



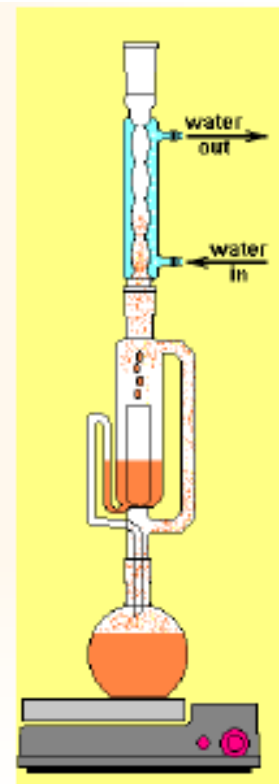
Интегрисане академске студије фармације
Инструменталне методе - Б14

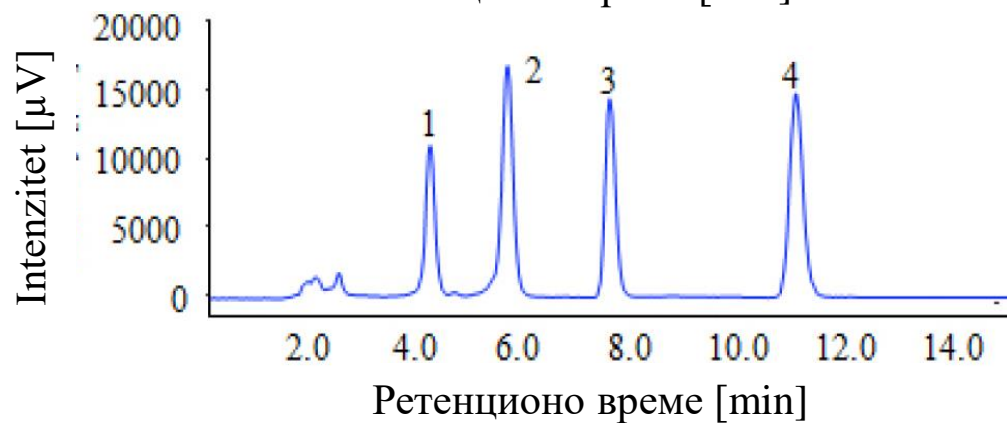
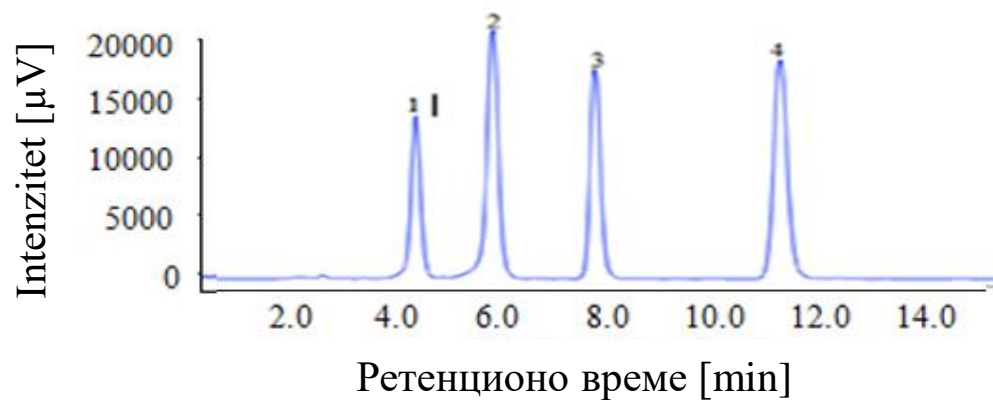
П5. Анализа секундарних метаболита.

Проф. др Недељко Манојловић

Изоловање секундарних метаболита

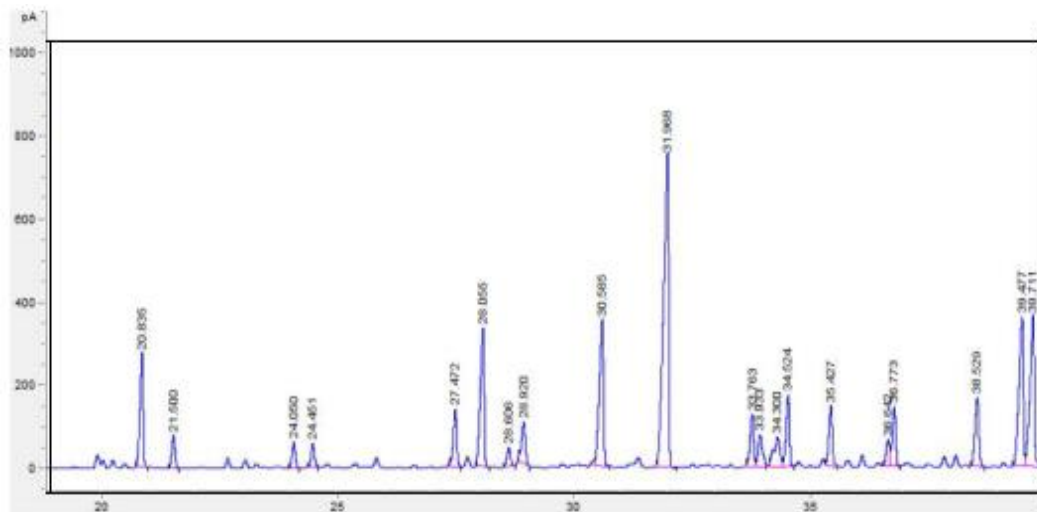
- Припрема биљног материјала за екстракцију
- Екстракција неким растварачима
- Упаравање екстракта (уклањање растварача)
- Сушење екстракта
- Анализа екстракта (најчешће хроматографски, TLC, HPLC)
- Раздвајање компонената смеше (најчешће хроматографски)
- Идентификација добијених компоненти (хроматографским и спектроскопским методама)





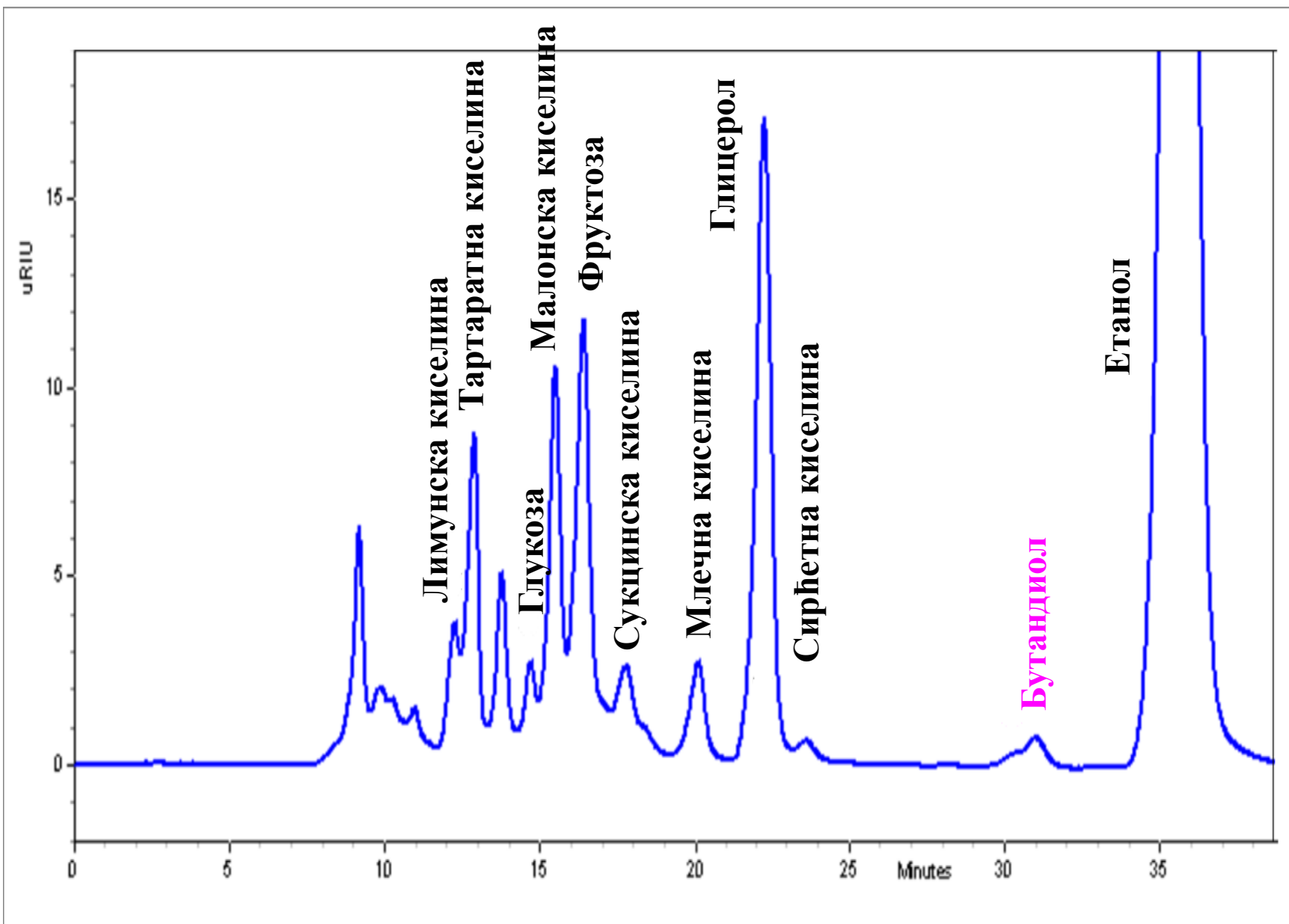
Хроматограм смеше афлатоксина (горе-стандарди) и смеше афлатоксина у храни (доле) добијен HPLC анализом

- На слици је приказан HPLC хроматограм сока дуње. Анализом испитиваног узорка добија се хроматограм као на слици. Идентификацијом пикова и поређењем са стандардима може се потврдити присуство етил-(2E,4Z)-декадиеноата на 30,585 мин и (E,E)- α -фарнесена на 31,968 мин.



HPLC хроматограм сока дуње

- HPLC анализа се може користити за идентификацију конституената вина. На слици је приказан HPLC хроматограм главних компонената у типичном црвеном вину.
- Хроматографски услови (концентрација елуента, брзина протока, температура) су оптимизовани тако да се постиже добро раздвајање компонента.



HPLC хроматограм црвеног вина

Услови снимања HPLC хроматограма црвеног вина

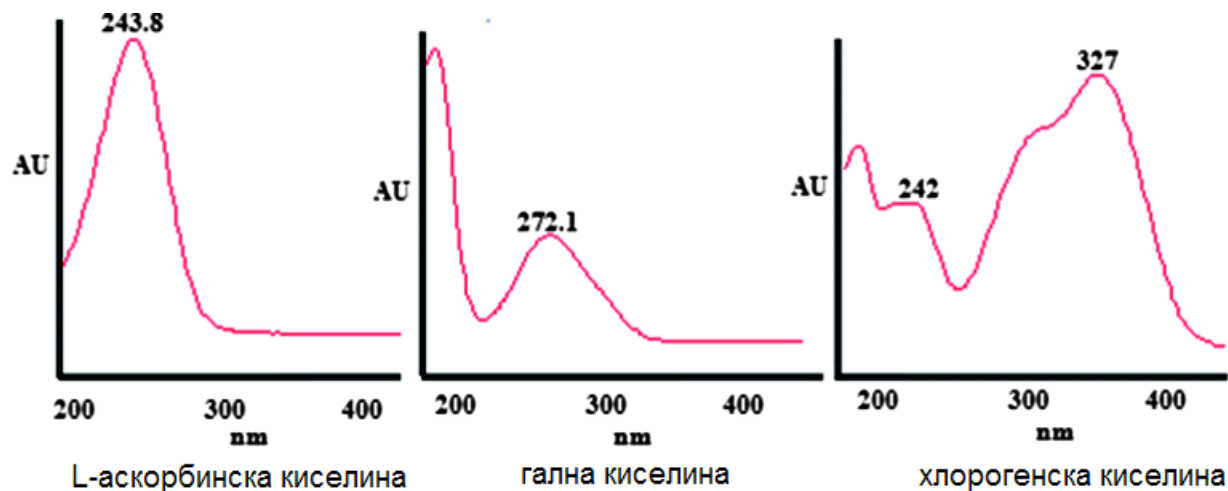
Колона	Eurokat H, 300 x 8 mm
Елуент	0,00125 М сумпорна киселина
Брзина протока	0,6 ml/min
Запремина узорка	20 µl
Температура колоне	95 °C
Притисак у систему	Приближно 37 bar
Детекција	Индекс рефракције
Време трајања	40 min

АНАЛИЗИРАНЕ КОМПОНЕНТЕ ЦРВЕНОГ ВИНА

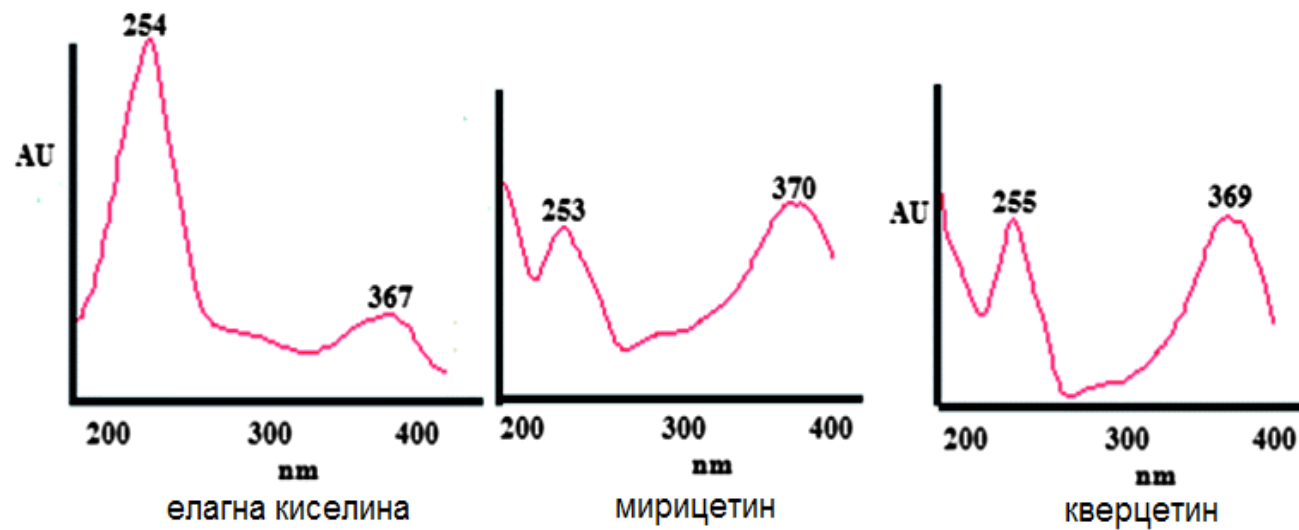
Супстанца	t_r (min)	Површина пика	Концентрација [g/l]
Лимунска киселина	12,283	98127	1,28
Тартаратна (винска) киселина	12,900	236473	428
Глукоза	14,714	73412	1,07
Малонска киселина	15,500	305124	3,55
Фруктоза	16,417	425668	5,73
Сукцинска киселина	17,800	140279	2,07
Млечна киселина	20,100	104133	1,64
Глицерол	22,283	614282	79,40
Сирћетна киселина	23,600	23710	0,65
Бутандиол	30,345	-	-
Етанол	35,650	4159017	111,59

За квантитативну анализу већине компонената црвеног вина коришћен је опсег калибрације од 0,2 g/l до 10,0 g/l. За глицерол и етанол коришћена је серија стандардних раствора концентрација од 2 g/l до 160 g/l.

- На следећим сликама приказани су карактеристични спектри неких природних производа, честих конституената лековитог биља, који су нашли своју примену како у фармацеутској тако и у прехранбеној индустрији.
- Приказани су спектри L-аскорбинске киселине, галне киселине, хлорогенске киселине, елагне киселине, мирицетина и кверцетина.

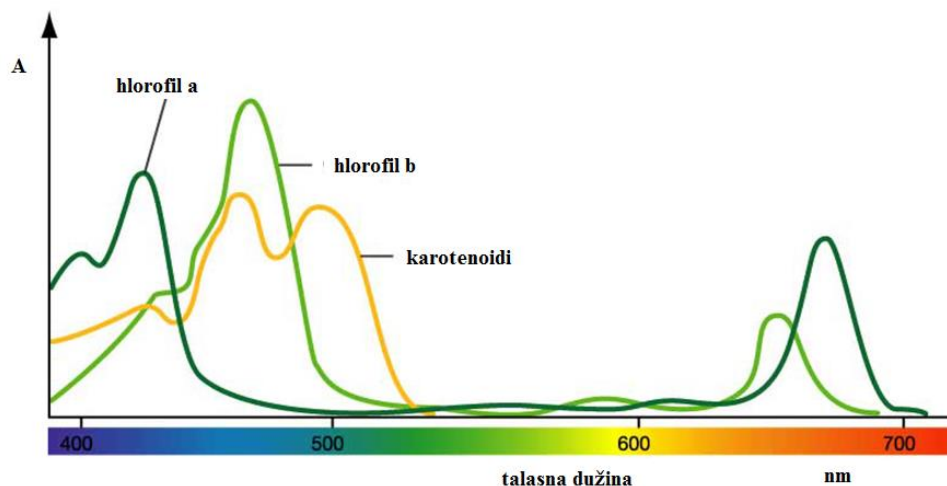
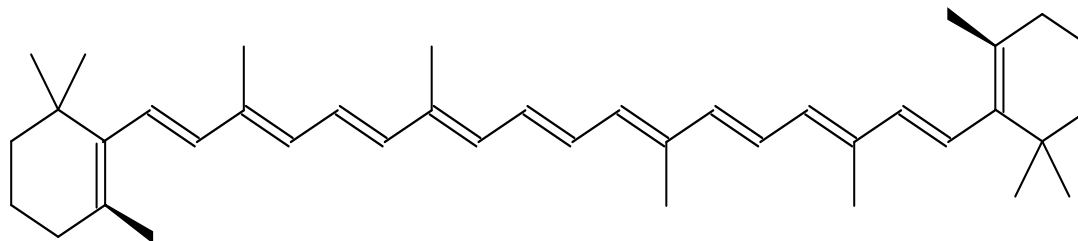


UV спектри L-аскорбинске киселине, галне киселине и хлорогенске киселине



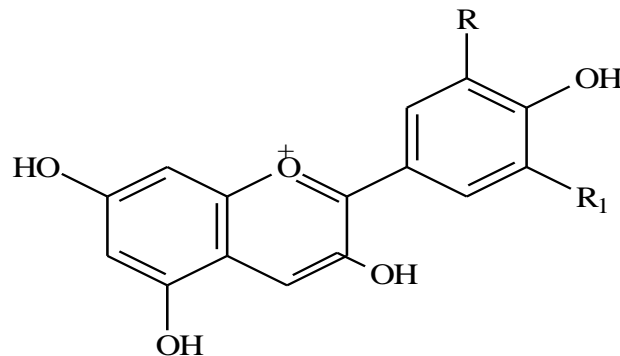
UV спектри елагне киселине, мирицетина и кверцетина

- Коњугација код *бета*-каротена потиче од једанаест коњугованих двоструких веза, што му даје наранџасту боју (боја шаргарепе). Овај каротеноид се користи као средство за бојење намирница.



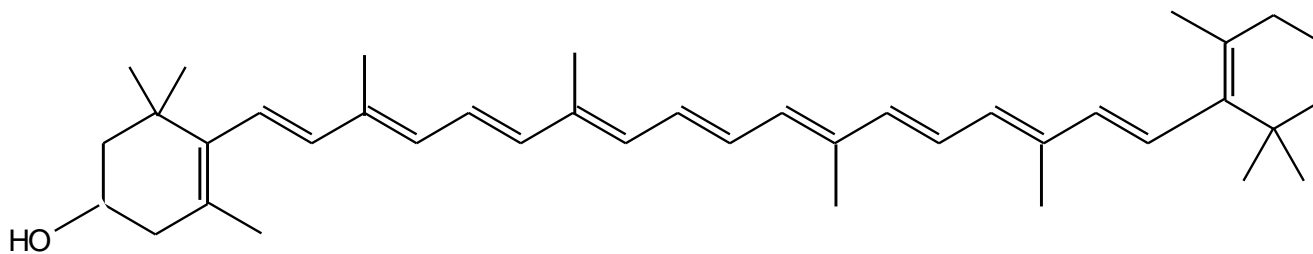
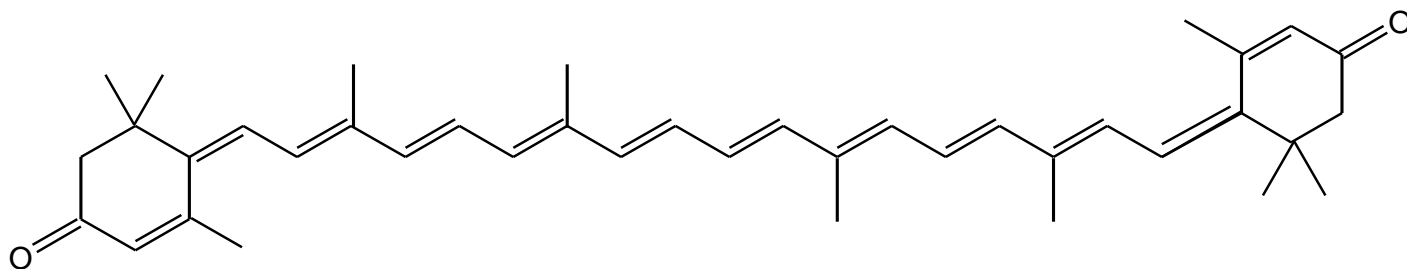
UV/VIS спектри неких пигмената

- Антоцијани, присутни у вину, трешњи, купини, боровници и другом обојеном воћу, садрже коњуговане двоструке везе које померају максимуме апсорпције у видљиви део спектра, тачније у црвену боју.



антоцијани

- Родоксантин је каротеноид чија је боја црвена, а апсорпциони максимум у UV/VIS спектру се налази на знатно вишим вредностима од већине каротеноида.
- Други приказани оранж каротеноид је криптоксантин који је нађен слободан и естерификован у кукурузу, махунама и паприци, а главни је пигмент мандарине.



КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА (ОДРЕЂИВАЊЕ)

- Волуметријско-титриметријски;
- Гравиметријски;
- Колориметријски;
- високо ефикасном течном хроматографијом (HPLC)
- друге технике, које не захтевају претходну изолацију метаболита и омогућавају израчунавање процента сваког појединачног метаболита.

ВОЛУМЕТРИЈСКО (ТИТРИМЕТРИЈСКО) ОДРЕЂИВАЊЕ

- Примењује се код оних дрога које садрже један алкалоид или више хемијски сродних и по молекулској маси блиских алкалоида, који имају довољно изражене базне особине, да са киселинама могу да граде соли.
- Алкалоиди се **титрирају раствором киселине познатог моларитета**, а резултат изражава преко једног од њих. Садржај може да се одреди и поступком ретитрације.

Примери волуметријског одређивања алкалоида у дрогама:

- Волуметријско одређивање алкалоида у *Belladonnae folium* (Ph. Jug. IV)
- Волуметријско-титриметријско одређивање алкалоида поступком ретитрације, према Ph. Jug. V
- Дрога: *Belladonnae folium (radix)*, (лист велебиља)
- *Stramonii folium* (лист и семе татуле),
- *Hyoscyami folium* (лист бунике)



Hyoscyami folium

ГРАВИМЕТРИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ

Примењује се код оних дрога које садрже алкалоиде различите по хемијској структури и молекулској маси (*Veratri radix et rhizoma* – ризом и корен чемерике), као и код оних чији алкалоиди немају довољно изражена базна својства (*Theae folium* и друге пуринске дроге).

Veratri radix (Ph. Jug. II) Примери гравиметријског одређивања алкалоида у дрогама:

ч
е
м
е
р
и
к
а



Л
И
С
Т

чаја

- Гравиметријско одређивање пуринских деривата у *Theae folium* (Ph. Jug. II)

КОЛОРИМЕТРИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ

- Примењује се код оних дрога чији алкалоиди са одговарајућим реагенсима дају стабилне обојене **комплексе**. Тако се алкалоиди ражене главнице одређују колориметријски, на основу **Ван-Уркове реакције** (деривати лизергичне киселине се са *пара*-диметиламинобензалдехидом боје плаво).
- Пример:
- **Колориметријско одређивање алкалоида у *Secale cornutum* (Ph. Jug. II) (склероцијум ражене главнице)**



раж



- **ВИСОКОЕФИКАСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА (HPLC)**
- не захтева претходну изолацију алкалоида и омогућавају израчунавање процента сваког појединачног алкалоида.
- **Одређивање морфина и кодеина у сировом опијуму, *Opium crudum*,**
- мобилна фаза: 1.0 г натријумхептансулфонат монохидрата раствори се у 420 мл воде, подеси рН на 3.2 помоћу фосфорне киселине (4.9 г/л H_3PO_4) (око 5 мл) и дода 180 мл ацетонитрила,
- детекција се врши на 280 nm

- Процентуални садржај сваког алкалоида израчунава се према изразу:

$$\frac{m_1 \times A_2 \times 625}{m_2 \times A_1 \times 5} \times \frac{100}{100 - h}$$



- m_1 = маса алкалоида у грамима употребљена за израду раствора за поређење
- m_2 = маса анализиране дроге у грамима употребљена за израду раствора за испитивање
- A_1 = површина пика одговарајућег алкалоида у хроматограму раствора за поређење
- A_2 = површина пика одговарајућег алкалоида у хроматограму раствора за испитивање
- h = губитак сушењем (проценат)
- 1 мг морфин-хидрохлорида одговара 0.759 мг морфина; 1 мг кодеина одговара 0.943 мг
- кодеина.
- Амонијум-хлорид-пуфер раствор рН 9.5: 33.5 г амонијум-хлорида раствори се у 150 мл воде,
- дода 42.0 мл концентрованог амонијака и разблажи водом до 250.0 мл.