



Интегрисане академске студије фармације
Инструменталне методе- Б14

**П8. Комбиноване хроматографско-
спектроскопске методе.**

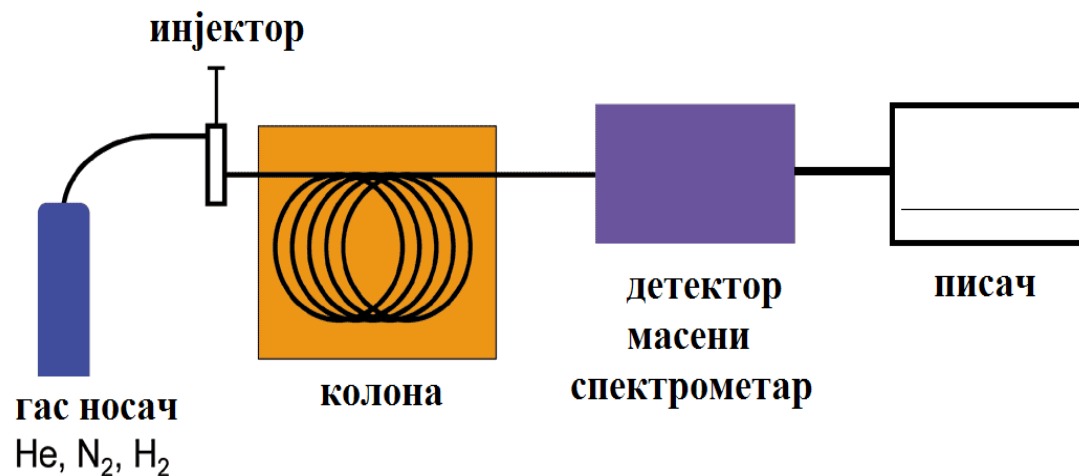
Проф. др Недељко Манојловић

Комбиноване хроматографско-спектроскопске методе

Класификација комбинованих метода

- гасна хроматографија-масена спектрометрија (GH-MS),
- гасна хроматографија-инфрацрвена спектроскопија (GH-IR),
- течна хроматографија високих перформанси – UV спектроскопија (HPLC- UV)
- течна хроматографија високих перформанси-масена спектрометрија (HPLC-MS)
- течна хроматографија високих перформанси-нуклеарно магнетно резонантна спектроскопија (HPLC-NMR)
- гасна хроматографија- масена спектрометрија- нуклеарно магнетно резонантна спектроскопија- инфрацрвена спектроскопија (GC-MS-NMR-IR) и друге.

- **Гасна хроматографија/масена спектрометрија (GH/MS)**
- улога гасне хроматографије је раздвајање, а улога масене спектрометрије је идентификација компоненти смесе.

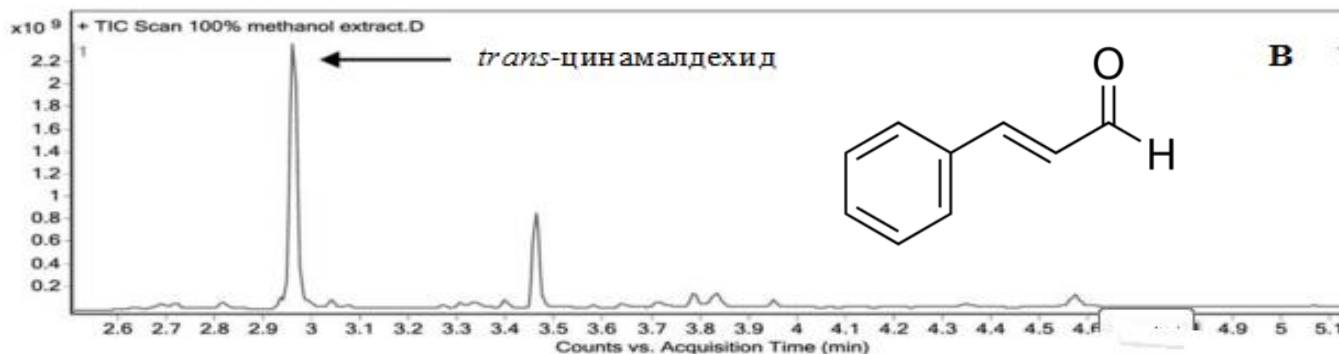
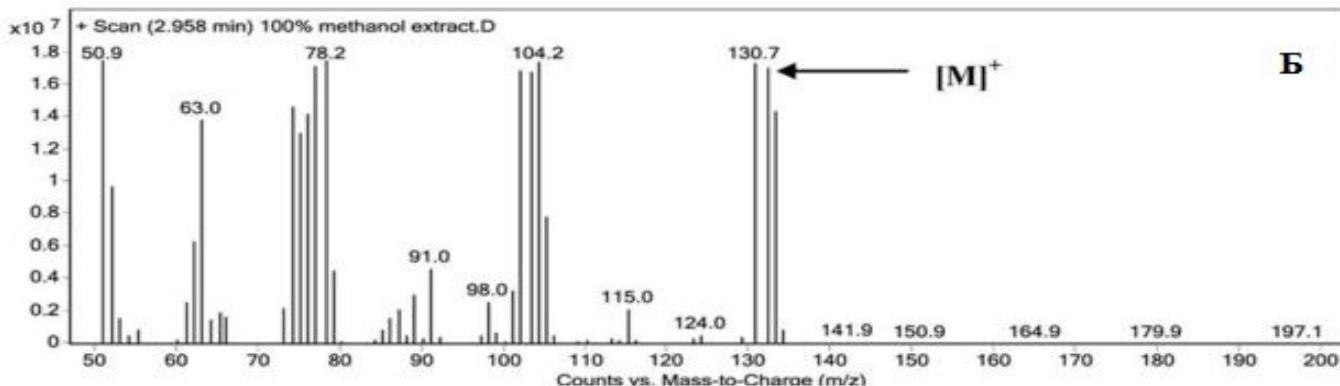
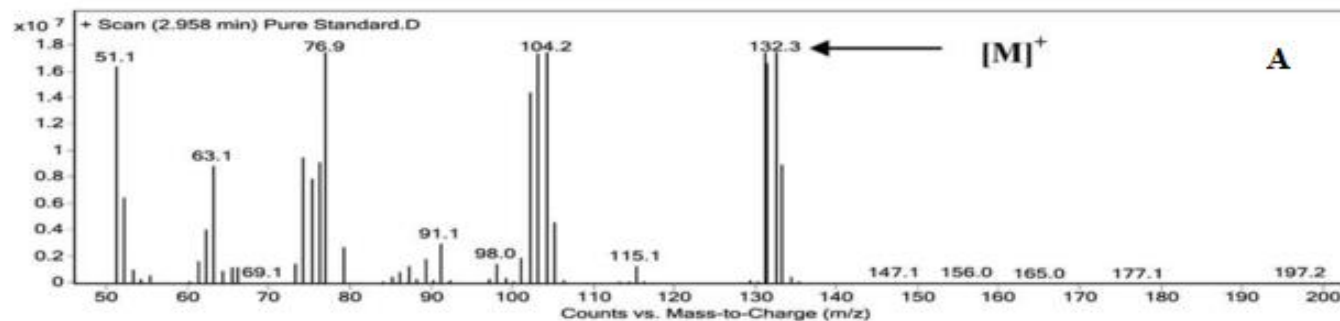


Упрошћена схема GH/MS систем

- **Лековитост цимета** (*Cinnamomum zeylanicum*) потиче од сложеног хемијског састава његовог етарског уља. Етарско уље чини 0,5-2,5%. Осим уља, ова биљка садржи и танине, кумарине и слузи. *Циметалдехид*, *trans*-*циметна киселина*, *еугенол* и *лимонен* су најзаступљенији конститенти етарског уља. Клиничке студије су показале да цимет утиче на снижавање нивоа шећера у крви, триглицерида, укупног холестерола, HDL и LDL холестерола.



GH/MS



GC-MS хроматограм коре гранчица биљне врсте *Cinnamomum burmannii*. (А) масени спектар стандарда *trans*-циметалдехида (Б) масени спектар добијен из GC-MS снимања и (В) гасни хроматограм етарског уља.

Гасна хроматографија/FT инфрацрвена спектроскопија (GH/FT IC)

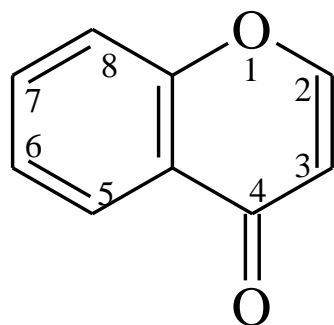
- Елуат са колоне пролази кроз IC ћелију у облику цеви (*engl. Light Pipe*) са прозорима од алкалних халогенида (који су пропустљиви за IC зрачење), која је део FT IC инструмената са такозваним Michelson-овим интерферометром, на овај начин се добијају IC спектри свих елуираних једињења чија је концентрација изнад границе осетљивости.
- Гасни хроматограм може да се детектује стандардним GH детектором, а постоји и могућност да се снимљени интерферограми искористе за GH детекцију, превођењем у IC спектре (Fourier-овом трансформацијом) и представљањем промене укупне апсорбације (у изабраном спектралном опсегу) у зависности од времена и редног броја интерферограма.

Течна хроматографија -масена спектрометрија (HPLC-MS)

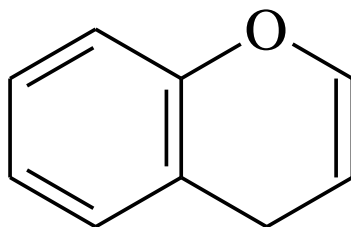
- Флавоноиди су врло важна група секундарних метаболита који су присутни у лековитом биљу и воћу (бреза, зова, липа, лимин, наранџа итд.).
- У великој количини их садрже цитрус врсте.
- **Кверцетин** је флавоноид присутан у биљном свету за који је потврђено да поседује добру антиоксидантну активност и који служи као референтно једињење за одређивање антиоксидантне активности екстраката и других једињења.

ФЛАВОНОИДИ

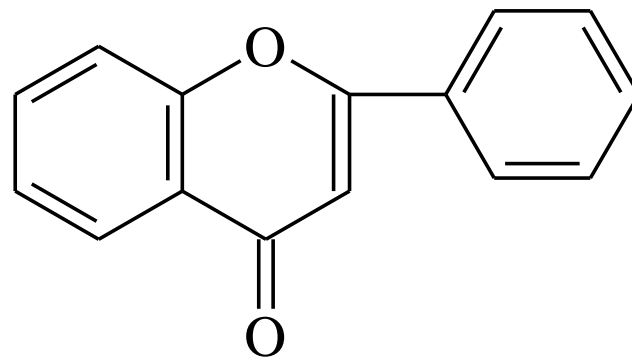
- Безбојни или жути, слободно или гликозидно везани пигменти (*flavus* = жут) локализовани у лишћу и цветовима биљака.
- Деривати **хромона** (бензо-γ- пирона) и **хромана** (бензо-γ-пирана), где је основни скелет флавоноидни систем $C_6-C_3-C_6$.



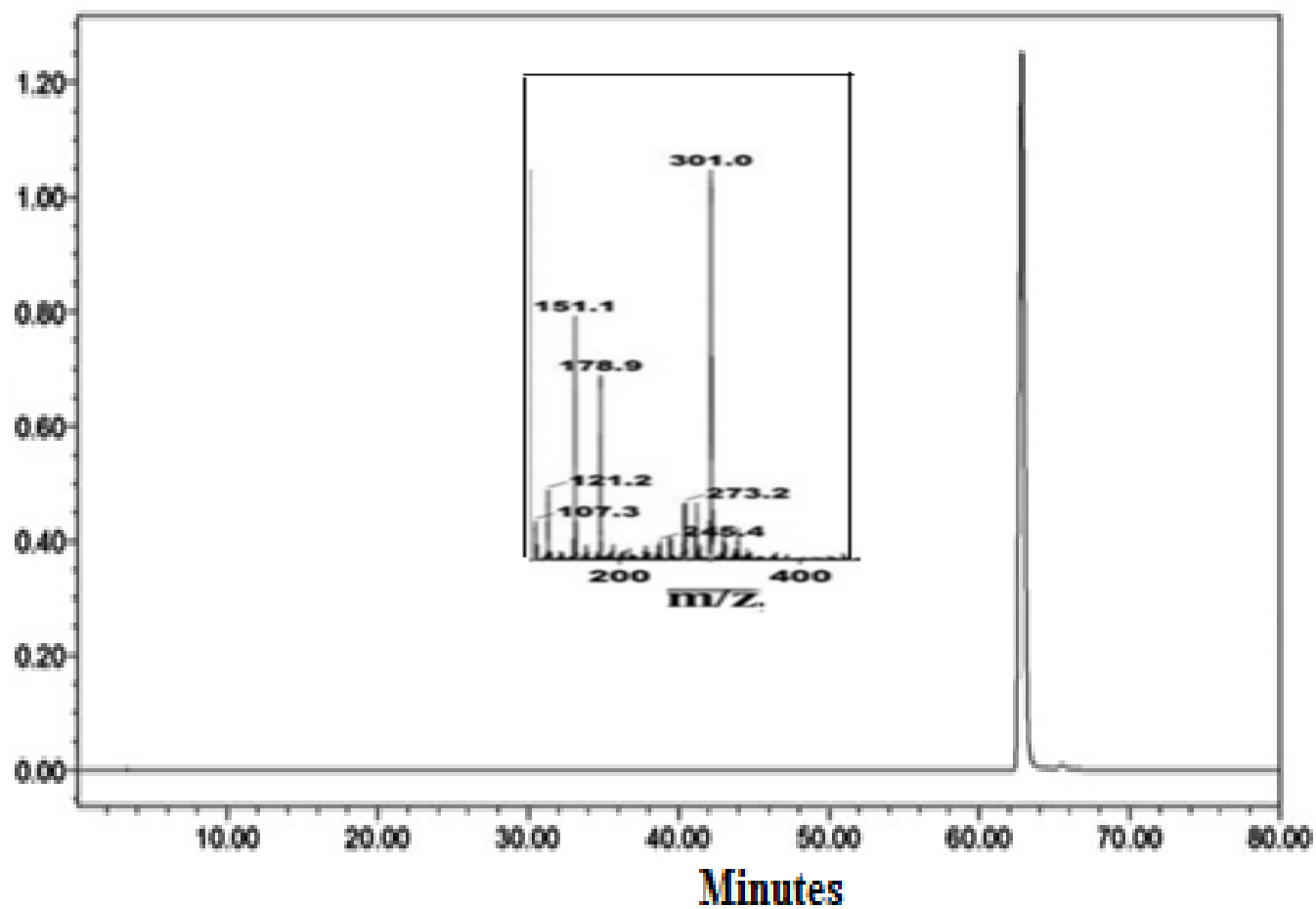
хромон
(бензо-γ-пирона)



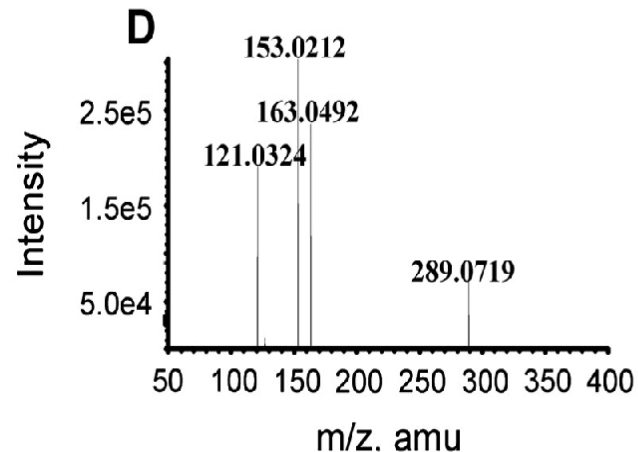
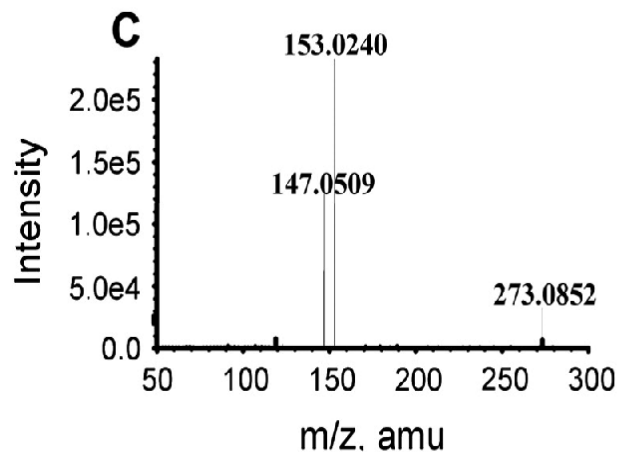
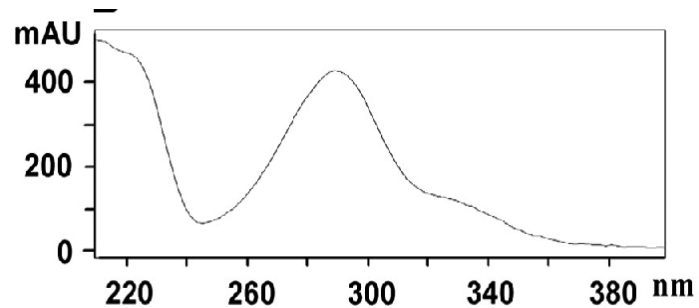
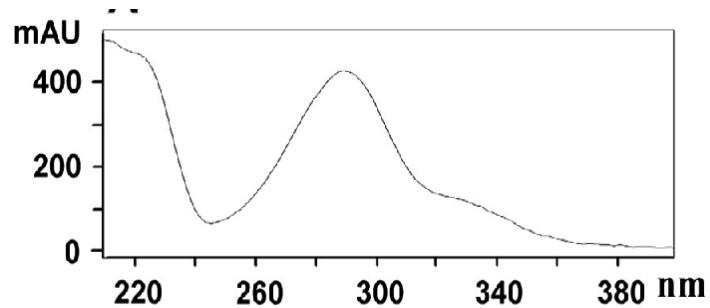
хроман
(бензо-γ-пиран)



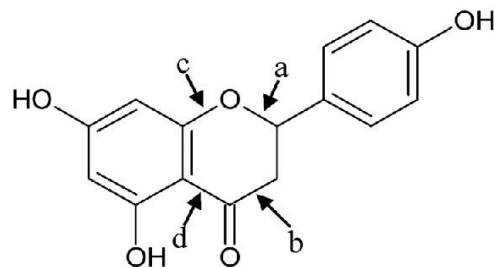
флавон
(2-фенил-хромон)



Гасни хроматограм и масени спектар кверцетина

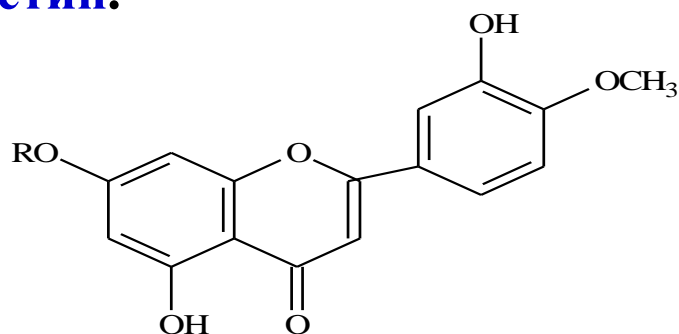


UV и MS спектри једињења раздвојених као HPLC пикови

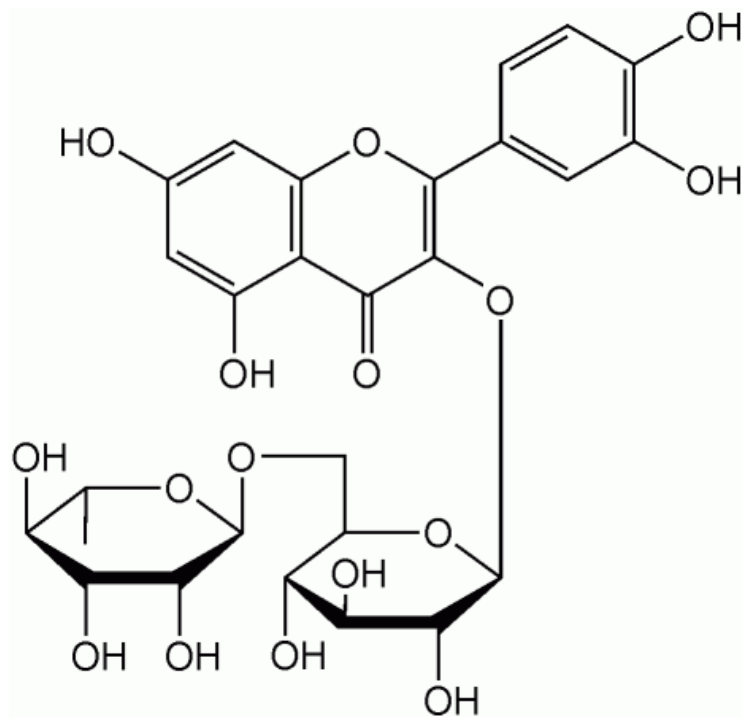


Структура нарингенина са означеним местима где се врши фрагментација молекула

- **Хесперетин** (агликон хесперидина) изолован из разних *Citrus* врста (лимун, поморанџа, грејпфрут и др.).
 - У биљкама се **хесперидин** налази у облику гликозида хесперетина, чијом се хидролизом киселинама као шећерна компонента добијају **глукоза и рамноза**.
 - Поред позитивног утицаја на капиларе, хесперидин као пратилац витамина Ц повећава његову активност. Такође делује као антиоксиданс за масти.
- Важан конституент *Citrus* врста је такође и **рутин** чијом се хидролизом добија агликон **кверцетин**.



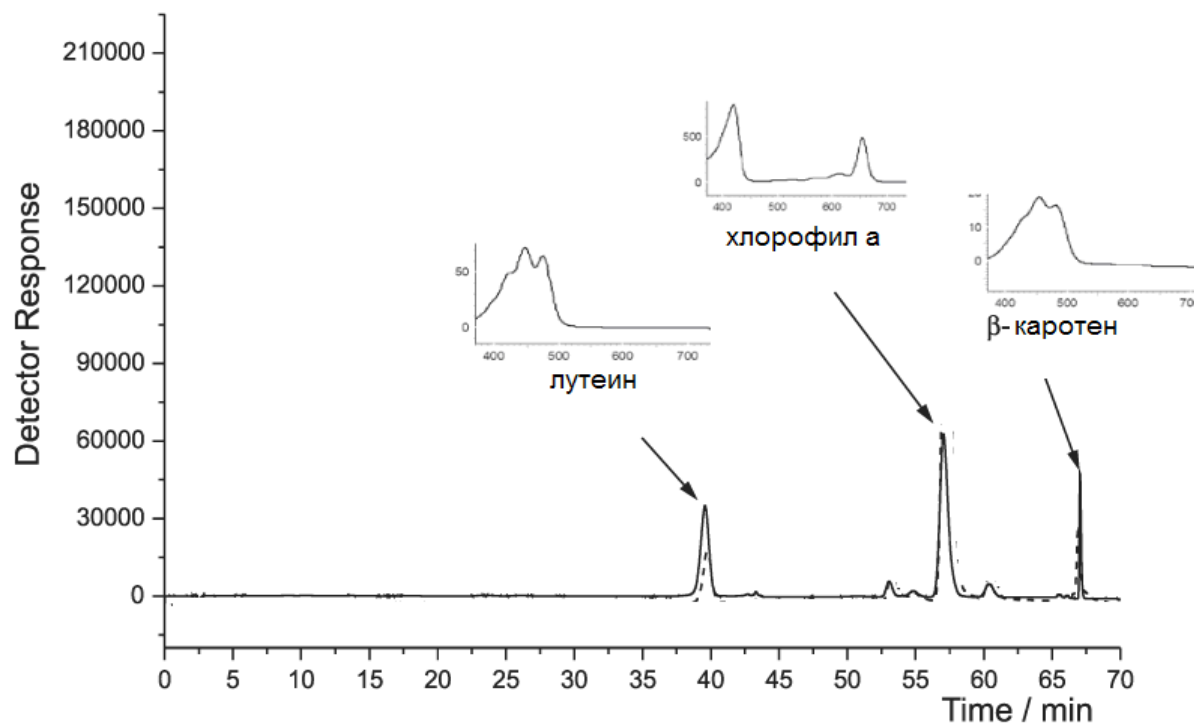
R = H
хесперетин
R = рутиноза
хесперидин



Рутин

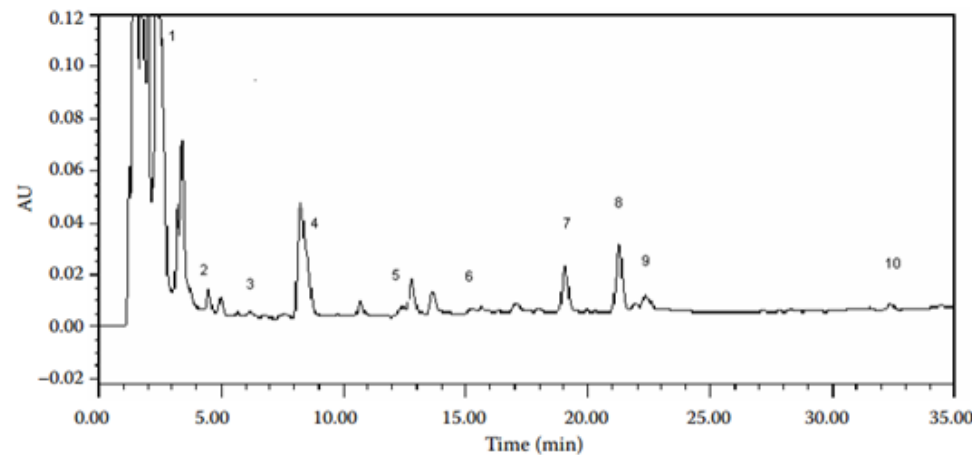
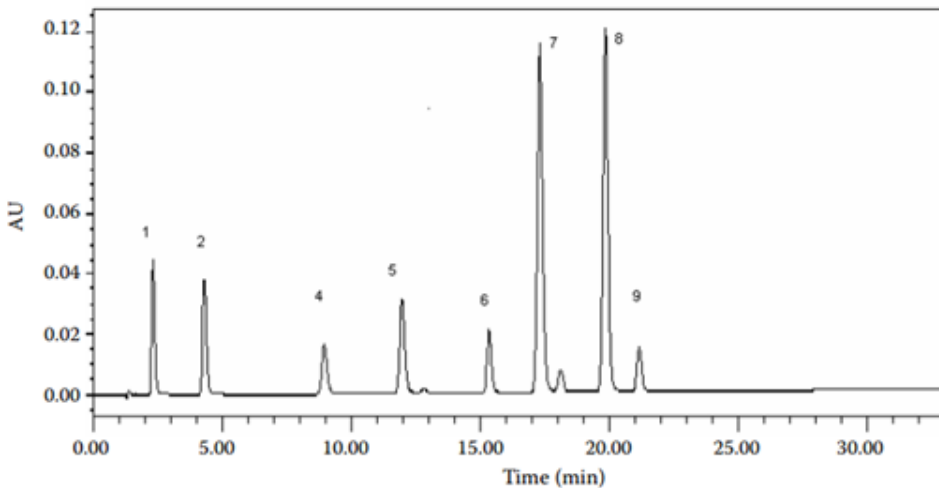
HPLC-UV анализа

- приказан HPLC хроматограм и UV спектри смеше стандарда лутеолина, хлорофила и бета-каротена, који се могу користити за идентификацију ових једињења у различитим узорцима (снимљеним под истим условима).



HPLC хроматограм и UV спектри смеше стандарда лутеолина, хлорофила и бета-каротена

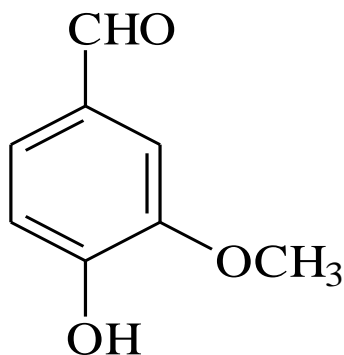
- ова метода може користити за анализу фенолних једињења и антиоксиданата у пиву.
- Идентификација је урађена на основу хроматограма смеше стандарда и компарацијом ретенционих времена са ретенционим временима компоненти узорка, као и на основи њихових UV спектра.



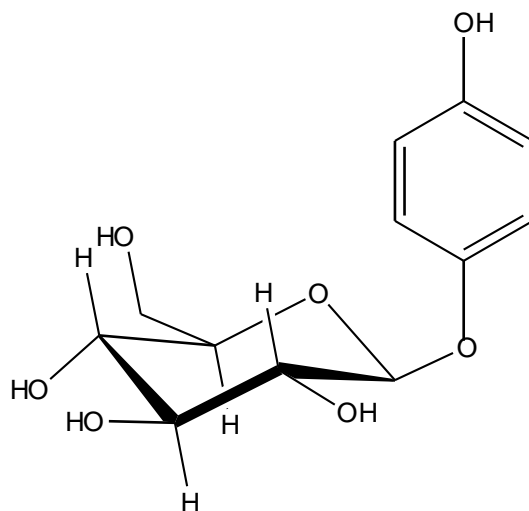
HPLC хроматограм узорка пива. 1-гална киселине; 2-пирокатехинска киселине; гентисинска киселина; 4-катехин; 5-кафена киселина; 6-епикатехол, 7-р-кумаринска киселина; 8-ферулна киселина; 9-салицилна киселина; 10-кверцетин.

Резултати одређивања укупног полифенолних садржаја су показали да се ове вредности крећу од 70 до 242 mg/l садржај ферулне киселине био је од 2.48 до 5.04 mg/l, салицилне киселине од 1.98 до 4.38 mg/l и р-кумаринске киселине, од 1.72 до 2.55 mg/l.

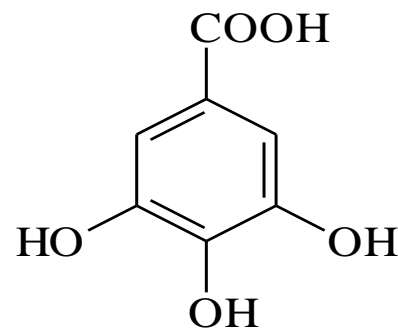
- **Природни феноли** садрже један ароматични прстен и једну или више фенолних група.
- Фенолна једињења се у биљкама налазе у облику гликозида (арбутин), естара или кондензованих производа.
- У листу планике, *Uvae ursi folium*, налазе се фенолни хетерозиди: арбутин (арбутозид) и метиларбутин (метиларбутозид). Арбутин се хидролизом разлаже на глукозу и хидрохинон, а метиларбутин на глукозу и метилхидрохинон. Ванилин је састојак ванилиног шећера и многих производа са укусом ваниле. Гална киселина је основна компонентна галотанина.



ванилин



арбутин



гална киселина

Фенолни хетерозиди и деривати циметне киселине се доказују бојеним реакцијама фенолне групе са Fe^{3+} , ванилином у H_2SO_4 , на основу UV спектра, TLC и HPLC.

Дроге које садрже фенолне хетерозиде су:

Uvae-ursi folium (лист планике, медвеђејег грозђа)

Salicis cortex (кора врбе)

Solidaginis herba (херба златице)

Cynarae flos (цваст и лист артичоке)

Квалитативна и
квантитативна анализа
екстракта биљака који
садрже фенолне метаболите

Којим методама се може
идентификовати арбутин из
коре врбе?

Којим методама се може
одредити количина
арбутина у кори врбе?



Врба



Кора врбе

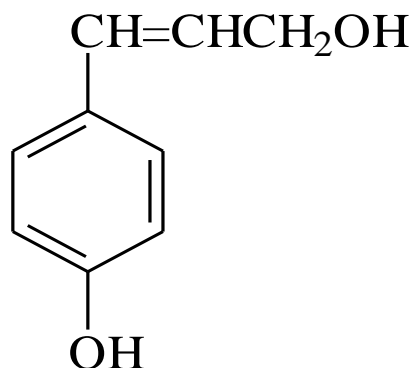


Златица

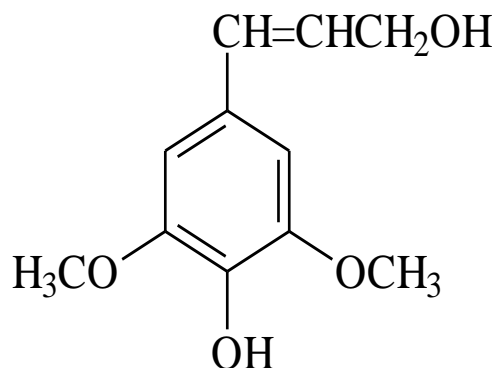


Артичока

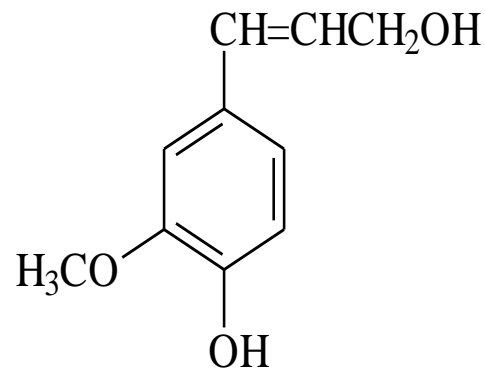
- **Фенилпропени** (C_6-C_3) су најчешће деривати циметне киселине. Најважнији представници фенилпропена су *n*-кумаринска киселина, кумарил-алкохол, синапил-алкохол, кониферил-алкохол, кофеинска киселина и ферулна киселина. Могу бити гликозидно везани или у облику естара, а такође се јављају као димери или полимери.



кумарилалкохол



синапилалкохол

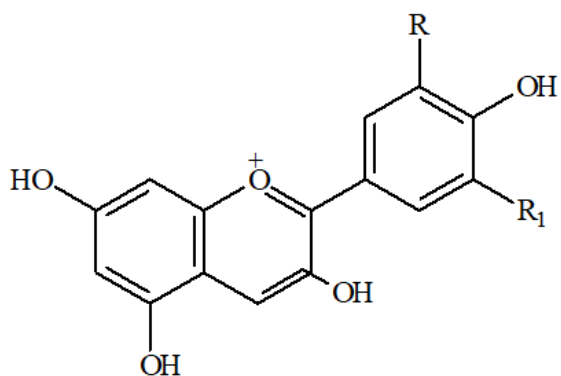


кониферилалкохол

Да ли се танкослојна хроматографија и HPLC анализа могу користити за разликовање ових деривата фенилпропена и како?

Да ли ће наведени фенилпропени имати исте R_f вредности и ретенциона времена у HPLC?

Ribes nigrum fructus – плод црне рибизле садржи деривате цијанидина и делфинидина. Користи се код поремећаја периферне циркулације. Одређивање антоцијана може се вршити спектрофотометријски (500-550 nm), из киселих алкохолних раствора или HPLC методом.



	R	R1
Пеларгонидин	H	H
Цијанидин	ОН	H
Делфинидин	ОН	ОН
Пеонидин	ОМе	ОМе
Петунидин	ОН	ОМе
Малвинидун	ОМе	ОМе



Остале комбиноване HPLC методе

- HPLC хроматографија се може истовремено комбиновати са неколико спектроскопских метода, као нпр. са UV спектроскопијом, NMR спектроскопијом и масеном спектрометријом дајући HPLC-UV-MS-NMR где се у колони врши раздвајање компонената у смеши, а спектрометри служе као детектори који дајући спектре компонената врше њихову комплетну анализу.
- Схема оваквог сложеног и скупог инструмента је приказана на слици.

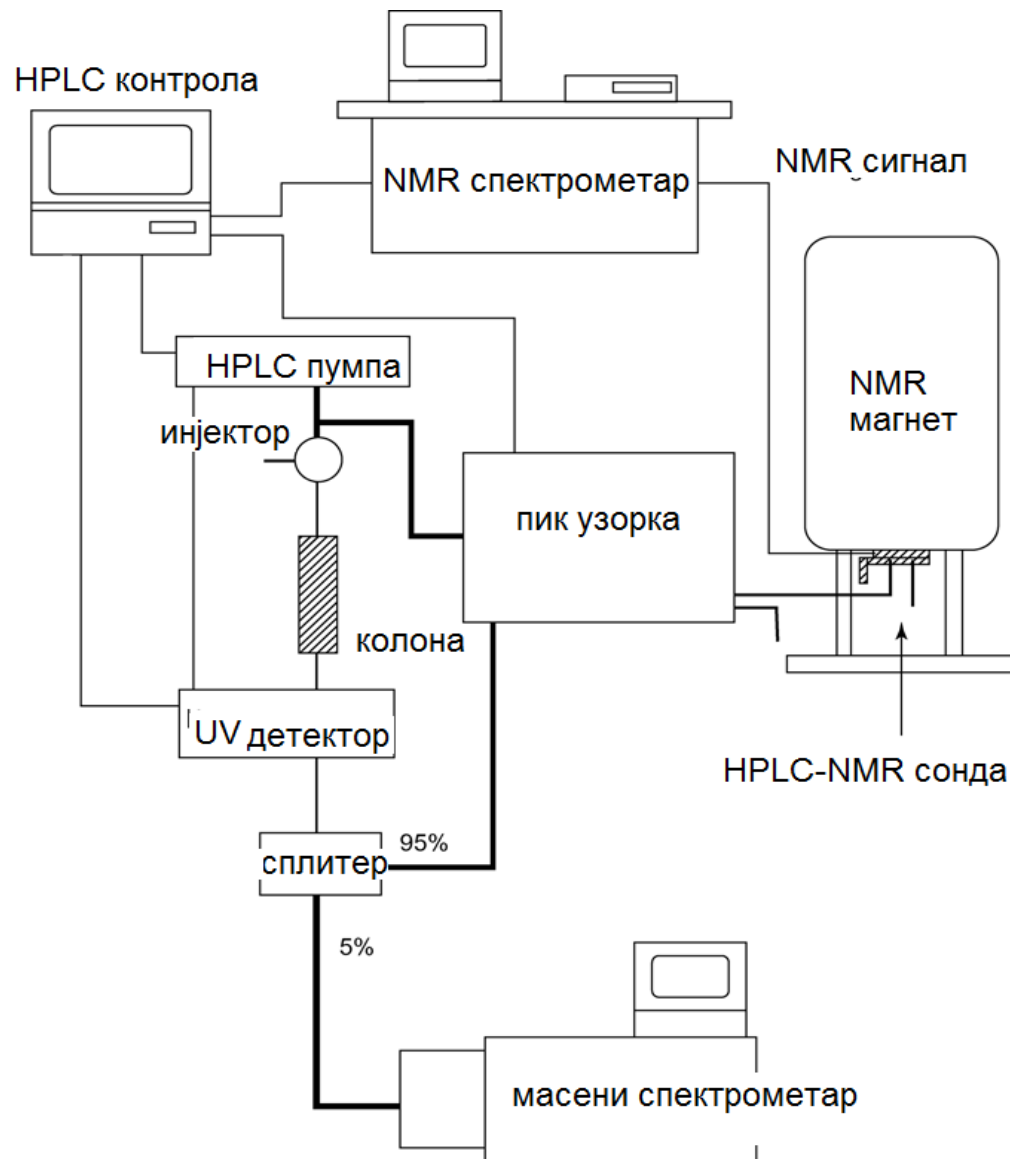
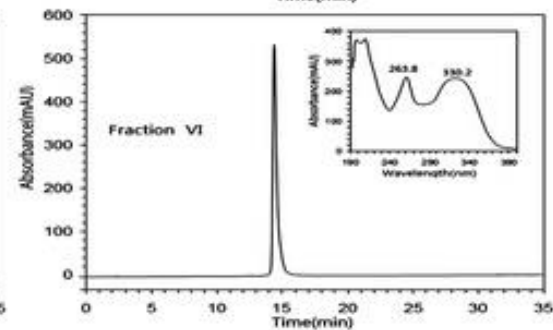
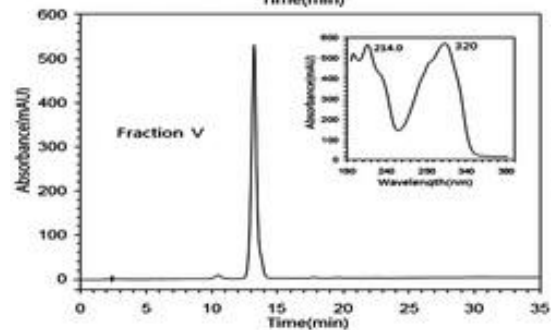
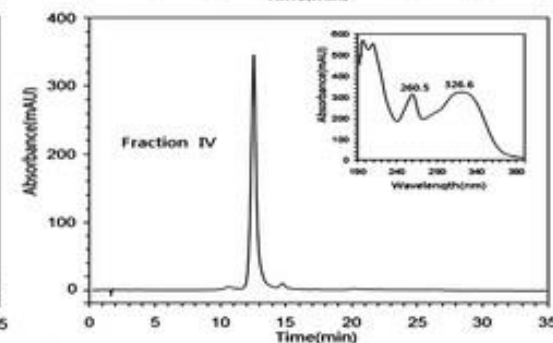
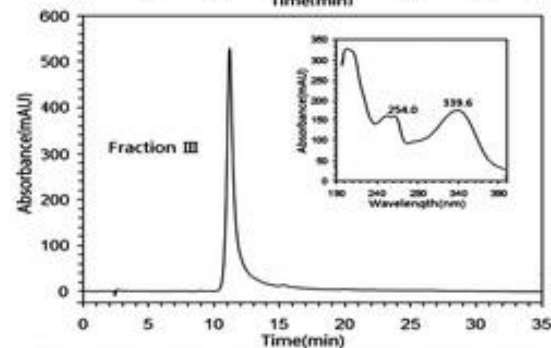
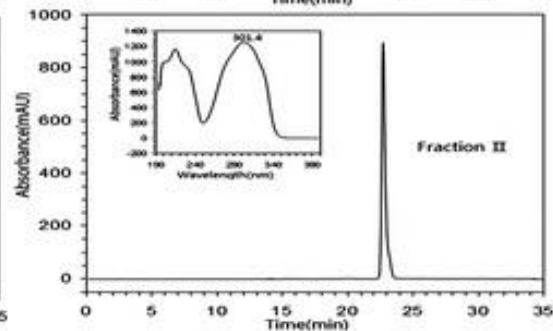
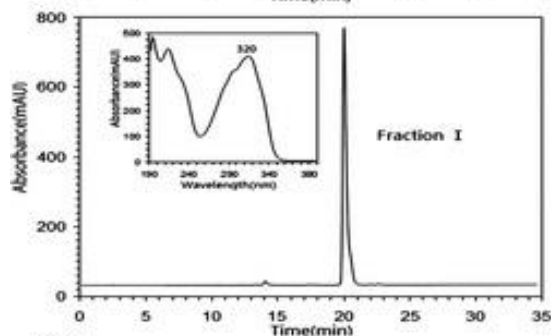
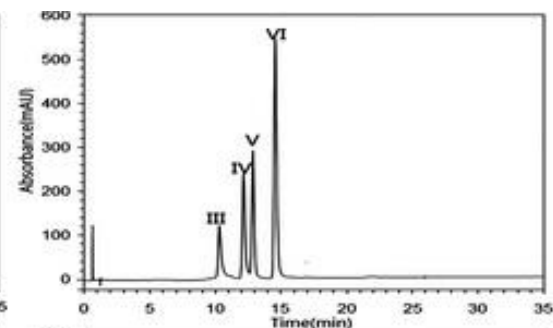
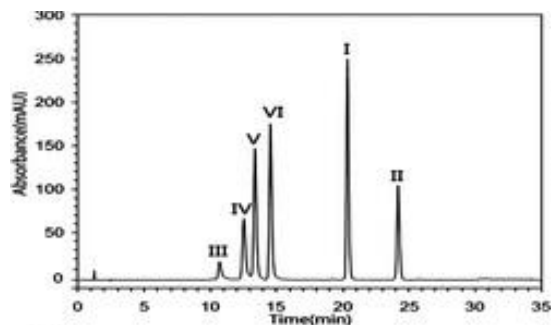


Схема HPLC-UV-MS-NMR инструмента

- брза течна хроматографија, тзв. *High-Speed Counter-Current Chromatography*
- анализа хемисјког састава биљне врсте *Trigonella foenum graecum* L., биљке која је код нас познаа под називом пискавица.
- Пискавица је једна од најстаријих лековитих биљака. У Египту се стављало истуцано семење на опекотине, а стари Кинези и Индијци на скрофулозне ране. Старогрчка медицина и Хипократови ученици открили су делотворност пискавице код бронхијалне упале, јер поспешује чишћење од слузи. Идентификовано је 6 једињења помоћу хроматограма и ултраљубичастих спектра. Ова метода служи за препаративно одвајање једињења, при чему су на овај начин пречишћена једињења из групе флавоноида и полихидроксистилбена.

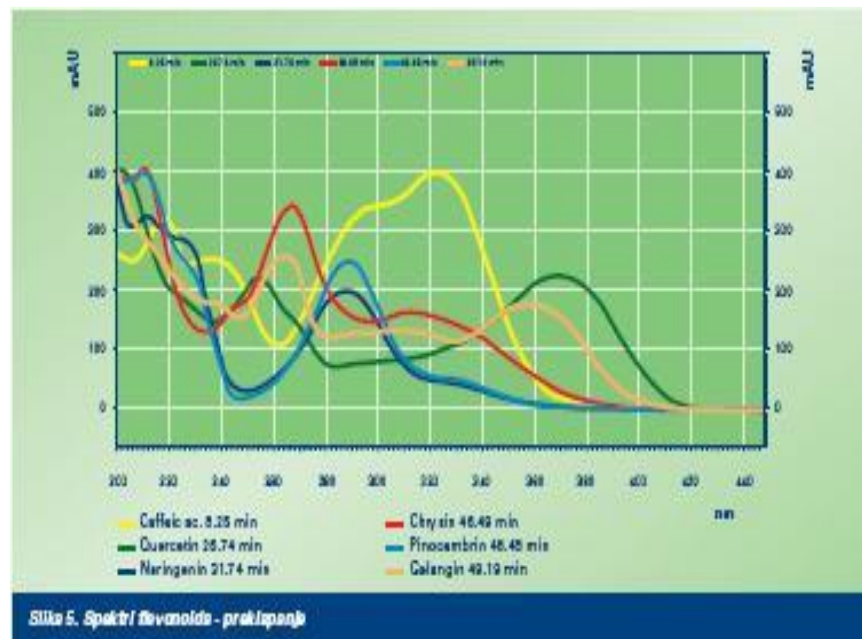
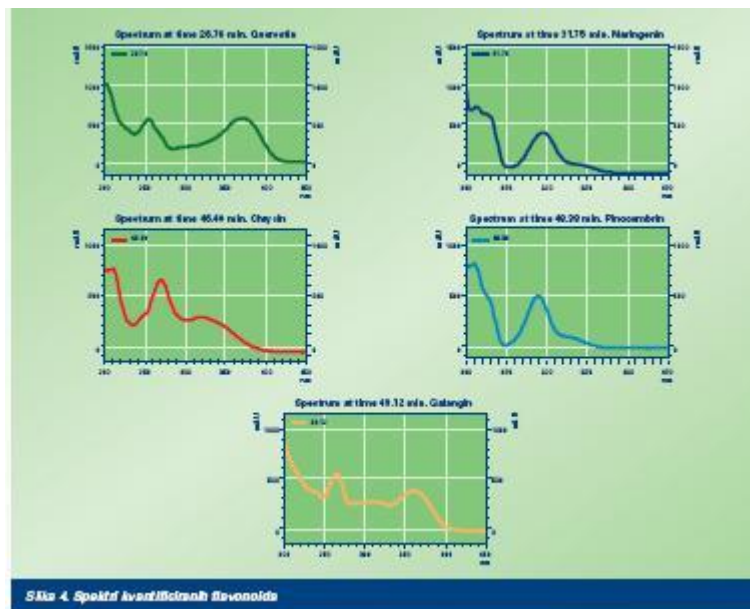
HPLC хроматограм
Trigonella foenum graecum
 L. И HSCCC фракција.
 HPLC за узорак 1 (a) и
 узорак 2 (b).



(a)

(b)

UV-VIS спектри кверцетина, нарингенина, хризина, пиноцебрина, галангина добијени снимањем **HPLC- UV** методом



Ова HPLC метода поуздана је за квантитативно мерење флавоноидних компоненти прополиса, а применом карактеристичног UV-спектра могу се додатно потврдити поједине компоненте.