

Экстракция, выделение и идентификация природных соединений

**PhD, асс. Профессор Тургумбаева
А.А.**

Введение

Цели: Узнать, как извлекать, фракционировать, очищать, и выделять структуры вторичных метаболитов из природных источников.

Что такое натуральные продукты?

Вторичные метаболиты из природных источников (растений, грибов, бактерий, водорослей, грибов, трюфелей, морских организмов, животных).

Могут быть в виде твердых, жидких, летучих жидкостей, плиточной жидкости форм, а также в виде жира и воска

Молекулярная масса: низкая или высокая.

Химически может быть

Обычные(сложные эфиры)

Кислотные (COOH группы, Фенольные соединения)

Базовые (Азотистые соединения как алкалоиды)

Липофильные (липиды, жиры, воск)

Гидрофильные (сахар, клей, полисахариды)

Широкий ассортимент химических соединений

Терпены и стероиды: моно-, сескви-, ди-, и Тритерпены, стероиды.
Углеводы: Сахар (моно-, ди-, три-и олигосахариды), полисахариды, Растительные клеи, пектины.

Аминокислоты, пептиды.

Липиды и масла: моно-, ди-и триглицериды, Эфирные масла, жирные кислоты.

Гликозиды: Флавоноиды, Сердечные, Сера, содержащая, Кумарин, хромонов, Антрахинон, Суанорфоре, Фенольный.

Алкалоиды (основные азотистых веществ): пиридин, пиперидин, тропана, индол, хинолин, изохинолин, фенольные, сложный эфир, фенантрен трополон, дитерпеноид, Хинолоны, Carboline, имидазол, стероидные, пурин.

Ацетилены, Лигнаны, стильбены

каннабиноиды

углеводороды

Выбор, Сборная Сушка, и идентификация растительного материала

Выбор: растительного материала может быть осуществлен различными подходами:

- Случайная выборка
- Селективный выбор с помощью этнофармакологических отчетов.
- Ограниченный выбор на группы в зависимости от хемотаксономических, географических или сложных структурных типов

Коллекция: Растительный материал должен быть здоровым, так как микробные инфекции могут изменить метаболитов, продуцируемых образца.

Изменение в коллекции: сайт, высота, возраст растения, во время цветения, после цветения, плодоношения, климат, тип почвы могут повлиять на уровень вторичных метаболитов.

Дата и время сбора: рано утром, в течение дня, вечером, в течение весны на осень, сезон дождей или сухого сезона

Продолжение

Органы растений: листья, цветы, плоды, стебли, корни. Различные органы производят или накапливают различные профили вторичных метаболитов.

Образцы должны храниться (образцы гербария), документация, число.

Идентификация и аутентификация ученым (ботаник).

Сушка, шлифование и хранение

Воздушно-сухой, тень, температура в помещении;

Духовка при температуре не выше 30°C;

Микроволновая печь; сублимационной сушки (lyophilization).

Свежие образцы иногда необходимо извлечь немедленно для предотвращения ферментативных процессов.

Общие реагенты для обнаружения различных фотохимических групп

Алкалоиды: Выдержка около 1 г растительного материала с 2 мл разбавленной HCl, фильтруют. Фильтрат разделить на 2 части: Добавить к первой части несколько капель **реагента Mayer** [2% Hg Cl₂ в воде и 50% KI в воде]. От белого до желтоватого осадка. Для второй части добавить несколько капель **реагента Dragendorff** [8% висмута, субнитрат в 30% азотной кислоты + 50% KI в воде]. Оранжевый коричневый п.п..

Сесквитерпены лактоны и Сердечные гликозиды: Извлечь 1 г растительного материала с этанолом, разделить экстракт на 2 части: 1-я часть + капли **Kedde реагента** [2% от 3,5-динитробензойной кислоты в MeOH +5,7% KOH в воде]. Голубоватый до фиолетового цвета. 2-я часть + капли **Baljet реагента** [1% пикриновой кислоты в этиловом спирте + 10% NaOH в воде]. Оранжевый в темно-красный цвет.

Продолжение

Стерины/Тритерпены: тест Либерман-Бурхард: смешайте 1 мл безводной уксусной кислоты и 1 мл CHCl_3 экстракта растения, прохладном, добавить одну каплю конц. серной кислоты. Синий, зеленый, красный или оранжевый цвет.

Флавоноиды: Тест Шинода: экстракт 1 г растительного материала с этанолом, фильтра. К фильтрату добавить Mg порошок и каплю концентрированной. HCl . Оранжевый, розовый, красный цвет появится от флавонов и флавонолов, флаванонов, дигидрофлавонолов..

Испытания серной кислотой: Флавоны и флавонолы дают глубокий желтый раствор с серной кислотой. Халконы и aurones дают красный или красно-синеватый цвет, флавонон дает от оранжевого до красного цвета.

Сапонины: Перемешать растительный материал с водой. Дает стойкую пену. Также спиртовой экстракт растительного материала вызовет гемолиз в красных кровяных клетках.

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

ТСХ дает представление о химической природе компонентов.

ТСХ посуда: пластик, стекло, алюминий. Покрытые сорбентом (стационарная фаза): силикагель, оксид алюминия, целлюлоза, полиамид. Толщина: 0,1-0,25 мм (аналитические пластины); 0,5-2 мм (подготовительные). Подвижная фаза (разработка системы).

Rf значение: отношение расстояния перемещаемой соединения к расстоянием перемещается по подвижной фазы. Факторы, влияющие на Rf значение: природа соединений, сорбент подвижной фазы, температура.

Извлечение растительного материала метанола, проведение ТСХ в различных системах:

Неполярная система: гексан: EtOAc (1-5%), гексан-эфир (10-20%)

Средняя система: CHCl₃: MeOH (1-10%), CHCl₃-EtOAc (10-25%)

Полярная система: CHCl₃: метанол (15-40%), BAW(4:01:05),(5:01:01)

Полярные растворители: гексан, бензол, толуол, эфир, DMSO, CHCl₃, EtOAc, ацетон, этанол, метанол, ацетонитрил, вода, кислоты.

Визуализация

Видимый свет, ультрафиолетовый свет (254 нм короткие волны, 366 нм длиной волны). [Неразрушающий]

Спрей с определенными для визуализации агентами (деструктивные):

Реагент Dragendorff: от оранжевого до красного цвета с алкалоидами.

5%-ная серная кислота в этаноле (универсальное распыление агента).

4%-ый ванилин в 5%-ной серной кислоте в этаноле;

Теплые пары аммиака; Флавоноиды

Йод: Непредельность

Алюминий трихлорид 2%: желтого цвета с флавоноидами.
Реагент хлорида железа: 5% в 0,5 N HCl; для обнаружения фенолов.

Методы экстракции

Выбор метода экстракции зависит от многих факторов:

Химическая природа вторичных метаболитов.

Гидрофобность / Гидрофильность.

РКа (кислота / основные свойства).

Расходов

Термостабильности.

Размера (молекулярная масса).

Конкретные методы: зависят от химического или физического характера соединения.

Последовательное извлечение

Добыча / разделение

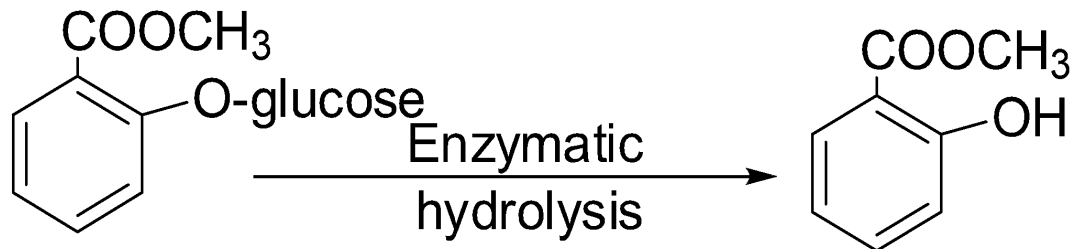
Сверхкритическая жидкость добычи

Летучие масла

Паровая дистилляция. Недостатки: разложение, рацемизация
Чувствительные масла (масло Жасмина): использовать метод мацерации: Прессовать цветы между двумя слоями энергонезависимого жира (сало и говяжий жир), а затем извлечь этанолом.

Цитрусовые; использовать метод. *шрамирования* кожура

Летучие масла могут быть подготовлены после **ферментативного гидролиза**: Масло грушанки (метилсалицилат): присутствующих в *Gaultheria procumbens* как гликозид (метилсалицилат-О-глюкозид).



Алкалоиды (основные азотные соединения)

Присутствует в растениях в виде солей: оксалатов, тартратов, таннатом.

Освобождение свободных оснований щелочным путем как NH_4OH , CaO , MgO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Алкалоиды соли: растворимый в воде, а не в CHCl_3 .

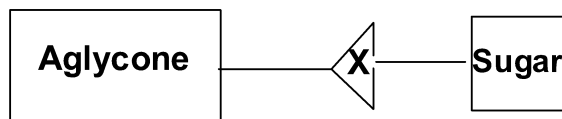
Алкалоиды основы: растворимый в CHCl_3 , а не в воде.

Фенольные алкалоиды (например, морфин), могут быть извлечены с помощью разбавленной *alkalie* 0,5%-ного водного раствора NaOH .

Табачные алкалоиды: нестабильные алкалоиды жидкости. Присутствует на заводе в виде солей. Смешать растения с *alkalie*, пар перегнать.

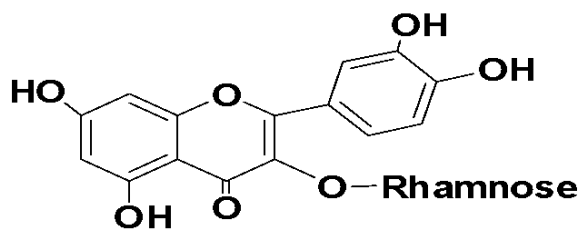
Экстракт растительного материала с разбавленной кислотой. Фильтр. Подщелачивать. Извлечение хлороформом (кислотно-щелочной экстракции).

Glycosides

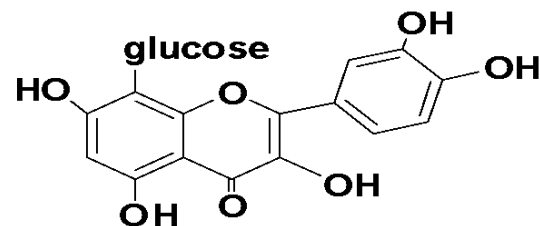


X = O или S или N или C

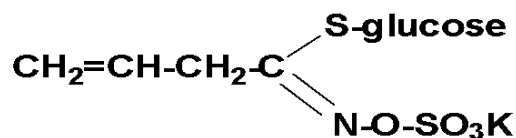
О-гликозиды, S-гликозиды, N-гликозиды и C-гликозиды



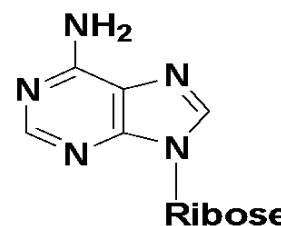
Quercetin



Quercetin-8-C-glucoside



Sinigrin



Adenosine

Избегать кислотного гидролиза, alkalie гидролиз, ферментативного гидролиза. Инактивации ферментов: непосредственной сушки например сердечные гликозиды;

Кипячение воды или в кипящем спирте (денатурации ферментов); сублимационной сушки (лиофилизации).

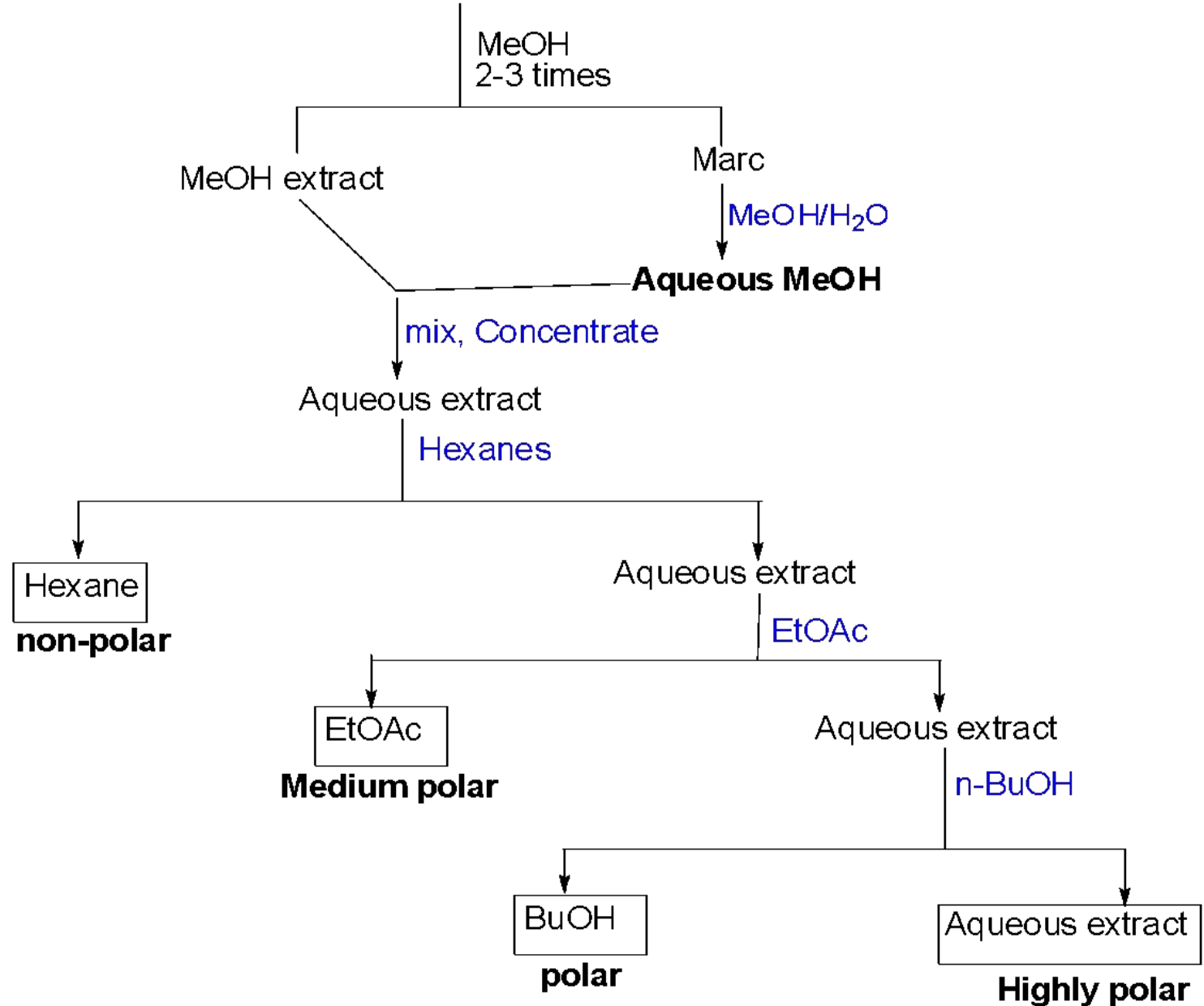
Продолжение

Полисахарид / слизь: Поражение высушенного растительного материала с гексаном, экстрагируют водой (холодной, теплой, кипящей водой). Добавить избыток этанола для осаждения полисахарида. Центрифуга отделить осадок. Перерастворить в п. п. в воде, затем осадок снова очистить спиртом.

Последовательное извлечение: Извлечение растительного материала путем мацерации или перколяции с гексаном, CHCl_3 , EtOAc и MeOH . Ультразвуковой растворитель облегчает процесс извлечения. Используйте Сокслета (не является предпочтительным для теплочувствительных соединений).

Добыча / раздел: Извлечение растительного материала метанола или этанола путем мацерации (2-3 раза). Затем извлечь выжимку с $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (1:1). Смешайте все экстракты и перегоните большую часть метанола. Водный остаток распределяют с гексаном, EtOAc и, наконец, с н-бутанолом.

Dried Plant Material



Разделение и фракционирование хроматографии

Большинство методов разделения являются той или иной формой хроматографии.

Хроматография включает распределение соединения между двумя движущимися фазами (подвижная фаза), которая передается по неподвижной фазы (стационарная фаза).

Разделение основано на характерном образе в которой соединения распределяются между этими двумя фазами. Это называется коэффициент распределения. Для соединения X

$$KD = \frac{X \text{ постоянная фаза}}{X \text{ подвижная фаза}}$$

Хроматография

Неподвижная фаза: твердые или жидкие. **Подвижная фаза:** жидкость или газ. Поэтому мы имеем: жидкостной хроматографии (ЖХ): подвижная фаза является жидкостной хроматографии газа (ГХ).

Жидкостная хроматография: По механизму разделения

1. Адсорбционная хроматография.
2. Распределительная хроматография.
3. Хроматография с исключением размеров
4. Ионообменная хроматография

Газовая хроматография: две категории:

1. Газ-адсорбционная хроматография.
2. Газ-распределительная хроматография.

Жидкая Хроматография

Адсорбционная хроматография: Компоненты смеси для анализа распределены по adsorption между подвижной фазы и неподвижной фазы. Соединения, которые являются более адсорбируют к стационарной фазы имеют низкую Rf, в то время как те, с меньшим сродством (адсорбируют) к стационарной фазы миграции быстро (высокое значение Rf).

Делятся на: **колоночная хроматография**
тонкослойная хроматография

Распределительной хроматографии (распределение жидкий раствор): Разделение зависит от распределения компонентов смеси между подвижной фазы и стационарной фазы (жидкости).

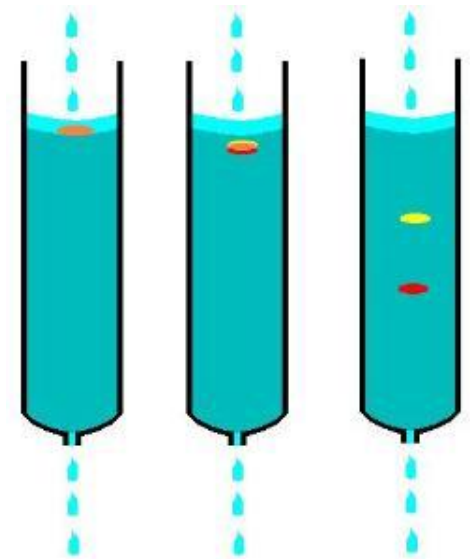
Делятся на : **колоночная хроматография раздела**
Бумажная хроматграфия
Тонкослойная хроматография раздела

Принципы хроматографии

Хроматография включает распределение соединения между двумя движущимися фазами (подвижная фаза), который передается по неподвижной фазы (стационарная фаза). Разделение происходит потому, что в динамическом равновесии молекул растворенного вещества, передающих между двумя фазами, различные молекулы проводят различные пропорции времени в мобильной и стационарной фазы.

Фильтр: растворенные вещества двигаться вниз по колонне, когда в подвижной фазы. Скорость миграции растворенного вещества обратно пропорциональна его коэффициент распределения.

Время удерживания (время элюирования): Это время между инъекцией и вымывания растворенного вещества. Это непосредственно связана со скоростью потока подвижной фазы, или длине колонны.



Продолжение

Размер частиц: Уменьшение размера частиц неподвижной фазы, средство максимизации площади поверхности неподвижной фазы. Соответственно, существует увеличение в равновесии растворенных веществ между подвижной и стационарной фазами. В колонках HPLC, размер частиц неподвижной фазы составляет около 5 мкм в диаметре. Поэтому требуется высокое давление, чтобы заставить подвижную фазу через такой плотно упакованным материалом. Увеличение длины колонны увеличится N (число теоретических тарелок), будет пропорционально увеличению времени хранения, которые приведут к полосе уширения.

Чтобы улучшить качество изображения, то лучше, чтобы перейти от открытой колонке ВЭЖХ или небольших колонок с меньшим размером частиц.

Упаковочные материалы

Широкий выбор упаковочных материалов. Физические символы упаковочных материалов зависят от: размера частиц: 10-200 мкм. Размер частиц 2-8 мкм (используется для КВУП) Форма: диапазон от неправильной формы к сферической; пористые частицы: поры варьируется от 50 нм до макроскопических размеров.

Силикагель:

Наиболее широко используется стационарная фаза. Химически: оксид Силиконовые $[\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$. Будучи пористым, он предлагает большие площади поверхности.

Размер частиц: 40-200 мкм для открытого ЦК и 2-8 мкм для КВУП.

Поверхность состоит из подверженных групп силанольными (активных центров). Они образуют водородные связи с соединениями. Чем сильнее водородных связей, тем сильнее соединение удерживается кремнезема.

Полярные соединения (COOH, амины, амиды) сильно адсорбируется на кремнезема. Неполярные соединения (например, терпены), отсутствие полярные функциональные группы, не водородные связи, плохо удерживается кремнезема.

Силикагель

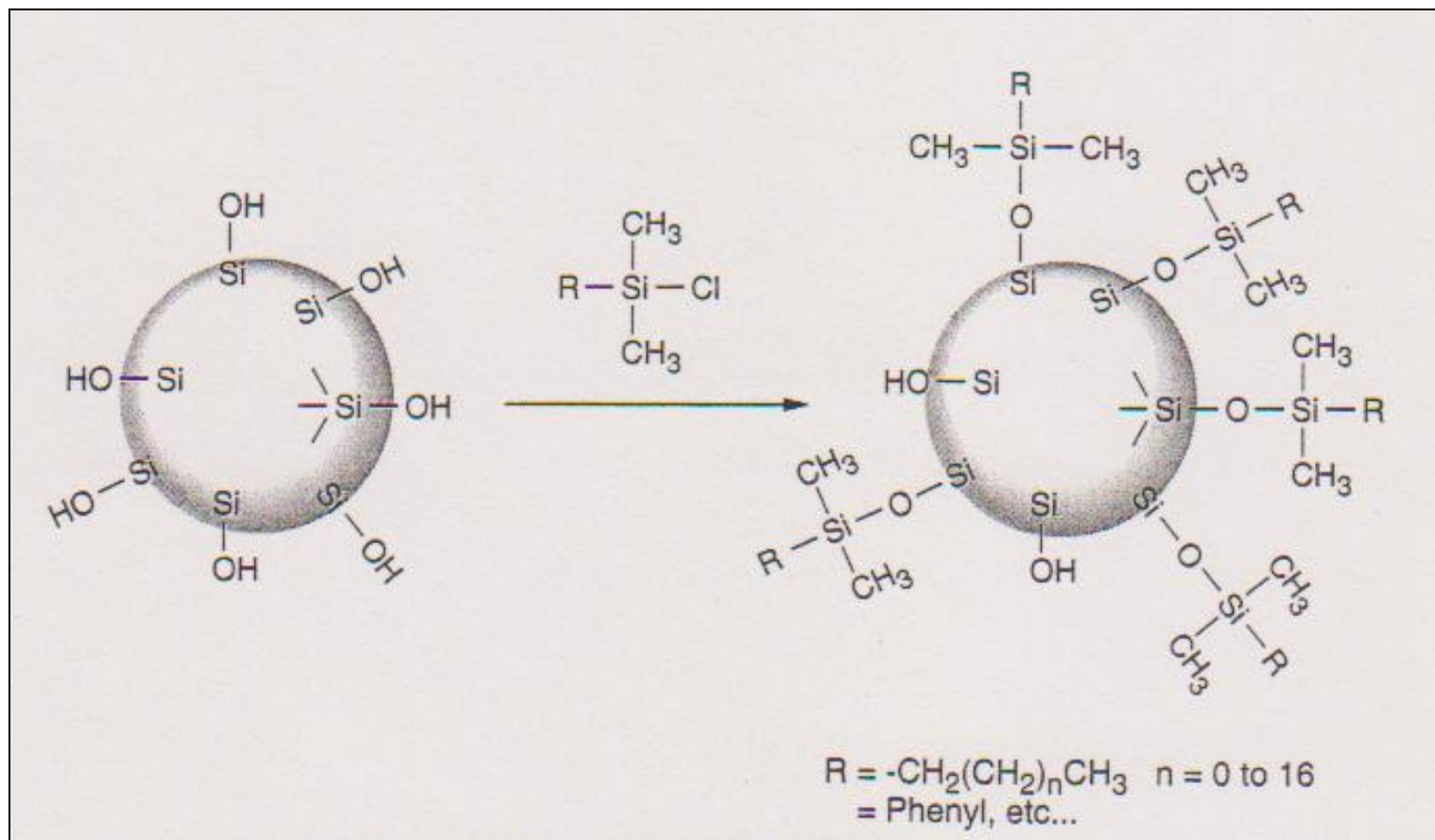
Неполярных растворителях (гексан, дихлорметан, хлороформ): элюции неполярные соединения. Полярные растворители, такие как MeOH, EtOH EtAc. Обрати особое внимание Использование MeOH / вода в качестве элюента может растворить часть кремнезема.

Силикагель может быть химически модифицированы таким образом, чтобы изменить и Его хроматографическое и физические свойства. Силанольные группы могут быть заблокированы, чтобы произвести неполярных (обратная фаза) или полярные (связаны нормальная фаза).

Лечение силикагеля с хлор диметилловых алкильных силанов передает полярную стационарную фазу на неполярную поверхность. Любые оставшиеся OH-группы не заблокированные придадут нормальной фазе природу с адсорбентом. Полная блокировка OH-групп в диоксиде кремния может быть достигнуто путем второй реакции с хлор триметил силана.

В обращенной фазой диоксида кремния длина алкильной цепи от C-2, C-4, C-6, C-8 и C-18. Наиболее распространенными из них являются C-18 и C-8. Также алкил длина может быть фенил.

Подготовка облигационного силикагеля



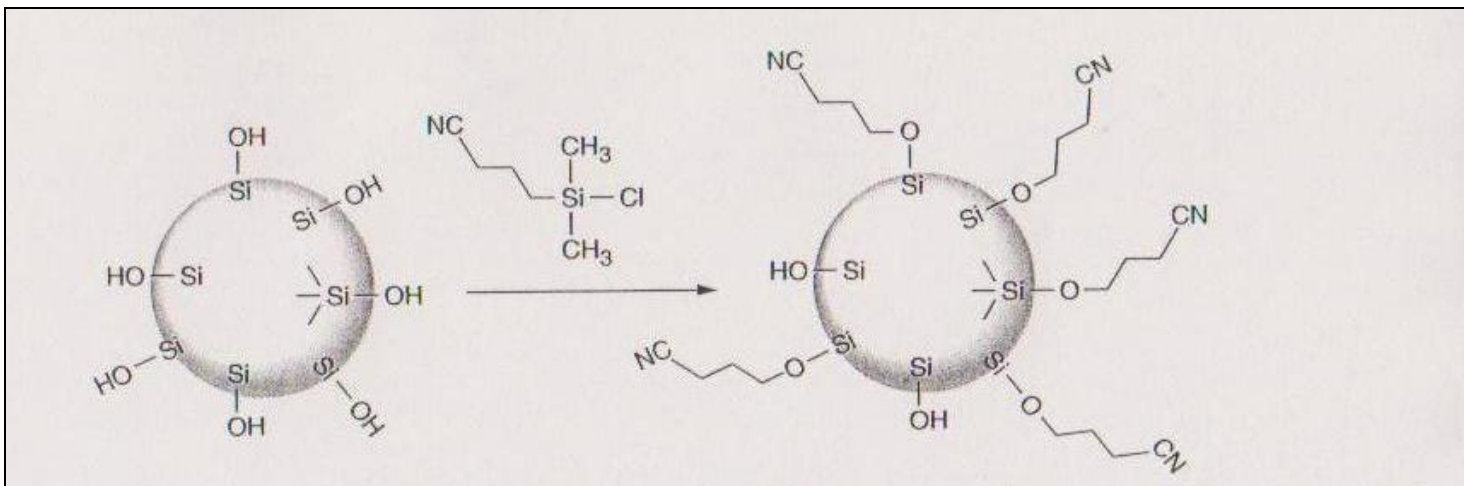
Облигационная форма силикагеля

Нормальная облигационная фаза: Получен способом, аналогичным способу производства с обращенной фазой. Краткая цепь функционализированные силаны прикреплены к силикагелю матрицы.

Широко используются на основе амино, диол-, циано-и нормальной фаз.

Преимущество: больше стабильности, чтобы полярных растворителях. Используется для разделения более полярных соединений.

Недостаток: Дорогой



Полиакриламид

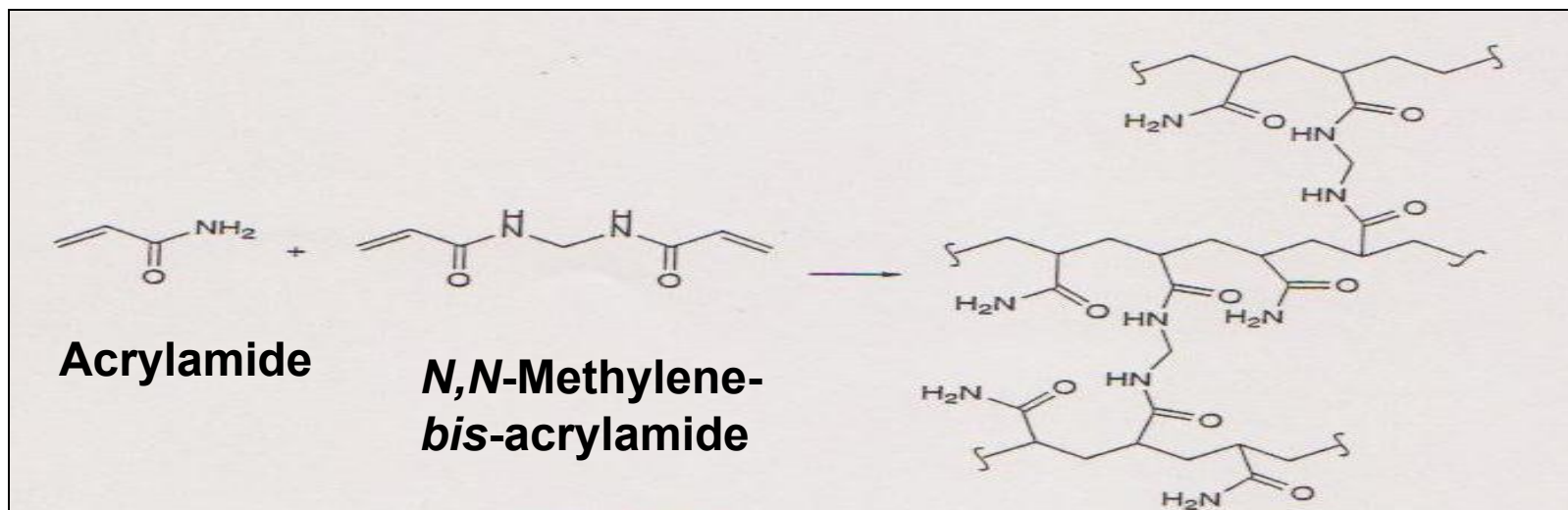
Синтетические полимеры в сферических шариков. Размеры частиц: 45-180 мкм.

Гель на основе для гель-хроматографии на колонке.

Они инертны, свободны, и устойчивы к бактериальному воздействию.

Подходит для хроматографии углеводов, пептидов, дубильные вещества.

Они являются гидрофильными, набухают в воде. Вода, используемая в качестве подвижной фазы. Механизм разделения: Водородная связь.



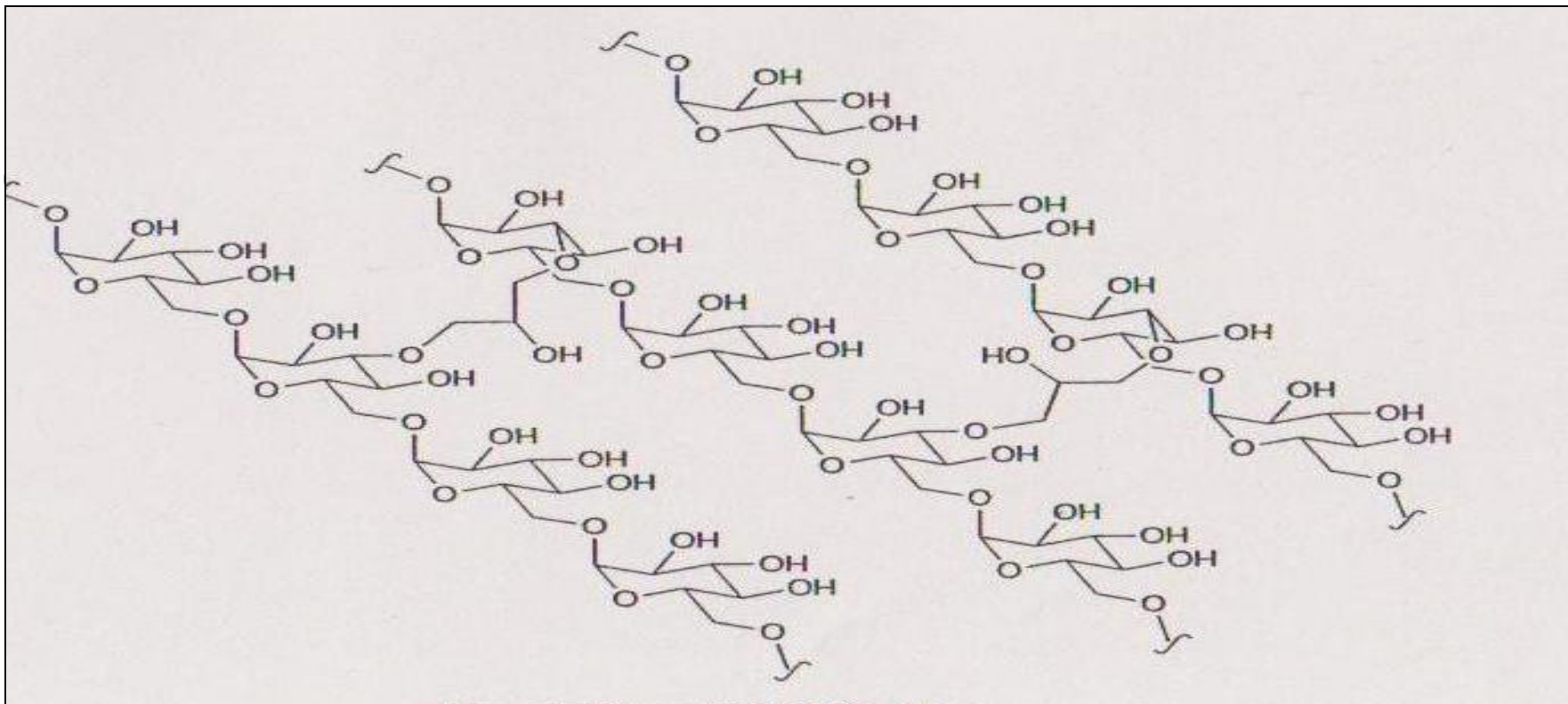
Углеводы

Инертные полимеры углеводов, образовавшиеся в бисер. Подходят для углеводов, малых пептидов. Они являются полисахаридами, для получения трехмерных сетей.

Sephadex: сшитый декстран с epichlorohydrin. Полимер имеет глицерин-эфирные связи в качестве связывающего агента. Набухает в воде. Степень набухания имеет большое влияние на хроматографических свойств геля. Чем плотнее гель, больше подходит для хроматографии низкомолекулярных соединений.

Серия **Sephadex G:** число представляет собой количество воды подобрали сухими бисером. **Sephadex G-15:** поднимает до 1,5 мл / г сухих шариков. **Sephadex G-100:** поднимает до 10 мл / г сухих шариков.

Sephadex LH-20: гидроксипропилированное Sephadex G-25, предназначенных для органических растворимых соединений. Оксипропильными группами увеличить отношение углерода к гидроксила так Полученный гель имеет как гидрофильные, так и липофильные свойства. Он набухает в воде, полярных органических растворителей, и водном растворителе.



Подходит для соединений с MW менее 4000 единиц массы.
При использовании смеси растворителей, более полные растворители будут рассмотрены предпочтительно для геля. Это приводит к двухфазной системе с неподвижной и подвижной фазами. Сейчас это распределительная хроматография.
Недостаток: Подвержен воздействию микроорганизмами.

Полистерин

Стиролдивинилбензолные полимеры, используемые в ионообменной хроматографии. В отсутствие ионизирующих групп, используемых для обращенно-фазовой хроматографии.

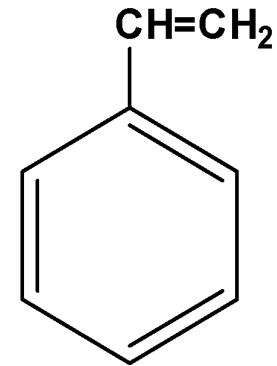
Термически и химически стабильные.

Используются в широком диапазоне pH.

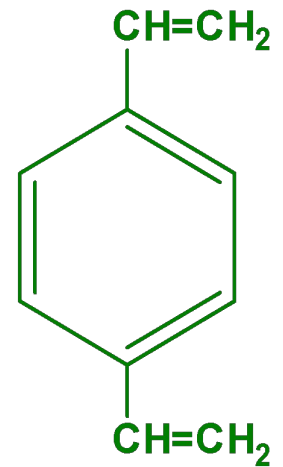
Количество сшивки прямо пропорциональна емкости смолы и селективности.

Dowex (Dow), получают взаимодействием стирола с дивинилбензолом (DVB). Количество полимеризации разработан процент DVB используется.

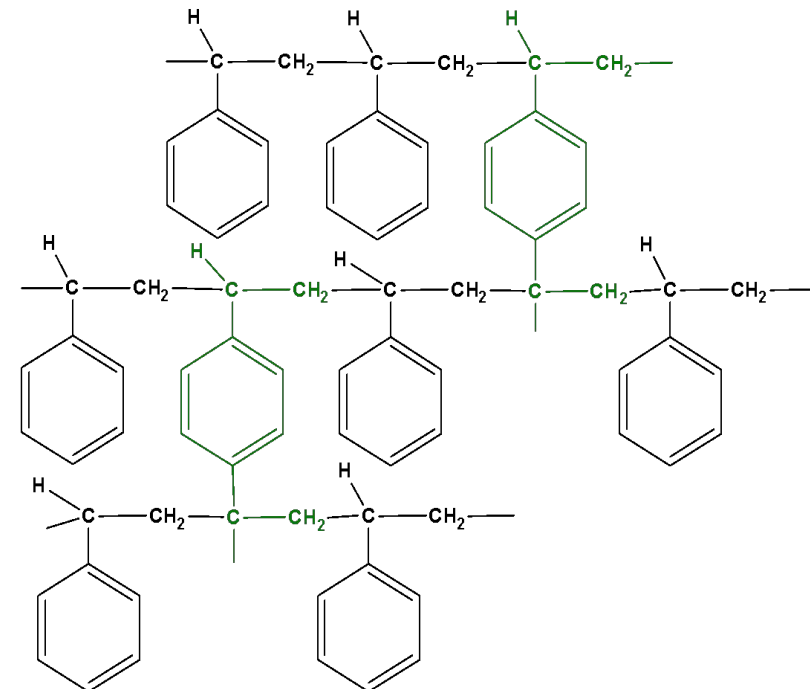
Дауэкс X-8 (содержит 8%) является наиболее распространенным.



Styrene



DVB



Глинозем

Это пористый полимер из оксида алюминия.

Есть три вида: кислые, основные и нейтральные, зависит от pH последней промывки.

Водную суспензию кислой глинозема имеет pH около 4,0, полезный для разделения кислых соединений (COOH),

Базовая глинозем (pH около 10), полезны для разделения основных соединений, таких как алкалоидов.

Обычный глинозем (pH около 7), полезен для разделения неполярных соединений.

Глинозем больше не является широко используется адсорбентом из-за его способности катализировать множество реакций

Факторы, контролирующие успешное хроматографическое разделение

Выбор неподвижной фазы: зависит от химической природы растворенных веществ; вид стационарной фазы (твердое или жидкое); размер частиц: (обычная колонка или ВЭЖХ); размеры колонки (длина и ширина); упаковка колонны (Wet или сухой способ).

Выбор подвижной фазы: контролируемый вид стационарной фазы: Полярным, или не полярным растворителем, нейтральным или заряженным растворителем;

Органические или водные растворители (нормальная фаза или обращенной фазой);

Изократическое элюирования или градиент элюирования.

Природа растворенных веществ (смесей): химическая природа растворенных веществ (алкалоиды, липиды, флавоноиды);

Растворимость: гидрофобность / гидрофильности;

Размер: высокий или низкий МВт, МВт ниже 1000 му или выше, или в миллионах;

Физические символы: кислые (COOH), BASIC (амины), нейтральные; твердые вещества, жидкости, газообразное; летучие или энергонезависимой; зарядки

Column Chromatography

