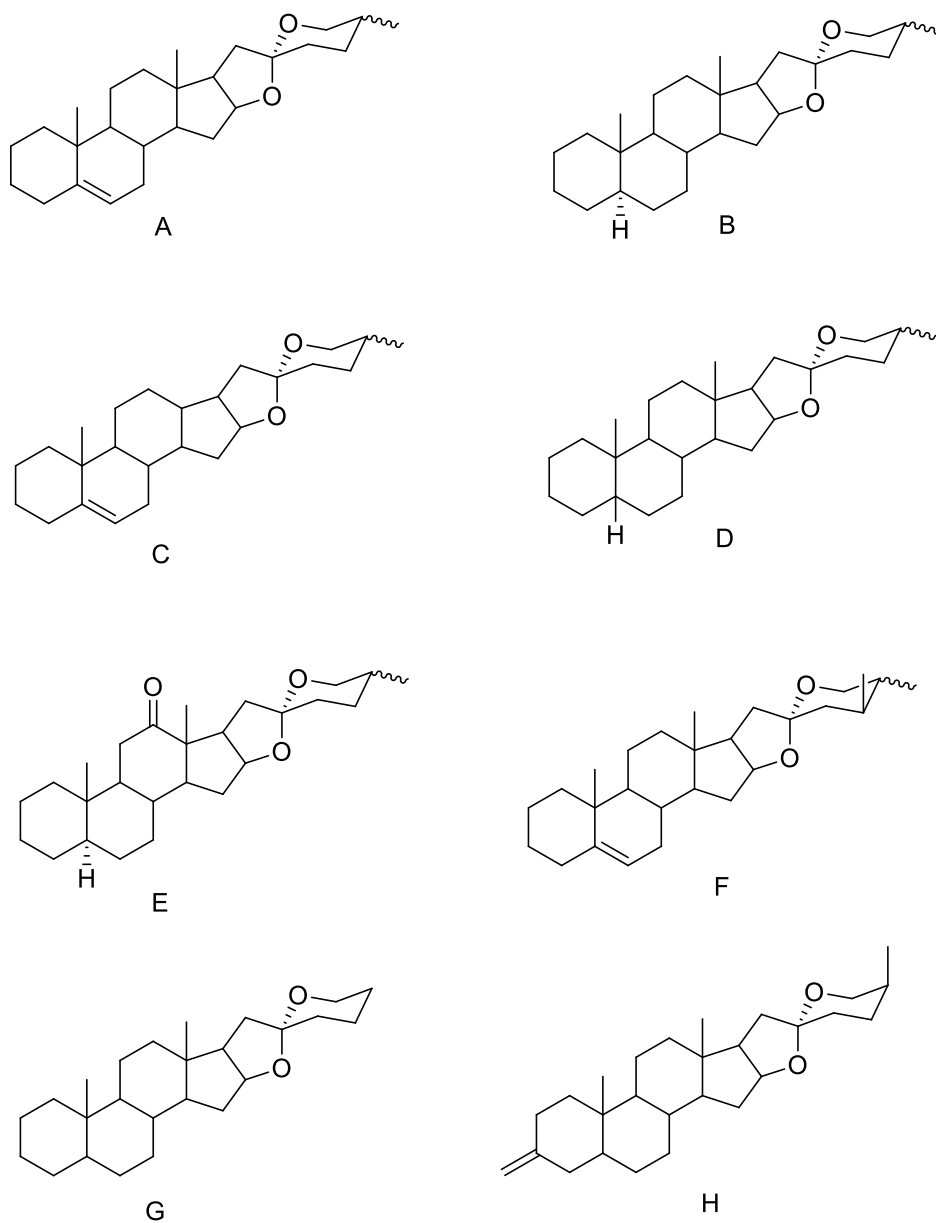


Slika 5. Strukture glavnih glikona steroidnih saponina.

Glikozide spirostanola nalazimo u korijenju, sjemenu i lukovicama biljaka. Poznato je više od 100 različitih struktura spirostanolnih aglikona, no broj kemijski definiranih glikozida relativno je malen zbog problema pročišćavanja i izolacije. Neke od takvih struktura nalaze se na slici 7. Postojanje kiralnih centara na položajima C-20, C-22 i C-25 omogućava nekoliko mogućih izomera. Najrašireniji aglikon je diozgenin (slika 6). Prvi put je izoliran 1936. godine iz japanske biljke *Dioscorea tokoro* po kojoj je dobio ime.<sup>4</sup> Nastaje hidrolizom dioscina, a koristi se kao prekursor u komercijalnoj sintezi steroida poput kortizona, progesterona i pregnetona. Dioscin pokazuje antitumorska, antivirusna, protuupalna i imunostimulirajuća svojstva te se nalazi u brojnim lijekovima.<sup>7</sup>



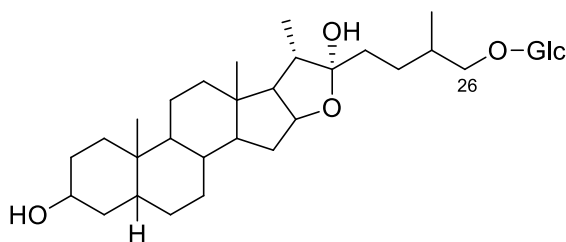
Slika 6. Struktura diozgenina.



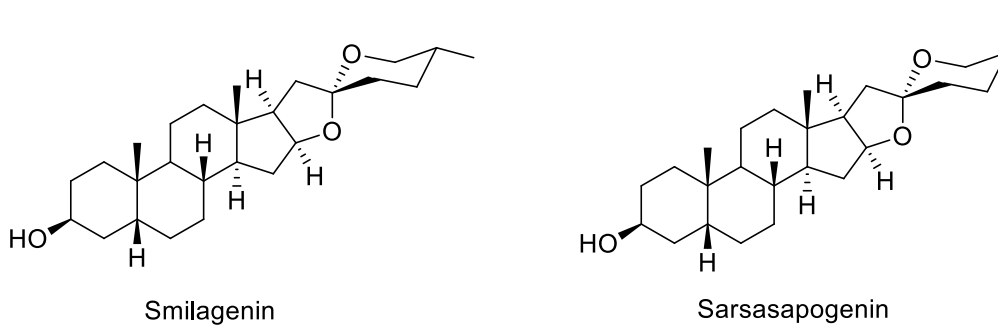
Slika 7. Prikaz najčešćih aglikona spirostanola.

Furostani predstavljaju glikozidne strukture otvorenog lanca. Prvi primjer takvog saponina je jurubin izoliran 1966. godine.<sup>4</sup> Saponini sa furostanskom strukturom ne pokazuju karakteristična obilježja poput hemolitičke aktivnosti, fungicidalnih svojstva i formiranja kompleksa sa kolesterolom. Jedina tipična karakteristika saponina koju posjeduju je stvaranje pjene u vodenim otopinama prilikom mućkanja. Odgovorni su za gorak okus šparoga, sjemena rajčice i ploda piskavice. Nalaze se u lišću i metabolički aktivnim organima gdje dozrijevanjem biljke prelaze u biološki aktivne glikozide spirostanola, zbog čega ih smatramo prijelaznim oblikom. Najjednostavniji pripradnik ove grupe spojeva je monodezmički saponin

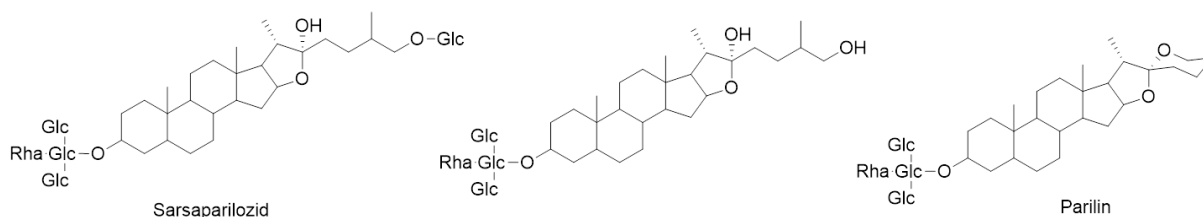
Asparagozid B iz šparoge čija je struktura prikazana na slici 8. Na C-26 atomu obično je vezana glukoza, osim kod Afromontozida odnosno furostanola 26-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozida. Predstavnik glikozida furostanola je Sarsaparilozid iz biljke *Sarsaparilla radix*. Korijen biljke u prošlosti se koristio prilikom liječenja kožnih bolesti, artritisa, bolesti bubrega, sifilisa, protiv upala i za smanjenje bolova, dok se danas upotrebljava u proizvodnji bezalkoholnih pića.<sup>9</sup> Istraživanja predlažu da bi se mogla koristiti za pripremu semisintetskih medicinski važnih steroida obzirom da sadrže sarsasapogenin i smilagenin prikazane na slici 9. Osim navedenih, *Sarsaparilla* sadrži 1,8-2,4% steroidnih saponina, uključujući i parilin. Parilin je derivat spirostanola koji nastaje spontanom zatvaranjem prstena do kojeg dolazi kiselim hidrolizom šećera na C-26 atomu ili u prisutnosti enzima. Reakcija hidrolize nalazi se na shemi 3.



Slika 8. Struktura Asparagina B.

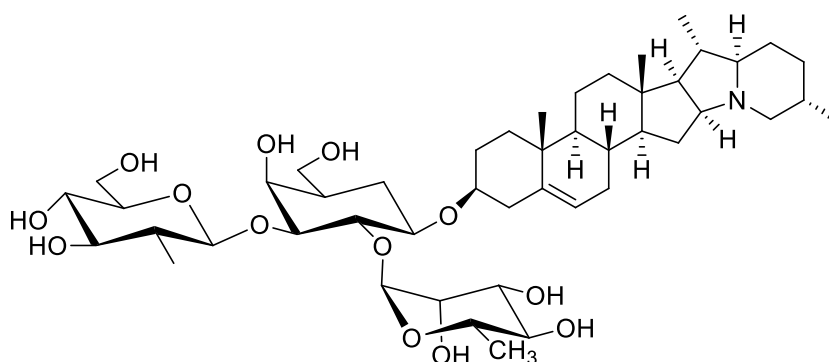


Slika 9. Reducirane forme diozenina u Sarsaparilozidu.



Shema 3. Ciklizacija sarsaparilozida u parilin.

Neke biljke tijekom sazrijevanja mogu reakcijom transaminacije ukomponirati atom dušika iz arginina u steroidnu jezgru.<sup>10</sup> Takvom doradom nastaju steroidni alkaloidi. Njihova svojstva sličnija su skupini alkaloida te iz tog razloga mnogi smatraju da ne pripadaju klasičnoj podjeli saponina. Ipak, pokazuju hemolitička svojstva, površinsku aktivnost te su generalno otrovni ukoliko se konzumiraju. Primjer takvog spoja je solanin čija se struktura nalazi na slici 10. Izoliran je 1820. godine iz biljke *Solanum nigrum* po kojoj je dobio ime.<sup>4</sup> Nalazi se u krumpiru, patlidžanu i rajčicama. Pokazuje pesticidna svojstva i predstavlja prirodnu obranu biljke. Biosinteza solanina počinje kada se dijelovi biljke izlože Sunčevoj svjetlosti. Time je potaknuta i sinteza klorofila zbog čega plodovi poprimaju zelenu boju te se ne bi smjeli konzumirati. Neprikladno skladištenje i oštećenja također stimuliraju povećanu proizvodnju solanina zbog koje je moguće trovanje. Simptomi uključuju mučninu, proljev, povraćanje, grčeve u trbuhu, glavobolju i bol u mišićima, dok se tek u težim slučajima mogu pojaviti halucinacije, visoka temperatura i paraliza.<sup>11</sup>

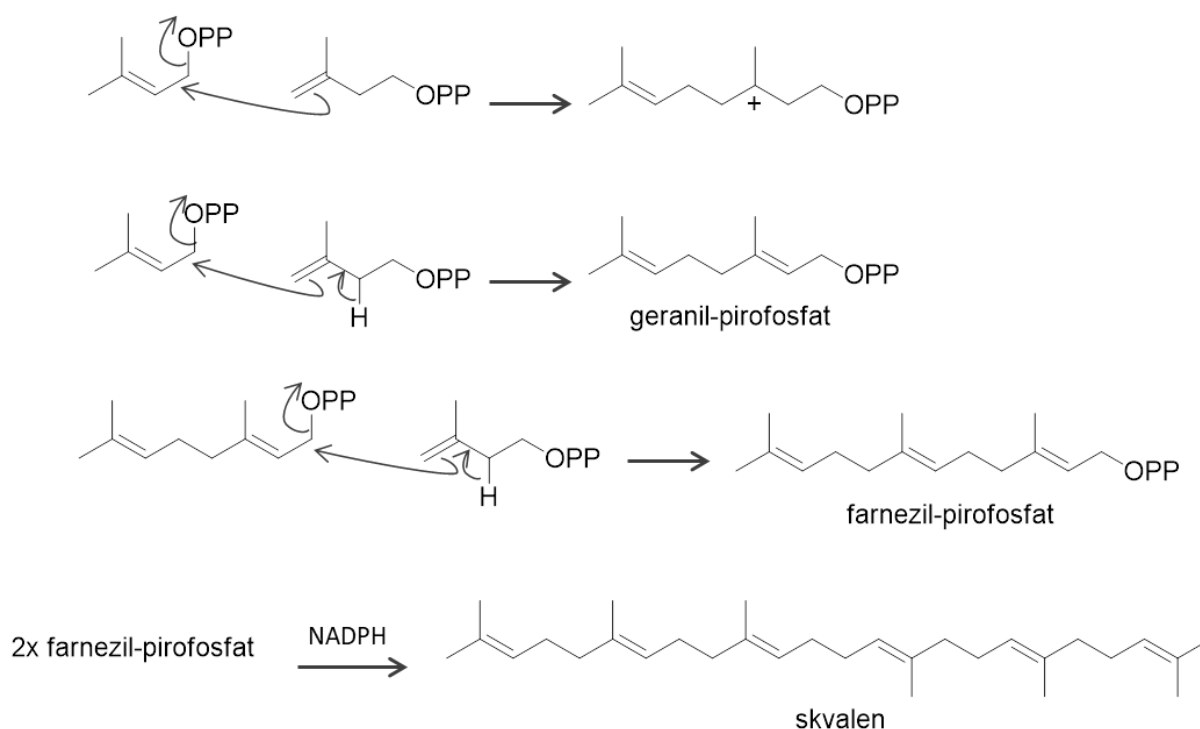


Slika 10. Struktura solanina.

## 2.3. Sinteza

### 2.3.1. Biosinteza

Saponini su izoprenoidi čiji je prekursor skvalen. Sinteza počinje kondenzacijom triju izoprenskih (C5) jedinica koja je prikazana na shemi 4. Međusobnim povezivanjem na način 'glava-rep' nastaje farnezil-pirofosfat. Dvije molekule farnezil-pirofosfata se uz utrošak molekule NADPH povezuju načinom 'rep-rep' pri čemu nastaje skvalen. Oksidacijom se prevodi u oksidoskvalen koji predstavlja početnu točku ciklizacije u sintezi saponina. Protonacijom oksidoskvalena dolazi do otvaranja epoksidnog prstena i nastaje karbokation koji se može ciklizirati u konformacijama 'stolica-stolica-stolica' ili 'stolica-čamac-stolica'. Raznim kemijskim reakcijama dobivamo brojne aglikone i njihove derivate prikazane na slici 11.

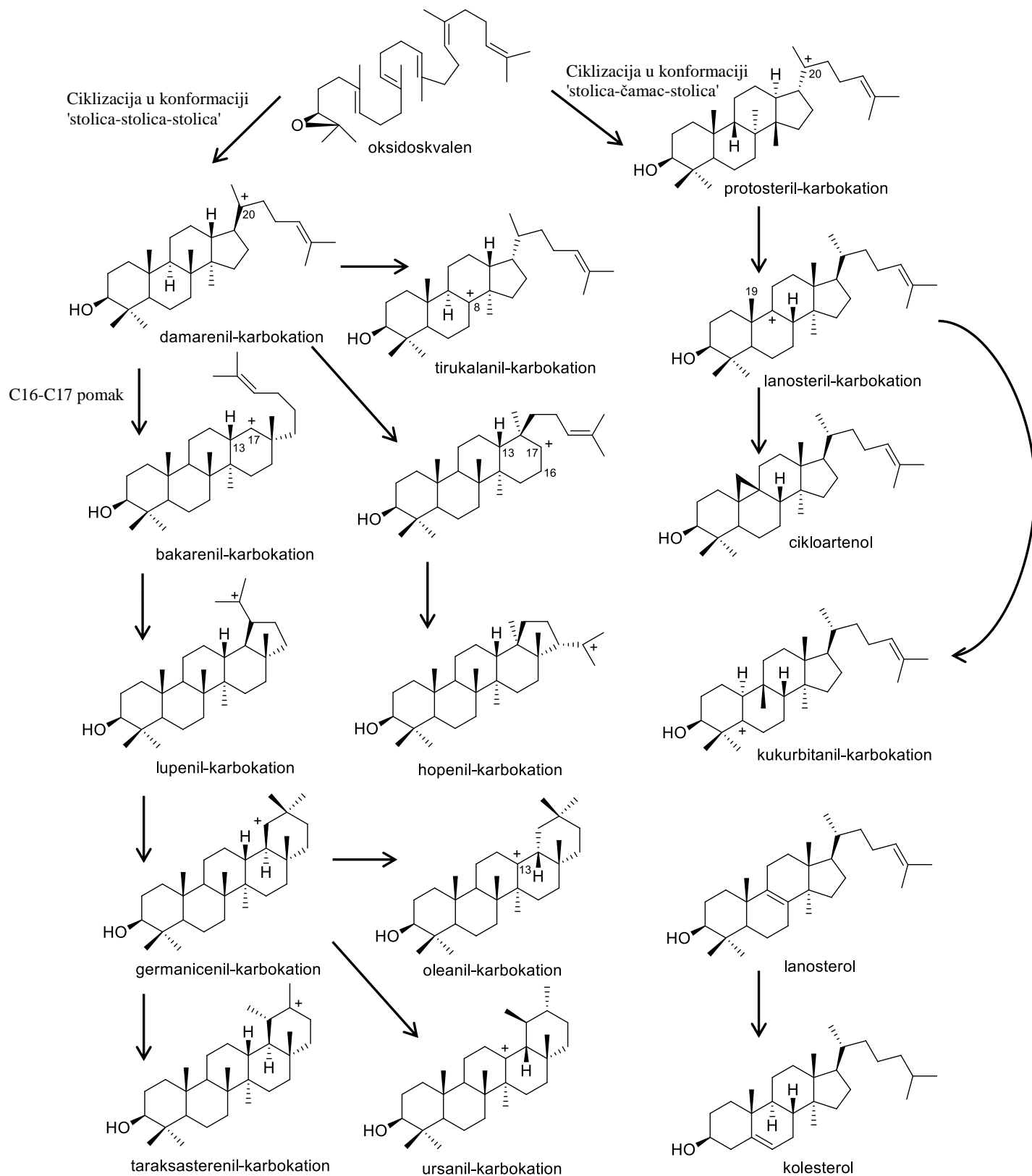


Shema 4. Biosintetski put kondenzacije izoprenskih jedinica u skvalen.

Ciklizacijom u konformaciji 'stolica-stolica-stolica' nastaju saponogenini triterpenske strukture. Prvo se formira tetracilički damarenil C-20 karbokation karakterističan za damarane. Hidridnim i metilnim pomacima nastaju tirukalani čiji karbokation ima pozitivan naboj na položaju C-8. Damarenil karbokation može proširiti svoj peteročlani prsten na dva

načina. Pomakom veze C13-C17 uz dodatno zatvaranje prstena nastaju hopani, dok uz pomak C16-C17 veze nastaju lupani. Lupenil se u germanicenil-karbokation prevodi proširenjem petog prstena. Njegovim preuređenjem mogu se dobiti oleani, taraksasterani i ursani. Oleani nastaju uz nekoliko hidridnih pomaka. Pomak  $\alpha$ -metilne skupine dovodi do nastajanja taraksasterana i oleana. Kod oleana dolazi do više hidridnih pomaka pri čemu se pozitivni naboj premješta na C-13.

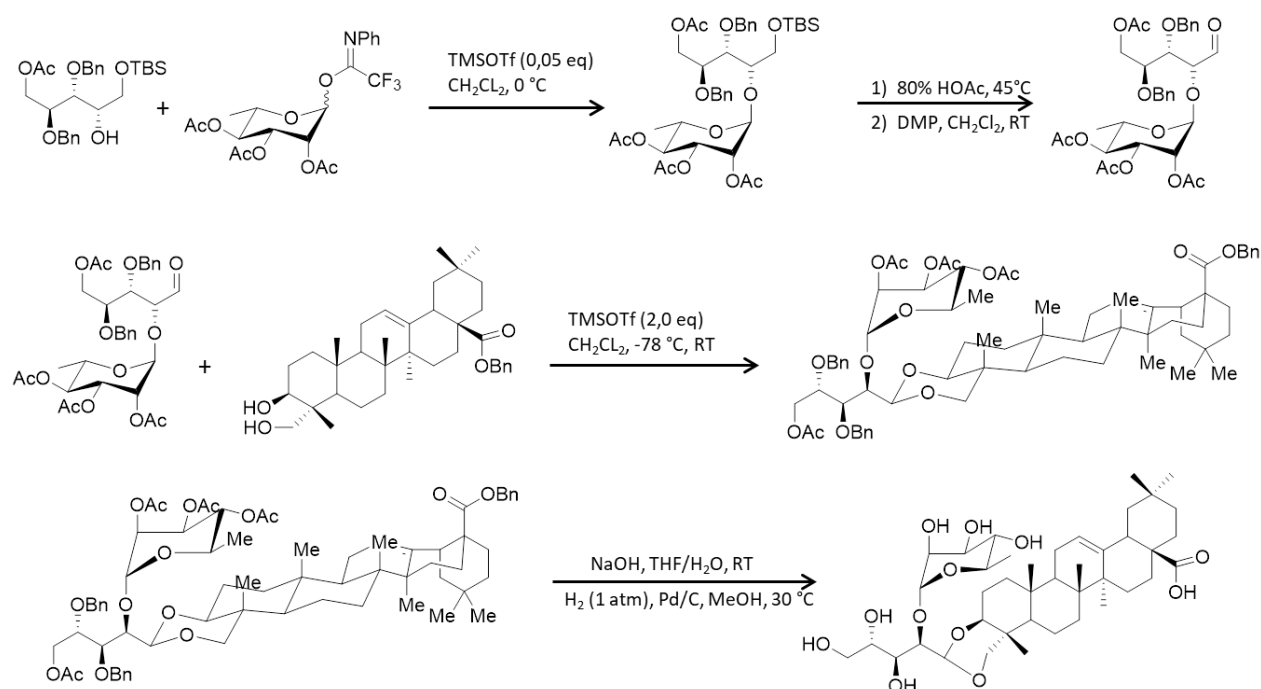
Steroidne saponine dobivamo ciklizacijom oksidoskvalena u konformaciji 'stolica-čamac-stolica'. Tetraciklički protosteril C-20 karbokation se metilnim i hidridnim pomacima prevodi u lanosteril karbokation. On je zajednički međuprodukt kukurbitana, cikloartana i steroida. Deprotonacijom C-19 metilne skupine lanosterilnog karbokationa nadolazi do zatvaranja ciklopropanskog prstena. Takav strukturni motiv karakterističan je za cikloartane. U algama i zelenim biljkama je međuprodukt pri sintezi kolesterola. Lanostani su produkti deprotonacije lanosterilnog karbokationa. Demetilizacijom i izomerizacijom dvostruke veze lanosterola nastaju steroidi. Dobivene strukture prolaze kroz niz modifikacija, dodavanja i funkcionalizacija skupine, reakcija oksidacije, redukcije i glikozilacije, čime nastaju konačni produkti-saponini.



Slika 11. Ciklizacija oksidoskvalena u razne vrste sapogenina<sup>6</sup>

## 2.3.2. Kemijska sinteza

Komplicirana izolacija iz biljaka i velika potražnja za komercijalnu upotrebu zahtijevaju nove, brže i uspješnije načine sinteze saponina. Najčešće se pripremaju glikozilacijom aglikona sa već pripremljenim saharidnim donorem ili postupnom glikozilacijom gdje se saharidni dio nadograđuje. Primjer pripreve Anemoklemozida prikazan je shemom 5.

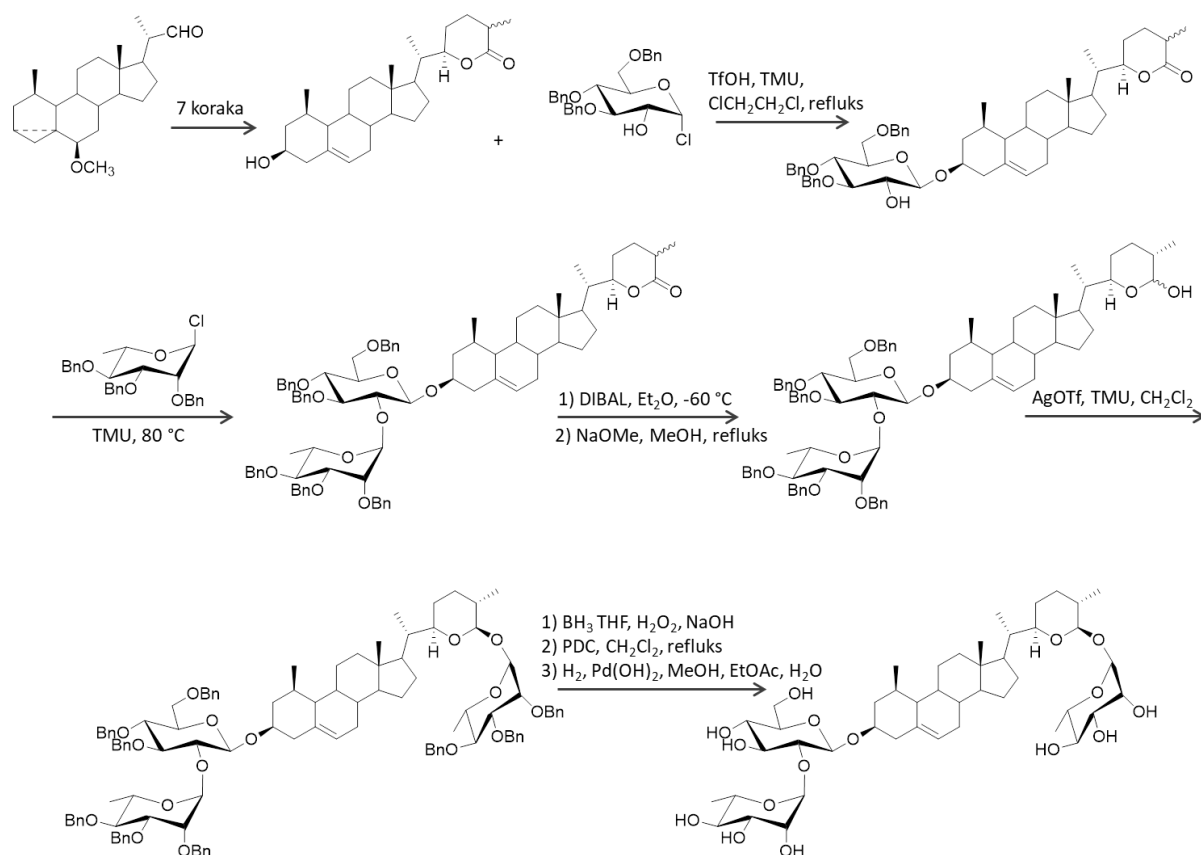


Shema 5. Sinteza saponina Anemoklemozida.<sup>12</sup>

Glikozilacija derivata pentaola i 2,3,4-tri-*O*-acetil-*L*-ramnopiranozil trifluoroacetimidata provodi se u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pri  $0\text{ }^\circ\text{C}$  uz trimetilsilil trifluorometansulfonat (TMSOTf) kao katalizator. U prvom koraku dobiven je  $\alpha$ -*L*-ramnopiranozid uz iskorištenje od 88%. Skupina 1-*O*-TBS je selektivno uklonjena sa otopinom octene kiseline ( $w=80\%$ ) pri  $45\text{ }^\circ\text{C}$ , a dobiveni alkohol je oksidiran s Dess-Martinovim perjodinanom (DMP). Nastalom aldehidu dodan je derivat hederagenina uz TMSOTf (2,0 eq) pri  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , pri čemu je dobiven (1'*R*)-acetalni produkt uz iskorištenje od 92%. Acetilne skupine uklonjene su dodatkom NaOH i THF, a cijepanje benzilnih skupina provedeno je hidrogenolizom uz prisutnost Pd/C u metanolu uz iskorištenje od 30%. Anemoklematozid sintetiziran je uz iskorištenje od 50%.<sup>12</sup> Inače se nalazi u korijenu ljekovite biljke *Anemoclema glaucifolium* koja raste u blizini rijeke Yangtse u Kini.



Osladin, izoliran iz paprati *Polypodium vulgare*, bidezmički je saponin i od saharoze slađi 500 puta. Njegova totalna sinteze provedena je 1995. godine te je prikazana na shemi 6.



Shema 6. Totalna sinteza osladina.<sup>12</sup>

Kroz sedam koraka steroidni aldehyd se prevodi u kolestan uz iskorištenje od 45%. Tada se glikolizira s djelomično zaštićenim glukozil-kloridom u prisutnosti TfOH i tetrametiluree (TMU). Nastalom 3-*O*- $\beta$ -glikozidu dodaje se benzilirani L-ramnozil klorid uz TMU pri  $80^\circ\text{C}$  što dovodi do nastajanja laktona. Redukcija se provodi uz DIBAL, a dodatkom natrijeva metoksida nastaje stabilan produkt. Ponovno se dodaje benzilirani L-ramnozil klorid uz AgOTf/TMU te se dvostruka C5-C6 veza prevodi u 6-keon. Zaštitne benzilne skupine uklanjaju se hidrogenolizom i finalni produkt je osladin.

## 2.4. Analiza i izolacija

Saznanje o njihovom komercijalnom potencijalu, ljekovitim i zdravstveno korisnim svojstvima dovelo je do razvoja metoda koje se mogu nositi problemom obrade ove grupe spojeva kompleksne strukture. Metode se bitno razlikuju obzirom da se u svakoj biljci nalazi mješavina raznih saponina, ali i drugih spojeva, koji utječu na sam proces. Pročišćivanje i izolacija komponenata najčešće se izvodi ekstrakcijom, dok kvantitativna i kvalitativna analiza uključuje metode kromatografije poput tankoslojne, plinske i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Prilikom jednostavnijih analiza upotrebljavaju se reagensi koji će reakcijom sa saponinima dati karakteristično obojenje. Takvu vrstu reakcija nazivamo reakcije bojenja.

### 2.4.1. Ekstrakcija

Prvi korak sastoji se u pripremi sirovog biljnog materijala. Biraju se oni dijelovi biljke s najvišom koncentracijom saponina. Uzorak se suši i usitnjava, a potom se uklanjaju masti pomoću lipofilnih otapala poput etil-acetata ili heksana. Nakon toga slijedi ekstrakcija uz odabir jednog ili više otapala. Iako je najčešće korištena klasična ekstrakcija, razvojem tehnologije i kombiniranjem s ostalim metodama dobivaju se bolji rezultati, veća efikasnost i kraće vrijeme ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta mikrolvalnim i ultrazvučnim razaranjem stanične strukture i otpuštanjem spojeva zarobljenim unutar stanične membrane postiže se brzim i selektivnim zagrijavanjem uzorka u otapalu koje je propusno za mikrovalove i ultrazvučne valove.<sup>2</sup> Ovom metodom provedena je ekstrakcija ginsenzida iz ginsenga. Iskorištenje ekstrakcije 5 g praha ginsenga u 50 mL otopine 80% metanola koristeći mikrovalno zračenje 30 s (4×) pri 72,2 °C usporedivo je sa ekstrakcijom uz refluks pri istim uvjetima u trajanju od 12 sati.<sup>13</sup> Ekstrakcije pri povišenom tlaku također pokazuju slične rezultate. Povišena temperatura postignuta visokim tlakom povećava topljivost, a samim time i efikasnost postupka. Ekstrakcijom escina iz divljeg kestena, u otopini 65% metanola pri tlaku od 140 bara i 100 °C, dobiven je veći udio escina. Uz povišeni tlak dobiven je maseni udio od 3,73%, dok klasičnom ekstrakcijom on iznosi 2,63%.<sup>14</sup>

Odabir otapala iznimno je važan korak u izolaciji saponina. Prilikom ekstrakcije najčešće su korišteni metanol, etanol, smjese alkohola, voda i glicerol. Iako su navedena otapala najučestalija, zbog raznih neželjenih reakcija određenih vrsta saponina potrebno je primijeniti

drugačiji pristup. Tijekom ekstrakcije furostanolnih saponina s metanolom primijećeno je nastajanje nepoželjnog produkta, metiliranog C-22 derivata. Kako bi se to izbjeglo, upotrebljava se piridin ili metoksilirani spojevi uz vrući aceton.<sup>4</sup>

#### 2.4.2. Reakcije bojenja

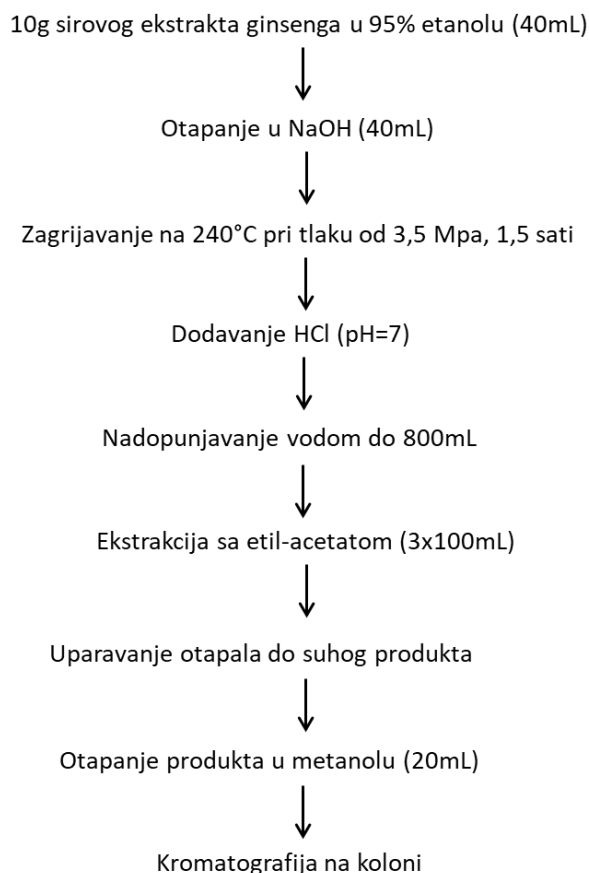
- (1) *Aromatski aldehidi*: anisaldehyd, vanilin i ostali aromatski aldehidi u mineralnim kiselinama reagiraju sa aglikonima. Dehidratacijom nastaju nezasićene metilenske skupine koje daju obojene produkte s aldehydima. Maksimumi absorpcije produkata nalaze se između 510 i 620 nm.
- (2) *Liebermann-Burchardov test*: Nezasićeni i hidroksilirani triterpeni i steroidi u reakciji sa sumpornom kiselinom i anhidridom octene kiseline daju crvene, plave i zelene otopine. Triterpenski saponini obično daju ružičaste ili ljubičaste otopine, dok su za steroidne karakteristične plavozelene .
- (3) *Ehrlichov reagens*: Ehrlichov reagens priprema se otapanjem 1 g *p*-dimetilaminobenzaldehida u 50 mL 36% HCl i 50 mL etanola. Tako dobivena reagira sa furostanolima uz nastajanje žutog produkta. Spirostanoli ne reagiraju s ovim reagensom.<sup>4</sup>

#### 2.4.3. Kromatografija

Kromatografija je vrlo važna fizikalna metoda kojom se pročišćava smjesa saponina iz sirova uzorka i identificiraju njene komponente. Ovisno o kompleksnosti uzorka može se koristiti jedna ili više metoda. Odjeljivanje komponenti smjese obično se izvodi kromatografijom na koloni. Iako je moguće izolirati čiste produkte, najčešće se smjesa tek djelomično odjeli. U koloni se nalazi silikagel, a eluiranje se provodi smjesom kloroforma, metanola i vode u omjeru 65:35:5 ili *n*-butanol-etanol-amonijaka u omjeru 7:2:5.<sup>4</sup> Brža i jeftinija metoda je tankoslojna kromatografija. Stacionarnu fazu predstavlja pločica silikagela, a mobilna faza je sutav kloroform-metanol-voda u različitim omjerima. Za vizualizaciju mrlja koriste se reagensi poput vanilina-sumporne kiseline, Liebermann-Burchard reagensa, antimonovog(III) klorida i drugi. Prskanjem pločice s vanilin-sumpornom kiselinom u prisutnosti etanola dobije se plava ili ljubičasta mrlja koja dokazuje prisutnost triterpenskih saponina. Steroidni saponini prepoznaju se po karakterističnom obojenju u reakciji s antimonovim(III) kloridom.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti idealna je metoda za analizu saponina zbog brzine, osjetljivosti i prilagodljivosti. Jedini nedostatak je manjak kromofora za UV detekciju. Problemi detekcije pri nižim valnim duljinama rješavaju se derivatizacijom saponina. U ovoj metodi sastav pokretne faze kontinuirano se mijenja tijekom ispiranja. Gradijentno eluiranje obično se izvodi upotrebom acetonitrila i vode. Acetonitril se preferabilno koristi pri nižim valnim duljinama zbog manje UV absorpcije.

Slijed izolacije prikazan je na shemi 7. Iz uzorka ginsenga izoliraju se sapogenini sa antikancerogenim svojstvima. Analiza se sastoji u ekstrakciji sirovog uzorka u 40 mL 95%-tnog etanola i zalučivanjem dobivenog ekstrakta s 40 mL NaOH. Reakcijska smjesa se zagrijava na 240 °C pri povišenom tlaku koji iznosi 3,5 Mpa u trajanju od 1,5 h. Potom se dodaje klorovodična kiselina do neutralne reakcije, razrjeđuje vodom do ukupnog volumena od 800 mL i ekstrahira tri puta s po 100 mL etil-acetata. Višak otapala se uklanja uparavanjem, a dobiveni produkt otopi se u 20 mL etanola i potom dodatno odjeljuje metodom kromatografije na koloni.<sup>2</sup>



Shema 7. Slijed izolacije sapogenina iz ekstrakta ginsenga.

## 2.5. Primjena

Saponini su pronašli niz primjena zbog raznih fizikalnih, bioloških i farmakoloških svojstava. Pjenušanje i sposobnost stvaranja micela u vodenim otopinama zaslužni su za masovnu upotrebu saponina kao alternativnih deterdženata i sapuna. Nizom istraživanja, otkriveno je da saponini pokazuju brojna svojstva korisna za zdravlje.

### 2.5.1. Primjena u medicini

Najistraživanije svojstvo je hemolitička aktivnost. Aglikoni saponina sa fosfolipidima u stanicama tvore netopljive komplekse što dovodi do bubrenja, a zatim do razaranja membrane eritrocita čime se oslobađa hemoglobin. Istraživanja su provedena intravenozno i oralno, a rezultati navode kako niska razina toksičnosti ne može prevagnuti poželjne nutritivne vrijednosti. Štoviše, prehrana bogata saponinima ima mnogo prednosti. Jedna od njih je regulacija razine kolesterola. Micele formirane s kolesterolom su prevelike da bi se mogle absorbirati u probavnom traktu, što dovodi do smanjenja koncentracije plazmatskog kolesterola. Iz tog razloga mnoge terapije u borbi protiv dijabetesa i pretilosti sadrže saponine.<sup>5</sup> Mnoštvo saponina su zbog farmakoloških svojstava našli primjenu kao lijekovi. Farmakološki efekti uključuju stimulaciju imonološkog odgovora. Najpoznatiji i jedni od najjačih poznatih prirodnih adjuvanata su saponini kvilaje čiji je glavni predstavnik QS-21. Sastoji se od smjese dva saponina QS-21<sub>Api</sub> i QS-21<sub>Xyz</sub> u omjeru 2:1. Razlikuju se samo po jednom šećeru u oligosaharidnom lancu koji može biti apioza ili ksiloza. QS-21 pokazuje uravnoteženi Th1/Th2 imunološki odgovor i stimulira proizvodnju citotoksičnih T limfocita protiv egzogenih antigena.<sup>15</sup> Nalazi se u cjepivu Shingrix koji djeluje protiv herpesa zoster. Istražuje se njegova upotreba u drugim cjepivima, ali i u terapijama protiv raka i proteinopatija. Antivirusna svojstva pokazuju brojni saponini, od kojih je važno istaknuti oleanolnu kiselinu i saponin sladića (*Glycyrrhiza glabra*). Oleanolna kiselina je triterpenski sapogenin koji sprječava replikaciju HIV-1 virusa inhibirajući aktivnost HIV-1 proteaze.<sup>16</sup> Glicirizin učinkovito inhibira replikaciju SARS-CoV virusa *in vitro*, te predstavlja put prema razvoju antivirusnih lijekova.<sup>17</sup> Osim toga, djeluje poput kortikosteroida i pokazuje protuupalna svojstva. Koristi se pri liječenju reumatoidnog artritisa, Addisonove bolesti i raznih upalnih procesa. Gliciretinska kiselina, aglikon glicirizina, inhibira enzime koji kataliziraju pretvorbu prostagladina i glukokortikoida u neaktivne metabolite. Zbog toga

dolazi do povećane razine prostagladina PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> i hidrokortizona.<sup>9</sup> Polusintetski derivat gliciretinske kiseline primjenjuje se pri liječenju čira na želucu.

### 2.5.2. Komercijalna upotreba

Za komercijalnu upotrebu koriste se glicirizin, escin, ginseng, saponini kvilaje, bršljan i mnogi drugi, dok su *Yucca schidigera* i *Q. Saponaria* dva glavna izvora. Najviše se koriste u kozmetici, prehrambenoj industriji i farmaciji. Za prehrambenu industriju je od velike važnosti glicirizin. Ime mu potječe od grčke riječi *glykosrhiza* što znači slatki korijen. Upotrebljava se kao sladilo i pojačivač okusa. Yucca prah se zbog antigljivičnih svojstava dodaje hrani kao konzervans. U slastičarskoj i prehrambenoj industriji poboljšava kvalitetu i produljuje rok valjanosti. Saponini kvilaje stotinama godina koristili su se kao šamponi, dok se u današnje vrijeme nalaze u pićima, deterdžentima, pasti za zube i aparatima za gašenje požara. Osim toga, koriste se kao sredstva za pjenjenje u pićima za nadoknadu elektrolita i služe kao emulgatori u pripremi fermentiranog povrća, gaziranih sokova i preljeva za salatu. U farmaciji se najviše ističe diozgenin koji služi kao prekursor u sintezi kortizona i kao oralni kontraceptik. Procjenjuje se da 60% svih steroidnih lijekova proilazi iz diozgenina. Ekstrakt *Dioscorea* i njezin prah koriste se pri smanjivanju simptoma menopauze te kao alternativa za razne hormonalne terapije obzirom da povećava razinu progesterone koji je prekursor za ostale hormone.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. [www.pfaf.org/user/cmspage.aspx?pageid=49](http://www.pfaf.org/user/cmspage.aspx?pageid=49) (datum pristupa 10. srpnja 2020.)
2. Ö. Güçlü-Üstündağ, G. Mazza, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* **47** (2007) 231-258.
3. V. P. Devmurari, *Arch. Appl. Sci. Res.* **2** (2010) 354-359.
4. K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995, str. 233.
5. D. Kreigel, J. Berlowska, I. Witonska, H. Antolak, C. Proestos, M. Babic, Lj. Babic, B. Zhang, *Saponin-base, biological-active surfactants from plants*, Application and Characterization of Surfactants, IntechOpen, 2017.
6. J. Vincken, L. Heng, A. de Groot, H. Gruppen, *Phytochemistry* **68** (2007) 275-297.
7. B. Yu, J. Sun, *Chem. Asian J.* **4** (2009) 642-654.
8. [www.vitamini.hr/blog/vitaminoteka/ginseng-drevni-korijen-ljekovitih-svojtava-13738/](http://www.vitamini.hr/blog/vitaminoteka/ginseng-drevni-korijen-ljekovitih-svojtava-13738/) (datum pristupa 18. kolovoza 2020)
9. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2009, str. 246
10. K. Tanaka, M. W. Mitsuhashi, *Phytochemistry*, **15** (1976) 1391-1393.
11. [www.canr.msu.edu/news/solanine\\_posioning\\_how\\_does\\_it\\_happen](http://www.canr.msu.edu/news/solanine_posioning_how_does_it_happen) (datum pristupa 2020. kolovoza 2020)
12. Y. Yang, S. Laval, B. Yu, D. Horton (ur.), *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Elsevier Inc., United Kingdom, 2014, str. 149, 176
13. Kwon, J.-H., Belanger, J. M. R., Páre, J. R. J., Yaylayan, *Food Res. Intl.*, **36** (2003) 491-498.
14. Benthin, B., Danz, H. Hamburger, *J. Chromatogr.* **837** (1999) 211-219.
15. A. Osbourn, R. J. M. Goss, R. A. Field, *Nat. Prod. Rep.* **28** (2011) 1261-1268.
16. S. D. Desai, D. G. Desai, H. Kaur, *Pharma Times*, **41** (2009) 13-16.
17. P. Luo, D. Liu, J. Li, *Int. J. Antimicrob. Agents* **55** (2020) 105995-105969.

- 
- <sup>1</sup> [www.pfaf.org/user/cmspage.aspx?pageid=49](http://www.pfaf.org/user/cmspage.aspx?pageid=49) (datum pristupa 10. srpnja 2020)
- <sup>2</sup> Ö.Güçlü-Üstündağ, G. Mazza, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* **47** (2007) 231-258.
- <sup>3</sup> V. P. Devmurari, *Arch. Appl. Sci. Res.* **2** (2010) 354-359.
- <sup>4</sup> K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- <sup>5</sup> D. Kreigel, J. Berlowska, I. Witonska, H. Antolak, C. Proestos, M. Babic, Lj. Babic, B. Zhang, *Saponin-base, biological-active surfactants from plants*, Application and Characterization of Surfactants, IntechOpen, 2017.
- <sup>6</sup> J. Vincken, L. Heng, A. De Groot, H. Gruppen, *Phytochemistry* **68** (2007) 275-297.
- <sup>7</sup> B. Yu, J. Sun, *Chem. Asian J.*, **4** (2009) 642-654.
- <sup>8</sup> [www.vitamini.hr/blog/vitaminoteka/ginseng-drevni-korijen-ljekovitih-svojtava-13738/](http://www.vitamini.hr/blog/vitaminoteka/ginseng-drevni-korijen-ljekovitih-svojtava-13738/) (datum pristupa 18. kolovoza 2020)
- <sup>9</sup> P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products* 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2009, str. 246
- <sup>10</sup> K. Tanaka, M. W. Mitsuhashi, *Phytochemistry*, **15** (1976) 1391-1393.
- <sup>11</sup> [www.canr.msu.edu/news/solanine\\_poisoning\\_how\\_does\\_it\\_happen](http://www.canr.msu.edu/news/solanine_poisoning_how_does_it_happen) (datum pristupa 20. kolovoza 2020)
- <sup>12</sup> Y. Yang, S. Laval, B. Yu, D. Horton (ur.), *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Vol. 71, Elsevier Inc., United Kingdom, 2014, str. 149, 176
- <sup>13</sup> J.-H. Kwon, J. M. R. Belanger, J. R. J. Pare, V. A. Yaylayan, *Food Res. Int.*, **36** (2003) 491-498.
- <sup>14</sup> B. Benthin, H. Danz, M. Hamburger, *J. Chromatogr.*, **837** (1999) 211-219.
- <sup>15</sup> A. Osbourn, R. J. M. Goss, R. A. Field, *Nat. Prod. Rep.*, **28** (2011) 1261-1268
- <sup>16</sup> S. D. Desai, D. G. Desai, H. Kaur, *Pharma Time*, **41** (2009) 13-16.
- <sup>17</sup> P. Luo, D. Liu, J. Li, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **55** (2020) 105995-105969