

Stereokemija spojeva iz biljnih ekstrakata

Belančić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:217:899458>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivan Belančić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

STEREOKEMIJA SPOJEVA IZ BILJNIH EKSTRAKATA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Potpis:

Table of Contents

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE STRUKTURE BILJNIH EKSTRAKATA.....	9
2.1. Metode pripreme i izolacije spojeva iz biljaka	9
2.2. Metode izolacije čistih spojeva iz frakcija biljnih ekstrakata	14
2.2.1. Adsorpcijska kromatografija.....	14
2.2.2. Brza kromatografija.....	15
2.2.3. Kromatografija na papiru.....	15
2.2.4. Kromatografija na gelu.....	16
2.2.5. Plinska kromatografija	16
2.2.6. Tankoslojna kromatografija.....	16
2.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	17
2.3. Određivanje strukture izoliranih homogenih spojeva	18
2.3.1. Ultraljubičasta spektroskopija.....	18
2.3.2. Infracrvena spektroskopija.....	19
2.3.3. Nuklearna magnetska rezonanca	19
2.3.4. Masena spektrometrija.....	20
2.3.5. Difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu	20
2.4. Stereokemija monoterpena i njihova svojstva.....	22
2.4.1. Općenita svojstva monoterpena	22
2.4.2. Biosinteza terpenoida u biljnim stanicama.....	24
2.4.3. Kamfor	27
2.4.4. Mentol	28
2.4.5. Geraniol	29
2.4.6. Limonen.....	30
2.4.7. Pinen	30
2.5. Općeniti zaključci o izolaciji prirodnih produkata i svojstvima monoterpena	32
§ 3. ZAKLJUČAK	34
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	35

§ Sažetak

U ovome radu su opisani i objašnjeni osnovni stereokemijski pojmovi i metode izolacije spojeva iz biljnih ekstrakata. Također, prikazan je utjecaj stereokemije moleula odabranih spojeva koji se odražava na njihova svojstva poput mirisa i okusa.

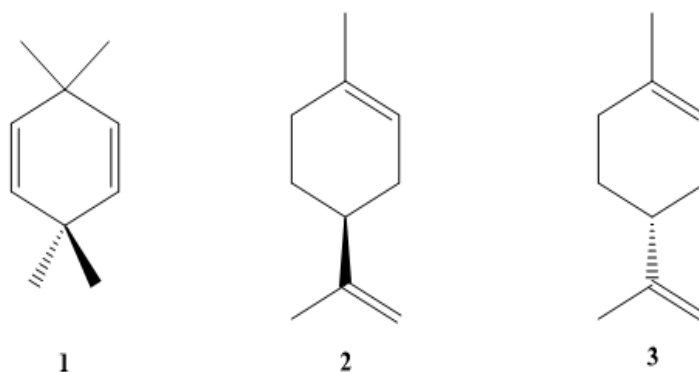
Ukratko su opisani najčešći postupci koji se koriste prilikom pripremanja biljnih uzoraka za procese ekstrakcije, s dodatnim objašnjenjima njihovih prednosti i nedostataka. Prikazane su aparature koje se koriste te dane općenite sheme izolacije smjesa prirodnih produkata s obzirom na njihova kisela ili bazična svojstva. Nakon opisa ekstrakcije kao najčešće korištene metode, opisane su kromatografske metode, korištene u izolaciji pojedinačnih spojeva iz smjesa prirodnih produkata te primjenjivost navedenih metoda na pojedinim vrstama spojeva. Iz dobivenih čistih spojeva potrebno je odrediti njihovu strukturu i apsolutnu konfiguraciju, što je omogućeno raznim spektroskopskim metodama te je opisana njihova svrha i način rada, pri određivanju strukture.

Posljednji dio je osvrt na grupu spojeva tj. prirodnih produkata, zvanih monoterpeni, među kojima su izdvojeni spojevi s najzanimljivijim svojstvima. Opisane su njihove građevne jedinice, općenita svojstva i svojstva koja proizlaze iz njihove stereokemije. Također su opisane biljne vrste iz kojih se ti spojevi mogu izolirati te primjenjivost izoliranih supstanci u svakodnevnom životu.

§ 1. UVOD

Svrha ovoga rada je opisati neke od aktualnih postupaka izolacije čistih spojeva iz biljaka, njihovu identifikaciju te spomenuti najčešće metode određivanja njihovih struktura i stereoizomera. Važnost i utjecaj stereoizomera na svojstva prirodnih ekstrakata opisani su na primjerima terpenoida, tj. monoterpenima, spojevima koji se mogu smatrati derivatima oligomera izoprena.^{1,2} Kako bi se mogle razumjeti drastične razlike, u djelovanju tih spojeva, potrebno je definirati pojam stereoizomera i njihov utjecaj na svojstva molekula.

Izomeri su spojevi iste molekulske formule, ali različite strukture. Dijele se na konstitucijske izomere, koji se strukturno razlikuju po konektivnosti unutar molekule i na stereoizomere, koji imaju istu konektivnost, ali različit raspored skupina u prostoru. Na primjeru molekulske formule $C_{10}H_{16}$ (Slika 1), prikazane su tri molekule, gdje se **1** i **2** te **1** i **3** odnose kao konstitucijski izomeri, a **2** i **3** kao konfiguracijski stereoizomeri.



Slika 1. Primjeri konstitucijskih izomera i stereoizomera molekulske formule $C_{10}H_{16}$.

Kod enantiomera može se uočiti svojstvo kiralnosti, tj. dvije molekule odnose se kao objekt i njegova zrcalna slika te se isti ne mogu preklopiti. Kiralnost je u potpunosti geometrijsko svojstvo te se može uočiti da ukoliko molekula posjeduje centar inverzije, ravninu simetrije ili nepravu os rotacije n -tog reda (gdje je n paran broj), ista se može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom te je takva molekula *akiralna*. Općenito, samo molekule koje ne posjeduju ikakvu vrstu refleksijske simetrije, mogu biti kiralne. Također, i u svim svojim konformacijama molekula se ne smije moći preklopiti sa svojom slikom da bi bila kiralna.

Kako bi se odredila kiralnost nekog spoja, potrebno je analizirati sve moguće konformere, tj. strukture dobivene djelovanjem rotacije oko jednostrukih veza ili translacija unutar molekule.¹ Iz kiralnosti spoja, proizlazi njegova optička aktivnost, koja se definira kao svojstvo neke tvari, da prilikom interakcije s polariziranom svjetlosti, uzrokuje zakretanje propuštene svjetlosti za kut α . Uzrok tog zakretanja je interakcija fotona s elektronskim oblakom svake molekule, što može rotirati ravninu oscilacije polarizirane svjetlosti. Smjer i iznos zakretanja ovisi o razmještanju elektronskog oblaka te je iz toga moguće uočiti, da dvije molekule s identičnim elektronskim oblacima, će rotirati svjetlost na jednaki način. To je ujedno i razlog zašto akiralne molekule ne posjeduju optičku aktivnost. Nasuprot toga, kiralne molekule tvore enantiomerne parove (ili enantiomorfe ukoliko se radi o kristalima), tj. stereoizomerne spojeve kod kojih jedan rotira svjetlost za pozitivnu vrijednost α , a drugi za negativnu. Ukoliko se radi o smjesi, gdje je količina obaju enantiomera jednaka, takva smjesa se naziva racemična smjesa i ista ne pokazuje svojstva optičke aktivnosti. U drugome slučaju, gdje je jedan od enantiomera prisutan u većoj količini od drugoga, dolazi do zakretanja svjetlosti u smjeru koji određuje interakcija svjetlosti s elektronskim oblakom molekule koja je prisutna u većem broju. Također, važno je pripomenuti da interakcije optički aktivnih spojeva nisu ograničene samo na polariziranu svjetlost, već djeluju i na nepolariziranu, no budući da takva svjetlost nema neku određenu orijentaciju prije interakcije s materijom, nije moguće mjeriti promjenu nakon interakcije.

Iznos rotacije polarizirane svjetlosti, tj. α , vezan je za mnogo faktora, koji ovise o prirodi tvari, vrsti svjetlosti te vanjskim uvjetima. Kada se radi o prirodi tvari, važno je radi li se o kristalu, tekućini, solvatom tvari ili plinu te kolike su gustoće i koncentracije istih (ukoliko se radi o otopinama). Uočeno je također, da neke tvari pokazuju optička svojstva samo u određenim agregatnim stanjima, primjerice kod kvarca ili natrijeva klorida, samo kristalni oblik može zakretati svjetlost. Energija fotona također igra važnu ulogu te iznos rotacije ovisi o valnoj duljini svjetlosti te duljini optičkog puta kroz koju ista mora proći. Posljednji faktor jest temperatura pri kojoj se mjeri interakcija svjetlosti s materijom. Ukupni iznos rotacije za neku specifičnu tvar, pri određenoj temperaturi, koncentraciji, optičkom putu i valnoj duljini, naziva se specifična rotacija tvari $[\alpha]$ te se definira kao¹:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot \gamma}$$

gdje T označava temperaturu u stupnjevima Celzijusa, l je optički put u dm, γ je masena koncentracija tvari dana u $\text{g} \times \text{cm}^{-3}$, λ je valna duljina svjetlosti te α je mjerena rotacija

svjetlosti u stupnjevima. Iz navedenih podataka može se uočiti da se mjerna jedinica specifične rotacije neke tvari izražava u obliku $10^{-1} \times \text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{g}^{-1}$. Uz mjernu jedinicu, potrebno je naznačiti i smjer optičke rotacije, tj. rotira li se za pozitivnu ili negativnu vrijednost α . Ukoliko se radi o otopini, masena koncentracija se zamjeni množinskom koncentracijom te izraz poprima oblik:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

Također, potrebno je definirati pojam molekularne rotacije $[M]$, koja se uvodi kako bi se kompenzirao efekt različitih molarnih masa pojedinih tvari te se izražava u obliku:

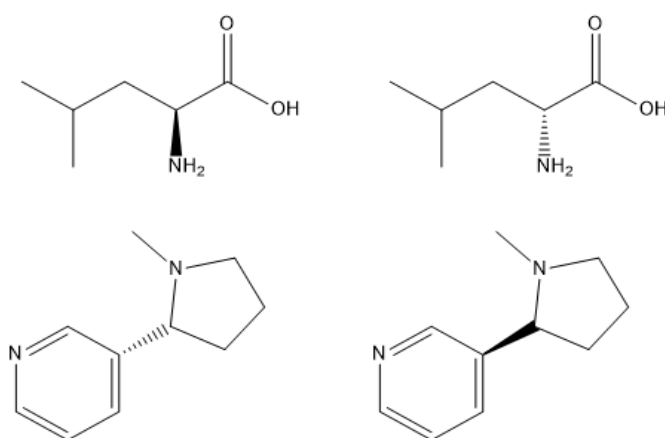
$$[M] = \frac{[\alpha] \cdot M}{100\alpha}$$

U ovoj jednadžbi M označava molarnu masu danu u $\text{g} \times \text{mol}^{-1}$, α je izmjerena rotacija u stupnjevima, a $[\alpha]$ prije definirana specifična rotacija neke tvari dok faktor $1/100$ služi kako bi numeričke vrijednosti molekularne rotacije ostale na skali specifične rotacije. Kada se radi s kiralnim tvarima, potrebno je znati i koliki je udio jednog enantiomera naspram drugog. To se može dobiti pomoću polarimetrije i izračuna enantiomernog suviška (kratica ee prema *engl. enantiomeric excess*)⁵:

$$ee = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S} 100\%$$

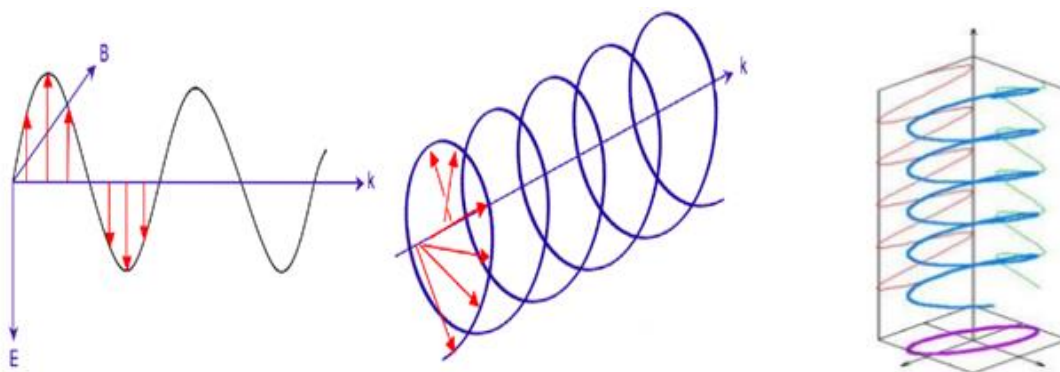
gdje se postotak enantiomernog suviška računa iz razlike množina prisutnih enantiomera, podijeljene s njihovim zbrojem.

Vrsta otapala igra ključnu ulogu pri mjerenju optičke rotacije. Pod utjecajem solvatacije i polarnosti otapala moguće je prigušiti ili promijeniti smjer rotacije, što je prikazano na primjeru molekule (*R*)-nikotina. Ukoliko je otopljen u polarnom otapalu poput vode ili etanola, mjerena rotacija raste sa smanjenjem koncentracije, no ukoliko se ista molekula otopi u nepolarnom otapalu poput kloroforma, dolazi do negativne mjerene rotacije. Takve promjene mogu se uočiti i pri različitim pH vrijednostima otopine te tako amino kiselina L- Leucin ima negativnu rotaciju, ukoliko je otopljena u vodi, a pozitivnu, ukoliko je otopljena u vodenoj otopini klorovodične kiseline. Strukture tih molekula prikazuje Slika 2.



Slika 2. Strukture enantiomernih parova L-leucina i D-leucina te (*S*)- nikotina i (*R*)- nikotina.

Efekt optičke rotacije može se mjeriti pomoću metoda optičkog rotacijskog raspršenja (*engl.* optical rotatory dispersion, ORD) i Cirkularnog dikroizma (*engl.* circular dichroism, CD). Navedene metode u svojem radu koriste linearnu, kružnu i spiralno polariziranu svjetlost, čije sheme prikazuje Slika 3. Obje metode mogu se koristiti i za određivanje apsolutne konfiguracije nekog spoja, što je zapravo točan prostorni raspored atoma na promatranoj molekuli ili skupini. U usporedbi s time, relativna konfiguracija prikazuje raspored atoma u optički aktivnoj molekuli, no bez mogućnosti raspoznavanja između pojedinih enantiomera, tj. iz strukture se ne može znati radi li se o *R* ili *S* izomeru.

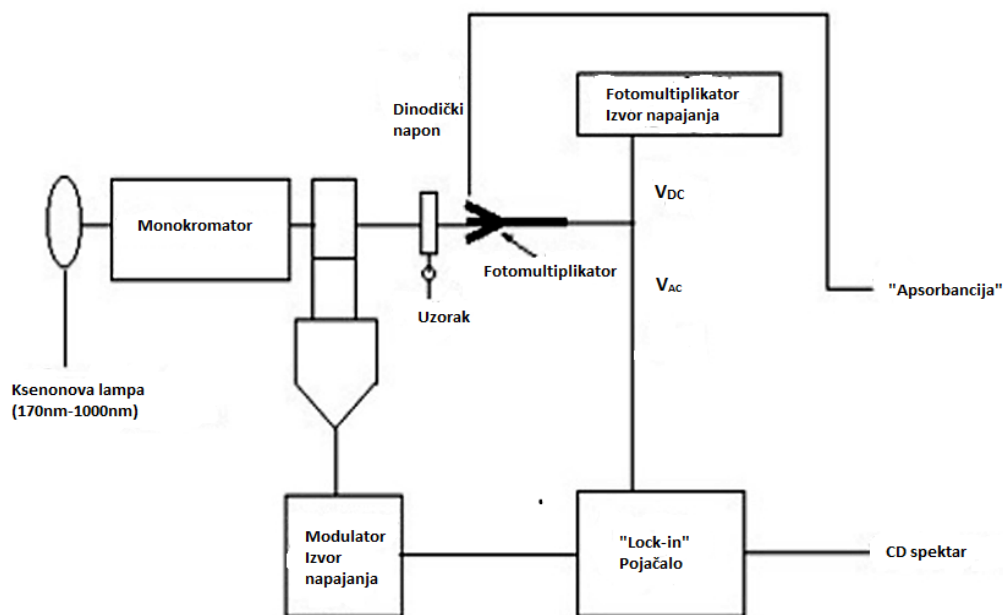


Slika 3. Usporedba linearno, kružno i spiralno polarizirane svjetlosti.^{8,6}

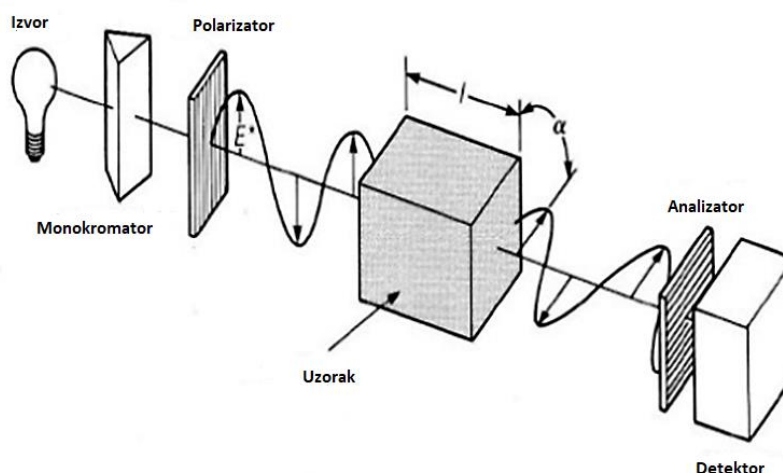
CD je pojava kiralnih tvari da drugačije apsorbiraju lijevu (–) i desnu (+) kružno polariziranu svjetlost. Uzrok te pojave je interakcija električne komponente polarizirane

svjetlosti s nabojem na molekuli, koja napravi linearni pomak naboja, dok magnetska komponenta taj naboj potakne u kružno gibanje. Djelovanjem tih dviju komponenti, rezultira se spiralnim pomakom naboja na molekuli. CD efekt može biti mjereno na uobičajenim spektrofotometrima, ukoliko može doći do nastajanja kružno polarizirane svjetlosti.⁶

ORD je metoda u kojoj se promatrana tvar obasjava s linearno polariziranom svjetlošću te se mjeri promjena specifične rotacije transmitirane svjetlosti s promjenom valne duljine korištene svjetlosti. Uzrok te promjene je fenomen kružnog dvoloma svjetlosti na optički aktivnim spojevima, koji uzrokuje desno rotiranu svjetlost (+) da posjeduje drugačiju brzinu od njenog lijevog (-) para, što se potom bilježi unutar uređaja. Shema uređaja za CD prikazuje Slika 4. te za ORD prikazuje Slika 5. Pojava fenomena ORD i CD su međusobno usko povezani, poput apsorpcije i disperzije zračenja te ukoliko je poznat cijeli ORD spektar, iz njega je moguće izračunati CD spektar i obrnuto.⁸



Slika 4. Shematski prikaz spektrofotometra prilagođenog za mjerenje CD.⁶

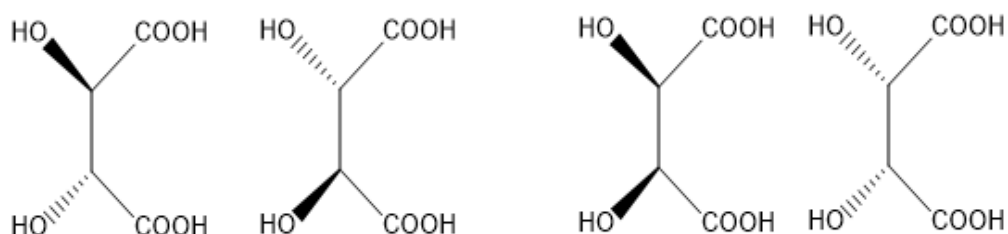


Slika 5. Shematski prikaz uređaja za mjerenje OCD efekta.⁶

Osim pomoću prethodnih metoda, apsolutna i relativna konfiguracija neke tvari može se odrediti i pomoću difrakcije rendgenskih zraka na kristalnom uzorku. To se postiže zračenjem uzorka s zračenjem valne duljine, koja je blizu apsorpcije unutarnjih elektrona na atomu kristala. Pomoću toga se dobije točna mapa elektronske gustoće te tvari, a ukoliko je poznata i relativna stereokemija svih kiralnih središta u kristalu te je poznata apsolutna konfiguracija jednoga kiralnog centra, tada se može isčitati apsolutna konfiguracija svih ostalih kiralnih središta.¹ Međutim, za točno određivanje apsolutne konfiguracije koriste se Bijvoetova metoda koja uključuje anomalno raspršenje rendgenskih zraka na kristalima molekula koje sadrže teške atome.

Osim enantiomera, uz stereokemiju veže se još jedna skupina spojeva, tj. diastereoizomeri. To su spojevi koji se međusobno razlikuju u konfiguraciji na jednome ili više stereogenih središta, ali ne na svima te se međusobno ne odnose kao objekt i njegova zrcalna slika. Ti spojevi su također optički aktivni, no ukoliko jedan od stereoizomera posjeduje ravninu simetrije, taj spoj neće biti optički aktivan i naziva se *meso* spoj. Dobar primjer takvih stereoizomera, je vinska kiselina, spoj koji se u prirodi pojavljuje kao L-(+) vinska kiselina, prisutna u grožđu, bananama i vrstama citrusa. Njene prirodne i sintetske

stereoizomere prikazuje Slika 6. Iako se enantiomeri u svojim fizikalnim svojstvima razlikuju samo u načinu zakretanja polarizirane svjetlosti, diastereoizomeri se razlikuju i u ostalim fizikalnim svojstvima, vrelištu i talištu, gustoći, topljivosti, entalpiji stvaranja i Gibbsovoj slobodnoj energiji te se mogu razlikovati čak i u svojoj kemijskoj reaktivnosti.⁷



Slika 6. Prikaz stereoizomera vinske kiseline. S lijeva nadesno su L-(+) vinska kiselina, D-(-) vinska kiselina te njihovi *meso* oblici.

Dijastereoizomeri sadrže i tzv. *cis-trans* izomeriju, koja proizlazi iz spojeva s dvostrukom vezom, ukoliko dvije skupine s jedne strane dvostruke veze nisu jednake. Stereoizomerija kod ovih spojeva nastaje zbog nemogućnosti slobodne rotacije oko dvostruke veze.

Još jedan važan pojam koji se veže uz stereokemiju je i konformacija spojeva. Konformacija se definira kao bilo koji prostorni raspored atoma u supstanci, koji može nastati rotacijom oko formalno jednostrukih veza. Iako pojam konformacije podrazumijeva sve moguće rasporede atoma, samo neki od tih rasporeda su uistinu zastupljeni u svojoj prisutnosti, tj. najzastupljenije su one konformacije koje imaju najnižu energiju. Uzrok povišenja energije jest potencijalna barijera, tj. torzijsko naprezanje prilikom rotacije oko osi kemijske veze. Ta potencijalna energija, može se prikazati izrazom¹:

$$V_{\phi} = \frac{1}{2} V_0 (1 + \cos n\Delta\phi) \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$$

U izrazu $\Delta\phi$ prikazuje torzijski pomak, V_0 je član koji predstavlja energijsku barijeru za rotaciju, a n je periodičnost, tj. koliko puta će se neka konformacija ponoviti za vrijeme potpune rotacije od 360° . Dobiveni minimumi na krivulji ovisnosti potencijalne energije o torzijskom kutu, nazivaju se konformerima. Pretraživanje plohe potencijalne energije, s ciljem pronalaska mogućih konformacija nekog spoja te interpretacija ili predviđanje fizikalnih svojstva, termodinamičkih stabilnosti i reaktivnosti, naziva se konformacijska analiza.

Stereokemija ima izuzetno važan značaj, u sintezi spojeva, kako u prirodi, tako i u laboratoriju. Kod biljaka optički aktivni produkti su sintetizirani u stanicama pomoću procesa koji su genetički kontrolirani i enzimski katalizirani te posjeduju dobro definiranu

stereokemiju. Shvaćanje koncepta stereokemije omogućilo je i nove metode sinteze u laboratoriju, gdje se mogu sintetizirati kiralne molekule iz kiralnih predložaka ili napraviti asimetričnu sintezu kiralnih molekula, temeljenu na stereoselektivnosti, čime se dobije jedan od enantiomera u suvišku naspram drugoga. Osim sinteze, stereokemija je važna i u djelovanju *in vivo*, gdje enantiomerni parovi mogu posjedovati različite okuse i mirise, djelovati kao lijekovi ili uzrokovati teške poremećaje ili čak smrt. Kako bi se ta svojstva mogla istražiti, čiste spojeve je potrebno izolirati iz biljaka, što će biti detaljnije objašnjeno u idućem poglavlju.

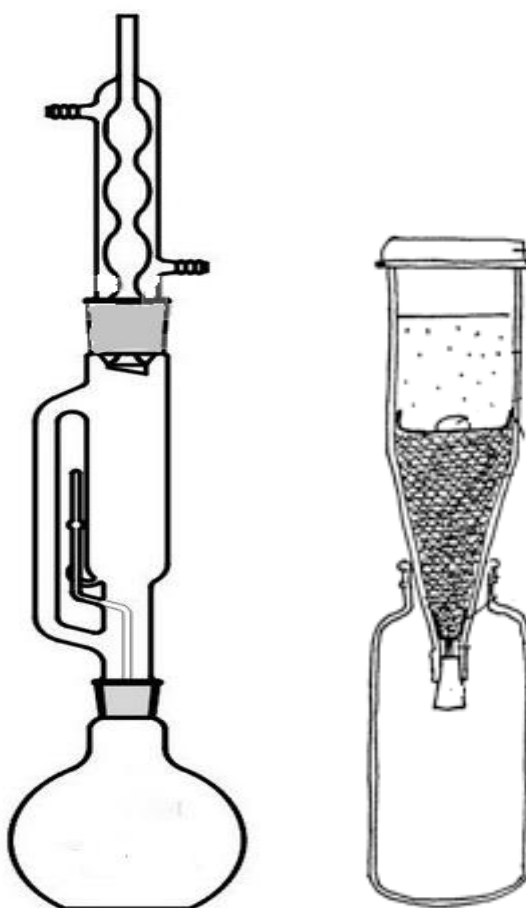
§ 2. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE STRUKTURE BILJNIH EKSTRAKATA

2.1. Metode pripreme i izolacije spojeva iz biljaka

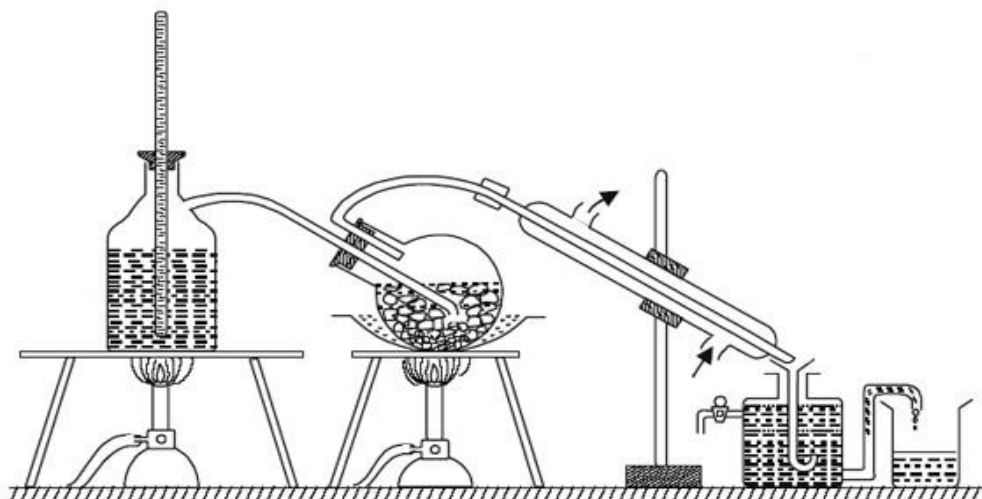
Kada se radi o pripravi biljaka, tj. dobivanju biljnih ekstrakata, mnogo pažnje je potrebno usmjeriti na rukovanje i pripremu uzoraka za fizikalne i kemijske postupke, kojima će biti podvrgnuti prilikom postupka izolacije. Prvo je potrebno odrediti koji dio biljke je potreban i koji spoj se želi izolirati iz uzorka. Kada se radi o djelovima biljaka, ekstrakcija se može vršiti iz lišća, cvijeta, stabljike, kore, korijena ili iz sjemenki. Odabir dijela biljke iz kojeg se ekstrakcija vrši važan je jer iz različitih dijelova iste biljke, mogu se izolirati drugačiji spojevi, a ako su isti, mogu varirati u svojoj koncentraciji. Također je važan i razvojni stadij biljke, jer različiti stadiji isto mogu utjecati na sastav i količinu pojedinih komponenti. Nakon što je prikladan dio odabran, potrebno ga je pripremiti za ekstrakciju. Uobičajeni postupci prije ekstrakcije uključuju sušenje uzoraka na sunčevoj svjetlosti, a zatim mljevenje. Ovakvim postupkom se dobije praškasti uzorak koji se zatim izvaže kako bi se moglo izračunati iskorištenje izolacije i udio pojedinih komponenti. Osim navedenih, mogući postupci su još i pretpranje uzoraka i sušenje zaleđivanjem. Posebno je važno da tijekom pripreme uzoraka ne dođe do potencijalne promjene ili uništenja aktivnih, tj. istraživanih komponenti sustava ili drugih sastojaka. Iz navedenih razloga je potrebno oprezno rukovati i odabrati metodu pripreme uzorka, koja neće ometati u daljnjoj izolaciji.⁴ Prilikom proučavanja spoja koji se želi izolirati iz neke vrste, korisno je proučiti spojeve izolirane iz taksonomno sličnih biljaka, budući da srodne vrste imaju veliku vjerojatnost tvorenja istih ili strukturno vrlo sličnih spojeva, zbog genetičkih sličnosti tog bilja. Osim toga, na sastav biljke može utjecati i njen geografski smještaj, koji utječe na uvjete u kojima ona raste. Kao primjer, mogu se uočiti drastične razlike u sastavu ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), ovisno o klimi u kojoj je biljka rasla.¹

Nakon što su uzorci pripremljeni, može se započeti s ekstrakcijom. Metode ekstrakcije koriste različita otapala ili smjese otapala, među kojima su najčešće korišteni metanol/etanol, etil-acetat, petrol-eter, heksan ili kloroform. Općenito, postupak se svodi na primjenu više ekstrakcija, u kojima se izmjenjuju otapala, od nepolarnih, slabo polarnih do polarnih, kako bi se dobile frakcije, koje sadrže komponente istraživanog uzorka.¹ Za objašnjenje tog procesa,

koristi se empirijsko pravilo „slično otapa slično“, tj. svaka frakcija u sebi sadrži komponente koje su dobro topljive u korištenome otapalu. Postupci ekstrakcije također variraju i u vrsti tvari koja se želi ekstrahirati ovisno radi li se o kiselim, bazičnim ili neutralnim komponentama. Sheme izolacije takvih komponenti prikazuje Slika 9. za bazične te Slika 10. za kisele i neutralne komponente. Nužno je imati na umu da navedene sheme nisu jednostavan recept za izolaciju bilo koje tvari, već služe kao općenite vodilje, koje je potrebno prilagoditi promatranom sustavu. Na osnovu toga, ovdje predloženim postupcima ponekad treba pristupiti s nekim novim idejama ili modifikacijama sustava, kako bi se došlo do željenoga produkta, a to se najčešće postiže metodama pokušaja i promašaja, tj. iskustvom. Frakcije se mogu dobiti različitim postupcima i aparaturama, među kojima se ističu Soxhletov uređaj, cjediljka (perkolator) te destilacija vodenom parom. Skice ovih aparatura prikazuju Slika 7. i Slika 8.



Slika 7. Skice Soxhletovog ekstraktora i perkolatora.^{18,19}



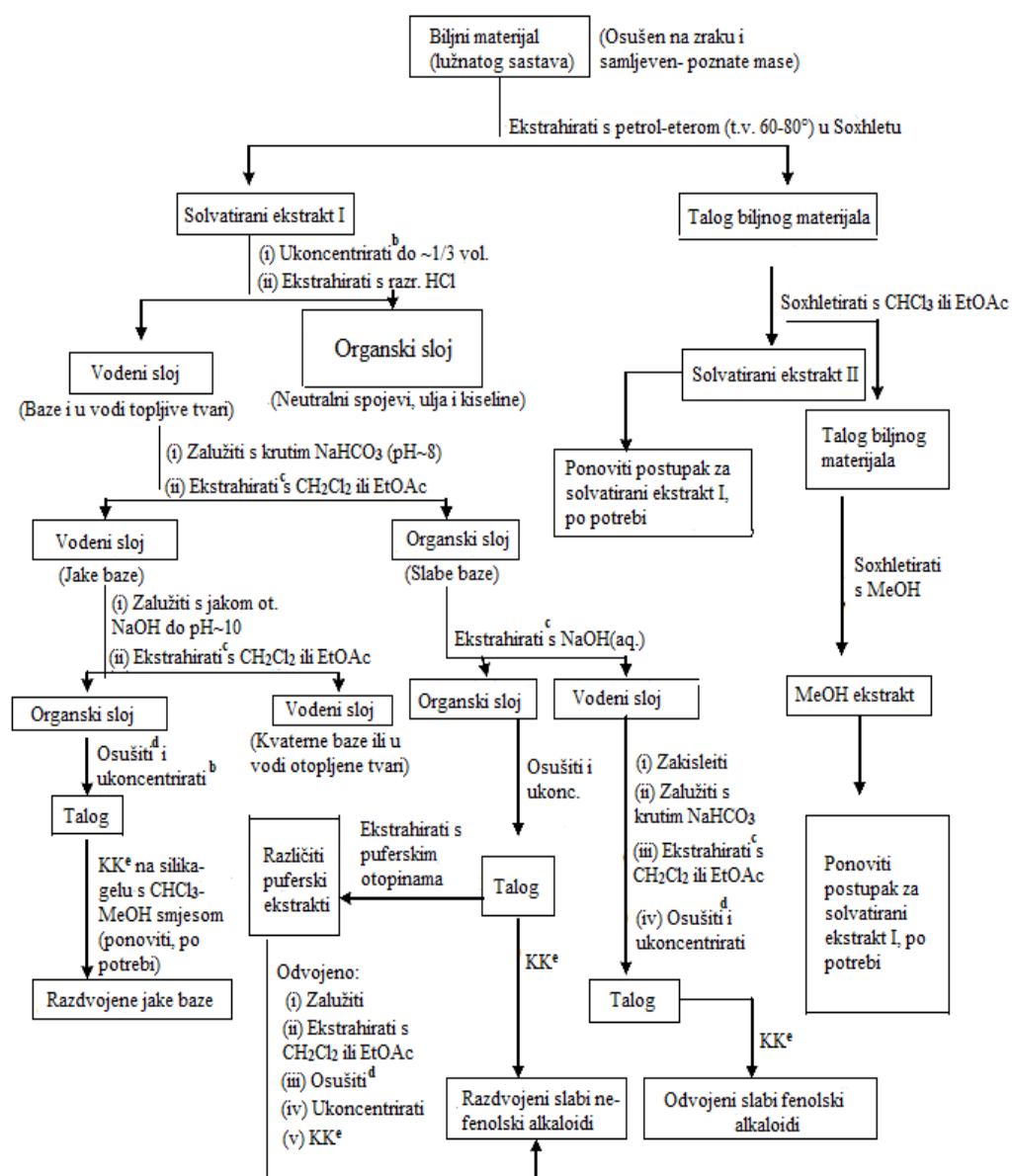
Slika 8. Shema aparature za destilaciju vodenom parom.²⁰

Soxhletov uređaj je aparatura u kojoj se kontinuiranim zagrijavanjem postiže ekstrakcija biljnih komponenti procesima uparavanja, kondenzacije, natapanja komponenti otapalom te na kraju izvlačenjem otapala s ekstraktom. U procesu se koriste i izmjenjuju otapala po rastućoj polarnosti. Proces je najčešće dugotrajan, ali učinkovit. Ukoliko ekstrakt sadrži termolabilne komponente, kontinuiranim zagrijavanjem i uparavanjem sustava, iste su podložne raspadu.¹

Ekstrakcija u cjediljci (perkolatoru) je vrlo praktična metoda, budući da zahtjeva izrazito malo izravne interakcije prilikom ekstrakcije te se ekstrakcija može vršiti i pri sobnoj temperaturi. To se postiže natapanjem obrađenog biljnog materijala u slabo hlapivom polarnom otapalu, unutar cjediljke, gdje se potom vrši ekstrakcija kroz nekoliko dana ili tjedana. Dobiveni ekstrakt se potom odvaja od biljnog materijala, koji se zadržava u cjediljci te se započinje novi proces ekstrakcije s novim otapalom.

Metoda destilacijom vodenom parom je jedna od najstarijih metoda izolacije biljnih ekstrakata. Proces uključuje direktno djelovanje vodene pare na biljni materijal, što uzrokuje oslobađanje hlapljivijih komponenti i njihovo kondenziranje s vodenom parom u destilatu. Ovaj postupak ima prednost, jer djelovanjem vodene pare na hlapive i manje hlapive tvari, povećava se njihov tlak para, što im omogućava ekstrakciju pri nižim temperaturama, nego je njihova točka vrelišta. Problem metode je taj da dugotrajnom destilacijom, mogući esteri, ako su prisutni, mogu biti hidrolizirani. Vodenom destilacijom najčešće se izoliraju esencijalna ulja koja mogu sadržavati terpenoide i/ili estere. Iako se ova metoda još uvijek koristi, u

današnje vrijeme najčešće je zamijenjena metodom vakuumske destilacije, budući da ona omogućava ekstrakciju komponenti s točkama vrelišta puno višim od vode.



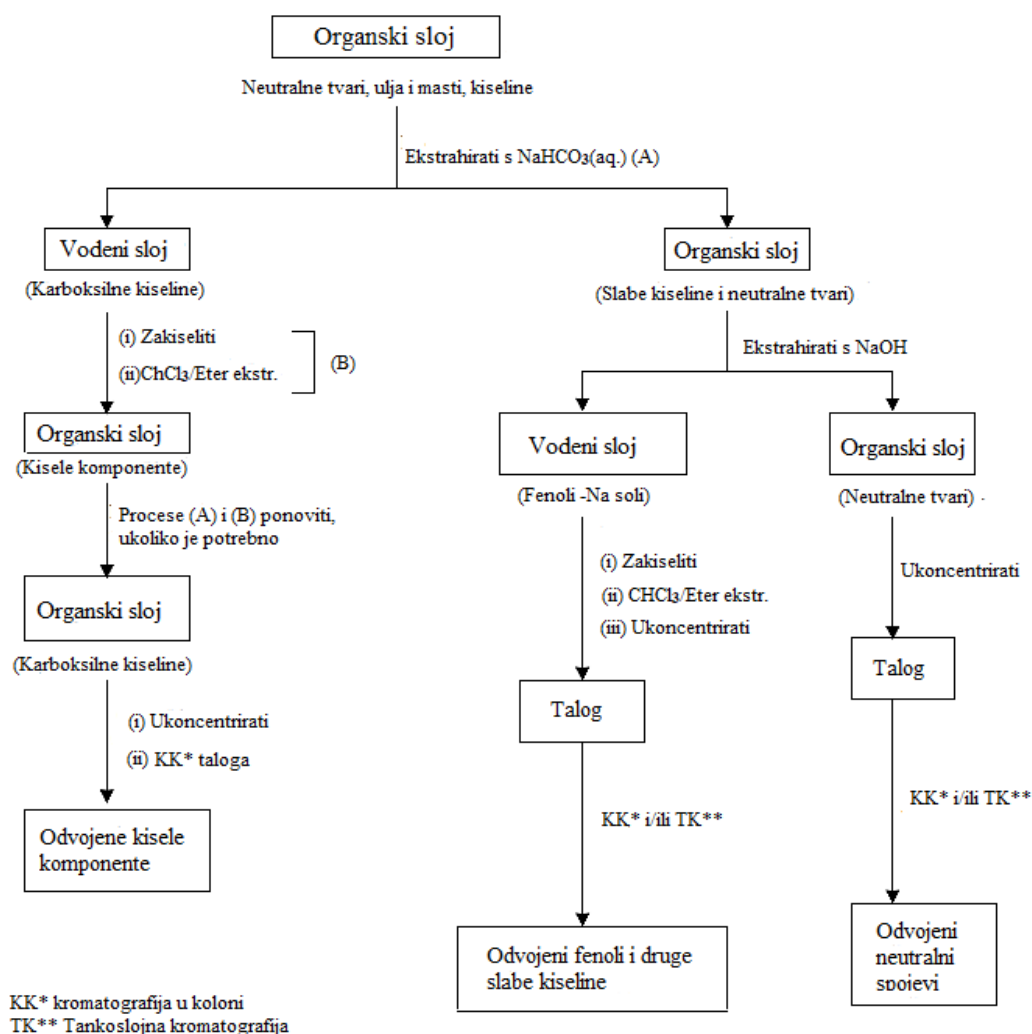
^bUkoncentrirati uvijek u brzom uparavaču pod smanjenim tlakom pri ~40°

^cEkstrahirati >2 puta s ~1/3 volumena faze koju se želi ekstrahirati

^dOrganski ekstrakti se trebaju sušiti s bezvodnim Na₂SO₄ ili MgSO₄ za dobivanje taloga za KK ili TK

^eKK (kromatografija u koloni) i potom preparativna TK (tankoslojna kromatografija) i/ili HPLC, po potrebi

Slika 9. Shema izolacije alkaloidnih (bazičnih) komponenti iz biljnih ekstrakata.¹

Slika 10. Shema izolacije neutralnih, blago kiselih i kiselih komponenti iz biljnih ekstrakata.¹

Osim navedenima, frakcije se mogu još pripremiti i modernijim metodama superkritične fluidne ekstrakcije, ekstrakcijom tekućine pod tlakom, mikrovalno potpomognute ekstrakcije ili mikro ekstrakcijama na krutoj fazi. Prednost ovih metoda je smanjena potrošnja otapala, manji raspad uzoraka prilikom ekstrakcije te manje procesa dodatnih pročišćavanja uzoraka prije prelaska na kromatografske metode. Također, ove metode su uglavnom automatizirane i zahtijevaju manju direktnu interakciju prilikom rada te ih to čini najpogodnijima za korištenje u laboratoriju, iako njihova jednostavnost i preciznost dolaze s povećanom cijenom takvih uređaja.⁴ Kada se uspješno dobiju frakcije s različitim komponentama, potrebno je izvršiti izolaciju pojedinih komponenti iz smjese te dobiti čistu tvar.

2.2. Metode izolacije čistih spojeva iz frakcija biljnih ekstrakata

Pripravljene frakcije moraju se rastaviti na pojedinačne komponente, tj. iz njih je potrebno izolirati čiste spojeve. Najčešće korištena i najbolja metoda za taj postupak je kromatografija, budući da posjeduje mnoge modifikacije i postupke koji su prilagodljivi u gotovo svakoj situaciji odvajanja dviju ili više tvari iz smjese. Kromatografske metode se koriste kako za laboratorijske svrhe tako i za industrijske pri odvajanju i pročišćavanju supstancija. Ove metode koriste fizikalne procese odvajanja tvari u kojima se supstancije na različit način raspodjeljuju između dvije faze. Jedna faza se sastoji od poroznih tvari, tekućina ili filma te se naziva stacionarna faza, dok druga, mobilna faza, eluira, tj. ispire nanese uzorke različitom brzinom sa stacionarne faze.¹ Pojedine kromatografske metode se međusobno razlikuju po načinu djelovanja tih dviju faza pri odvajanju pojedinačnih spojeva iz smjese. Tako postoje metode koje se zasnivaju na polarnim interakcijama između komponenata smjese i dviju faza. Postoje metode koje koriste razne gelove koji djeluju kao molekulska sita kroz koja velike i male molekule prolaze različitim brzinama. Također je moguća primjena tlaka za odvajanje supstanci.

2.2.1. Adsorpcijska kromatografija

Prva i najčešće susretana kromatografska metoda je adsorpcijska kromatografija na stupcu. Ova metoda se temelji na reverzibilnoj i različitoj adsorpciji pojedinih komponenata smjese sa stacionarnom fazom te na različitoj topljivosti tih komponenata u mobilnoj fazi, tj. eluensu. Nakon što su komponente vezale za stacionarnu fazu, one se različitim brzinama ispiru (eluiraju) mobilnom fazom te ih je moguće odvojiti u pojedinačne frakcije, koje sadrže čiste ili gotovo čiste spojeve. Sastav pojedinih frakcija se potom može razlučiti pomoću tankoslojne kromatografije (*engl.* thin layer chromatography, TLC). Najčešće korišteni adsorbensi u adsorpcijskoj kromatografiji su silika gel (SiO_2) i alumina (Al_2O_3) te se ponekad još koriste i ugljen, saharoza ili kalcijev hidroksid. Mobilna faza ove metode koristi više vrsta otapala, koja se razlikuju po svojoj polarnosti te zbog te razlike komponente i izlaze različitim brzinama kroz stupac. Neki od korištenih eluensa su (po rastućoj polarnosti): petrol-eter, heksan, cikloheksan, ugljikov tetraklorid, benzen, kloroform, dietil-eter, etil-acetat, aceton, etanol, metanol, voda te octena kiselina. Vrste tvari koje ti eluensi razdvajaju su, također po rastućoj polarnosti, ugljikovodici, olefini, eteri, aromatski spojevi, ketoni, aldehidi, esteri,

alkoholi, amini, kiseline te jake baze. Također potrebno je razlikovati i vrste interakcija koje su prisutne između komponenata smjese i dviju faza, budući da su one najvažniji faktor pri protjecanju supstanci kroz kolonu. Navedene po rastućoj jačini interakcija, prisutne su van der Waalsove interakcije, dipol-dipol interakcije, vodikove veze, koordinacijske interakcije te ionske nastajanjem soli. Povećanje efikasnosti adsorpcijske kromatografije, može se postići povećanjem mase adsorbensa naspram mase smjese koja se želi odvojiti te povećanjem duljine kromatografske kolone. Oba faktora pomažu preciznijem odvajanju pojedinačnih komponenata.¹

2.2.2. Brza kromatografija

Brza kromatografija (*engl.* flash chromatography, FC) je modernija kromatografska metoda koja djelovanjem tlaka, može razdvojiti tvari slične polarnosti. Ova metoda se uglavnom koristi za ciljanu izolaciju jedne komponente iz smjese, razdvajanje diastereoizomera te uklanjanje neželjenih komponenti iz smjese prije nego se ista podvrgne izrazito detaljnim metodama, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC). Glavna razlika između adsorpcijske kromatografije i FC je što u prvoj, supstance se ispiru sporim, gravitacijom pokrenutim, tokom eluensa kroz kolonu, dok FC koristi djelovanje tlaka na gornjem djelu kolone, čime je bitno ubrzan protok kroz kolonu. Posljedica toga je da FC metoda ima kraće trajanje te labilne supstance brže prolaze kroz kolonu što omogućava njihovu izolaciju u većim količinama, naspram standardnih metoda. Kao i kod adsorpcijske kromatografije i ovdje se sakupljaju frakcije koje se potom mogu detaljnije analizirati pomoću drugih metoda, kako bi se saznao sastav pojedinih frakcija.

2.2.3. Kromatografija na papiru

Kromatografija na papiru je slabije korištena kromatografska metoda, zbog relativno malenog opsega tvari koje se efektivno njome mogu izolirati. To su, primarno ionski spojevi ili neki polarniji spojevi poput šećera. Iako ova metoda sadrži određenu vrstu celuloze kao stacionarnu fazu i neki eluens kao mobilnu fazu, u praksi, ta visoko kvalitetna celuloza hvata vodu iz atmosfere u svoje pore te uhvaćena voda djeluje kao stacionarna faza. Sama metoda funkcionira na način da se nanese komponente razdijele između mobilne i stacionarne tekuće faze te pomoću kapilarnih sila se spuštaju ili penju po celulozi.

2.2.4. Kromatografija na gelu

Kromatografija na gelu koristi poliakrilne gelove kao molekulska sita kroz koja se komponente smjese moraju provući kako bi izašle iz kolone. To znači da se pojedinačne komponente odvajaju na temelju njihovih veličina i oblika čestica, Manje molekule prolaze kroz ta molekulska sita koja ih zadržavaju unutar kolone, dok velike molekule kroz te pore ne mogu proći te ih izbjegavaju i brže se eluiraju iz kolone. Ova metoda se najviše koristi za razdvajanje velikih biomolekula poput proteina.¹⁰

2.2.5. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija koristi plin kao mobilnu fazu te tekućinu kao stacionarnu fazu, a samo odjeljivanje se temelji na drugačijim interakcijama analiziranih plinoviti tvari sa stijenkama stupca koji sadrži stacionarnu fazu, dok mobilna faza, tj. plin nosač supstance vodi kroz kolonu. Preduvjet za odvajanje tvari ovom metodom je njihovo uparavanje kako bi se potom mogle razdvojiti u stupcu. Ukoliko su analizirane komponente podložne raspadu, prije nego dostignu temperaturu vrelišta, može doći do potencijalnih problema prilikom izolacije. Mobilne faze koje se koriste u ovoj metodi su plinoviti dušik, helij ili vodik, dok je sama metoda primjenjiva na nepolarnim i neionskim ugljikovodicima, koji su netopljivi u vodi.

2.2.6. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC) je kromatografska metoda koja se najčešće koristi u kombinaciji s drugim metodama kako bi se analizirao sastav pojedinih frakcija - dobivenih tim drugim metodama. Sama metoda je lako primjenjiva, nije skupa i nije vremenski zahtjevna. Način na koji ova metoda djeluje je sličan adsorpcijskoj kromatografiji utoliko što isto koristi silika gel ili aluminu, kao stacionarnu fazu. Međutim, mobilna faza, tj. eluens se ne giba pomoću gravitacije, već se kapilarnim silama penje po kromatografskoj pločici koja se nalazi unutar posude za razvijanje. Ova metoda može koristiti iste eluense koji su korišteni u adsorpcijskoj kromatografiji te vrijede ista pravila prilikom odabira polarnosti otapala. Kada se kapilarno penjanje eluensa završi, pločica se razvije, a sastav pojedinih frakcija može se vizualizirati na više načina koji se razlikuju prema tipu interakcija s komponentama smjese. Tako se razlikuje destruktivne i nedestruktivne metode. Kod destruktivnih metoda, razvijena pločica se popraska koncentriranom sumpornom kiselinom te potom zagrijava, čime se komponente raspadaju i ostavljaju vizualni trag u obliku crnih mrlja. Nedestruktivne metode

za vizualizaciju koriste UV-lampu ili bojanje jodom, čime komponente poprimaju žućkastu ili smeđu boju. U idealnom slučaju pojedine komponente već imaju nekakvu boju, čime ih je moguće razlikovati, no budući da je velika većina organskih supstanci bezbojna, takvi slučajevi su izrazito rijetki.

2.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Posljednja i vjerojatno najvažnija kromatografska metoda je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Ova metoda je najuspješnija i rutinski najčešće korištena za odvajanje supstanci. Razlog tome je što je metoda prilagodljiva gotovo svakoj smjesi te se njome mogu odvojiti makromolekule, prirodni ekstrakti, ionski spojevi, polimeri i spojevi s više različitih funkcionalnih skupina te također nije ograničena labilnošću ili termalnim raspadom komponenti. Metoda je također primjenjiva za kvantitativnu i kvalitativnu analizu te se ponekad koristi i u sprezi s drugim metodama, kao masenom spektrometrijom (*engl.* mass spectrometry, MS), kako bi se dobile informacije o količini i strukturi pojedinih komponenti. Pri izolaciji prirodnih spojeva, HPLC se smatra najučinkovitijom i najkorištenijom metodom današnjice. Kako bi se raspoznale pojedine komponente u smjesi, metoda koristi električne detektore, koji djeluju najčešće u UV dijelu spektra, budući da gotovo svi prirodni spojevi, posjeduju barem neki kromofor koji apsorbira UV zračenje pri nižim valnim duljinama (190-210)nm.¹ Na odvajanje komponenti utječe više faktora, poput odabira duljine kolone te odabir prikladnih stacionarnih i mobilnih faza. Ukoliko se iz jednog uzorka želi izolirati više komponenti, koje se bitno razlikuju u sastavu/strukturi, tada je moguće primijeniti i gradijentno eluiranje, odnosno postupak u kojem se omjeri organskog otapala i vode mijenjaju tijekom kromatografije. Prilikom analize sirovih prirodnih ekstrakata potrebno je zaštititi kolonu, jer ti ekstrakti mogu sadržavati tvari koje se mogu jako vezati za kolonu, poput klorofila, te time permanentno smanjuju prohodnost i osjetljivost kolone za daljnje analize.

Kada su frakcije uspješno analizirane i poznat je njihov sastav, tj. komponente, potrebno je odrediti strukture izoliranih spojeva. Određivanje struktura se uglavnom određuje spektroskopskim metodama, što je detaljnije obrađeno u idućem poglavlju.

2.3. Određivanje strukture izoliranih homogenih spojeva

Kada je uspješno određena homogenost izolata, mogu se proučiti neka njegova fizikalna svojstva, kao što su gustoća, točke tališta i vrelišta, topljivost u pojedinim otapalima, svojstva optičke rotacije te u konačnici i molekulska formula tvari. Međutim prije je potrebno odrediti strukturu spoja, što se može dobiti pomoću spektroskopskih metoda. Prednosti modernih spektroskopskih metoda su višestruke, budući da zahtijevaju malo vremena za analizu uzoraka te uz iznimku masene spektrometrije, postupci nisu destruktivni za uzorak i isti se mogu ponovno iskoristiti. Pritom je potrebna izrazito mala količina uzorka kako bi se potrebna mjerenja mogla obaviti. Još jedna prednost spektroskopskih metoda je u postojanju brojnih baza podataka u kojima se mogu pronaći spektri sličnih ili istih spojeva, što može poslužiti za usporedbu radi brže identifikacije dobivenih spojeva.

Općeniti postupak određivanja strukture izoliranoga spoja najčešće sadrži sljedeće korake. Prvo se određuje točna molekulska formula spoja što se dobije spregom različitih metoda poput masene spektrometrije (MS) ^1H NMR i ^{13}C NMR metoda te elementarnom analizom. Potom se određuju funkcionalne skupine spoja pomoću IR i UV spektroskopije. Zatim se rade ORD i CD mjerenja (ukoliko ih je moguće napraviti) te na kraju, ako je moguće dobiti kristal izoliranoga spoja, napravi se difrakcija rendgenskog zračenja na prikladnom kristalnom uzorku.

2.3.1. Ultraljubičasta spektroskopija

Ultraljubičasta (UV) spektroskopija je povijesno prva napravljena spektroskopska metoda, te se koristi za određivanje prisutnosti kromofora, što su zapravo atomi ili skupine koje su odgovorne za apsorpciju zračenja. Kada su te skupine ozračene svjetlošću određene valne duljine, dolazi do apsorpcije, a u dobivenom spektru se mogu uočiti specifične vrpce. Prisutnošću tih vrpca u spektru potvrđuje se prisutnost određenih funkcionalnih skupina ili kromofora. U današnje vrijeme korisnost UV spektroskopije opada, zbog postojanja IR i NMR metoda, koje mogu u približno jednakome vremenu kao i UV, dati mnogo više informacija o strukturi spoja.

2.3.2. Infracrvena spektroskopija

Druga izrazito korisna metoda za određivanje funkcionalnih skupina spojeva je infracrvena (IR) spektroskopija. Ova metoda koristi izvore zračenja, koji rade na različitim valnim duljinama, pri čemu dolazi do poticanja vibracija atoma unutar molekule. Različite funkcionalne skupine se u ovoj metodi pojavljuju pri različitim valnim brojevima, ovisno o potrebnoj energiji kojom dolazi do vibracija (npr. istezanja veza i savijanja kutova). Glavni nedostatak ove metode je, da vibracije kod kojih ne dolazi do promjene dipolnog momenta neće biti aktivne u IR spektru. Unatoč tome, navedena metoda je svejedno izrazito djelotvorna, budući da je potrebno relativno kratko vrijeme za vrijeme snimanje spektara. Također su napravljene baze podataka IR spektara mnogih spojeva, pomoću kojih su generalizirani položaji određenih vibracija radi lakšeg određivanja i usporedbe različitih spojeva.

2.3.3. Nuklearna magnetska rezonanca

Danas možda najnaprednija metoda korištena za analizu struktura organskih spojeva je nuklearna magnetska rezonanca (NMR). Ova metoda se temelji na analizi jezgara atoma, koje posjeduju spin različit od nule, u jakome magnetskom polju. Kada se na te jezgre djeluje slabijim oscilirajućim magnetskim poljem, dolazi do pobude jezgara čiji se signal bilježi tijekom relaksacije pri frekvenciji karakterističnoj za magnetsko polje u kojem se jezgra nalazi. Ovaj proces se događa blizu karakteristične rezonancijske frekvencije, kada frekvencija oscilirajućeg magnetskog polja odgovara intrinzičnoj frekvenciji jezgre. Ta karakteristična frekvencija jezgre ovisi o jačini statičkoga magnetskog polja, kemijskog okruženja jezgre te magnetskih svojstava izotopa koji se analizira. Dvije često korištene vrste NMR analize, kod određivanja strukture prirodnih produkata su ^1H -NMR te ^{13}C -NMR. Glavna razlika između dviju metoda je u promatranim jezgrama, tj. izotopima, koje uređaj analizira. Metode se također razlikuju i u osjetljivosti, budući da je prirodna zastupljenost ^{13}C jezgri vrlo mala (svega 1,1%), naspram ^1H koji je najzastupljeniji izotop vodika (99,98%). Zbog toga za analizu uzoraka ^{13}C -NMR-om potrebna je veća količina analiziranoga materijala, no obje metode su nedestruktivne, što znači da je moguće sačuvati uzorke nakon analize. Osim navedenih, postoji i oblici dvodimenzionalne nuklearne magnetske rezonance (2D NMR), tj. metode korelacijske spektroskopije (*engl.* correlation spectroscopy COSY). Ove metode daju više informacija o strukturi uzorka, naspram jednodimenzijskih NMR

metoda, a djeluju sprežanjem nekoliko jednodimenzijskih eksperimenata. Ti eksperimenti šalju pulseve različitim frekvencijama i snimaju drugačije periode detekcije koji proizlaze iz tih pulseva. Najčešće korištene COSY metode su spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta (*engl.* nuclear Overhauser effect spectroscopy, NOESY) izmjenična spektroskopija, (*engl.* exchange spectroscopy, EXSY) te totalna korelacijska spektroskopija (*engl.* total correlation spectroscopy, TOCSY).¹

2.3.4. Masena spektrometrija

Metode masene spektrometrije (MS), za razliku od UV, IR i NMR, se ne baziraju na apsorpciji elektromagnetskog zračenja, već na nastanku molekularnih iona, koji se potom cijepaju na manje fragmente koji se međusobno razlikuju u svojem omjeru naboja i mase. Zbog tog različitog omjera nastalim fragmentima treba međusobno više ili manje vremena, kako bi iz ionizacijske komore stigli do detektora. Maseni spektar prikazuje relativnu prisutnost tih fragmenata, u usporedbi s najprisutnijim ionskim fragmentom, tj. signalom, koji se naziva osnovni signal. Razlika između samih metoda masene spektrometrije je u načinu na koji dolazi do fragmentacije i nastajanja iona. Najčešće je korištena elektronska ionizacija, u kojoj se upareni uzorak pod niskim tlakom bombardira elektronima visoke energije, čime dolazi do fragmentacije. Metoda se može koristiti na uzorcima koje je moguće upariti pri čemu ne dolazi do termičkog raspada. Usporedbe radi, metoda kemijske ionizacije koristi ionske plinovite reagense, poput NH_4^+ ili H_3^+ , koji uzrokuju fragmentaciju interakcijom s uzorkom. Nastali ionski fragmenti posjeduju nižu energiju te je ova metoda prikladnija za analizu nestabilnijih spojeva i identifikaciju stereoizomera.¹ Još jedna metoda ionizacije koja je primjenjiva na tvarima, koje se ne mogu lako upariti ili su termalno labilne, je desorpcija poljem. U ovoj metodi, analizirana tvar je otopljena u prikladnom otapalu te smještena između ploča, koje na uzorak djeluju jakim električnim poljem, čime dolazi do odvajanja elektrona i nastanka molekularskih iona. Zbog prirode svoga djelovanja, metode MS su po prirodi djelovanja destruktivne, tj. analizirani uzorak se ne može naknadno iskoristiti.

2.3.5. Difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu

Posljednja metoda određivanja strukture čistih tvari je difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu. Metoda je vrlo precizna i točna kada je potrebno odrediti strukturu neke tvari, no nedostatak joj je što za svoj rad zahtjeva dobivanje kristalnog uzorka te tvari, što u

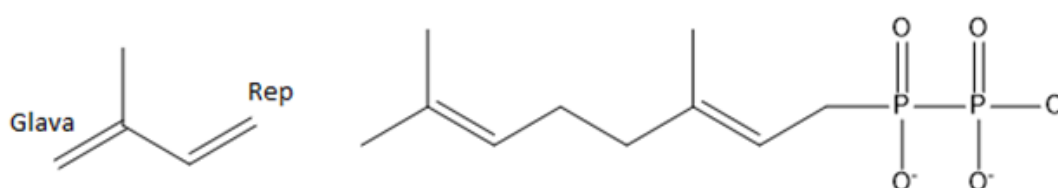
nekim slučajevima nije moguće dobiti ili su dobiveni kristali previše nestabilni kako bi se mogli analizirati. Velika prednost ove metode je postojanje baza podataka s riješenim strukturama i pripadajućim difrakcijskim uzorcima već analiziranih tvari, poput Cambridge Structural Database (CSD), čime je identifikacija nekih spojeva, mnogostruko olakšana.

Ovdje navedene metode analize strukture su samo neke od mogućih i postojećih postupaka koji se danas koriste pri analizi prirodnih ekstrakata. Mnoge od ovih metoda prilagođene su specifičnim uvjetima izolacije. Kao i kod odabira postupka ekstrakcije, za određivanje apsolutne strukture neke tvari, najčešće je potrebna sprega više različitih metoda, kako bi se dobila nedvosmisljena struktura, a odabir metoda koje će se koristiti variraju od slučaja do slučaja te izbor najboljih metoda proizlazi iz iskustva.

2.4. Stereokemija monoterpena i njihova svojstva

2.4.1. Općenita svojstva monoterpena

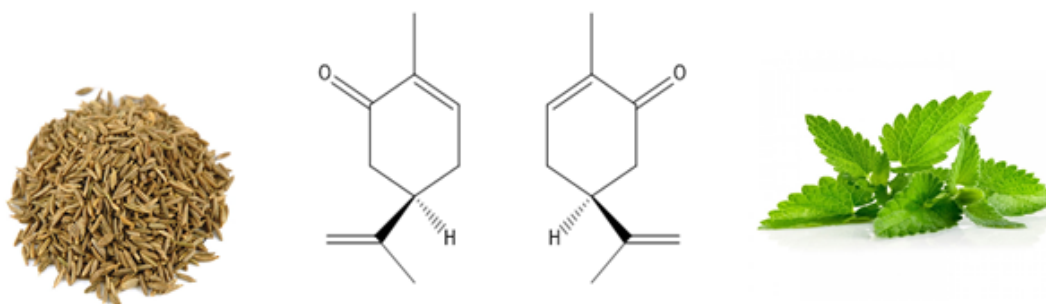
Monoterpeni su spojevi iz skupine terpenoida, koji se smatraju najvećom grupom prirodnih produkata, s preko 30 000 karakteriziranih spojeva. Oni su najstariji znani prirodni produkti te ih se može naći i u fosilima te sedimentnim naslagama različite starosti.¹ Među terpenoidima postoji nekoliko klasifikacija, koje se baziraju na broju ugljikovih i vodikovih atoma u spojevima. Tako se razlikuju monoterpeni ($C_{10}H_{16}$), seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$), diterpeni ($C_{20}H_{32}$), triterpeni ($C_{30}H_{48}$), tetraterpeni ($C_{40}H_{64}$) te politerpeni (C_5H_8)_n. Najveći izvor terpenoida su esencijalna ulja koja se sastoje od kompleksnih smjesa monoterpena ili seskviterpena, alkohola, aldehida, ketona, kiselina i estera. U prirodi, ovi spojevi imaju vrlo raširenu ulogu te mogu služiti biljkama kao kemijska obrana protiv potencijalnih nametnika ili biljojeda, kao dijelovi strukture biomembrana, kao mamac za oprašivače (npr. pčele) te razne druge svrhe. Osim kod biljaka, terpenoidi i kod ljudi mogu naći mnoge primjene te se tako koriste kao mirisna sredstva, začini, sredstva za ublažavanje boli te pokazuju potencijal za primjenu u lijekovima koji ublažavaju simptome i posljedice bolesti poput tumora.¹⁶ Glavna gradivna jedinica terpena je izoprenska jedinica, čiju strukturu prikazuje Slika 11. Kondenzacijom ponavljajućih izoprenskih (C_5) jedinica, tj. vežući ih najčešće na način „glava“ i „rep“, dobiju se terpeni, a ovisno o broju vezanih izoprenskih jedinica, mogu se razlikovati monoterpeni, diterpeni, itd.



Slika 11. Strukture izoprena, s označenim mogućim pozicijama spajanja, i geranil pirofosfata.

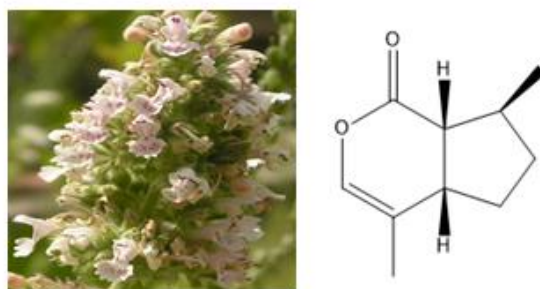
U biljkama terpenoidi su sintetizirani pomoću enzimski kataliziranih reakcija, a jedan od prekursora takvih reakcija je geranil-pirofosfat, prvi spregnuti izoprenoid prilikom biosinteze unutar biljnih stanica. Strukturu te molekule prikazuje Slika 11. Enzimi zaslužni za sintezu monoterpenoida, nazivaju se monoterpenoid sintetaze te velika većina njih djeluje stereospecifično, što znači da će prilikom biosinteze nastati samo jedan stereoizomer

monoterpena. Osim monoterpenoid sintetaza, postoje i tzv. ciklaze, tj. enzimi zaslužni za biosintezu cikličkih monoterpena. Stereospecifično djelovanje sintetskih enzima može uzrokovati prisutnost jednog enantiomera u jednoj biljnoj vrsti, a prisutnost drugoga u drugoj, što se može uočiti na primjeru molekule karvona (Slika 12.) Karvon izoliran iz kima (*Caram carvi*) je (+)-karvon, dok se njegov enantiomerni par (–)-karvon, može izolirati iz zelene metvice (*Mentha spicata*). Posljedica toga je i različit biološki odgovor organizama na te biljke, primarno u olfaktivnim receptorima u nosu.¹



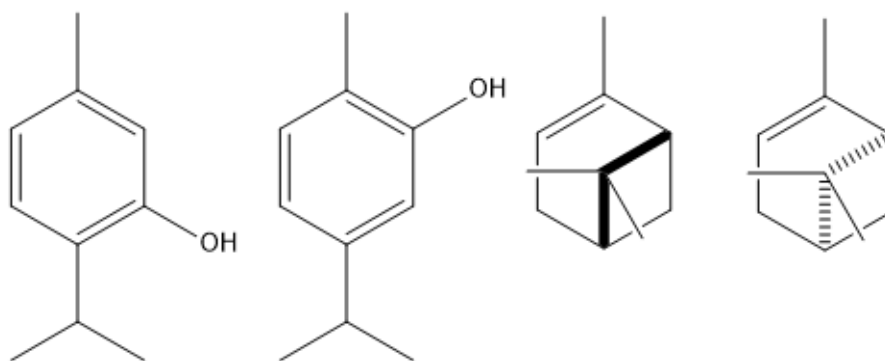
Slika 12. Sjemenke kima iz kojih se izolira (+)-karvon, te (–)-karvon, izoliran iz zelene metvice.^{13,14}

Osim u različitim biljkama, enantiomeri nekog spoja mogu se naći i u istoj biljnoj vrsti, ali u različitim omjerima, čime toj vrsti daju karakteristične gustativne i olfaktivne karakteristike. Odličan primjer toga jest monoterpen limonen, čiji (+)-limonen daje karakterističan miris naranči, dok (–)-limonen miriše po limunu, a oba enantiomera su prisutna u narančama, limunu, limeti, tj. skupini citrusa, a osim toga i u celeru, papru, kopru, itd. Strukture enantiomera limonena, prikazuje Slika 1. gdje struktura **2** prikazuje (–)-limonen, dok struktura **3** prikazuje (+)-limonen. Kada se radi o olfaktivnom djelovanju monoterpenoida, vrlo zanimljivi primjer može se naći kod nepetalaktona, izoliranoga iz mačje metvice (*Nepeta cataria*). Taj spoj ima primamljujuća svojstva na mačkama te se pretpostavlja da je njegovo djelovanje genski uzrokovano, budući da djeluje na, prosječno tri četvrtine mačaka.¹² Osim navedenoga djelovanja, ovaj spoj pokazuje i suzbijajuća svojstva na nekim insektima, poput žohara i komaraca. Struktura aktivnog izomera nepetalaktona prikazuje Slika 13.



Slika 13. Mačja metvica i aktivni izomer nepetalaktona, odgovoran za njena svojstva. Preuzeto s ¹⁵.

Monoterpeni su također odgovorni i za mnoga gustativna svojstva začina koji se upotrebljavaju u kulinarskim profesijama. Primjeri takvih spojeva su karvakrol, koji se može naći u origanu (*Origanum vulgare*), α -pinen, prisutan u ružmarinu te timol, spoj odgovoran za specifičan okus majčine dušice, tj. timijana (*Thymus vulgaris*). Strukture ovih spojeva prikazuje Slika 14. Iz iste slike može se uočiti da molekule karvakrola i timola nemaju enantiomere, naspram α -pinena, ali se spojevi međusobno odnose kao konstitucijski izomeri. Iz toga se također se može uočiti, prije navedeno svojstvo, spojeva koji dolaze iz iste biljne obitelji, u ovome slučaju origano i timijan, vrsta *Lamiaceae* da posjeduju vrlo sličnu građu.

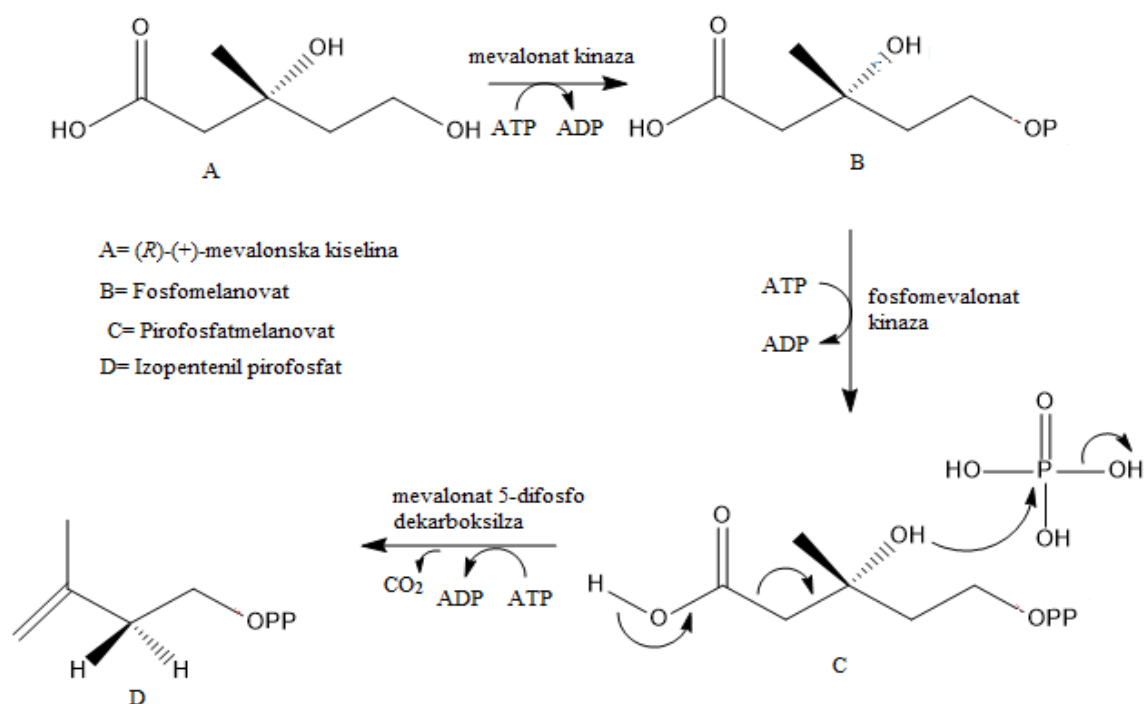


Slika 14. Strukture karvakrola, timola, (-)- α -pinena te (+)- α -pinena.

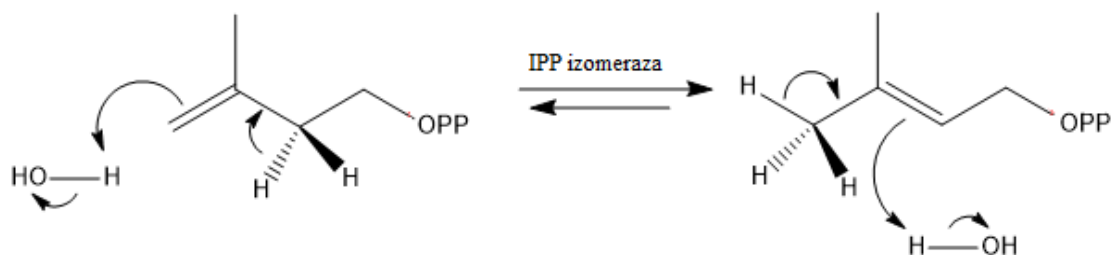
2.4.2. Biosinteza terpenoida u biljnim stanicama

Iako je glavna građevna jedinica monoterpena, a time i terpenoida, izopren (Slika 11.), ta molekula je biološki neaktivna. Kako bi došlo do kondenzacije u složene terpenoidne sustave, biljka mora izopren prevesti u aktivni oblik, tj. u izopentenil-pirofosfat (IPP) te u prisutnosti dimetilalil-pirofosfata (DMAPP), može se provesti biosinteza terpenoida.

Strukture ovih spojeva prikazuje Slika 16. Sam postupak biosinteze može se opisati u četiri uzastopna procesa, koje u biljnoj stanici kataliziraju razni enzimi. Prvi proces dovodi do nastanka izoprenskih jedinica, IPP i DMAPP koji mogu nastati kroz dva različita postupka. Jedan od tih procesa, stereospecifičnu sintezu s (*R*)-(+)-mevalonskom kiselinom prikazuje Slika 15. Također, postoji i enzim IPP izomeraza, koji katalizira reverzibilnu izomerizaciju između IPP i DMAPP te njegovo djelovanje prikazuje Slika 16. Drugi korak je nastajanje linearnih polimera izoprenskih jedinica kao što je geranil-pirofosfat (Slika 11.). U trećem koraku dolazi do ciklizacije i preraspodijele tih poliprenskih prekursora, kako bi nastali brojni različiti oblici, tj. skeleti cikličkih terpenoida. U zadnjem koraku nastala struktura, pod enzimskim djelovanjem, podvrgnuta je raznim stereospecifičnim reakcijama poput hidroksilacije, oksidacije, redukcije kako bi nastali konačni produkti.¹

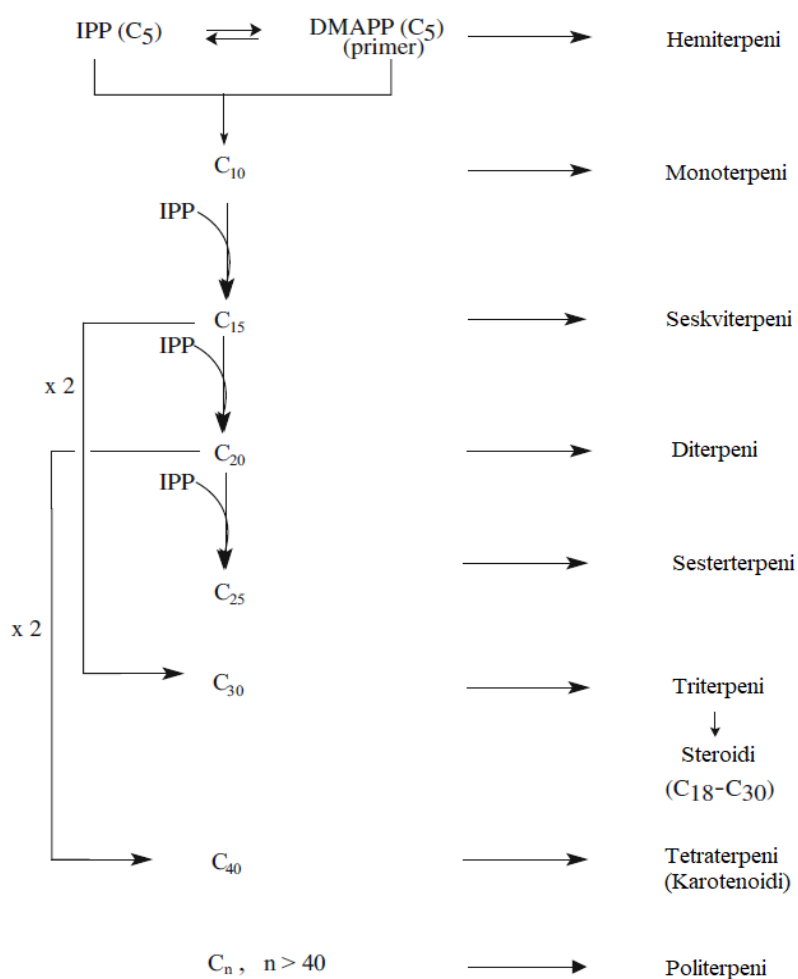


Slika 15. Shema biosinteze IPP iz (*R*)-(+)-mevalonske kiseline.



Slika 16. Strukture IPP i DMAPP te djelovanje enzima IPP izomeraze.

Procesi biosintetskog produljenja izoprenskih lanaca iz C_5 do C_{10} , C_{15} , i dalje, katalizirani su setom enzima zvanim prenilttransferazama. Više od petnaest različitih prenilttransferaza je otkriveno, svaki s drugačijom katalitičkom funkcijom. Općeniti proces produljenja ugljikovih lanaca terpenoida prikazuje Slika 17.

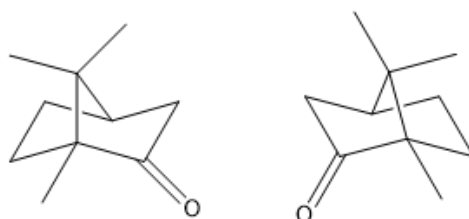
Slika 17. Shema produljenja terpenskih lanaca.¹

Prilikom biosinteze terpenoida određene biljne vrste, poput hrasta ili smreke, iz svojeg lišća mogu ispuštati izopren, za vrijeme dana, kada su dnevne temperature $\geq 30^\circ$. Pri tim uvjetima, manja koncentracija izoprena u lišću stabilizira fotosintetsku membranu od štete uzrokovane visokim temperaturama. Plava izmaglica koja se ponekad može vidjeti iznad šuma pri visokim temperaturama uzrokovana je emisijom i akumulacijom izoprena iz drveća. Procjenjuje se da je globalna emisija izoprena na sličnim razinama poput globalne emisije metana.¹

2.4.3. Kamfor

Među važnijim svojstvima monoterpena su njihova ljekovita i umirujuća svojstva. Prvo dokumentirano korištenje biljnih ekstrakata u medicinske svrhe datiraju iz Mezopotamije oko 2600 godina pr. Kr. Opisano je korištenje ulja čempresa (*Cupressus sempervirens*) i mire (*Commiphora*) za prehlade, kašalj i upale. Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organisation, WHO), procjenjuje da preko 75% svjetske populacije se još uvijek oslanja na lijekove dobivene iz biljnih ekstrakata.⁹

Kod ovih spojeva ističe se kamfor, koji se koristi kao blagi anestetik i daje osjećaj hlađenja kada se nanosi na kožu, preko koje se i upija u organizam. Osim u direktnoj primjeni, ovaj spoj se koristi i u farmakološkoj industriji u značajnoj količini, kao pripravak u lijekovima protiv svrbeži i za kašalj. Industrijski se ovaj spoj još koristi i kao tekućina za balazamiranje, odbijajuće sredstvo za moljce te zbog postojanja enantiomera, on i njegovi derivati koriste se kao reagensi pri asimetričnoj sintezi organskih spojeva. Kamfor se koristi i u kulinarske svrhe, gdje djeluje kao začim na slasticama i desertima u nekim djelovima Azije. Također, zbog svojih olfaktivnih svojstva, prisutan je i u nekim religijskim ceremonijama. Sam spoj se industrijski dobiva iz α -pinena, uobičajeno Meerwein-Wagnerovom pregradnjom. Strukture enantiomera kamfora prikazuje Slika 18.

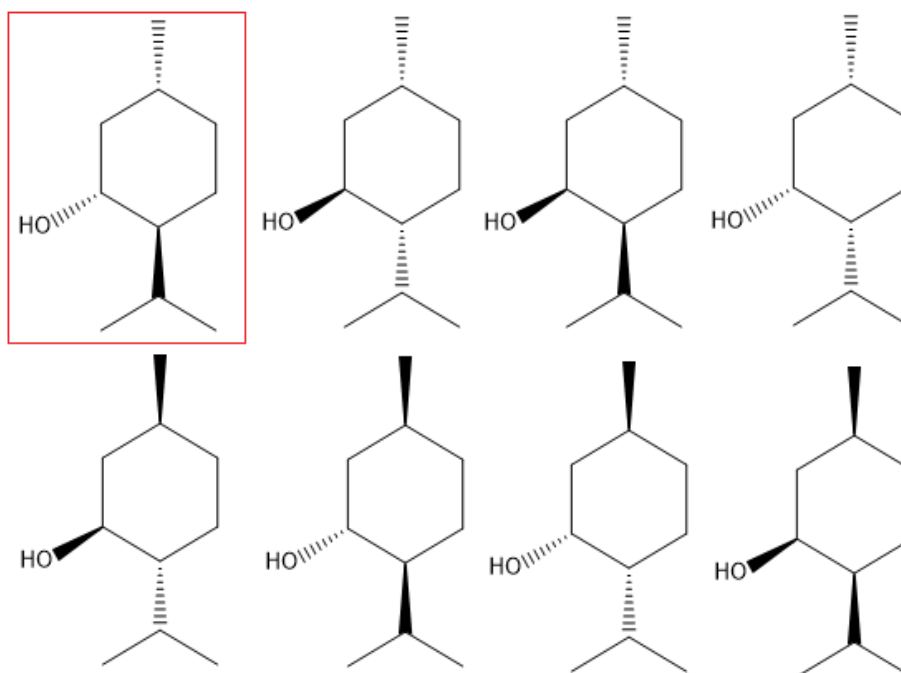


Slika 18. Strukture enantiomera (+)-kamfor i (-)-kamfor.

Biosintezom kamfora nastaje samo (+)- kamfor, dok se njegov enantiomerni par dobiva industrijskim metodama. Olfaktivno, enantiomeri kamfora su identični, no postoje razlike u djelovanju te je uočeno da (-)-kamfor pokazuje povećanu toksičnost *in vivo*, u obliku nekontroliranih trzanja tijela. Također, (-)-kamfor pokazuje manju aktivaciju toplinskih receptora u organizmu, prilikom direktnog nanošenja.¹⁷

2.4.4. Mentol

Uz kamfor, jedan od najkorištenijih monoterpena danas je mentol. Ovaj spoj prisutan je u mnogim esencijalnim uljima raznih sorti metvice te pogotovo u paprenoj metvici (*Mentha piperita*). Mentol posjeduje slična svojstva kamforu te se tako odlikuje blagim anestezijskim i anti iritacijskim svojstvima. Prilikom inhalacije, spoj daje umirujuću i pročišćavajući osjećaj u nosu te olakšava simptome grlobolje. U prirodi, mentol se gotovo uvijek pojavljuje u obliku (1*R*,2*S*,5*R*)- mentola, a osim tog, spoj posjeduje još 7 različitih stereoizomera, čije strukture prikazuje Slika 19.



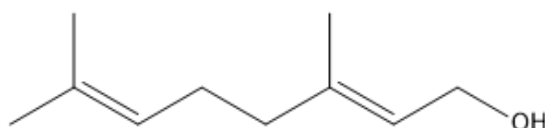
Slika 19. Stereoizomeri mentola. (1*R*,2*S*,5*R*)-mentol je označen u gornjem lijevom kutu.

Budući da kod (1*R*,2*S*,5*R*)- mentola svi supstituenti na cikloheksanskom prstenu su u ekvatorijalnoj poziciji. To je ujedno i moguće objašnjenje zašto je upravo taj stereoizomer

najviše prisutan u biljnim ekstraktima metvice, dok njegov inverzni stereoisomer, koji supstituente ima u aksijalnom položaju, (Slika 19) gotovo uopće nije zastupljen. Jedna od industrijskih metoda dobivanja mentola je zamrzavanje esencijalnog ulja metvice pri čemu se nastali kristali potom odvajaju filtracijom. Neke od važnijih primjena ove supstancije su u različitim gelovima ili kremama, gdje u kombinaciji s kamforom ili uljem eukaliptusa ima analgetičko djelovanje, tj. umanjuje bolove i simptome pri upalama mišića, glavobolji, grčevima i sl. U kombinaciji s aloa verom, mentol se koristi kao sredstvo za liječenje opekлина od sunca. Također ga se može naći u šamponima za sprječavanje prhuti, proizvodima za održavanje oralne higijene, poput pasti za zube i vodice za ispiranje usta te kao aditiv koji poboljšava okus hrani u slatkišima i žvakaćim gumama. Esteri mentola koriste se u parfemskoj industriji, kako bi naglasili cvjetne note, tj. mirise, pogotovo prisutno u mirisu ruža.¹

2.4.5. Geraniol

Geraniol je lančani monoterpen koji se u značajnijim količinama može naći u ulju limunske trave te ružinom ulju. Osim u ovim biljkama, geraniol se može naći i u raznim vrstama bobičastog voća, poput vinove loze, gdje je prisutan kao prekursor u procesu sazrijevanja, čime tome voću daje bogatiji okus. Čisti geraniol je bistra, bezbojna tekućina, karakterizirana mirisom ruža, čiju strukturu prikazuje Slika 20. te je primjer *cis-trans* izomera.



Slika 20. Struktura geraniola.

Ovaj spoj je vrlo značajan kao reagens u sintezi stereospecifičnih molekula u organskoj kemiji. Razlog tome je prisutnost dviju odvojenih dvostrukih veza, što omogućava primjenu ove molekule u raznim asimetričnim sintezama. Osim sintetske, ovaj spoj ima i industrijske primjene te se koristi kao sredstvo za odbijanje i neutralizaciju komaraca te u parfemskoj industriji, zbog svojih ugodnih olfaktivnih svojstava. Budući da nema negativnih efekata na ljude, geraniol je prisutan i u kulinarskoj industriji kao mirisna tvar na nekim slasticama te se koristi u sintetskim okusima kojima se želi postići umjetni okus breskve, ananasa, grejpa, šljive i sl. U prirodi geraniol tvore pčele u mirisnim žlijezdama kako bi označile bilje za

polinaciju te za označavanje puta u svoje košnice. Uloga geraniola u sazrijevanju voća, tj. bogaćenjem njihovog okusa, proizlazi iz činjenice da je upravo geraniol jedan od prekursora za sintezu drugih monoterpena, čija prisutnost može uzrokovati različita gustativna svojstva plodova.

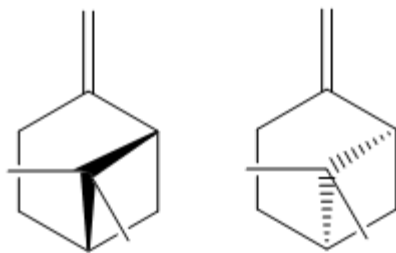
2.4.6. Limonen

Jedan od boljih primjera značajnog utjecaja monoterpena na gustativna svojstva bilja je molekula limonena. Kako je prije navedeno, enantiomeri limonena posjeduju drugačija olfaktivna svojstva, što ih čini idealnim spojevima za kulinarske profesije, gdje se koriste kao aditivi za različit okus hrane. Iako je moguće pronaći oba enantiomera u biljnim ekstraktima, (+)-limonen je češće prisutan, napsram svog enantiomernog para. Prilikom biosinteze, prekursor limonena je geranil pirofosfat (Slika 11.), a sam limonen je prekursor u biosintezi karvona (Slika 12.). Obje biosinteze su primjeri stereospecifičnih, enzimski kataliziranih, reakcija te će u pravilu iz (-)- limonena nastati (-)- karvon, iako u nekim biljnim vrstama ne nastaje optički čist produkt te je moguća prisutnost i drugog enantiomera, no u vrlo malim količinama. Razlog tome su drugačiji biosintetski putevi i različiti enzimi korišteni u tim reakcijama koji potencijalno nisu u potpunosti stereo ili supstrat specifični.³ Industrijskim postupcima, limonen se može dobiti destilacijom vodenom parom iz citrusnog voća, poput limuna, limete, naranče, grejpa i sl. Korisnost limonena je višestruka te se koristi kao otapalo u sredstvima za čišćenje u kućanstvu, zbog dobre topljivosti ulja u njemu, kao aroma u parfemskoj industriji te u mnogim proizvodima za osobnu higijenu poput šampona ili losiona za brijanje. Iako je spoj siguran za korištenje i konzumaciju, može urokovati iritaciju na koži prilikom direktnog nanošenja. U botanici limonen se koristi kao prirodni insekticid i herbicid. Limonen također posjeduje zanimljivo svojstvo, jer se zagrijavanjem jednoga enantiomera pri 300°C dobije racemična smjesa (+) i (-) limonena, koja se naziva dipenten.

2.4.7. Pinen

Prije navedeni spoj α -pinen (Slika 14.), koji se, osim u esencijalnom ulju ružmarina, može naći i u esencijalnom ulju kadulje (*Salvia officinalis*), osim svojega enantiomernog para, posjeduje i vrlo sličan konstitucijski izomer, tzv. β -pinen, koji također posjeduje enantiomerni par i čije strukture prikazuje Slika 21. Ovi konstitucijski izomeri se međusobno razlikuju prema položaju dvostruke veze. Prilikom biosinteze, sva četiri izomera, poput limonena,

nastaju iz istog prekursora, a to je geranil-pirofosfat. Iako su oba enantiomera α -pinena prisutna u prirodnim produktima, pritom je jedan više ili manje zastupljen relativno prema drugom, ovisno o biljnoj vrsti iz koje se izolira. β -pinen gotovo uvijek prisutan u optički čistoj formi kao $(-)$ - β -pinen. Naime $(+)$ - β -pinen slabo je zastupljen u prirodi.⁹ Za razliku od limonena, kod izomera pinena, nema velikih razlika u olfaktivnim svojstvima te svi posjeduju sličan miris bora, po kojemu su i dobili ime.



Slika 21. Strukture $(-)$ - β -pinena, i $(+)$ - β -pinena.

Stereoizomeri pinena se u najvećim količinama mogu naći u smoli različitih sorti bora, poput *Pinus contorta* ili *Pinus taeda* te su glavne komponente terpentina, koji se dobiva destilacijom smole. Jedan od najčešćih monoterpena u prirodi je α -pinen, a zastupljenost njegovih enantiomera ovisi o geografskim položajima gdje se nalazila matična biljka. Tako se $(-)$ - α -pinen, u većim količinama može naći u Europskim sortama bora, dok je $(+)$ - α -pinen prisutniji u sjeverno američkim vrstama. Osim u inudistriji, u obliku terpentina, izomeri pinena se koriste kao odbijajuća sredstva za insekte, a njegova olfaktivna svojstva kod ljudi uzrokuju pročišćavanje dišnih puteva te se koristi u lijekovima pri problemima s disanjem. U parfemskoj industriji, selektivnom oksidacijom pinena, dobivaju se umjetna mirisna sredstva.

Ovdje navedeni primjeri monoterpena su odabrani zbog svojih specifičnih karakteristika i njihovoj značajnoj prisutnosti, koja prolazi nezapaženo, u svakodnevnome životu. Još mnogi, ne samo monoterpeni, već i cijela klasa terpenoida su spojevi, koji sadrže nevjerojatna svojstva i mogućnosti za olakšavanje izazova s kojima se ljudi susreću. Osvrt na prirodne produkte i njihovu izolaciju, dan je u idućem poglavlju.

2.5. Općeniti zaključci o izolaciji prirodnih produkata i svojstvima monoterpena

Iako je možda neočekivano da spojevi poput stereoizomera, koji su strukturno vrlo slični, mogu uzrokovati dramatične razlike u svojim makroskopskim svojstvima pogotovo kada se radi o malim molekulama poput monoterpena. Iako su samo jedna od klasa terpenoida, među njima se mogu naći primjeri koji vrlo jasno prikazuju njihovu raznolikost svojstava što su ujedno i razlozi zašto su ovi spojevi našli i imaju svoju primjenu kod ljudi već tisućama godina. Slični primjeri mogu se naći i u drugim skupinama prirodnih produkata, kao što su alkaloidi ili flavonoidi. Zanimljiva stereokemijska svojstva ovih spojeva nisu svojim utjecajem ograničena samo na biljni svijet, već ih se može okarakterizirati i kod raznih životinja. Kod ljudi, opisan je različit utjecaj stereoizomera na doživljaj njihovih olfaktivnih ili gustativnih svojstva. Međutim slično djelovanje može se pronaći i kod insekata koji koriste kemijsku komunikaciju, putem feromona tijekom privlačenja jedinke suprotnog spola pri čemu, kiralna svojstva određuju sutpanj privlačnosti i spol jedinke kao na primjer, u vrsti maslinine muhe (*Bactrocera oleae*).

Također, nije rijetka pojava naići na potpuno neokarakterizirani spoj tijekom izolacije iz biljne vrste, za koju se smatralo da su svi njeni prirodni produkti znani. Kao što je već prikazano, iz iste biljne vrste mogu se dobiti drastično drugačiji spojevi, ukoliko je ista rasla u drugačijim uvjetima ili na drugo geografskom položaju. Iako su ljudi prirodne produkte koristili od najranije povijesti, tek od 20. stoljeća, s razvojem modernih tehnika izolacije i karakterizacije spojeva, moguće je točno razlučiti koje od pojedinačnih tvari iz tih smjesa posjeduju korisna svojstva zbog kojih su te smjese i prvotno korištene, a koje od njih su potencijalno štetne ili umanjuju njihovo djelovanje. U cijelom procesu izolacije, koji uključuje i određivanje strukture izoliranih supstanci, najviše vremena se izgubi prilikom pripremanja uzoraka i same ekstrakcije smjesa iz biljnog materijala. No osim vremena, i ovisno o odabranoj metodi, prilikom ekstrakcije se također troše velike količine otapala, što može uzrokovati dodatne ekološke i financijske poteškoće u metodama izolacije.

Prilikom procesa određivanja strukture neke metode imaju određene nedostatke. UV spektroskopija traje jednako kao i IR, ali daje puno manje informacija o promatranome spoju. Difrakcija rendgenskih zraka je vrlo korisna i dobra metoda određivanja apsolutne konfiguracije, no zahtjeva dobivanje čistog kristalnog uzorka, što nije moguće u svim slučajevima. Masena spektrometrija je odlična pri određivanju strukture spojeva i zajedno s

IR spektroskopijom, može se relativno brzo odrediti struktura tražene supstance. Kritični nedostatak metode je što destruktivno djeluje na uzorke. Izolacija prirodnih produkata, u velikoj većini slučajeva neće uroditi s velikim količinama izoliranih supstanci te će se, maseno gledajući, raditi o miligramima neke supstance, a dodatni gubitci, uzrokovani analizom, uzrokovati će velike gubitke u iskorištenju izolacijskog procesa. Ovo naravno nije problem, ako se radi o biljnoj vrsti koja raste brzo i prilagodljiva je većini klimatskih uvjeta pa se biljni materijal može nabaviti u većim količinama poput zelene metvice, no ukoliko se radi o specifičnim vrstama, koje mogu rasti samo u određenim uvjetima i iste tvore malo prirodnih produkata, poput praha šafrana, dobivenog iz vrste *Crocus sativus*, dolazi do određenih poteškoća. U konačnici, osoba koja vrši izolaciju će se koristiti i kombinirati one metode, kojima ima pristup budući da uređaji za neke od ovdje navedenih metoda su izrazito skupi te ih se ne može pronaći u svakome laboratoriju.

Pri kraju, potrebno je naglasiti da se prilikom bilo kakvih procesa, bilo izolacije ili sinteze, vodi računa o tzv. zelenoj kemiji, tj. da utrošeni resursi u obliku otapala i prekursora budu racionalno iskorišteni te da je njihovo iskorištenje bilo vrijedno dobivanja konačnog produkta. S ovim načinom razmišljanja često se veže i pojam atomske ekonomije, koja se može izraziti u obliku¹:

$$\text{Atomska ekonomija} = \frac{\text{Molekularna masa željenog produkta}}{\text{Molekularna masa svih reaktanata}} * 100\%$$

Ova jednadžba na vrlo jednostavan način prikazuje koliko je odabrani postupak u konačnici isplativ, u pogledu potrošnje resursa, da bi ga se izvršilo.

U konačnici, metode izolacije se mogu smatrati jednim od najkorištenijih i najkorisnijih kroz ljudsku povijest, budući da su izolirani produkti često pronašli korisnu primjenu, npr. kao lijekovi. Proučavanje i izolacija prirodnih produkata je svakako opširno područje, koje zahtjeva mnogo predznanja i truda da bi se moglo u potpunosti iskoristiti. Vrlo često svaki novi izolirani i okarakterizirani spoj pomaže u boljem razumijevanju prirodnih procesa. Vrlo često novi izolati pronalaze potencijalnu primjenu u nekoj industriji šireći daljnje mogućnosti istraživanja sinteze sličnih novih spojeva.

§ 3. ZAKLJUČAK

Procesi izolacije prirodnih produkata su najčešće dugotrajni pri čemu je potrebno veliko strpljenje i pedantnost tijekom izvođenja postupaka. Male greške mogu uzrokovati mnoge poteškoće, a i moguć je potpuni gubitak spojeva koji se žele izolirati. Iz postojećih baza podataka moguće je dobiti informacije o potencijalnim supstratima, koji bi mogli biti dio ekstrakta, ali i ideje za odabir metoda koje bi mogle biti najučinkovitije, financijski najisplativije i vremenski prihvatljive. Sami postupci kromatografije prilikom izolacije su zapravo dio rutinskog rada u laboratoriju kada se radi o izolaciji ili sintezi novih spojeva te je za njihovo uspješno provođenje najbitnije iskustvo rada s istima. Dobivene frakcije čistih spojeva nakon kromatografije je potom potrebno analizirati kako bi se došlo do točnih struktura supstanci. U ovome dijelu vjerojatno najbrži put određivanja strukture je napraviti IR spektar spoja kako bi se dobile informacije o prisutnosti pojedinih funkcionalnih skupina te potom napraviti neku od NMR metoda analize, poput ^1H NMR ili ^{13}C NMR. Korisno je tom procesu pridodati i jednu od metoda određivanja optičke rotacije izoliranoga spoja, što je zapravo vrlo česta pojava kod prirodnih produkata budući da je većina procesa biosinteze u biljkama stereospecifična i vrlo rijetko će doći do nastanka racemičnih smjesa.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. S.K.Talapatra, B. Talapatra, *Chemistry of Plant Natural Products*, Spriger, Berlin, 2015.
2. R. Ikan, *Natural products A laboratory guide*, Academic press inc. USA 1991.
3. J. M. Finefield, D. H. Sherman, M. Kreitman, R. M. Williams, *Angew. Chem: Int. Ed.* 51 (2012.), 4802-4837
4. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants` Extracts, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/>
5. <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/Polarimetry.html> (datum pristupa 15. srpnja 2018.)
6. <https://www.slideshare.net/sujitpatel11/optical-rotatory-dispersion> (datum pristupa 15. srpnja 2018.)
7. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/12/oc/vlu_organik/stereochemie/physikalische_eigenschaften.vlu.html (datum pristupa 19. srpnja 2018.)
8. https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism (datum pristupa 15. srpnja 2018.)
9. A. H. Dengada, *Isolation and Structural Elucidation of Compunds from Natural Products*, Blacksburg, Virginia, 2014.
10. D. L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and company, New York, 2013.
11. <https://remotecat.blogspot.com/2014/11/chiral-molecules-in-everyday-life-from.html> (datum pristupa 4. ožujka 2018.)
12. <http://www.compoundchem.com/2014/03/13/chemical-compounds-in-herbs-spices/> (datum pristupa 4. ožujka 2018.)
13. <https://www.savoryspiceshop.com/caraway-seeds> (datum pristupa)
14. <http://sportsvape.net/product/mint/> (datum pristupa 28. srpnja 2018.)
15. <https://en.wikipedia.org/wiki/Catnip> (datum pristupa 28. srpnja 2018.)
16. M. N. Gould, *Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes*, Environmental Health Perspectives; Vol 105, Supplement 4, June 1997.
17. P. Zuccarini, G. Soldani, *Camphor: benefits and risks of a widely used natural product*, Acta Biologica Szegediensis, Volume 53(2) (2009.) 77-82
18. <http://firststepglass.com/soxhlet-extractor.html> (datum pristupa 11. rujna 2018.)
19. <http://madisonherbalinstitute.org/herbal-education/making-herbal-tinctures-percolation-method/> (datum pristupa 11. rujna 2018.)

20. <http://www.epharmacognosy.com/2012/05/direct-steam-distillation.html> (datum pristupa 11. rujna 2018.)