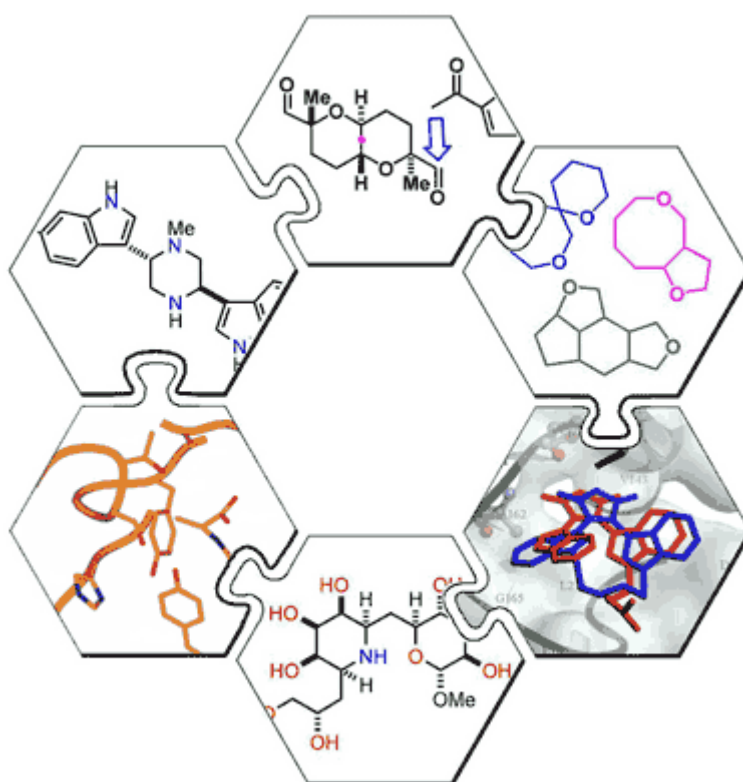


Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје
Фармацевтски факултет – Скопје
Институт по Фармакогнозија

Проф. д-р Светлана Кулеванова
Доц. д-р Ѓоше Стефков
Асистент м-р Марија Карапанцова
м-р Ивана Цветковиќ

ЕКСТРАКЦИЈА И ИЗОЛАЦИЈА НА ПРИРОДНИ СОСТОЈКИ

Студиската програма - лабораториски биоинженери



Скопје, 2012

Содржина

Вовед	4
1. Екстракција	7
1.1. Екстрактивни средства	7
1.2. Екстрактивни постапки	10
1.2.1. Мацерација	11
1.2.2. Перколација	16
1.2.3. Фракционирање и пречистување на екстрактите	24
1.2.4. Водени екстракти	25
2. Изолација	26
2.1. Постапки за изолација и пречистување	26
3. Вежби	34
Вежба 1: Екстракција и изолација на јаглехидратни соединенија	34
Вежба 2: Екстракција и изолација на арбутин	38
Вежба 3: Екстракција и изолација на хесперидин	42
Вежба 4: Оптимизација на екстрактивна постапка за екстракција на вкупни флавоноиди	44
Вежба 5: Екстракција и изолација на диосгенин	47

ЛИСТА НА СЛИКИ

Слика 1.1.	Екстракција со рефлукс	13
Слика 1.2.	Шематски приказ на течна екстракција под притисок	14
Слика 1.3.	Екстрактивна батерија	16
Слика 1.4.	Лабораториски садови за перколација	16
Слика 1.5.	Перколација во лабораториски услови	18
Слика 1.6.	Перколатори со голем капацитет за индустриска екстракција	19
Слика 1.7.	Soxhlet екстракција	20
Слика 1.8.	Клевенџер апаратура	21
Слика 1.9.	Систем за суперкритична екстракција (шематски приказ)	22
Слика 1.10.	Услови за создавање на суперкритичен флуид	22
Слика 1.11.	Систем за SPE екстракција	24
Слика 1.12.	Пакување со силиконски влакна за цврсто-фазна микро екстракција	25
Слика 2.1.	TLC хроматограм добиен после рачно нанесување на екстрактот (во точки)	28
Слика 2.2.	TLC хроматограм добиен после полуавтоматско нанесување (во линија) при HPTLC	29
Слика 2.3.	Едноставна колонска хроматографија	29
Слика 3.1.	Арбутин	38
Слика 3.2.	UV спектар на арбутин во метанол	40
Слика 3.3.	Емерсонова реакција за идентификација на фенолни соединенија (арбутин)	41
Слика 3.4.	Хесперидин	42
Слика 3.5.	UV-Vis спектар на хесперидин во метанолен раствор	43
Слика 3.6.	Диосгенин	47

Вовед

Природна состојка (природен производ, *анг.* natural product) е хемиска компонента или супстанца произведена од жив организам во природа, што вообичаено има определена фармаколошка или биолошка активност и се користи како во производство на медицински производи, така и во дизајнот и во откривање на нови лекови. Со оглед дека природните производи се карактеризираат со определена активност, се означуваат и како активни компоненти (активни принципи). Најголем дел на активни природни соединенија се компоненти од групата секундарни метаболити. Ако примарните метаболити (јаглехидрати, белковини и липиди) се значајни за обавување на животните функции на живите организми (раст, развој, функционирање и репродукција), за секундарните метаболити се уште во целост не се знае улогата во организмите, особено кај растенијата кои се најголеми производители на вакви соединенија. Извесно е дека секундарните метаболити не се неопходни за обавување на животните функции поради што и се нарекуваат секундарни, но исто така е познато дека имаат заштитна улога од негативните надворешни влијанија, овозможуваат подобро адаптирање во условите на живеење и во надворешната средина генерално, спречуваат оксидативни промени во организмот и вршат низа други функции кои го помагаат и олеснуваат животот на организмите (растенијата). Од друга страна, секундарните метаболити се од огромно значење поради тоа што поседуваат определена активност и можат да се користат како лекови или да служат како модел супстанци за синтеза на аналогни молекули со подобрени физичко-хемиски својства, подобра активност и помала токсичност. Одтука, екстракцијата и изолацијата на активните принципи од природен материјал се операции неопходни за извлекување на биолошки активните компоненти од природниот материјал за нивно понатамошно користење, а структурната идентификација на изолараните соединенија е неопходна поради спроведување на евентуална синтеза на синтетски реплики на природните соединенија (синтетски витамин С, синтетски морфин, синтетски кверцетин), за евентуални модификации на молекулите и создавање на полусинтетски производи (етопозид и тенипозид се полусинтетски супстанци добиени со хемиска интервенција во молекулот на подофилотоксин) или за ситеза на потполно нови аналози на природните молекули (синкумар е нова кумаринска супстанца добиена со потполна синтеза и во основа е структурно аналогна на природното соединение кумарин).

Во однос на хемиската градба, секундарните метаболити можат да имаат една од трите можни основни структури:

- фенолна,
- терпенска и
- алкалоидна.

Во рамките на секоја група соединенија можни се повеќе различни хемиски структури, поради што трите групи секундарни метаболити понатаму се класификуваат во подгрупи:

1. Феноли:

- прости феноли, фенолни киселини и фенолни гликозиди,
- кумарини и кумарински хетерозиди,
- лигнани, неолигнани, норлигнани и сл. соединенија,

- флавоноиди, каде спаѓаат правилни флавоноиди, флавани, антоцијани и др.,
- хинони, каде спаѓаат нафтохинонски и антрахинонски соединенија и
- танини, каде спаѓаат хидролизирачки и кондензирани танини.

2. Терпени

- едноставни моно и сесквитерпени и сесквитерпенски лактони,
- дитерпени,
- тритерпени и стероли и
- кардиотонични хетерозиди.

3. Алкалоиди, соединенија што најчесто се класификуваат врз база на нивното биосинтетско потекло на алкалоиди што настануваат како производи на метаболизмот на:

- орнитин и лизин,
- фенилаланин и тирозин,
- триптофан,
- хистидин,
- антранилна киселина,
- терпенски алкалоиди,
- стероидни алкалоиди и
- пурински алкалоиди (пурински бази).

Секоја подгрупа има своја понатамошна субкласификација, што укажува на големата дивергентност во можните структури на секундарни метаболити. Покрај наведените, иако јаглехидратите, белковините и липидите претставуваат примарни метаболити, некои од овие соединенија можат да бидат фармаколошко и биолошко активни и да претставуваат компоненти од интерес за екстракција и изолација. Такви се слузните материји (јаглехидрати од типот на сложени полисахариди), алгинската киселина (јаглехидрат на кафеави морски алги), агар-агар (јаглехидрат на црвени морски алги), вазопресин и окситоцин (полипептидни соединенија), различни растителни масла со фармаколошка активност како што се ричинусовото и лененовото масло, енотера масло, и други што во основа се липиди итн.

Покрај употребата во медицински цели и во производство, во дизајн и во развој на нови лекови, определени природни состојки имаат голема употреба и во козметичкото и во парфимериското производство, во прехранбената индустрија и во други комерцијални цели. Иако тие не претставуваат *природни производи* во смисла на горе наведената дефиниција, сепак претставуваат компоненти од интерес и нивната екстракција и изолација се одвива со исти методи и процедури.

Извори за добивање на природни производи

Природни извори за добивање на природни производи можат да бидат растенија, морски организми и микроорганизми, односно производи на нивната ферментација, животински организми и природни отрови и токсини (главно се добиваат од животинските организми).

Природните производи се извонредно голема група соединенија со многу различни хемиски структури, а хемискиот диверзитет во природата се базира на биолошкиот (организмите) и на географскиот (потеклото) диверзитет.

Растително царство. Растенијата од секогаш претставувале извор за добивање на различни активни соединенија (на пр. различни алкалоиди: морфин, кокаин, атропин, пилокарпин, ...). Голем број од овие соединенија денес се изолираат од растителните извори и се користат како лекови, додека другите супстанции имаат значење во полусинтетското производство на лековите. Растенијата продуцираат голем број различни и сложени структури, комплексни за лабораториска или индустриска синтеза, поради што е многу поедноставно и поефтино истите да се екстрахираат и изолираат од природните материјали.

Микроорганизми. Бактериите и габите се значајни продуценти на фармаколошко и биолошко активни соединенија. Главните производи на нивната ферментација се антимикробните агенси, почнувајќи од пеницилинот, па се до цефалоспорини, тетрациклини, аминоклиозиди, рифампицин и хлоранфеникол, извонредно значајни лекови од групата антибиотици. Некои микробни метаболити денес се користат и во други медицински цели, каков што е асперлицин, компонента изолирана од некои соеви на габата *Aspergillus*, што дејствува како антагонист на пептидниот хормон холецистокининвклучен во контролата на апетитот. Друг значаен метаболит е ловастатинот, супстанца што го намалува нивото на покачениот холестерол и липидите во циркулацијата и се користи за третман на хиперлипидемиите. Денес ловастатин е водечко соединение или модел супстанца за синтеза на цела серија други антихиперлипидемични лекови од групата на статини.

Морски организми. Природните производи на морските организми се актуелни во последните неколку години одкако во различни морски школки, корали, сунѓери, риби и други организми се пронајдени фармаколошко и биолошко активни соединенија. Ваквите активни соединенија покажуваат антиинфламаторна, антивирална и антиканцер активност. На пример, супстанците бриостатин, долостатин и цефалостатин се моќни антитуморни агенси.

Животински организми. Животинските организми поретко се користат како извор на природни производи што можат да се користат како водечки или модел супстанции за понатамошен дизајн и развој на лекови. Сепак познати се некои пептидни компоненти изолирани од некои видови африкански жаби што покажуваат силна антибактериска активност или компоненти со аналгезична активност што се изолирани од јужноамерикански отровни жаби.

Отрови и токсини. Растенијата и животните се продуценти и на голем број отрови и токсини, особено отровните змии, пајациите, скорпиите, инсектите и микроорганизмите кои синтетизираат извонредно многу потентни соединенија што влегуваат во специфична интеракција со макромолекуларните таргети во човековиот организам. Повеќето од овие токсини се со полипептидна градба и како такви атакуваат на рецепторите, јонските канали и ензимите, притоа манифестирајќи определена реакција, често фатална за човекот или за животните.

Денес отровите и токсините се користат како модел супстанции во развојот на нови лекови. Карактеристичен пример во оваа смисла е лекот каптоприл (Captopril) што се користи во третманот на хипертензијата, а претставува супстанца синтетски добиена врз база на змискиот

отров изолиран од бразилски питон, што е искористен како модел супстанца во развојот на лекот. Невротоксините од бактеријата *Clostridium botulinum* што инаку се одговорни за труење со храната познато како ботулизам, денес имаат клиничка примена во третманот на мускулните спазми и како супстанции што ја превенираат холинергичната трансмисија, поради што истите се користат во развојот на нови антихолинергични лекови.

1. Екстракција

Екстракција претставува операција на извлекување на компоненти од интерес од растителен материјал, односно одстранување на растворливи компоненти од материјалот од нерастворливите резидуи, било да се течни или цврсти, со третман со течен раствор (екстрактивно средство, растворувач). Во зависност од целта на истражувањето може да биде користен материјал во свежа, во сува или во замрзната состојба. Во однос на карактеристиките на компонентите што се од интерес, се употребува соодветен растворувач за екстракција на истите. Генерално гледано, со оглед дека природниот материјал е во цврста состојба и содржи цврсти нерастворени компоненти, ова претставува цврсто-течна екстракција, каде што по пат на растворање на компонентите од разрушените ткива и клетки на материјалот истите преминуваат во екстрактивниот медиум (површински восок на пример). Ако се екстрахираат соединенијата што се локализирани внатре во ткивата, станува збор за течно-течна екстракција поради тоа што најголем број од ваквите соединенија се наоѓаат веќе растворени во клеточниот матрикс. Изборот на екстрактивната постапка зависи од особините на природните состојки што треба да се екстрахираат. Како универзално екстрактивно средство се користи етанолот, бидејќи претставува многу моќен растворувач за голем број природни соединенија. За екстракција на неполярни и липофилни компоненти се користат неполярни органски растворувачи, на пр. петролетер за масни масла или хлороформ за алкалоиди. Ако се присутни алкалоиди во облик на соли, потребно е алкализирање на материјалот и потоа екстракција со органски растворувач што добро ги раствора алкалоид-базите. Од друга страна, екстракција на ароматични киселини и фенолни соединенија подобро се врши во закиселени медиуми. Освен течности, како растворувач се користат и гасови и суперкритични флуиди.

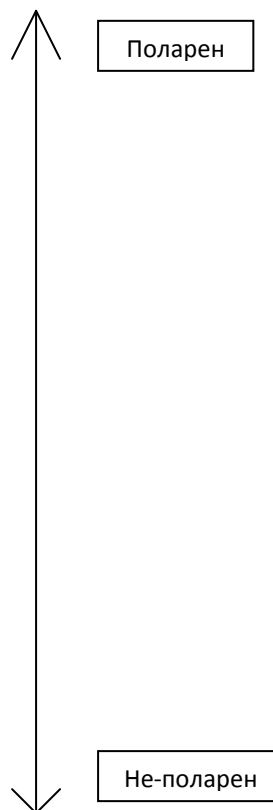
1.1. Екстрактивни средства

Екстракцијата се изведува со користење на екстрактивни средства, различни растворувачи што се нарекуваат солвенти или во зависност од самата екстрактивна процедура, менструми. При изработката на екстракти за фармацевтски потреби, солвенти што можат да предизвикаат неприфатлива токсичност треба да се одбегнуваат. Тука спаѓаат солвенти од класа 1: бензен, јаглентетрахлорид, 1,2-дихлоретан, 1,1-дихлоретан, 1,1,1-трихлоретан. Растворувачи што се асоцирани со помалку сериозна токсичност припаѓаат на солвенти од класа 2 и истите треба да се користат ограничено (ацетонитрил, хлороформ, дихлорметан, хексан, метанол, пиридин, толуен, ксилен и др.). Идеални за употреба се растворувачите од класа 3 со незначителна или мала токсичност каде спаѓаат: оцетна киселина, ацетон, анизол, бутанол, етанол, етил ацетат, етил етер, етил формат, мравска киселина и др. Според фармакопејските прописи и другите

барања, производителите на екстрактите за фармацевтските потреби должни се да обезбедат документ за количеството на евентуалните резидуи на користените растворувачи во фармацевтските производи. Вода како растворувач често се користи во подготовката на екстракти за фармацевтски потреби (традиционална форма за употреба на лековити растенија е водената односно чајната напивка, всушност водениот екстракт). Водата е многу добар растворувач за голем број активни супстанции, но исто така ги раствора и супстанциите што не се посакувани во екстрактот, па се јавуваат како нечистоции или примеси од кои екстрактот треба да се прочисти. Водата дополнително ги раствора високо поларните соединенија и ако растителниот материјал содржи танини, а тие не се цел на екстракцијата, тие ќе се екстрахираат како непосакувани компоненти од кои екстрактот мора дополнително да се пречисти со хроматографски постапки или со кристализација. Дополнително, негативната страна на водата како растворувач е и високата точка на вриење, повисока од сите други растворувачи. Бидејќи примарните екстракти најчесто понатаму се концентрираат или се впаруваат до многу мал волумен што се превзема со друг растворувач (со цел пречистување), водата многу тешко се впарува и многу потешко се одстранува од екстрактот во споредба со сите други органски растворувачи. Одлуката кој растворувач да се користи за изведување на определена екстракција зависи од повеќе фактори: од карактеристиките и поларноста на компонентите што треба да се екстрахираат, од степенот на токсичноста на растворувачот за човекот и за околината, од цената на чинењето на растворувачот и други фактори. Подолу е дадена листата на најчесто користените растворувачи со нивна поларност.

Поларност на растворувачот

Вода
 Оцетна киселина
 Етилен гликол
 Метанол
 Етанол
 Изопропанол
 Пуридин
 Ацетонитрил
 Нитрометан
 Диениламин
 Анилин
 Диметилсулфоксид
 Етилацетат
 Диоксан
 Ацетон
 Дихлороетан
 Тетрахидрофуран
 Дихлорометан
 Хлороформ
 Диетиленетер
 Бензен
 Тoluен
 Ксилен
 Јаглеродтетрахлорид
 Циклохексан
 Петрол етер
 Хексан
 Пентан



Производството на растителни екстракти што се користат во прехранбената индустрија исто така е регулирано во однос на растворувачите што можат да се користат. Во Европската Унија, за изработка на вакви екстракти можат да се користат само:

1. вода, со додаток од киселина или од алкалија,
2. прехранбен производ што може да се користи како растворувач (пр. растителни масла) и
3. растворувачи како што се пропан, бутан, етил ацетат, етанол, CO₂, N₂O, и ацетон.

Исто како кај фармацевтските, и кај прехранбените производи се ограничува нивото на евентуални резидуи од користените растворувачи, но само ако се користени растворувачи од третата група. За определени растворувачи не е дозволено да се мешаат со одредени прехранбени производи (на пр, ацетон не смее да се меша со маслиново масло), а некои се потполно забранети за употреба (пр. мешавина од хексан и етилметил кетон). Во производството на екстрактите за прехранбената индустрија, денес се повеќе се преферира користење на екстракти добиени со екстракција со CO₂ (суперкритична екстракција) или самиот процес се користи во одстранување на определени компоненти од прехранбените производи (на пр., одстранување на кофеинот од зеленото кафе или од чајот). Оваа екстракција е изворедно ефективна за добивање високо квалитетни хербални екстракти, екстракти од зачини и етерични масла, лути супстанции, природни бои, антиоксиданси и масла со висок квалитет.

Фактори што влијаат на изборот на екстрактивното средство

Покрај капацитетот за растворливост што претставува клучен фактор во изборот на екстрактивното средство, постојат и дополнителни критериуми за селекција на соодветен солвент (растворувач):

- **Селективност.** Добра селективност на растворувачот овозможува користење на помалку фази во екстрактивниот процес, а со тоа се намалуваат и фазите во евентуалните прочистувања (прочистителни постапки). Ако се екстрахира една компонента, се бара растворувач што селективно ја раствора токму таа компонента, а ако цел на екстракцијата е група состојки тогаш се бара таква селективност на растворувачот, што ќе ги извлече сите состојки што припаѓаат на групата (на пр. растворувач што ќе го екстрахира само морфинот (морфин селективен) од опиумот или растворувач што ќе го екстрахира сите алкалоиди (алкалоид селективен).
- **Обновување на растворувачот.** Обновувањето на растворувачот треба да биде лесно. Ако се користи впарување или дестилација, растворувачот треба да има ниска температура на испарување, да не создава азотропни смеси и лесно да се кондензира со ладна вода. Јонските течности (киселини, раствори на соли и слично) не можат да се впаруваат и производот на таквата екстракција мора да биде испарлив за да се одвои со дестилација. Ако се користат алкилирани терцијерни амини (триоктиламини) во кисели медиуми (хлороводородна киселина), јонски течности се формираат сами од себе и оваа реакција може да биде реверзибилна, ако се додат алкалии. Во такви случаи се формираат слободни амини што можат да се дестилираат.

- **Вискозност и точка на топење.** Високата вискозност на растворувачот ја редуцира ефикасноста на масениот трансфер и создава потешкотии при некои фази од екстрактивниот процес (на пр., ако е потребно пумпање и диспергирање). Температурата на топење (одмрзнување) на растворувачот по можност треба да биде пониска од амбиенталната.
- **Површинска напон.** Нискиот површински напон овозможува подобро натопување на цврстите материјали. Ова е значајно за екстрактивниот процес, бидејќи растворувачот треба да продре во матрикот на природниот материјал.
- **Токсичност и запаливост.** Во производството на храна, исклучиво можат да се користат нетоксични растворувачи. Генерално треба да се има впредвид дека при користење на растворувачи што можат да претставуваат било каква опасност, мора да се применат дополнителни мерки за безбедност.
- **Корозивност.** Растворувачи што можат да доведат до корозивност бараат поголемо инвестирање во опремата што се користи во процесот на екстракцијата. Дополнително, тие бараат дополнителни средства за соодветно ракување со нив пред и соодветно одстранување, после екстракцијата.
- **Термална и хемиска стабилност.** Термалната и хемиската стабилност на растворувачите е многу важна, бидејќи после екстрактивниот процес тие се рециклираат. Особено не смее да дојде до било какви промени при обновување на растворувачот во евапораторот.
- **Достапност и цена на чинење.** Растворувачите мора да бидат лесно достапни со што е можно повеќе прифатлива цена на чинење.
- **Влијание врз надворешната средина.** Растворувачот треба да биде компатибилен со фазите во екстракцијата во кои се бара протекување на растворувачот, но исто така треба да биде компатибилен и со надворешната средина, со минимални загуби во текот на евапорирањето, растварањето и другите екстрактивни фази. Одстранување на растворувачите од резидуалните материјали по екстракцијата може да предизвика сериозни проблеми, поради што е неопходен т.н. пост третман. Главно се практикува механичко пресување (за да се истисне заостанатиот дел од растворувачот што повторно ќе се рециклира), бидејќи други третмани можат значајно да влијаат на економските аспекти на екстракцијата, кога се работи за екстракција со големи размери.

1.2. Екстрактивни постапки

Екстракцијата може да биде:

- дисконтинуирана или
- континуирана.

Дисконтинуирана екстракција во основа е **мацерација**, а континуирана **перколација**. Двете екстрактивни техники се многу стари, конвенционални или традиционално познати. Зависно од потребите на екстрактивниот процес, основните методи денес се модификуваат на

различни начини за да се обезбеди поголем принос и подобар квалитет на производот, на екстрактот.

1.2.1. Мацерација

Мацерацијата е едноставна, класична и се уште многу широко применувана екстрактивна процедура во која се користи ладен солвент, со што се минимизираат евентуалните декомпензации кај нестабилните компоненти, поради што претставува безбеден екстрактивен процес, но бара повеќе време и поголемо количество на екстрактивно средство (растворувач).

Главната цел на ваквата дисконтинуирана екстрактивна процедура е добивање на екстракт што содржи посакувани компоненти при што непосакуваните се елиминираат (не се раствораат) со користење на добро одбрано екстрактивно средство (селективен солвент) што ги раствора само компонентите од интерес. Бидејќи идеално селективни екстрактивни средства нема, секој екстракт ќе содржи и определени количества од непосакуваните компоненти. Квалитетот на добиениот производ ќе зависи од количеството на компонентите од интерес, но меѓу другото и од количеството на непосакуваните состојки. Екстрактите добиени по пат на мацерација се користат во фармацевтската индустрија во производство на хербални лекови, во производство на козметички производи, во прехранбената индустрија како различни адитиви итн., бидејќи ги содржат компонентите од интерес што се биолошко-фармаколошки активни соединенија. Се користат и во производство на лекови и козметички препарати или имаат друга функција на пр. арома супстанции, средства за подобрување на вкусот, зачински екстракти, конзерванси, природни прехранбени бои, и сл. и како такви се користат во прехранбената индустрија. Ваков тип на екстракти се користат и за изолација и карактеризација на терапевтски значајни соединенија (пр. алкалоиди, кардиотонични гликозиди, антоцијани, флавоноиди, ...итн.).

Принципот на дисконтинуираните екстракции се состои во извлекување на компонентите со една порција на растворувач и во потопување на растителниот материјал во точно дефинирано количество растворувач во определено време, од 3 до 7 дена. Во текот на овој период се врши непрекинато промешување (агитација) за подобро растворање на потребните компоненти. За таа цел може да се користи механички шејкер што ќе овозможи непрекинато мешање на материјалот со што ќе се зголеми брзината на екстрактивниот процес. Кај мацерацијата, времето на екстракцијата е времето што е потребно:

- растворувачот да навлезе во клетките од растителниот материјал,
- да се обезбеди партиционирање на активниот градиент во растворувачот (во солвентот) и
- да се трансферира активната компонента вон клетките и да се пренесе во солвентот.

Фреквентната агитација е потребна за да се редуцира локализираното концентрирање на компонентите околу клетките и ткивата на растителниот материјал што се обработува.

Според фармакопејските прописи, процесот на мацерација за подготовка на екстракти од организирани растителни сировини (сув корен, сув лист, плод и сл), се состои од следното:

- поставување на **исечениот или грубо иситнетот** растителен материјал во **целото количество на солвент** (во овој случај се нарекува менструм) во затворен сад и се остава да отстои 7 дена, со повремено протресување,

- цедење или пресување и истиснување на течниот дел и
- филтрирање на течноста (со цел пречистување) и добивање на течен производ (екстракт),
- не се додава дополнително количество растворувач (за да се надополни количеството што заостанува во остатокот по цедење и пресување)(битна карактеристика).

Во фармацевтската практика, мацерацијата како екстрактивен процес се користи за добивање тинктури (алкохолни екстракти со дефиниран однос растителен материјал:растворувач = 1:4 или 1:5) или за добивање други екстракти. Како растворувач (солвент, менструм) се користи алкохол (етанол), водено-етанолни мешавини во различен однос или вода.

Модификации на мацерација

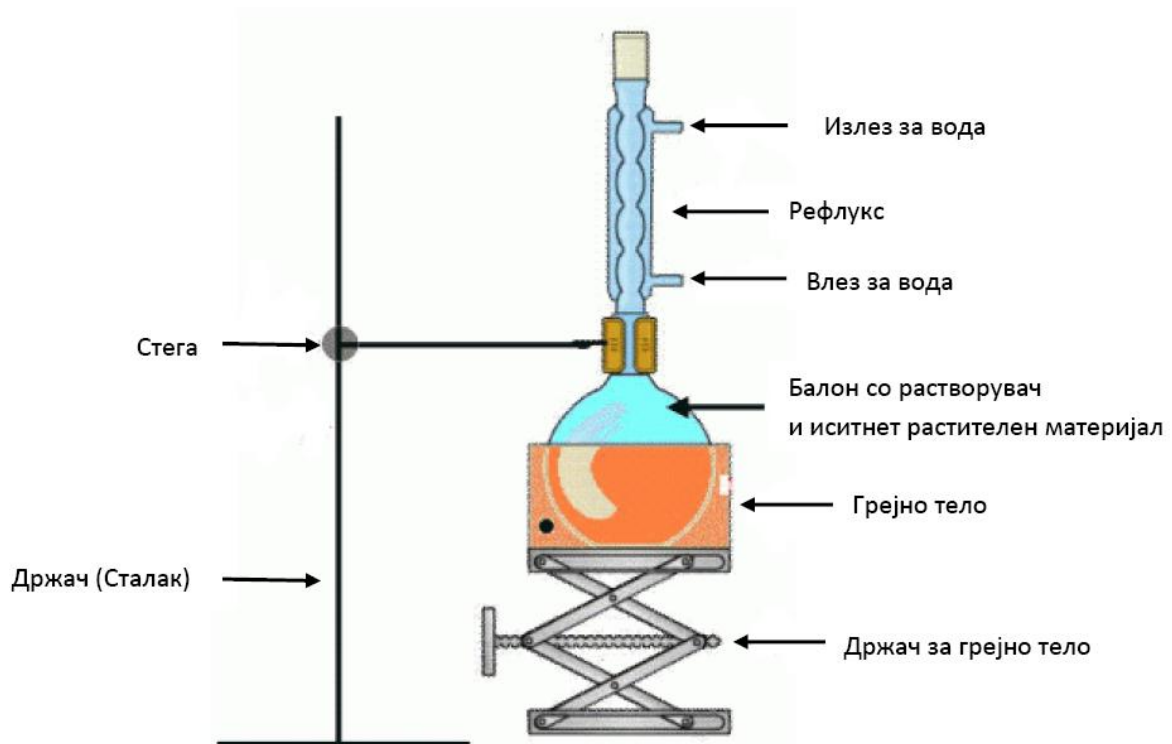
Мацерацијата може да биде забрзана и потпомогната на различни начини. Освен што се користи операцијата мешање со цел постојано нарушување на динамичката рамнотежа што настанува при распределбата на компонентите внатре во растителниот материјал и надвор во растворувачот, таа може да биде и адаптирана мацерација и многукратна (multiple maceration).

Првата (адаптираната мацерација) се користи за изработка на екстракти од т.н. неорганизиран растителни суровини како што се смоли, балсами, восоци и други растителни ексудати кои претставуваат мешавини од различни соединенија и немаат клеточна или ткивна структура за разрушување. При ваква мацерација времето на екстракција од максималните 7 главно се скратува на 2 дена. Постапката на цедење и истиснување на течниот дел е непотребна бидејќи делот што заостанува нерастворен не содржи растворувач и компоненти од интерес, а раздвојување од заостанатиот дел што не е растворен се врши со филтрирање. Вообичаено, кај ваквите мацерации, екстракцијата се изведува со 4/5 од потребното количество солвент и по фазата на филтрирање се дополнува со преостанатата 1/5 од растворувачот за да се добие екстракт со посакувана концентрација.

Многукратната мацерација се изведува на ист начин како и едноставната, со тоа што количеството на растворувачот потребно за изведување на екстракцијата се дели на два (двократна), односно на три (трикратна) дела. Истото количество растителен материјал се обработува со две односно со три порции од растворувачот. Двократната мацерација вообичаено се користи за изработка на екстракт од кора од портокал и од корен од линцура, а трикратната за добивање на течен екстракт од листови од сена. При многукратните мацерации, количеството на солвентот е големо и вообичаено втората и третата порција од екстрактите (мацератите) се упарува до определен волумен пред да се додаде на првиот мацерат.

Во лабораториски услови, во случаи кога екстрактот (мацератот) се подготвува со цел изолација на определени компоненти, се прават и други модификации на екстрактивната процедура. Во случаи кога компонентите од интерес се термостабилни, можно е екстрактивниот сад и содржината да се загреваат на определена температура. Ако се загрева до тој степен содржината да врие, се поставува повратно ладило за да пареите од

растворувачот кондензираат назад. Овој вид екстракција е познат како екстракција под рефлукс (Слика 1.1.).

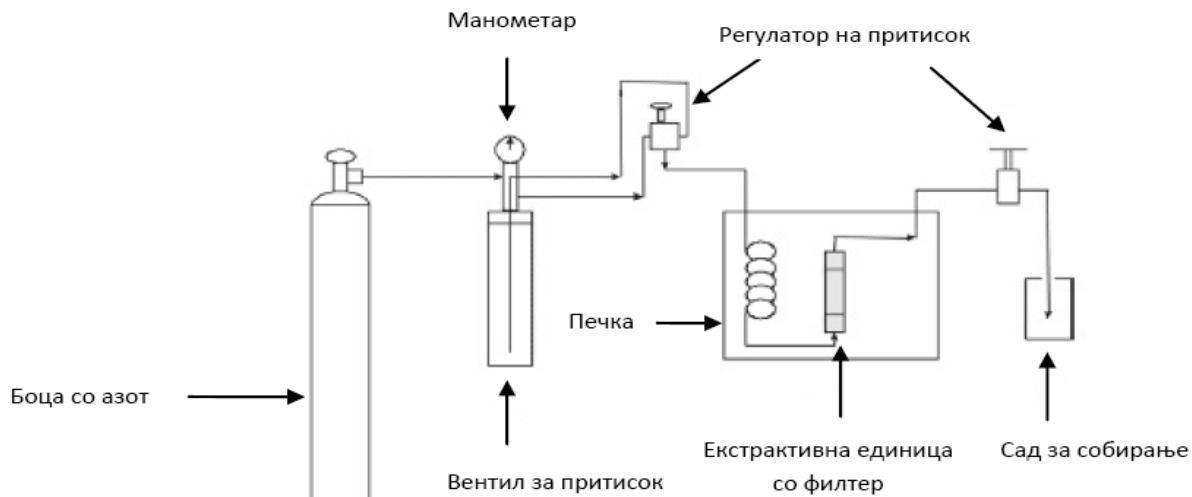


Слика 1.1. Екстракција со рефлукс

Екстракција со ултразвук (*Ultrasonic extraction-USE*) е екстракција каде што садот со материјал и растворувач се поставува во ултразвучна бања и се агитира со ултразвук (20 kHz) определено време на контролирана температура. Ултразвучните бранови создаваат микрокавитации во растворувачот што се карактеризираат со висока температура и притисок со што се забрзува преминот на компонентите од примерокот во растворувачот.

Екстракција во микробарнова печка (*Microwave assisted extraction-MAE*) е екстракција каде што садот со растителен материјал и растворувач се поставува во микробарнова печка најчесто на 2,45 GHz. Системот може да биде затворен, кога се работи за помало загревање и отворен со повратно ладило, кога загревањето е поенергично.

Течна екстракција под притисок (*Pressurized liquid extraction-PLE*) е вид на екстракција каде што примерокот бавно се екстрахира со мало количество на загреан растворувач што се пропушта под висок притисок низ растителниот материјал, поставен во специјална комора (Слика 1.2.). Се користат различни течни растворувачи, секогаш загреани над нивната температура на вриење и под висок притисок, притоа не менувајќи ја својата агрегатна состојба. Токму поради овој факт, овој вид екстракција уште се нарекува и субкритична екстракција.



Слика 1.2. Шематски приказ на течна екстракција под притисок

Секвенцијална (последователна) раствор екстракција

Секвенцијалната (последователната) екстракција (*Sequential solvent extraction*) се применува во случаи кога не е позната поларноста на компонентите од интерес што треба да се екстрахираат. Претставува конвенционална, но и многу погодна и многу често применувана екстрактивна метода.

Базичен принцип на ваквата екстракција е обработка на растителниот материјал со серија од растворувачи со последователна поларност. Вообичаено се започнува со многу неполарен растворувач, при што материјалот што е можно повеќе исцрпно се екстрахира, а по одвојување на течниот дел истиот понатаму се обработува со други растворувачи со растечка поларност. Во првиот чекор може да се користи дихлорметан или друг сличен растворувач со кој ќе се екстрахираат високо неполарните растителни соединенија, како што се масните масла, јаглеводородите, терпеноидите, флавоноските агликони и сл. Вториот чекор може да биде екстракција со ацетон или со етил ацетат со кои ќе се екстрахираат средно поларни компоненти, како што се флавоноидните хетерозиди, а наредниот чекор би била екстракција со алкохол или мешавини од алкохол-вода со кој ќе се екстрахираат високо поларните соединенија како што се танините. Така се добиваат најмалку три сепарирани екстракти што понатаму соодветно се обработуваат. Неполарните и средно поларните екстракти вообичаено се впаруваат под вакуум, а водените се лиофилизираат.

Екстрактивниот протокол може да се модификува зависно од типот на компонентите што треба да се екстрахираат. На пр. при екстракција на алкалоидите може да се додаде киселина за да се подобри извлекувањето на алкалоидите во форма на соли.

Една од модификациите е и екстракцијата по Натиен-Лебретон што се користи за екстрахирање на вкупни флавоноиди. Зависно од карактеристиките на материјалот што треба да се обработува, може да се примени или да се исклучи првиот чекор, екстракција со високо неполарни растворувачи. Понатаму растителниот материјал се обработува најчесто со алкохолно-водена смеша (етанол:вода = 70:30 или метанол:вода = 80:20) со мацерирање на

собна температура, 24 часа, со постојано мешање за што се користи магнетна мешалка. Садот во кој се одвива екстракцијата се затвора со воздушно ладило.

Со филтрирање се одвојува течниот дел, а остатокот се плакне со мала порција од солвентот и со цедење и филтрирање течниот дел се додава на првото количество од екстрактот. Вака добиениот вкупен екстракт понатаму се впарува до водена фаза и се сепарира со течно-течна екстракција, со растворувачи со растечка поларност (диетилетер, етилацетат и п-бутанол). Добиените фракции се впаруваат под вакуум и вообичаено се користат за изолација на чисти флавоноидни соединенија.

Екстрактивни процедури со големи размери (Large scale extraction procedures)

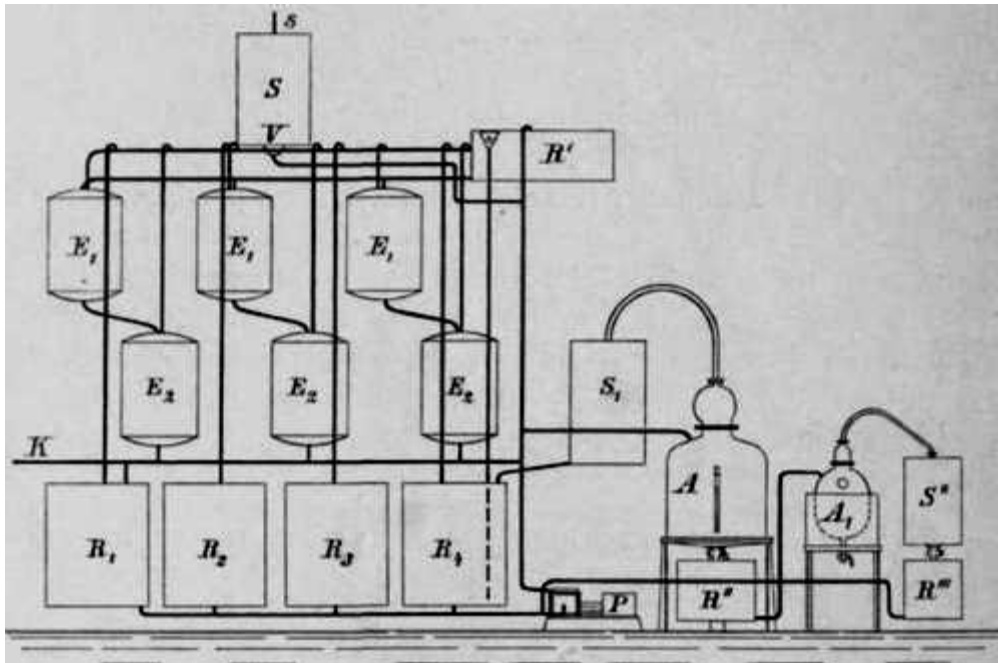
Екстрактивните процедури со големи размери бараат модификација на многу фази од екстрактивната процедура. Тие се применуваат во индустриски услови, протекуваат со користење на многу големо количество растворувач и поради потребата од мешање или агитација главно се скапи и во пракса тешки за изведување. Затоа најчесто се применуваат модификувани екстрактивни процедури со големи размери (*Modified large scale extraction procedures*), како што се:

- циркулирачка екстракција,
- екстракција во повеќе чекори и
- екстракција во екстрактивни батерии.

Циркулирачката екстракција е процес на мацерација во кој растворувачот континуирано циркулира низ растителниот материјал. Растворувачот се пумпа низ долната страна на контејнерот во кој е поставен материјалот за екстракција. Движењето на растворувачот го редуцира создавањето на граничните слоеви при што за многу кратко време, униформната дистрибуција ја минимизира локалната концентрација на компонентите од интерес.

Екстракцијата во повеќе чекори се изведува во големи челични танкови поврзани со циркулирачка пумпа и со спреј распрскувач и со неколку други садови за примање на порции од екстрактот. Предноста на ваквата екстракција е во тоа што материјалот се екстрахира неколку пати и таквите фракции од екстракти се собираат во посебни садови. Последниот третман на материјалот пред тој да се фрли како отпад, се врши со чист растворувач, со што се подобрува исцрпноста и приносот на екстракцијата.

Екстрактивните батерии (Слика 1.3.) се големи екстрактивни системи што се користат во случаи кога треба да се обработи многу големо количество од истиот растителен материјал. Во овој процес се користи серија од танкови наполнети со материјалот, а самата екстракција е семи-континуирана.



Слика 1.3. Екстрактивна батерија

1.2.2. Перколација

Перколација уште се нарекува и исцрпна екстракција (exhaustive extraction). Претставува метод на подготовка на растителен екстракт со континуирано перколирање на растворувачот низ растителниот материјал во стаклени цевки или инки (перколатори) на температура помеѓу собната и 60 °C. Може да биде:

- едноставна перколација,
- перколација за подготовка концентрирани преработки, каде спаѓаат:
 - ограничена перколација, и
 - модификувана перколација и
- континуирана врела екстракција (hot percolation), позната и како Соклет (Soxhlet) екстракција (во англосаксонската литература се означува и како Soxhletation).

За изведување на едноставната перколација потребни се перколатори, конусни или цилиндрични (Слика 1.4.) или перколатори со заштитни обвивки со пара што се користат за екстракции на повисока температура.



Слика 1.4. Лабораториски садови за перколација

На слика 1.5. е прикажана перколација во лабораториски услови. Главните карактеристики на овој екстрактивен процес се следните:

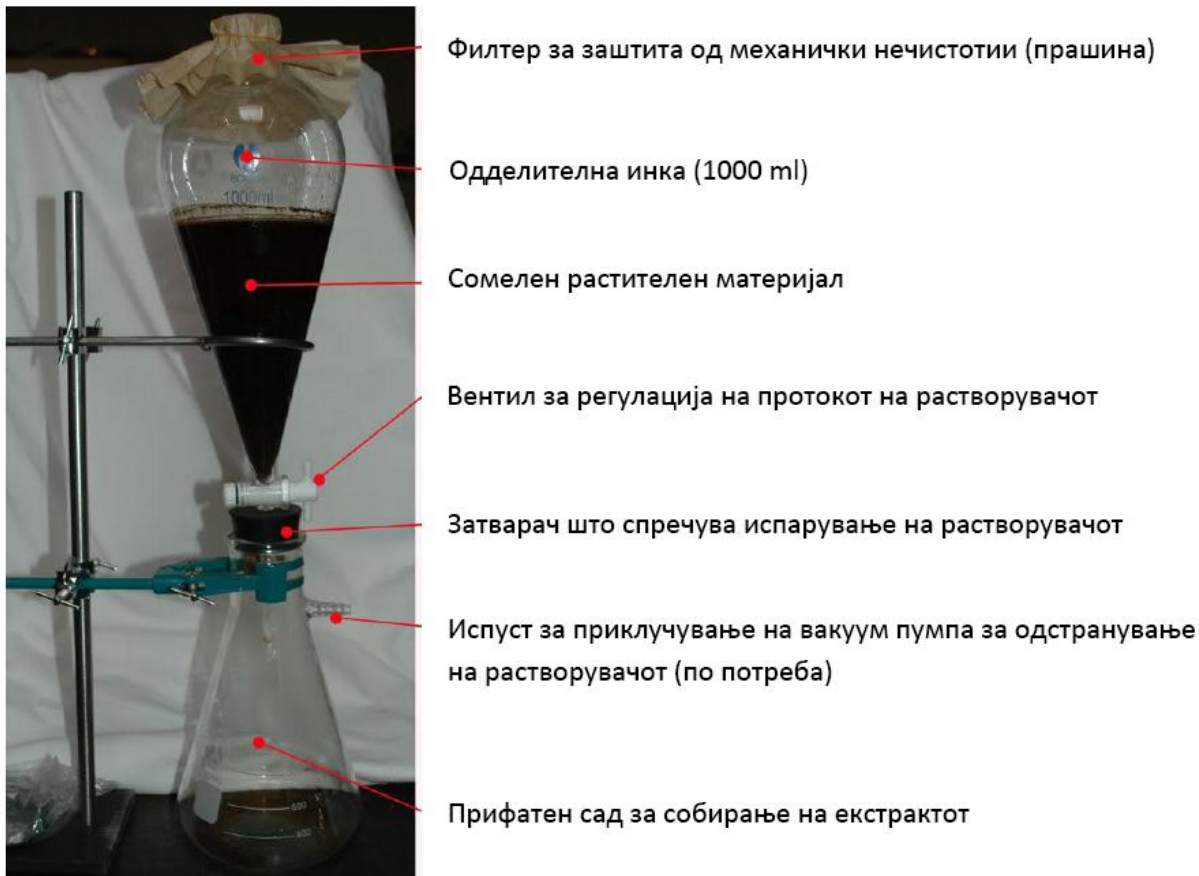
- растителниот материјал се меле до прашкаста форма, пулверизирање (size reduction),
- спршениот материјал се потопува во растворувач (менструм) во посебен сад и се остава да одстои 4 часа за добро да го прими растворувачот (натопување, квасење) (imbibition),
- наквасениот материјал рамномерно се пренесува во перколатор, пакување (packing),
- парче филтер хартија се става на површината, а преку неа слој од чист песок (така површинскиот слој од растителниот материјал нема да се разместува),
- вишокот од менструмот бавно се налева преку поставениот материјал (вентилот се држи отворен за поминување на евтуално заостанатиот воздух и потоа се затвора),
- вишок од менструмот се додава за да се направи мал слој над поставениот материјал, се покрива одозгора со филтер хартија за да се спречи навлегување на прашина и се остава да стои 24 часа, мацерација (maceration),
- се отвара вентилот и се пушта солвентот контролирано да истекува (перколира) со постојано додавање на ново количество менструм, перколација (percolation),
- се собира 75% од вкупниот волумен на готовиот екстракт,
- материјалот во перколаторот се притиска и се цеди за да се добие дополнително количество од екстрактот (до 80-90%),
- волуменот се дотерува со додавање на дополнително количество чист менструм до добивање на 100% производ (вкупен екстракт) и
- по потреба се врши концентрирање на добиениот екстракт со впарување користејќи соодветни техники за таа намена.

Ограничена перколација (*Reserve percolation*)

Во овој процес првата порција од перколатот (околу $\frac{3}{4}$ од финалниот производ) е делот што содржи максимално количество активни компоненти или состојки од интерес. Последователно, перколацијата се комплетира на вообичаен начин се додека растителниот материјал не се исцрпи, но последниот дел од перколатот (околу $\frac{1}{4}$ од од финалниот производ) се собира одвоено. Овој дел понатаму се впарува до сирупеста конзистенција и потоа се меша со првиот дел од перколатот. Финалниот волумен се дотерува со додавање на чист менструм.

Оваа постапка се користи за изработка на течен екстракт од сладок корен.

Предности на оваа постапка се во тоа што првиот дел од перколатот што содржи максимално количество на компоненти од интерес не е подложен на загревање, туку само дилуираниот дел од перколатот што се впарува до сирупест остаток. На тој начин, најголемиот дел од компонентите се заштитетни од евентуалното распаѓање. Процесот е економичен бидејќи не е потребно впарување на целокупниот перколат.



Слика 1.5. Перколација во лабораториски услови

Модификувана перколација

При подготовка на екстрактите од групата тинктури, перколацијата се изведува така да односот растителен материјал:перколат (м/п) изнесува 1:4 (имено од 1 дел материјал се добиваат 4 дела перколат). Во случаи кога односот се редуцира на 1:3 станува збор за модификувана перколација. Во ваков случај се заштедува на потребната топлина, на времето и на менструмот.

Перколацијата е процес на замена. Силно концентрираните раствори на активни компоненти што се формираат во текот на фазата мацерација се заменуваат со свеж менструм (растворувач) кога ќе започне фазата на перколација. Докажано е дека при едноставната перколација, менструмот што е стационаран во материјалот тешко се одстранува и е потребно поголемо количество нов менструм за потполно исцрпување на материјалот. Но доколку континуираните фази од перколацијата имаат соодветни паузи со краткотрајни фази на мацерација, односот м/п може да се редуцира на 1:3.

Во индустриски услови се користат перколатори со голем капацитет (Слика 1.6., а) што можат да бидат поврзани со екстерен циркулирачки евапоратор, со рефлукс или со Soxhlet екстракција. Вакви постројки можат да се користат за екстракција, но истовремено и за

концентрирање на екстрактит пред тие да се извлечат надвор од системот (Слика 1.6., б). Често се користат и за изведување на водена екстракција за изработка на екстракти за потребите на фармацевтската и на прехранбената индустрија. Во ваквите екстрактивни системи како екстрактивно средство може да се користи и органски растворувач, најчесто етанол.



а)



б)

Слика 1.6. Перколатори со голем капацитет за индустриска екстракција.

а) едноставна перколација; б) екстрактивна постројка со можност за врзување со екстерен циркулирачки евапоратор, со рефлукс или со Soxhlet екстракција. Вакви постројки можат да се користат за екстракција, но и за концентрирање на екстрактите истовремено, пред екстрактот да се извлече надвор од системот. Често се користи за изведување на водена екстракција за изработка на екстракти за потребите на фармацевтската и прехранбената индустрија. Во ваквите екстрактивни системи како екстрактивно средство може да се користи и органски растворувач, најчесто етанол.

Соклет (Soxhlet) екстракција

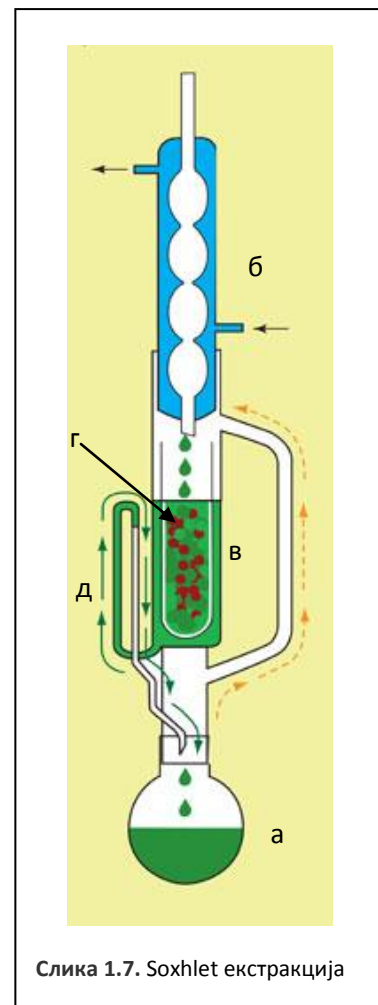
Кај континуираната перколација со загреан растворувач (Soxhlet екстракција), за време на екстрактивниот процесот се користи многу пати истото почетно количество на растворувач. Растителниот материјал физички е одвоен од растворувачот (солвентот), а екстракцијата се изведува со поминување на чист растворувач низ материјалот. Процесот се користи за екстракција на растителен материјал кај кој менструмот тешко пробива во клетките, активните компоненти не се раствораат добро и количеството на менструмот за екстракција е мало.

Соклет екстракцијата се користи за извлекување на неиспарливи компоненти и се изведува во специјална стаклена апаратура (Слика 1.7.), каде што најдолу се наоѓа стаклен балон (а) во кој се става органски растворувач што се загрева до вриење. Парите кондензираат во повратното ладило на врвот од апаратурата (б) и полека и контролирано капат во резерварот (в), што се наоѓа помеѓу стаклениот балон и ладилото. Во резервоарот се наоѓа растителниот материјал спакуван во порозна капсула (г). Штом ќе се преполни резервоарот со растворувачот, истиот, по систем на сврзани садови (д) истекува долу во балонот заедно со компонентите што биле екстрахирани. Екстрахираните тешко испарливи компоненти остануваат во стаклениот балон и кумулативно се собираат, додека чистиот растворувач континуирано испарува и кондензира во резервоарот. Циклусот тече континуирано и се повторува повеќе пати. Овој вид на екстракција е подолготраен (од 6-48 часа, зависно од особините и количеството на состојките што се екстрахираат), но е многу исцрпен, со принос до речиси 100%.

Со Соклет екстракцијата возможно е и фракционирано екстрахирање на ист растителен материјал со различни растворувачи со растечка поларност, за да се извечат фракции што ќе содржат различни соединенија, со различни физичко-хемиски својства (различна поларност).

Главно се започнува со многу неполарен растворувач (хексан, диетилетер, хлороформ) со кој се извлекуваат високо неполярни соединенија (липиди, восоци, јаглеводороди, терпени и др.), потоа стаклениот балон се заменува со друг пополарен растворувач (етил ацетат) со кој се извлекуваат поларни соединенија, како што се на пример различните терпенски хетерозиди, за да на крај се заврши со многу поларен растворувач (етанол, метанол), со кој се извлекуваат пополарни соединенија како што се фенолните хетерозиди и сл.

Соклет екстракцијата не може да се применува ако карактеристиките на растителниот материјал се такви да го блокираат екстрактивниот процес (гуми, смоли, опиум и сл.) или ако активните состојки се термолабилни (ензими, некои алкалоиди, антрахинони, естри и сл.). Како екстрактивно средство можат да се користат само чисти растворувачи или мешавини што вријат (алкохол-вода).

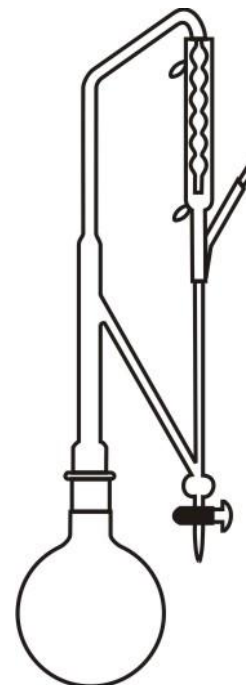


Слика 1.7. Soxhlet екстракција

Екстракција по пат на дестилација со водена пареа

Дестилацијата со водена пареа најчесто се изведува во специјално изработена стаклена апаратура по Клевенџер (Слика 1.8.), поретко по Унгер или Ликенс-Никерсон. Се користи за екстракција на испарливи компоненти, а најголема употреба има за екстракција на етерични масла. Се изведува во затворена стаклена апаратура поврзана со стаклен балон, каде што се наоѓа растителниот материјал и определено количество на вода. Со загревање на овој стаклен балон и содржината во истиот до вриење, настанува екстракција на испарливите компоненти со водена пареа и истите потоа кондензираат и кумулативно се собираат во собирната цевка, а водата континуирано се враќа назад во балонот, односно кружи во системот преоѓајќи од течна во гасовита состојба и обратно.

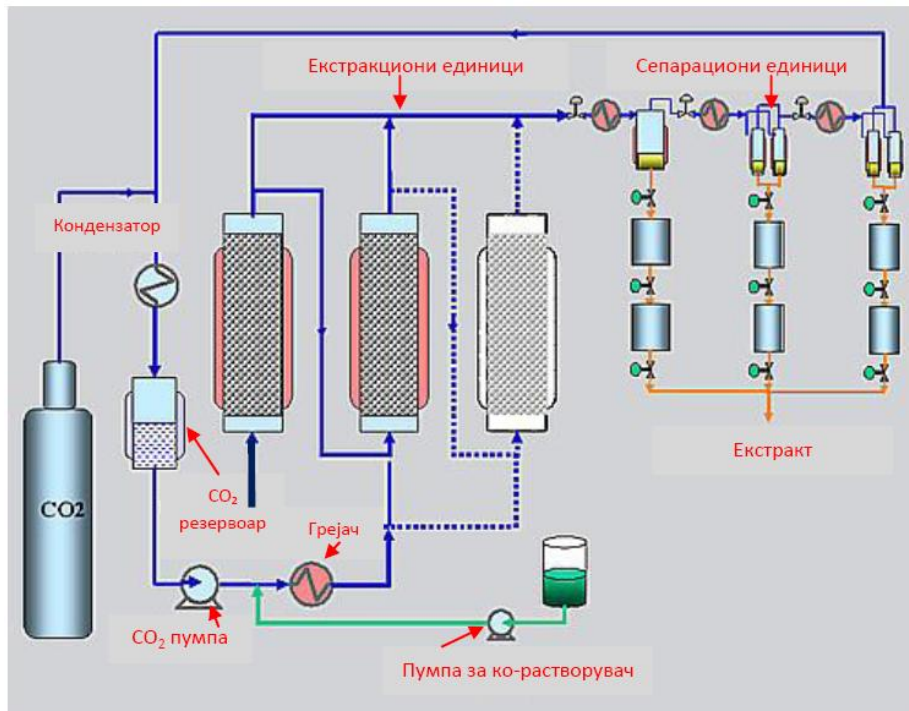
Дестилацијата со водена пареа се базира на Далтоновиот закон според кој две течности што взаемно не се мешаат ќе провријат во моментот кога збирот на нивните парцијални притисоци ќе се изедначи со атмосферскиот. Таков е случајот со дестилацијата на етеричните масла, со оглед на тоа дека тие не се мешаат со водата. Кога се загреваат заедно (во балонот ароматичниот растителен материјал и водата), двете течности (етеричното масло и водата) не се мешаат, но истовремено испаруваат, а мешавината ќе проврие по изедначувањето на притисоците. Температурата на вриење во вакви смеси секогаш е пониска од температура на вриење на засебните течности. Ако водата врие на 100 °C, а етеричното масло на температура од 150-300 °C, мешавината од двете течности ќе проврие на температура околу 96-98 °C.



Слика 1.8. Клевеџер апаратура

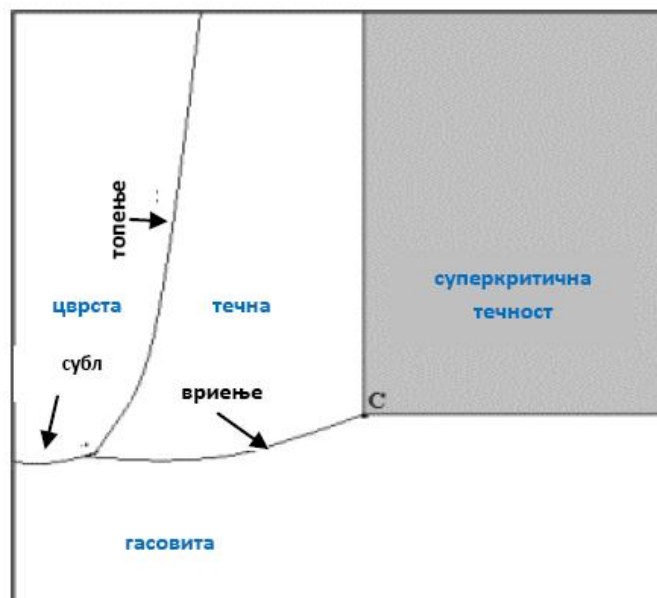
Суперкритична течна екстракција

Суперкритична течна екстракција (*Supercritical fluid extraction-SFE*) е екстракција во која како екстрактивно средство се користи определен флуид (најчесто гас CO_2) што во услови на суперкритична температура и притисок преминува во суперкритичен флуид (течен CO_2) што дејствува како солвент. Шематски приказ на еден систем за суперкритична екстракција е прикажан на Слика 1.9.



Слика 1.9. Систем за суперкритична екстракција (шематски приказ)

Чист суперкритичен флуид е секоја компонента што се наоѓа на температура и притисок над критичните вредности (преку критичните точки). Над критичната температура, гасовите компоненти не можат да преминат во течна состојба се додека не бидат подложени на притисок, а критичниот притисок е оној кој дејствува на гасот што се наоѓа на критичната температура (Слика 1.10.).



Слика 1.10. Услови за создавање на суперкритичен флуид

Со оглед дека секоја супстанца (материја), во зависност од условите, може да се најде во една од трите агрегатни состојби (цврсто, течно или гас), во услови на суперкритична температура и притисок (точка C, Слика 1.10.), постои само една фаза – фаза на суперкритичен флуид. Точката C се наоѓа на крајот од кривата на гас-течност еквилибриумот. Во случаи кога се користи комбинација на изобарни промени во температурата со изотермални промени во притисокот, можно е конвертирање на чиста компонента од течност во гас и обратно, преку суперкритичниот регион. Однесувањето на флуидот во суперкритичната состојба може да се опише како многу мобилен флуид, со капацитет за брзо и силно пенетрирање во цврстиот матрикс (растителен материјал). Како резултат на тоа, времето на екстракцијата се скратува значително, како и сепарирањето на фракциите од екстрактот. Дополнително, условите на екстракцијата можат да се контролираат и со тоа да се направи селективна сепарација. Суперкритичната екстракција со флуиди зависи од густината на флуидот, што пак се контролира преку системот на температура и притисок. Во практиката ваквата екстракција може да се користи за екстракција на течности од природни матрикси како што се храната, растителни фармацевтски сировини, зачински растенија и слично, што наликува на конвенционалната течна екстракција. Разликата е во тоа што при враќањето на амбиенталните услови (температура и притисок, 25 °C и 1 бар) течниот суперкритичен флуид се враќа во гасовита состојба и како таков го напушта системот, а екстрактот се состои од потполно чисти природни состојки. Селективност при екстракцијата се постигнува преку варирање на притисокот во садот за екстракција, со што се зголемува или намалува екстрактивната моќ на суперкритичните флуиди.

Суперкритичните флуиди можат да се користат за потполна екстракција на компоненти од растителен материјал. Употребата на суперкритичната екстракција има предности во поглед на еколошки чисти работни услови во споредба со повеќето органски растворувачи што вообичаено се користат во екстрактивните процедури, а што се штетни по здравјето и по околината. Суперкритичните флуиди имаат голема предност од причина што добиените екстрактивни производи не содржат резидуи од растворувачот. Ако екстракцијата се изведува на пониски температури, се овозможува заштита на термолабилните компоненти или на лесно испарливите состојки, што е од големо практично значење при екстракцијата на мирисните компоненти. По завршување на почетната екстракција се добива првичен екстракт што често се подложува на понатамошно фракционирање и прочистување.

Суперкритична екстракција денес се применува при:

- отстранување на кофеин од кафето,
- изолација на виндолин од катарантот (*Catharanthus roseus*),
- екстракција на таксол од тисата (*Taxus brevifolia*),
- екстракција на масно масло од енотерата (*Oenothera biennis*),
- изолација на партенолоиди од танацетумот (*Tanacetum parthenium*),
- екстракција на оксигенирани хиперфорини од кантарионот (*Hypericum* spp.),
- изолација на етерично масло и на смола од хмељ, роза, рузмарин, а во експеримент се наоѓаат ангелика, целер, кориандер, свездест анасон, клека и други сировини.

1.2.3. Фракционирање и пречистување на екстрактите

Суровите екстракти се пречистуваат и фракционираат со користење на неколку постапки:

- **Течно-течната екстракција** сеуште е најчесто применуваната метода за фракционирање на компонентите од првичниот екстракт. Се изведува со растворувачи што практично не се мешаат меѓусебе. Растворувачот со кој се врши течностно-течностна екстракција се додава на екстрактот во одделителна инка и истиот треба да ги поседува следниве карактеристики: а) поголема растворливост на целните компоненти, одколку растворувачот што се наоѓа во првичниот екстракт и б) практично да не се меша со првичниот растворувач. Ваквиот вид на фракционирање може да се изведе последователно, со неколку растворувачи, со различна поларност. Најчест пример е: вкупниот првичен воден екстракт најнапред да се екстрахира со крајно неполарен растворувач (пр. тетрачлорметан- CCl_4 , петролетер) и да се одделат многу неполарни компоненти. Овој чекор често се користи за пречистување на екстрактот (одстранување на хлорофилот, смолите и восоците). Понатаму екстрактот се третира со умерено неполарни растворувачи како што се диетилетер или дихлорметан, за да во последната фаза остатокот од водениот екстракт се екстрахира со n-бутанол со што се одделуваат преостанатите компоненти со најголема поларност. Денес се користат поголем број на современи методи за пречистување и селективно одделување на целни компоненти.
- **Цврсто-фазната екстракција (Solid phase extraction-SPE)** каде што првичниот екстракт се нанесува на мали пластични колонки, налик на шприц, полни со порозна материја, со карактеристичен афинитет кон некоја хемиска група на компоненти, претходно накувасена со растворувач. По нанесување на екстрактот на полнењето на колонката, неколку пати низ колонката се пропушта растворувач што ги извлекува со себе сите компоненти од екстрактот освен оние што имаат голем афинитет кон полнежот на колонката. Задржаните компоненти од интерес потоа се елуираат од колонката со мало количество на друг (селективен) растворувач, што многу лесно ги раствора и ги одвојува од полнењето на колонката.



Слика 1.12. Систем за SPE екстракција

- **Цврсто-фазната микро екстракција (Solid phase micro extraction-SPME).** Станува збор за силиконски влакна, долги до неколку cm, обложени со тенок слој на полимер со определени карактеристики и афинитет кон некоја хемиска група на компоненти. За полесно ракување со овие влакна, изработени се специјални држачи за работа во форма на шприц или пенкало. Влакното може да се внесе директно во мало количество од првичниот екстракт, поставен на мешалка и по определно време, откако ќе ги адсорбира целните компоненти, влакното се извлекува и со мало количество на друг растворувач, истите се елуираат. Освен со потопување на влакното во екстрактот, може да се работи на тој начин да влакното стои во просторот на екстрактот, во добро затворен сад што се загрева на определена температура. Во овој случај влакното ги адсорбира само испарливите компоненти. Освен елуирање со растворувач, постои можност, и најчесто така и се користи, да влакното директно се внесе во гасен хроматограф, каде адсорбираните компоненти се десорбираат за понатамошна анализа.



Слика 1.13. Пакување со силиконаски влакна за цврсто-фазна микро екстракција

- **Биоесеј водено фракционирање и изолација (Bioassay guided fractionation and isolation).** Екстрактите можат да се фракционираат и врз база на нивната биолошка активност. Во ваквите биоесеј-водени фракционирања, суровиот екстракт се разделува хроматографски на фракции што содржат компоненти што понатаму се евалуираат во однос на биолошката активност. Целта на ваквото фракционирање во постапките на понатамошно фракционирање и изолација е да се земат предвид само фракциите што покажале биолошка активност. Циклусот на фракционирање во ваквите постапки оди до таму додека не се изолира компонентата што е одговорна за определената активност.
- Покрај наведените, се користат и други постапки за пречистување, од кои некои од нив ќе бидат дадени понатаму.

1.2.4. Водени екстракти

- **Инфузија.** Методот на инфузија се користи за растителни материјали со нежна градба во кои водата може лесно да пенетрира во ткивата и кај кои активните компоненти лесно се раствораат во водата.

Екстрактот добиен па пат на инфузија се нарекува инфуз. Се добива со ставање на растителен материјал во погоден сад и со додавање определено количество вода, со мешање неколку пати во текот на самата екстракција. Течниот дел по завршетокот на екстракцијата се одвојува со филтрирање. Инфузите се подготвуваат во секојдневната практика – традиционалниот начин за конзумирање на чај е преку подготовка на инфуз (воден екстракт). Ако станува збор за фармацевтска форма инфуз, тогаш истата се подготвува според препораките на фармакопејските прописи. Како такви се подготвуваат свежи или со додавање на етанол (20-25% од вкупниот волумен) за да се продолжи рокот на употребата.

➤ **Деконција.** Деконција е процес со кој во вода растворливите и на температура стабилните компоненти се екстрахираат од цврсти растителни материјали (кори, корени, ризоми). Материјалот се сече на поситни парчиња и вари со определено количество вода, 10-15 минути. По ладење, се филтрира, остатокот се притиска и се цеди. На крај се дополнува до вкупниот волумен со што се добива производ што се означува како деконт.

➤ **Дигестија.** Ова е процес на модификувана мацерација во која растителниот материјал се екстрахира со загревање и под определен притисок. На тој начин се овозможува продирањето на водата или на други растворувач во ткивата со цел подобро исцрпување на компонентите од интерес.

2. Изолирање на чисти компоненти

Постапките за разделување (сепарирање), изолирање и пречистување се многубројни и зависат од природата и од физичко-хемиските карактеристики на компонентата што се изолира. Некои компоненти можат да се издвојат со едноставна сублимација, како што е на пр. издвојување на кофеинот од чајот. Денешните техники за сублимација користат намален притисок и строго контролирани температурни услови. Дестилацијата е постапка што традиционално се користи за издвојување на испарливи компоненти, пред сè, на етеричните масла. Фракционото ослободување од смеша е постапка што се применува за издвојување алкалоиди од различни растворувачи, користејќи го нивното својство со киселини да градат хидросолубилни соли што по алкализирање на медиумот го ослободуваат липофилниот алкалоид. На тој начин, менувајќи ги условите на екстракцијата, со додавање киселина или алкалија во мешавината и со користење различни растворувачи, може да се изврши фракционо издвојување на поединечни алкалоидни компоненти од смеша на алкалоиди. Слична постапка може да се користи за изолирање на органски киселини растворливи во органски растворувачи. Во овој случај се започнува со смеша од соли на киселините од интерес, а одделни киселини фракционо се ослободуваат со додавање определени минерални соли. Фракциона кристализација е метод што традиционално се користи за издвојување на компоненти од смеша, користејќи различна растворливост на компонентите во избран растворувач.

2.1. Хроматографски техники

Сепарирањето и изолирањето на природни производи не може да се замисли без употреба на различни хроматографски техники. Хроматографијата претставува процес на разделување на компонентите од анализираната смеша во зависност од нивната распределба меѓу мобилната (подвижната) фаза и стационарната (неподвижната) фаза. Постојат повеќе поделби на хроматските методи и тоа: според физичката и хемиската природа на мобилната и стационарната фаза; според механизмот на разделување; според техниката на работење, и сл. Една од поделбите што многу често се користи е поделбата според начинот на пакување на стационарната фаза. Според оваа поделба постојат:

I) Планарна хроматографија

1. Хартиена хроматографија
2. Тенкослојна хроматографија

II) Хроматографија на колона

3. Течна хроматографија
4. Гасна хроматографија
5. Капиларна хроматографија

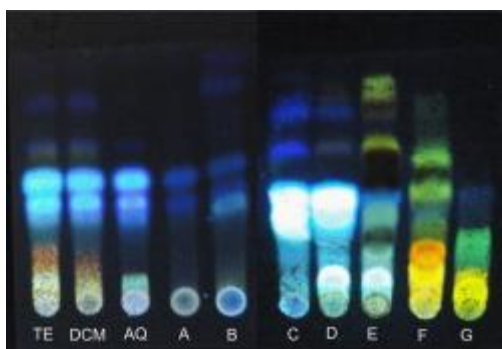
2.1.1. Планарна хроматографија

➤ **Хартиена (папирна) хроматографија.** Ова е вид на партициона хроматографија во која како носач се користи филтер хартија. Смеша од компоненти што треба да се раздвојува се наносува во линија блиску до едниот раб на хартијата, што потоа се поставува во комора за хроматографирање, каде е сместена мобилната фаза. Хартијата, по завршеното разделување, се суши, а детекцијата на зоните се изведува со користење на определени реагенси. Во минатото, хартиената хроматографија во голема мера била користена за сепарирање и изолирање на определени природни супстанции од растителен материјал, но денес оваа хроматографија во најголем дел е заменета со хроматографија на тенок слој.

➤ **Хроматографија на тенок слој (*Thin layer chromatography - TLC*).** Екстрактот што се испитува се раствора во мало количество органски растворувач и се наносува на плоча во вид на серија точки на определени растојанија. Компонентите од екстрактот мигрираат низ слојот од стационарна фаза (најчесто силика гел), под влијание на мобилната фаза (обично смеса од органски растворувачи), што се движи низ стационарната фаза под дејство на капиларни сили. Растојанието што го поминува анализаторот зависи од неговиот релативен афинитет за стационарната фаза во однос на мобилната фаза. Односот на патот што компонентата го поминува на плочата и патот што го поминува растворувачот (мобилната фаза) е означен како R_f вредност. Во стандардни услови R_f вредност е константа за секоја испитувана компонента. Сепак, во практиката често се случуваат отстапувања, поради што е препорачливо секогаш да се работи паралелно со референтни супстанции што служат како стандарди. Денес се користат и готови плочи каде стационарната фаза е нанесена на

стаклена или алуминиумска подлога. Најчесто се користи силикагел (Kieselgel GF₂₅₄, Merck) или полиамид, декстран (Sephadex) или друг адсорбент. Визуелизација на петната од компонентите вообичаено се изведува под UV-светлина, при што супстанците што флуоресцираат многу лесно се детектираат. За детекција на природни супстанции можат да се користат повеќе реагенси специфични за одредена група компоненти (јодни пареи или Драгендорфов реагенс за повеќето алкалоиди, SbCl₃ во хлороформ за стероидни компоненти, пареи од амонијак за антрахинони, итн.). Постои и дводимензионална тенкослојна хроматографија каде испитуваната проба се поставува на само една точка во аголот на плочата, потоа се развива со една мобилна фаза во еден правец, а по сушење на плочата, истата се ротира за 90° и се развива со друга мобилна фаза.

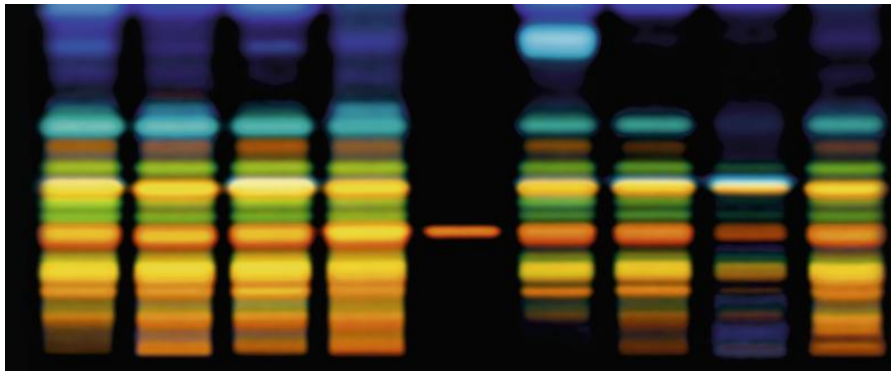
Тенкослојната хроматографија може да се применува и во препаративни цели (за изолација на компоненти). Слојот од адсорбентот во препаративната TLC е многу подебел поради тоа што се нанесува поголемо количество на растителен екстракт. Принципот на развивање на плочата е идентичен како кај аналитичката TLC. Петната од сепарираниите компоненти поединечно се стругаат од плочата, заедно со адсорбентот, од каде што понатаму се екстрахираат со погоден растворувач. Во денешни услови на работа оваа техника е многу значајна, бидејќи за структурни испитувања со современите инструментални техники, потребни се многу мали количества од природен материјал што може да се обезбедат од само едно петно при препаративната TLC.



Слика 2.1. TLC хроматограм добиен после рачно нанесување на екстрактот (во точки)

Денес постојат многу усовершени и во голем дел автоматизирани системи за тенкослојна хроматографија т.н. високо ефективна тенкослојна хроматографија (*High Performance Thin Layer Chromatography-HPTLC*). Направени се голем број подобрувања со што основната метода на хроматографија на тенок слој може да се автоматизира во различни чекори, со цел да се зголеми резолуцијата и да се овозможат попрецизни квантитативни мерења. Подобрувањата се состојат во автоматизација на процесот на апликација на пробата на плочата со што е постигнато квантитативно точно нанесување на пробите, како и во стандардизирано и контролирано развивање на плочи во специјални комори. Постои можност со дензитометриско скенирање на плочите, хроматограмот да биде дигитализиран, да биде

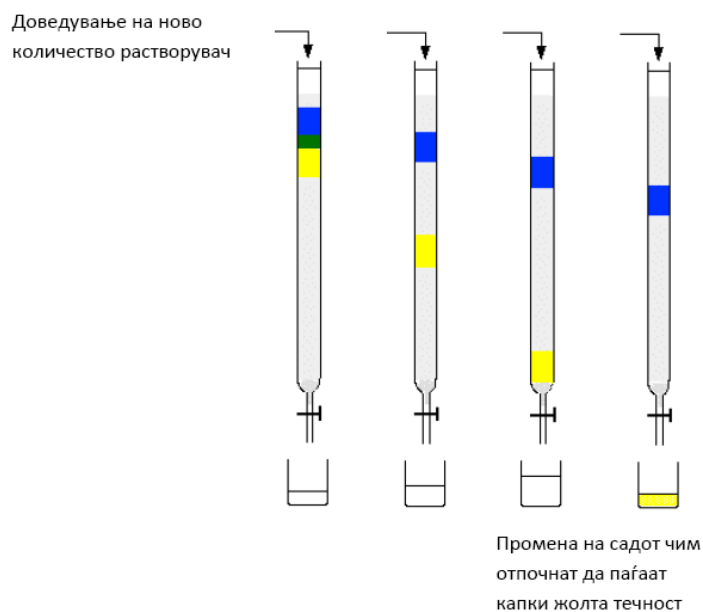
извршена квантитативна анализа и да биде документиран. Ваквите системи денес многу се употребуваат, посебо во идентификацијата на хербални супстанции и препарати.



Слика 2.2. TLC хроматограм добиен после полуавтоматско нанесување (во линија) при HPTLC

2.1.2. Хроматографија на колона

➤ **Течната колонска хроматографија** се изведува во вертикално поставени стаклени колони во кои се полни адсорбентот. Мигрирањето на растворувачите и компонентите низ колоната е резултат на гравитационата сила. За зголемување на брзината на овој вид хроматографија може да се користи и притисок од горниот крај на колоната, особено кога се работи со испарливи растворувачи или со вакуум во долниот крај на колоната. Познати се голем број модификации на апаратирите со цел да се постигне подобар резултат, особено ако се работи со загреани растворувачи или ако хроматографирањето треба да се изведе во отсуство на воздух или во отсуство на кислород. Растителниот екстракт што треба да се сепарира се раствора во мало количество органски растворувач и се нанесува на врвот од колоната. Елуирањето на компонентите се врши со растворувачи со различна елуирачка моќ (Слика 2.3.).



Слика 2.3. Едноставна колонска хроматографија

Детекција на компонентите се прави на различни начини, зависно од физичко-хемиските карактеристики на компонентите. Детекција на зоните на одделните компоненти може да се врши врз база на флуоресценцијата на компонентите под дејство на UV-светлина. Во случај на киселини или на бази, зоните на компонентите можат да се детектираат со определен индикатор растворлив во вода. Сепак, најчесто се практикува собирање на елуатите во точно определени порции и утврдување на степенот на сепарацијата со определување на некои физички константи (оптичка ротација, релативна густина, индекс на рефракција) или со хемиски методи (на пр. титрација). Понекогаш е попогодно да се врши елуирање од целата колона и да се собираат елуати за понатамошно испитување на одделни компоненти. Денес многу често, колонската хроматографија се комбинира со хроматографија на тенок слој со која се испитуваат елуатите.

- **Адсорпциона хроматографија.** Оваа техника вообичаено се користи за пречистување растителни екстракти од непожелни компоненти (clean-up техника). Како адсорптивни материјали се користат различни супстанции: каолин, магнезиум оксид, калциум карбонат, активен јаглен и др. Пречистувањето вообичаено се врши од петролетерски или од бензенски (неполарни) и од алкохолни, водени или пиридински (поларни растворувачи) екстракти. Адсорпционата хроматографија се покажа како извонредно погодна техника за изолација и пречистување витамини, хормони, голем број алкалоиди, кардиотонични хетерозиди, антрахинони и др. компоненти.
- **Партициона хроматографија.** Метод што се користи за сепарирање на компоненти од смеша врз база на разликите во партициониот коефициент на компонентата во растворувачи што меѓусобно не се мешаат (вода и неполарен органски растворувач). Водената фаза обично е стационарна фаза и се меша со некој носач, како што се: силика гел, киселгур и др., а добиената смеша се пакува во вертикално поставени колони, слично како кај адсорптивната хроматографија.
- **Гел-филтрација (молекуларни сита).** Хидрофилни гелови подготвени од скроб, агар, агароза, полиакриламид, поливинилкарбитол и вмрежени декстрани се користат за фракционирање на протеини, пептиди, аминокиселини и полисахариди. Честичките на овие гелови содржат пори формирани од молекуларната структура на гелот. Кога се пакуваат на колона и перколираат со раствор, пропуштаат големи молекули од растворот што не можат да влезат во порите, додека малите молекули влегуваат и рамномерно се распоредуваат во гелот. Тенки слоеви од геловите можат да се нанесат на стаклена плочи и да се користат во TLC хроматографијата. Декстрански гелови (Sephadex) се формираат од декстрани умрежени со α -епихлорхидрин. Секој тип гел поседува пори со големина во точно определен распон, така што при гел филтрација молекулите од растворот ќе влегуваат во гелот во помал или во поголем обем што ќе придонесе во варирање во нивното елуирање од колона. Во секој случај гел-филтрацијата е метод од избор во сепарирањето на мешавини што содржат компоненти со големи молекули и придружни компоненти со мали молекули.

➤ **Течна хроматографија под висок притисок (HPLC).** Оваа хроматографија е вид течна колонска хроматографија што се изведува на релативно тесни (тенки) колони (дијаметар од 3-10 mm) под притисок што може да се движи до 1200 atm (120 000 kPa). Пробата се внесува во колоната со инјектор (рачен или автоматски), а разделувањето на компонентите се врши врз

основа на релативното време на задржување на компонентите во стационарната фаза. Мониторирањето на елуатите од колоната може да се врши со различни детектори. Денес, овој вид хроматографија претставува најсовршен вид течна хроматографија што овозможува поефикасно и побрзо сепарирање на компонентите во смеша во споредба со класичните методи на хроматографија. Апаратите за течна хроматографија под висок притисок се комплетно автоматизирани и софтверски поддржани, што овозможува неверојатно погодни услови во анализата на природните производи. Изборот на стационарните фази е голем. Најчесто се силика гел базирани и можат да се користат во рН подрачје 3-8. Денес постојат и модификувани колони со кои може да се работи во рН од 1 до 13. Од неодамна се произведуваат и хирални стационарни фази што овозможува сепарирање на енантиомери од рацемски смеси. Бидејќи природните супстанции многу често се оптички активни компоненти, течната хроматографија под висок притисок на колони со хирални стационарни фази дава големи можности за сепарирање на фармаколошки активни изомери. Детекцијата на компонентите во течната хроматографија под висок притисок се врши на различни начини, со употреба на различни детектори што работат на различен принцип на: ултравиолетова и видлива спектроскопија (HPLC-DAD); масена и масено-масена спектроскопија (HPLC-MSn); рефрактивен индекс (HPLC-RI); флуоресцентна спектроскопија (HPLC-FLD) или нуклеарно-магнетна резонантна спектроскопија (HPLC-NMR).

➤ **Гасна хроматографија (GC).** Гасната хроматографија е техника каде што се користи гас како мобилна фаза што поминува под притисок низ хроматографската колона, најчесто цевка обложена со течна стационарна фаза или пакувана со цврста подлога обложена со течна стационарна фаза. Гасот што се користи како мобилна фаза мора да биде инертен, а вообичаено се користи водород, азот, хелиум или аргон. Пробата за анализа се внесува во просторот над колоната преку загреан инјектор, каде што испарува, а во колоната кондензира поради пониската температура. Температурата на печката каде се наоѓа колоната, се одржува константна или се програмира да се зголемува постепено. Подесувањето на температурните услови за работа во гасната хроматографија е многу значаен фактор за успешно хроматографирање. Протокот на гасот е, исто така, многу битен. Висок проток може да даде некомплетна сепарација на компонентите, а низок проток многу големи ретенциони времиња и дифузни пикови на хроматограмот. Откако пробата ќе навлезе во колоната настанува сепарација на смешата според разликите во времето на задржување на компонентите во стационарната фаза. Мониторирањето на елуатите од колоната може да се врши со различни детектори. Најчести детекторски системи во гасната хроматографија се пламен јонизационен (Flame Ionisation Detector-FID), детектор со зафаќање на електрони (Electron Capture Detector-ECD) или најмоќниот од сите, масениот детектор (Mass Selective Detector-MSD). Заедничко за сите овие детектори е што даваат електричен сигнал што понатаму се процесира.

Употребата на капиларни колони во гасната хроматографија овозможи големо подобрување на сепаративните можности и многу пократко времетраење на анализите. Капиларните колони се долги и многу тесни цевки, со внатрешен дијаметар од 0,15-0,53 mm и должина од 1-60 m. Воведувањето на хирални стационарни фази во гасната хроматографија овозможува анализа на енантиомери, што најде практична примена особено во аналитиката на етеричните масла, за раздвојување и определување на енантиомери на различните алкохоли, алдехиди, јаглеводороди и др. компоненти.

Количеството на смеша што треба да се сепарира и што може да се инјектира во апаратот за гасна хроматографија е многу мало, 1-5 микролитри (μl). Мерењето на така мало количество материјал е доста тешко, особено ако се изведуваат квантитативни анализи. Затоа се практикува растворање на смешата во некој растворувач со ниска точка на вриење, кој носен од гасот многу брзо поминува низ колоната. Испитуваната смеша при контакт со стационарната фаза треба веднаш да премине во гасовита состојба.

Некои компоненти, што инаку не се испарливи, можат да се анализираат со гасна хроматографија, ако претходно се дериватизираат во испарливи продукти. Разни шеќери, флавоноиди, антоцијани, кардиотонични гликозиди, морфин и кодеин и редица други природни супстанции можат да се преведат во испарливи, најчесто силил-, метил- или ацетил- деривати и да се анализираат со гасна хроматографија.

Предности на гасната хроматографија се во тоа што има поголема моќ на раздвојување од HPLC доколку се применуваат капиларни колони, може да се применува за определување на компоненти што не содржат хромофор, мобилната фаза не варира и нема отпад. Покрај тоа, гасната хроматографија овозможува идентична точност и прецизност при квантитативните определувања како и HPLC, особено кога се применува внатрешен стандард и дури и ако се користи хелиум како носечки гас (што е најскапата опција), поевтина е во споредба со HPLC. Ограничувања на гасната хроматографија се тоа што може да се анализираат само термостабилни и испарливи соединенија, додека водените раствори и соли не може да се аплицираат во инструментот.

Гасната хроматографија има голема примена во хемијата на природните соединенија, особено во фитохемијата. Вообичаено се користи за анализа на хемискиот состав на етерични масла, за испитување на некои алкалоиди (опиумски, кониин, тропански деривати), на смоли, на стероидни компоненти, како што се сапонини и кардиотонични хетерозиди и др.

➤ **Електрохроматографија.** Електрофоретско раздвојување на смеси се врши на ленти од филтер-хартија, инпрегнирани со раствор од електролит. Двата краја од лентата се потопени во раствори во кои се наоѓаат електроди. Материјалот што треба да се сепарира се нанесува во форма на точка на хартијата и целата апаратура се затвора, така што на хартијата се создава разлика во потенцијал од околу 2-10 V на секој cm. Некои сепарации се изведуваат на многу големи волтажи. Во зависност од природата на компонентите од интерес, создадените јони од компонентата ќе се движат кон анодата или кон катодата. Овој метод е погоден за сепарирање на смеси од алкалоиди, киселини, шеќери и антрахинонски деривати. Комбинација на електрофореза со гел-филтрација е полиакриламид гел-електрофореза, еден димензионален електрофоретски систем, што може да сепарира компоненти врз база на нивната мобилност во едниот правец и врз база на големината на молекулите во другиот правец.

➤ **Капиларната електрофореза** е релативно нова сепаративна техника. Раздвојувањето на компонентите од смешата се изведува во хоризонтална капиларна цевка (дијаметар 25-75 mm), со примена на висок потенцијал (10-30 Kв) и мобилна фаза, главно воден раствор, што мора да содржи електролит. Компонентите мигрираат во применетото електрично поле, со брзина зависна од нивниот полнеж и јонскиот радиус. Дури и неутралните компоненти мигрираат низ колоната врз основа на електроосмотскиот проток, што обично се јавува кон катодата. Кај капиларната електрофореза, се користат главно истите детектори како и кај HPLC

техниката. Во однос на сепарирачката моќ, оваа метода е поефикасна од HPLC, колоните се поевтини, времето на анализа е пократко и има мала потрошувачка на растворувач (воден пуфер, што е многу поевтина опција во споредба со органски растворувачи). Со оваа техника се анализираат различни природни компоненти, а во последно време сè повеќе се користи во анализата на флавоноидите и на алкалоидите.

2.2. Карактеризација на изолирани компоненти

Утврдување на структурата на изолирани компоненти бара комбинирање на низа хемиски и физички методи. Хемиските методи како што се реакции на деградација, денес многу малку се користат, така што поголема предност се дава на физичките техники UV, IR, MS и NMR спектроскопија, како и на рендгенска кристалографијата и методот на дисперзија на оптичка ротација. Различни модификации на масената спектрометрија ја направија оваа техника незаменлива во карактеризацијата на непознати природни компоненти.

3. ВЕЖБИ

Вежба бр. 1

3.1. Екстракција и изолација на јаглехидратни соединенија

3.1.1. Изолација на слузи

Слушите се сложени јаглехидратни соединенија што во растенијата се лоцираат во клетките, во клеточните ѕидови или во меѓуклеточните простори и секој пат имаат функција задржување на вода. Дејствуваат емолиентно (навлажнувачки), ги смируваат воспаленијата, ги намалуваат дразбите во горниот респираторен тракт и дејствуваат како антитусици, се користат при стоматитис, гингивитис, пептичен улкус и при ентероколитис, некои имаат способност да ја заменуваат крвната плазма, да запираат помали крварења, и во зависност од конвентрацијата да дејствуваат лаксативно или антидијароично. Некои покажуваат емолирачки својства (особено природните гуми) а некои дејствуваат имуно модулаторно и цитотоксично. Растителните сировини што ги содржат слузите традиционално се користат за подготовка на инфузи што се користат во терапевтски цели или за изолација на слузи кои наоѓаат различна примена.

Екстракцијата на слузите може да се направи после предходно деолирање и екстрахирање на растителниот материјал од други соединенија што ги содржи. Со неполарен растворувач се одстрануваат масните материи, восокот, јаглеводородите, терпените и другите липофилни соединенија, а со зовриен етанол поларните компоненти од групата фенолни и алкалоидни соединенија. Слузите како полимеризирани јаглехидрати се во најголем број случаи добро растворливи во ладна вода и се екстрахираат по постапка **мацерација**.

Постапка за изолирање на сурова слуз:

ДЕН 1

- 25 г исушен и сомелен растителен материјал се пренесува ерленмаер од 250 мл и се екстрахира со 100 мл петролетер 1 ч, со повратно ладило, на магнетна мешалка, со цел деолерирање на материјалот. Петролетерскиот екстракт се отфрла (се филтрира внимателно растителниот материјал да остане во садот за екстракција). (~1.15 h)
- Се продолжува со континуирана екстракција 3 пати со по 100 мл 80% зовриен етанол. Секоја етанолна фракција се одвојува со филтрирање и се отфрла (отстранување на поларни компоненти). (~1.30 h)
- Обработениот растителен материјал се прелива со 200 мл ладна вода, се протресува и се става на магнетна мешалка 1h.

ДЕН 2

- Предходно подготвениот воден екстракт со слуз се филтрира или процедува, зависно од густината на слузта во ерленмаер од 250 ml и се додава 1% раствор на оцетна киселина во етанол за да се исталожи суровата слуз (се додава во порции од по 5 ml,

по потреба и се додека не се изврши потполно таложење). Откако ќе се исталожи целата слуз се остава да одстои 5 минути, а потоа внимателно се одвојува со декантирање на течниот дел. (~10 -15 min)

Постапка на пречистување:

- Добиениот талогот (суровата слуз) се пренесува во Бихнерова инка во која е поставена предходно измерена филтер хартија. Пречистувањето се изведува со промивање на талогот по 50 ml на етанол, потоа 50 ml смеса етанол:етер = 1:1 и на крај 50 ml чист етер, со филтрирање со вакуум. (~20 min)
- Филтер хартијата со пречистената слуз се вади од Бихнеровата инка (со пинцета и мали шпатули) и се остава да се суши во ексикатор над P_2O_5 , 2 часа. Се мери. (~2.15 h).

Од разликата на двете мерења се пресметува количеството на изолираната слуз.

Приносот на екстракцијата се изразува во % (g слуз во 100 g растителен материјал, сметано на апсолутно сува маса (со одземена влага во материјалот). (содржината на влагата ќе биде предходно измерена).

Постапка за идентификација на изолираната слуз

- 15 mg од суровата слуз се пренесуваат во епрувета и се раствораат во 2 ml вода на ултрасонична бања со загревање до потполно растворање на слузта. Добиениот раствор мора да биде хомогено млечно бел.
- се додава 5 ml на етанол (96%) со што слузите мора да се изсталожат како бел прашкаст талог. (~10 min).

Растителен материјал за работа (5 групи студенти работат по еден растителен материјал):
семе од лен, корен од бел слез, грчко семе, семе од бел синап, лист од бел слез.

3.1.2. Изолација на целулоза

Целулозните влакна се основна градбена единица на секоја растителна клетка бидејќи влегуваат во градбата на клеточниот ѕид. Тие се индиферентни материјали од групата примарни метаболити. Чисти целулозни влакна за медицинска употреба се добиваат од растението памук, но можат да се добијат и со изолација од дрвесината на различни дрвенести растенија. Во медицината целулозата се користи за изработка на медицинска вата и завојни материјали.

Содржината на целулоза (сирови влакна) се одредува со метода која ја поставиле Scharer и Kurschner, поставена во 1931 година. Се состои во варење на примерокот со смеса на HNO_3 , CH_3COOH и CCl_3COOH со која се постигнува најдобро одвојување на целулозата со најмала количина на примеси.

Постапка за изолирање сурова целулоза:

ДЕН 1

- 3 g од сомелен растелен материјал (количеството се корегира зависно од видот на материјалот) се вари со 25 ml реагенс за целулоза во ерленмаер од 250 ml со повратно ладило, почесто проматувајќи, во вриечко водено купатило. (~2 h)
- Кога ќе се издвојат бели целулозни влакна, сè уште топлиот раствор се филтрира преку филтер G4 преку кој е ставена квантитативна филтер хартија (предходно исушена и измерена). Плакнењето на талогот се врши со топол реагенс за целулоза, топла вода и на крај со топол метанол се додека талогот на филтерот не стане сосема бел. (~20-30 min).
- филтер хартијата со талогот се суши во сушилница на 105-110°C, до константна маса (~30 min) и после ладење во ексикатор се мери. (~1 h).

Пресметување на принос на суровата целулоза:

- Разликата помеѓу масата на филтер хартијата со целулоза и празна филтер хартијата ја дава масата на изолираната сурова целулоза (која содржи и други компоненти и минерали).
- Приносот на екстракцијата се изразува во % (g сурова целулоза во 100 g растителен апсолутно сув материјал).

Чиста целулоза: (се изведува по потреба !)

- порцеланско лонче се жари на 700 °C, се лади во ексикатор и мери.
- со пинцета се вади филтер хартијата со талогот од целулоза, се пренесува во тарирано, претходно жарено лонче за жарење, внимателно се спалува и потоа се жари на 700°C до константна маса. После ладење се мери добиениот пепел.
- Од разликата во двете мерења се определува и таа маса се одзема до претходно добиената, а така добиената содржина на целулоза се изразува во g % во растителен материјал.

Реагенс за целулоза:

75ml 70% CH₃COOH + 5ml конц. HNO₃ + 2g CCl₃COOH

Растителен материјал (5 групи студенти работат по еден растителен материјал):

- семе од афион, семе од лен, корен од бел слез, грчко семе, семе од бел синап.

Пресметки, прилози и заклучок:

Асистент:

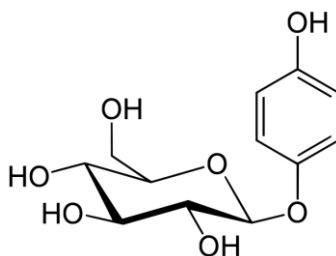
Вежба бр. 2

3.2. Екстракција и изолација на фенолни соединенија

3.2.1. Изолација на арбутин

Арбутиноот е фенолен гликозид ограничено распространет во растителниот свет. Растителните сировини што го содржат, најчесто се користат како уроантисептични средства. Изолиран арбутин влегува во состав на лекови со уроантисептично и диуретично дејство.

Арбутин (β -D-гликопиранозид на хидрохинон) за прв пат е изолиран од листот на мечкино грозје. Претставува бела кристална супстанца, лесно растворлива во вречка вода, а по ладењето кристализира во форма на игличести кристали. Тешко се раствара во ладна вода и во алкохол, а многу добро во етер. Со FeCl_3 дава сино обојување (реакција за идентификација).



Слика 3.1. Арбутин

Постапка за подготовка на првичниот (сировиот) екстракт:

ДЕН 1

- 5 g иситенети листови од мечкино грозје се пренесуваат во ерленмаер од 250 ml, се додаваат 100 ml вода и се загрева да врие 15 минути на грејно тело со азбестна мрежа, со повратно ладило. По ладење се филтрира. Остатокот уште еднаш се екстрахира со 50 ml вода, 10-15 минути. По ладењето, се филтрира и се спојува со предходниот филтрат. (~30 min).
- Во филтратот се додава 5 g олово ацетат (неутрален, кристален) и се загрева на водена бања 10 минути, со цел таложење на баластните материји. (~10 min)
- Талогот се одвојува со центрифугирање или со филтрирање, а потоа филтратот се доведува до неутрална реакција со додавање 2 g натриум карбонат. Растворот што ќе се добие треба да има слабо жолто обојување.
- Добиениот раствор се меша со 5 g Kieselgel (Merck, 0,05-0,02 mm) за колонска хроматографија. Добро се протресува 10 минути и потоа се евапорира на вакуум впарувач до суво. Сувиот остаток се користи за нанесување на колона од адсорбенс. (~2 h)

Колонска хроматографија (A): (ДЕМОНСТРАЦИЈА)

- 50 g Kieselgel (Merck, 0,05-0,02 mm) за колонска хроматографија се става во стаклена колона, предходно подготвена со слој од памук во долниот дел. Се натопува со

етил ацетат (внимателно за да не се создадат меурчиња воздух), а потоа се елуира со меша од етил ацетат:метанол:вода = 100:16,5:13,5 (V/V/V). За полнење и елуирање на колоната потребни се околу 600 ml од елуентот (смешата). Се отвара вентилот и се остава растворувачот да искапе се до моментот кога над адсорбенсот ќе застане дел од елуентот во висина од околу 5 cm.

- Сувиот остаток со екстрактот се нанесува во мали порции над адсорбентот. Одрко ќе се нанесе целото количество, се започнува со елуирањето собирајќи порции од по 20 ml (во епрувети). Елуентот внимателно се додава за фракциите да се собираат континуирано. Секоја фракција се испитува на присуство на арбутозид со боена реакција (во порцеланска зделичка неколку капки од фракцијата се мешаат со неколку капки раствор за детекција што се подготвува со растворање на 10 g FeCl₃ и 0,5 g калиум фери цијанид во 100 ml вода). Детекцијата може да се изведува и со TLC или спектрофотометриски.
- Фракциите што содржат арбутин се спојуваат и се евапорираат под вакуум.
- На остатокот се додаваат 2-3 ml вода, се загрева на водена бања на 50 °C до растворање на остатокот, при што доаѓа и кристализација на арбутинот.
- Суровиот арбутин се одвојува со филтрирање низ предходно исушена и измерена филтерна хартија. Филтерната хартија со арбутинот се суши во сушилница на 105 °C, 1 час. По ладење, се мери и се пресметува приносот на екстракцијата, а резултатот се изразува во %.

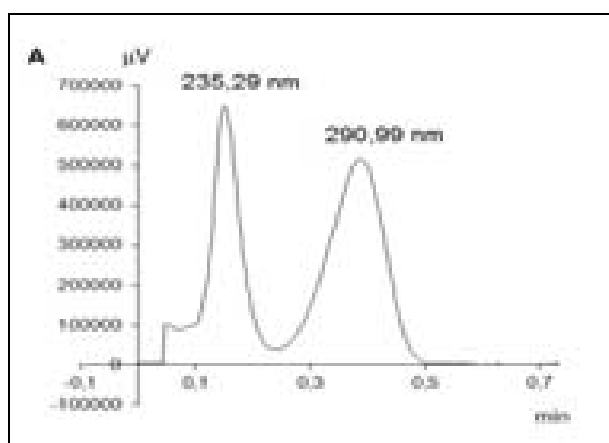
Колонска flash хроматографија (B):

- 50 g Kieselgel (Merck, 0,05-0,02 mm) за колонска хроматографија се става во порцелански филтер гуч во кој предходно има поставерно филтер хартија. Слојот од киселгел се покрива со друго парче филтер хартија и внимателно се натопува со етил ацетат (за да не се создадат меурчиња воздух), а потоа се елуира со 10 ml од меша од **етил ацетат:метанол:вода = 100:16,5:13,5 (V/V/V)**.
- горната филтер хартија се подига, рамномерно се нанесува предходно подготвениот сув екстракт со киселгелот, се покрива со филтер хартијата и се започнува со елуирање на екстрактот со мешата за елуирање. потребно количество на елуентот изнесува околу 300 ml. Првата порција изнесува 40 ml, а наредните по 30 ml. Фракциите од елуентот се собираат поединечно во соодветни садови (епрувети).
- Секоја фракција се испитува на присуство на арбутин. За тоа се користи ТЛЦ хроматографија под следни услови:
Стационарна фаза: Силикагел (готови ТЛЦ плочи на алуминиумски носач),
Мобилна фаза: етил ацетат:метанол:вода = 100:16,5:13,5 (V/V/V).
Волумен за нанесување: 15 µl.
Детекција: прскање со реагенс за идентификација на феноли (10 g железо трихлорид и 0,5 g калиум ферицијанид во 100 ml вода) и визуелизација на дневна светлина. Фракциите што содржат арбутин даваат темнозелено петно во средината од ТЛЦ хроматограмот. (~1 h)
- Фракциите што содржат арбутин се спојуваат во балон за впарување под вакуум. Се оставаат во фрижидер на +4 °C преку ноќ.

ДЕН 2

- Фракциите со арбутин се впаруваат под вакуум. Во текот на впарувањето може да се издвојат кристалчиња од арбутин. (~1.30 h).
- На сувиот остаток (по впарување) се додаваат 2-3 ml вода, добро се промешува и се загрева на водена бања на 50 °C. Температурата не смее да биде повисока бидејќи арбутиноот во тој случај ќе се раствори и нема да прекристализира. (се добиваат бели кристалчиња од арбутин што се видливи со голо око).
- Дел од оваа мешавина (**1 ml**) се пренесува во ерленмаер од 100 ml и се користи за хемиска идентификација, а другиот дел се евапорира повторно до сув остаток и се користи за идентификација, спектрофотометриски.

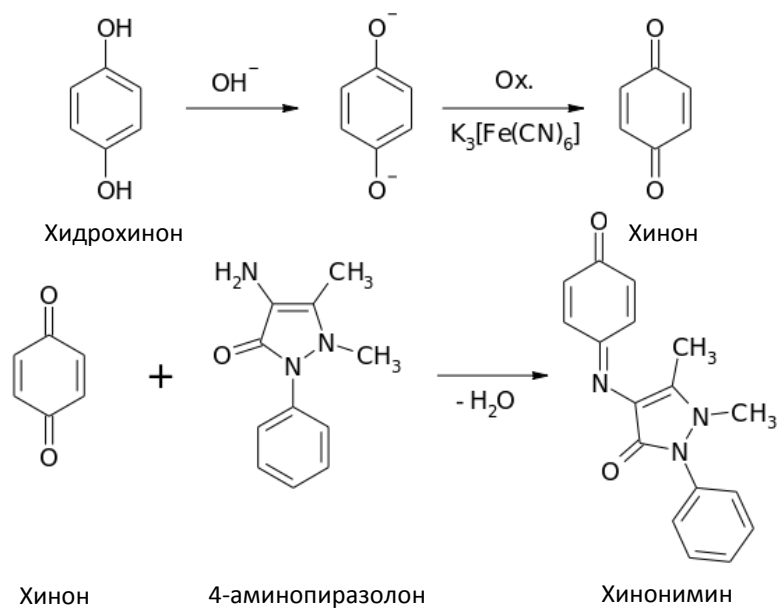
Спектрофотометриска идентификација: сувиот остаток се раствора во метанол и се снима UV спектар во подрачје од 200-400 nm во однос на метанол како слепа проба. Добиениот спектар треба да одговара на спектарот на арбутиноот прикажан на сликата 3.2.



Слика 3.2. UV спектар на арбутиноот во метанол

Хемиска идентификација со реакција по Emerson:

- делот од мешавината за хемиска идентификација (1 ml) се раствора во 50 ml вода, со загревање на водена бања до вриење. По ладење, се додава 1 ml 2% раствор 4-аминопиразолон, 0,5 ml разблажен раствор NH₄OH (3.4%) и 1 ml 8% раствор калиумхексацијано(III) ферат, [K₃Fe(CN)₆]. Се промешува и се остава да одстои 5 минути. Арбутиноот во алкална средина се хидролизира до хидрохинон, а во присуство на калиумхексацијаноферат се оксидира до хинон кој со 4-аминопиразолон гради стабилен црвено обоен производ (хинонимин) (слика 3.3.).



Слика 3.3. Емерсонова реакција за идентификација на фенолни соединенија (арбутин)

Пресметки, прилози и заклучок:

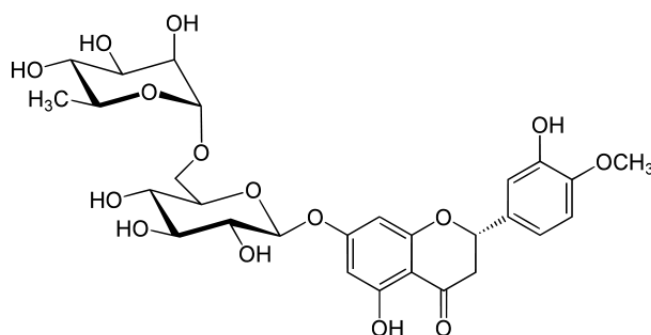
Асистент:

Вежба бр. 3

3.2.2. Изолација на хесперидин од кора на портокал

Хесперидин е флавоноски хетерозид на агликонот хесперетин, кај кој за ОН-групата на позиција 7 гликозидно е поврзан шеќер (дисахарид) што се состои од маноза и глюкоза. Во природата хесперидинот се наоѓа во незрелите и зрелите плодови од портокал, во надворешниот дел од перикарпот (портокаловиот дел). Претставува значајна лековита супстанца што се користи во третманот на заболувања на крвните садови, како капиларопротектор. Показува способност за редукција на нивото на холестеролот и за намалување на покачениот крвен притисок. Дејствува антиинфламаторно, седативно и антиканцерогено.

За фармацевтски потреби се изолира од природни материјали, најчесто од зелените и зрелите плодови на портокал.



Слика 3.4. Хесперидин

Постапка:

ДЕН 1

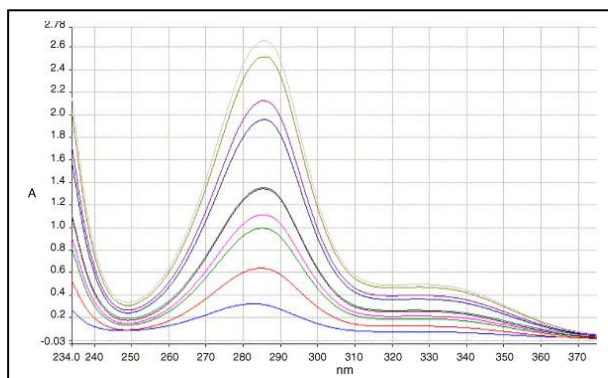
- 30 г исушена и сомелена кора од портокал се става во капсула од филтер хартија и се екстрахира во Соксклет апарат со петрол етер, 1.30 часа. Петролетерскиот екстракт се отфрла во соодветен сад за рециклирање, а капсулата со растителниот материјал се суши.
- Исушената капсула повторно се екстрахира во Соксклет апаратот со метанол, 2 часа.
- Метанолниот екстракт филтрира и се впарува под вакуум до сирупеста конзистенција.

ДЕН 2

- Остатокот се обработува со 6% оцетна киселина (се додаваат порции од по 3 ml) се додека не дојде до потполно исталожување на жолт талог од хесперидин (потребно е околу 20-25 ml оцетна киселина).
- Жолтиот талог (хесперидин) се филтрира преку порцелански филтер (гуч) во кој се става предходно измерена квантитативна филтер хартија. Талогот се плакне со две порции од по 5 ml 6% оцетна киселина.
- Филтер хартијата со хесперидинот се суши на 105 °C, 1 час и се мери.
- Се пресметува приносот на екстракцијата (очекуваниот принос е околу 400 mg).

Идентификација на изолираниот хесперидин:

- околу 10 mg од изолираниот хесперидин се префрлаат во одмерна тиквичка од 10 ml и се раствораат во метанол на вортекс. Се снима UV спектар со метанол како слепа проба и се определува UV max (UV max треба да се јави на 285-290 nm со брег на 330 nm, а спектарот треба да има изглед како што е претставено на сликата 3.5.).



Слика 3.5. UV-Vis спектар на хесперидин во метанолен раствор

Пресметки, прилози и заклучок:

Асистент:

Вежба бр. 4

3.2.3. Оптимизација на ултрасонична екстрактивна процедура за екстракција на вкупни флавоноиди

Екстракција на вкупни флавоноиди може да се направи со примена на повеќе различни методи на екстракција. Најчесто се применува селективна екстракција со различни растворувачи, со растечка поларност. Изборот на растворувачот зависи од бројот на слободни ОН-групи и шеќерните остатоци во молекулата на флавоноидот. Добиените сурови екстракти се впаруваат до водена фаза, а потоа се фракционираат со течно-течна екстракција најпрвин со етер при што се екстрахираат слободните агликони, потоа со етил ацетат со кој се извлекуваат флавоноидните монозиди и на крај со бутанол со при што се екстрахираат флавоноидните биозиди.

Денес процесот на екстракцијата на вкупните флавоноиди, со цел брз скрининг и определување на содржината на вкупните флавоноиди, се изведува со екстракции што бараат многу пократко време за изведување, најчесто со примена на ултрасоничната агитација. Ваквата екстракција може да овозможи подготовка на екстракти за многу пократко време во однос на конвенционалните методи, но претходно е неопходно да се изврши оптимизирање на екстрактивната постапка.

Оптимизацијата во случај на ултрасонична екстракција во услови на константен однос растителен материјал/растворувач (1/100) подразбира утврдување на влијанието на неколку фактори врз приносот на екстракцијата, како што се степен на уситеноста на материјалот, температурата, бројот на фази во текот на екстракцијата (еднократна, двократна или трикратна екстракција), времетраење на екстракцијата, видот на екстрактивното средство и други фактори.

Оптимизација на ултрасонична екстракција на вкупни флавоноиди во однос на факторите:

- најпогоден растворувач (метанол, ацетон, вода, смеси итн.)
- време траење (15, 30, 45, 60 и 75 минути),

Утврдување на најпогоден растворувач:

ДЕН 1

Фаза 1

Во 5 мали ерленмаери се става по 0,25 g дрога и се екстрахира на ултразвучна бања 15 минути со по 25 ml од секој од наведените растворувачи (метанол:вода = 1:1, метанол:ацетон = 1:1, метанол, ацетон, и вода):

После секоја екстракција се филтрира во тиквичка од 25 ml и се дополнува со соодветниот растворувач до марката.

Проверка на ефикасноста на екстракцијата:

Во тиквичка од 10 ml се ставаат 4 ml дест.вода (може дејонизирана) и се додава 1 ml на екстракт. Во друга тиквичка од 10 ml се става 4 ml на дест.вода и наместо 1 ml екстракт се става уште 1ml на вода. Во двете тиквички паралелно се додаваат следниве реагенси:

- 0,3 ml (300 μ l) 5% NaNO₂ се меша и се остава да стои 5 минути,
- 0,3 ml (300 μ l) 10% AlCl₃, меша и се остава точно 6 минути,
- 2 ml 1M NaOH и се дополнува со вода до цртчката.
- Се меша и се мери на апсорбанцата на 510 nm.

Со утврдување на највисоката абсорбанца се определува најпогодниот растворувач кој ќе се користи во понатамошната постапка за работа. Ако во фаза 1 се утврди дека најдобар принос на изолирани флавоноиди се добива со меша на растворувачи (на пр., 50% метанол), се преминува на фаза 2.

Фаза 2

Се постапува како во фаза 1, а се користат смеси подготвени во следниве соодноси:

- 1,5:1,
- 2:1, и
- 2,5:1.

ДЕН 2

Утврдување на време траење на екстракцијата:

Во 4 мали ерленмаери се става по 0,25 g дрога се екстрахира на ултразвучна бања со по 25 ml најпогоден растворувач утврден во фаза 1 односно во фаза 2, во траење од:

- 30, 45, 60 и 75 минути.

Постапка понатаму се изведува како што е наведено во фаза 1, вклучувајчи и определување на приносот на екстракција. Највисока прочитана абсорбанца е мерка за најсоодветно време за изведување на екстрактивната постапка.

Од добиените резултати се дефинира постапка за екстракција на вкупни флавоноиди во зададениот растителен материјал со што е извршена оптимизација на условите под кои екстракцијата треба да се изведува.

Растителен материјал за работа (5 групи студенти): цвет од камилица, херба од мајчина душица, лист од бреза, лист од рузмарин (жалфија), цвет од бозел.

Пресметки, прилози и заклучок:

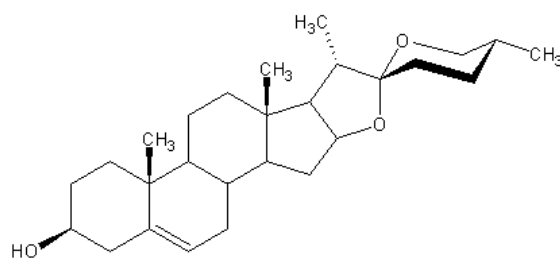
Асистент:

Вежба бр. 5

3.3. Екстракција на терпенски и стероидни соединенија

3.3.1. Екстракција на диосгенин од грчко семе

Грчко семе е име и на растението и на семето од едногодишно теревесто растение кое расте и се култивира во земјите од Медитеранскиот регион. Од растението се користи семето кое се карактеризира со присуство на слузи, протеини, масно масло, амински бази, стероидни сапонини и фитин. Стероидните сапонини на грчкото семе претставуваат комплексна мешавина од повеќе различни структури во кои доминираат хетерозидите на диосгенинот.



Слика 3.7. Диосгенин

Покрај другите активни компоненти што ги содржи, сапонините (диосгенинот) на грчкото семе, се одговорни за низа биолошко-фармаколошки дејства (ги стимулират метаболните процеси во организмот, го намалуваат нивото на шеќерот и на липидите во циркулацијата), поради што се препорачува неговата употреба при дијабетес, белодробни заболувања, воспалителни процеси на кожата и др. Сапонините од грчкото семе, особено чистиот диосгенин, се користат како појдовни природни производи во полусинтетското производство на стероидни лекови, стероидни хормони и контрацептивни средства. За овие цели, диосгенинот се изолира и од други природни материјали како што се ризомите од различните видови диоскорее.

Постапка за екстракција на вкупни сапонини (диосгенин):

ДЕН 1

- 50 g грчко семе се меле како фин прашок и се става во целулозна капсула во резервоарот на Сокслет апаратот.
- првата екстракција се изведува со 400 ml петролетер, 1 час. Петролетерскиот екстракт се префрла во сад за рециклирање за петролетер (содржи масни материји и други високо неполярни соединенија што не се потребни и пречат на понатамошната екстракција).
- втората екстракција (после сушењето на капсулата) се врши со 400 ml метанол, 2 часа.

- Добиениот метанолен екстракт се префрла во претходно исушен и измерен балон и потоа брзо се впарува до суво под вакуум. По сушење се мери балонот со суровиот сапонински комплекс и се пресметува приносот на екстракцијата.

ДЕН 2

- Цврстиот остаток од сурови сапонини се поврзува со рефлукс и екстрахира со 50 ml 80% етил ацетат, 30 минути. По ладењето се одвојуваат фазите цврста/течна и течниот дел внимателно се декантира и отфрла (во сад за рециклирање на етилацетат).
- Остатокот се раствора во 30-40 ml 90% метанол на ултрасонична бања, по што се филтрира.
- на филтратот капка по капка се додава ~ 50 ml ацетон, при што сапонините се таложат (преципитираат). По пренесување на целиот остаток добиениот преципитат се одвојува со филтрирање преку филтер хартија поставена на порцелански филтер (гуч) со вакуум. Се суши и се мери приносот на пречистениот сапонински комплекс.

Изолираниот диосгенин се идентификува со боена реакција со аниз алдехид, сулфурна киселина и етил ацетат и мерење на абсорбанцата на 430 nm.

Идентификација на диосгенинот:

- се подготвуваат два раствори за развивање на боја:
 - А - 0,5 ml p-p на аниз алдехид се меша со 99,5 ml етил ацетат, и
 - Б - 50 ml концентрирана сулфурна киселина се меша со 50 ml етил ацетат.
- половина од изолираниот диосгенин се раствора во 1 ml метанол. 0,2 ml од овој раствор се пренесува во тест туба (мала епрувета) и се меша со 2 ml етил ацетат, по што се додава по 1 ml од реагенсите А и Б и добро се промешува.
- тест тубата потоа се става во водена бања загреана на 60 °C, 10 минути, за развивање на боја, а потоа се лади во водена бања на 25 °C.
- абсорбанцата на обоениот раствор се мери спектрофотометриски, на 430 nm, спрема етил ацетатот како слепа проба.

Пресметки, прилози и заклучок:

Асистент: