



المحاضرة الثالثة

كيمياء العقاقير Phytochemistry

القسم النظري - الفصل الثاني

كلية الصيدلة

فصل وتنقية المركبات الفعالة

Isolation and purification of Natural products

تحتوي المستخلصات الخام على العديد من المواد والهدف هنا هو فصل هذه المواد كل على حدى ليتسنى دراسة كل مادة بشكل منفصل تتم هذه العملية بطرق الكروماتوغرافيا المختلفة.

1. تعطي نواتج التنقية فعالية محسوسة كما كان يعطيها المستخلص الخام وذلك لعدة امور أهمها
2. قلة تركيز المادة الفعالة بنواتج التنقية مقارنة بالمستخلص الخام.
3. قد يحتاج اظهار الفعالية الى أكثر من مادة تعمل سويا وقد تم الفصل بينهما
4. التغير الكيميائي للمادة الفعالة كالتأكسد والاختزال وغيرها.

إذا ما بخر المذيب المستخدم في الاستخلاص فإننا نحصل على مزيج من المركبات، حيث يتم فصلها بطريقة أخرى، وعملية الفصل هذه تعتمد على الخواص الفيزيائية والكيميائية لمكونات الخليط. يتم فصل وتنقية المركبات العسوية بواسطة التقطير أو بواسطة إعادة البلورة وهذه الطرق تستخدم للمنتجات الطبيعية، فمثلاً إذا كان هناك خليط من مركبات طبيعية إلا ان المركبات السائدة هي اثنين أو مركب واحد فإنه عندئذ يمكن الاعتماد على تقنية التقطير أو البلورة وفقاً لطبيعة المركب. ولكن الخلاصة النباتية تتكون من مزيج من المكونات لدرجة يصعب فصلها عن بعضها البعض بالطرق التقليدية لذلك نلجأ إلى طرق الفصل اللوني (الكروماتوغرافيا

(Chromatography)

1. كروماتوغرافيا العمود (CC) column chromatography
 2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin-layer chromatography
 3. الكروماتوغرافيا الورقية (PC) Paper Chromatography
 4. التقريق اللوني على الطبقة الرقيقة عالي الأداء HPTLC
 5. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC
 6. الكروماتوغرافيا الغازية Gas Chromatography
- جميع طرق الكروماتوغرافيا تعتمد على الفعل المتبادل بين أطوار متحركة **Mobile phases** قد تكون غازية أو سائلة، وأطوار ساكنة **Stationary phases**. وتكون في الغالب صلبة أو

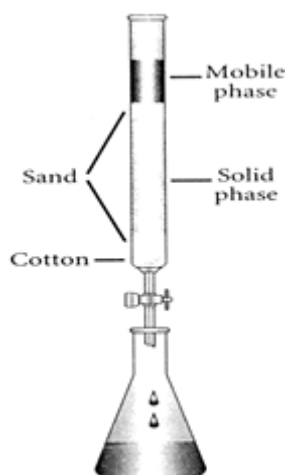
سائلة. فعند تماسّ الجسم الصلب مثلاً (الطور الساكن) مع غاز ما (طور متحرك) يجذب سطح الجسم الصلب جزيئات المادة في الطور الغازي الملامس له، مما يؤدي إلى تركيز المادة على سطح المادة الصلبة. ومن أهم المواد الصلبة المستعملة لهذه الغاية السيلكا جل والألومينا، وأحياناً الفحم الفعّال .

كما ان اختيار الطور المتحرك لتحريك مكونات المزيج خلال عمود يجب ان يتناسب مع قطبيتها، بحيث يتدرج الاستخدام من المذيب غير، إلى المذيب ذي القطبية المعتدلة، ثم إلى المذيبات القطبية.

- كروماتوغرافيا العمود (CC) Column Chromatography :

تعتمد إمكانية فصل المركّبات بهذه الطريقة على حركة الوسط المتحرك (السائل) خلال الوسط الثابت (الصلب) الذي يملأ العمود.

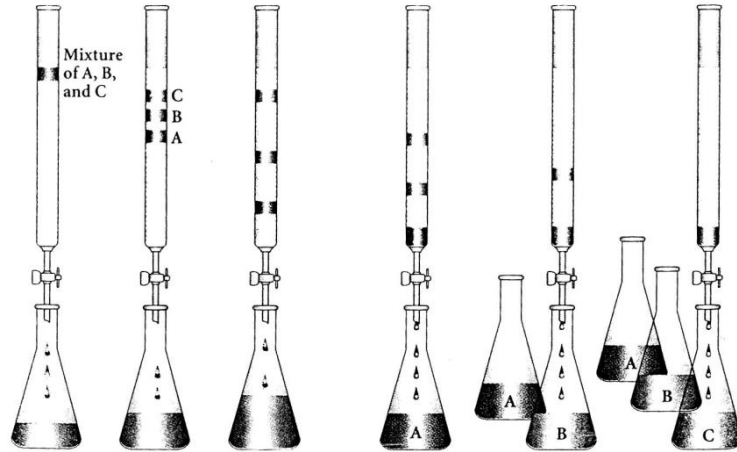
تُوضَع كمّيّة من المادّة المراد فصلها في أعلى سطح المادة الصلبة، ويمرّر الطور المتحرك عبر الطور الساكن دافعاً معه المزيج إلى الأسفل .



وهكذا يفصل المزيج إلى عصابات أو حلقات يدفع بها المُحل للخارج، فتجمع القططات المختلفة وتبخر للحصول على مكونات المزيج. وكما أشرنا سابقاً فإن عملية الفصل بالعمود الكروماتوغرافي تعتمد بشكل أساسي على طبيعة المواد المكونة للمزيج والطور السائل المستخدم. فالمركّبات القطبية كالكحولات والأمينات والحموض الكربوكسيلية تدمصها المادة الصلبة بشدة، وبالتالي فإن تحركها يكون بطيئاً في الطور الساكن هذا، في حين أن المركّبات اللاقطبية كالفحوم الهيدروجينية لا تدمصها المادة الصلبة، وبالتالي تتحرك بسرعة ضمن الطور الصلب أو مزائج المُجَلات المناسبة لتحقيق فصل أفضل.

ولتحقيق فصل جيد يجب أن يكون المُحل المستعمل أقل قطبية من المواد المكونة للمزيج المراد فصله.

وقد تُستعمل المحلول الواحد كطور متحرك لفصل أو تنقية المواد أو مزيج لمحلولين أو أكثر. ونستعمل أولاً الشريحة الكروماتوغرافية الرقيقة عادة لتحديد نوع المُحل، أو مزيج المُحلات المناسب، خصوصاً إذا كانت المادة (أو المزيج) يتم فصلها لأول مرة.



يُجمع السائل الخارج من العمود في أنابيب مختلفة يجري فحصها وجمع مكوناتها المتماثلة ثم تبخيرها للحصول على المواد المطلوبة بشكل نقي، ويستعمل لهذا الغرض حالياً جهاز خاص لتجميع القطرات يسمى **Fraction collector**.

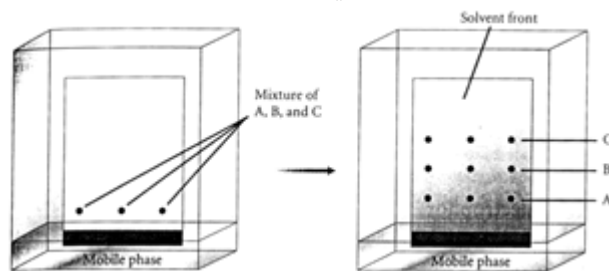
وأحيانا تستخدم الضغط العالي مع هذه الطريقة فتسمى (HPLC)

– كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة: (TLC) Thin layer Chromatography

تستعمل هذه الطريقة لمعرفة مدى تقدم التفاعلات الكيميائية أو لمعرفة عدد المركبات ضمن مزيج معين ومقارنتها مع مركبات معلومة، وكذلك لفحص القطرات الناتجة عن العمود الكروماتوغرافي.

ويشكل الطور الصلب المؤلف من السيلكا جل طبقة رقيقة تُطلى في الغالب على شرائح زجاجية أو ألومنيوم.

يُنقَط المزيج المراد فصله بواسطة أنبوب شعري على أسفل الشريحة ويترك للتبخّر ويُحدّد مكانه، ثم يُوضع في زجاجة تحوي على المُحل المناسب (طور سائل) ويبدأ المحلول بالصعود بالخاصة الشعرية حتى النهاية تقريباً، وتحدد النهاية التي وصل إليها المُحل.



وتحسب قيمة R_f من العلاقة:

$$R_f = \frac{r_s}{r_e}$$

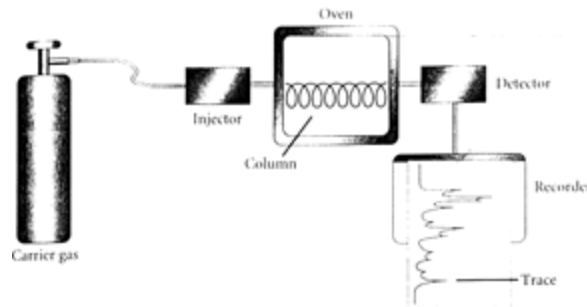
حيث r_s = المسافة بين بداية وضع العينة في الأسفل والمكان الذي وصل إليه المركب.
 r_e = المسافة بين بداية وضع العينة في الأسفل والمكان الذي وصل إليه المحلول في مقدمة الشريحة .

وهكذا تتحرك المركبات المشكّلة للمزيج بسرعات، إذا كان المزيج مكوناً من مركبات ملونة فيمكن تمييزها مباشرة أو يتم إظهار الشريحة الكروماتوغرافية الرقيقة بطرق مختلفة:

- (1) **طريقة الأشعة فوق البنفسجية:** حيث تُعرض الشريحة للأشعة تحت البنفسجية من أجل المركبات التي تبدي امتصاصاً لهذه الأشعة.
- (2) **طريقة الإظهار باليود:** توضع الشريحة ضمن زجاجة مغلقة تحوي بضع بلورات من اليود حيث تعطي أبخرة اليود أثراً على شكل بقع بنية عند مواقع المركبات.
- (3) **طريقة بخّ الشرائح كيميائياً:** تبخ الشرائح التي لا يمكن إظهارها بالطرق السابقة بمزائج خاصة مثل كلوروفلوروسين المذاب في الميثانول، أو مزيج من محلول كحولي للناينهيدين مع حمض الكبريت، ثم تعرض للحرارة لرؤية مواقع المركبات حيث تظهر على شكل بقع مختلفة اللون

- الكروماتوغرافيا الغازية (GC):

ساعدت طريقة الكروماتوغرافيا الغازية على التحليل الكمي والكيفي للمركبات الكيميائية وخاصة ذات درجات الحرارة المنخفضة نسبياً. وتعتمد هذه الطريقة على فصل مزيج مركبات بين الطور الصلب أو السائل (الساكن) والطور الغازي (المتحرك)، وتعتمد بشكل أساسي على الاختلاف في ادمصاص المركبات المشكّلة للمزيج بشكل متباين على سطح الطور الساكن. وهكذا فإن جزيئات المركب الأكثر ادمصاصاً على سطح الجسم الصلب تمكث زمناً أطول من جزيئات المركب الأقل امتصاصاً. وعلى هذا الأساس يستند مبدأ الفصل الكروماتوغرافي لمكونات مزيج عضوي. وهناك أجهزة متنوعة ومتطورة تُستعمل في عمليه الفصل الكروماتوغرافي الغازي، ولكن المبدأ متشابه.



(رسم تخطيطي لجهاز الكروماتوغرافيا الغازية)

تتم عملية الفصل بالكروماتوغرافيا الغازية وفق المراحل التالية:

أ- تحقق عادة عينة المزيج المراد فصله في فتحة خاصة بالجهاز **Injector**، وتسخن بواسطة لهب خاص متحولة إلى غاز.

ب- تجرف أبخرة العينة إلى العمود الكروماتوغرافي بواسطة غاز حامل **Carrier gas** غير فعال وتتحرك ضمن العمود بسرعات مختلفة فتندفع المركبات الأقل ادمصاصاً بسرعة في العمود **Column** الموضوع ضمن فرن **Oven** بدرجات حرارة محددة في حين تتحرك المركبات المدمصة ببطء وبسرعات متفاوتة.

ج- تصل المركبات المتطايرة أولاً فتصادف كاشفاً خاصاً يتحسس وصولها ويرسل إشارة كهربائية تنتقل عبر مضخم لترسم مخططاً كروماتوغرافياً أو ترسل إلى معالج رقمي يبين الزمن الذي قضته المادة ضمن العمود، ويسمى **زمن الاحتباس**، أو تسجل على راسم خاص **Recorder**. ويتأثر زمن الاحتباس بطبيعة وكمية الطور الساكن وسرعة تدفق الغاز الحامل ودرجة الحرارة ضمن العمود وطوله.

وهكذا تُستعمل الكروماتوغرافيا الغازية لمعرفة المواد المكونة لمزيج ما، ونسب هذه المواد وإمكانية فصلها.

وبشكل عام فإن المركبات القطبية تسري ببطء شديد ضمن العمود الكروماتوغرافي ، ويستعمل غاز الارغون أو الآزوت كغاز حامل يقوم بدفع أبخرة العينة ضمن العمود ولا يتفاعل معها .

- الكروماتوغرافيا الورقية **Paper Chromatography (CC)** :

استُخدمت هذه الطريقة في البداية لفصل الكميات البسيطة من الحموض الأمينية والسكريات. وهي تشبه في مبدئها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بفارق استخدام ورق ترشيح مسامي كطور ثابت.

نضع على الورق السفلي نقطة من المحلول المراد فصله، ثم نضع الورق ضمن حوض زجاجي يحتوي على المذيب (الطور المتحرك). ويتحرك المذيب ببطء إلى الأعلى، ويدفع مزيج المواد معه بسرعات مختلفة حسب عامل توزيع كل منها (**R_f**). فالمواد المحبة للماء والمحلات القطبية مثلاً تتحرك بسرعة، بينما تسير المواد الدفوعة للماء ببطء، مما يسمح بفصل المواد المكونة للمزيج بعضها عن البعض.

إن هذه الطريقة تُمكننا من أخذ فكرة سريعة عن مكونات مزيج ما، كما تستعمل أحياناً لفصل مكونات المزيج، خصوصاً إذا كانت الكميات محدودة.

طرق التعرف على البنية الكيميائية للمنتجات النباتية: **Identification of natural products**

الطرق المتبعة الني يمكن ان نتبعها لمعرفة تركيب مركب طبيعي هي الطرق نفسها المتبعة لمعرفة بناء مركب عضوي وهي الطرق الفيزيائية والكيميائية وطرق التحليل الطيفي.

1- الطرق الفيزيائية Physical methods

- i. تعيين درجة الانصهار أو درجة الغليان
- ii. الذوبانية والرائحة
- iii. قياس الفعالية الضوئية.

2- الطرق الكيميائية Chemical Methods

وهنا يتم إجراء التفاعلات التي تحدد هوية المجموعات الفعالة الموجودة ببناء المركب الطبيعي، ويمكن ان يتبع ذلك تحضير مشتقات المركب.

3- طرق التحليل الطيفي: يستخدم في وقتنا الحاضر الطرق الفيزيائية الحديثة، وذلك بغية التعرف على بنية المركبات العضوية، هذا بالإضافة إلى ما يجريه من طرق تقليدية، ولقد برز الدور المهم لهذه الطرق في التعرف خاصة على المركبات الطبيعية المعقدة البناء وسنذكر هنا اهم الطرق الفيزيائية المعمول بها حالياً ومنها:

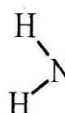
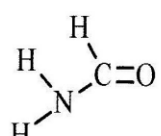
الأطياف الالكترونية:

لما كانت الأطياف الالكترونية جلية في التعرف على جزيئات المركبات العضوية التي تحوي مجموعات فعالة بها الكترونات حرة، او تلك الجزيئات التي وعلى الأخص التربينات التي يتميز معظمها بوجود الروابط المضاعفة في بنيتها.

❖ أطياف الأشعة تحت الحمراء IR :

على الرغم من أن أطياف الأشعة تحت الحمراء (IR) لمركب ما، لاتمكن من معرفة الصيغة البنائية لهذا المركب إلى انه يمكن جمع المعلومات الكثيرة من واقع هذه الأطياف التي تقوم بتشخيص المجموعات الوظيفية، ومن هنا فإن هذه الوسيلة الطيفية تعتبر من أحد الوسائل التي تساعد في توضيح بنية المركبات العضوية. ولن نتعرض هنا إلى الناحية التفصيلية بصدد تفسير أطياف IR للمركبات لاعضوية إلا أننا نورد الجدول التالي الذي يحوي موقع انتصاص IR لأهم المجموعات الوظيفية الشائعة:

مواقع امتصاص IR لأهم المجموعات الوظيفية الشائعة

كثافة الحزمة الطيفية	موقع امتصاص الحزمة الطيفية (سم ⁻¹)	الرابطة
قوية	3970-3850	C-H الألكانات
متوسطة الشدة	3090-3010	C-H الألكينات
قوية	3300	C-H الأستيلينات
متوسطة الشدة	3100-3010	C-H المركبات العطرية
متغيرة الشدة	1670-1610	C=H الألكينات
متغيرة الشدة	1600-1500	C=H المركبات العطرية
متغيرة الشدة	2260-2100	C≡H الألكاينات
قوية	1360-1180	 أمينات، إيمينات
قوية	2280-2120	C≡N نيتريلات
قوية	1300-1050	كحولات، إيثرات، أحماض كربوكسيلية، أسترات C=O
قوية	*1780-1650	ألدهيدات، كيتونات، أحماض كربوكسيلية، أسترات
متوسطة الشدة	3540-3200	 أمينات، أميدات الكحولات، الفينولات - H-O
حادّة متغيرة الشدة	3650-3590	(غياب الروابط الهيدروجينية)
عريضة متغيرة الشدة	3600-3200	(وجود الروابط الهيدروجينية)
عريضة	3200-2700	الأحماض الكربوكسيلية

* الاكتونات الرباعية و كلوريدات الأحماض تمتص مجموعة الكربونيل فيها عند $\approx 1820 \text{ سم}^{-1}$

❖ أطيف الطنين النووي المغناطيسي NMR

بالمقارنة للوسائل الطيفية آنفة الذكر، فإن أطيف الرنين النووي المغناطيسي تعطي معلومات أوفر عن البنية التركيبية للجزيئات العضوية وعلى الأخص عن الهيكل البنائي للمركب. وهناك العديد من النوى التي تتمتع بخواص مغناطيسية أي يمكن دراستها بواسطة ظاهرة الطنين المغناطيسي، إلا أن أطيف الطنين النووي المغناطيسي للبروتونات (H) والكربون ^{13}C ، أوسعها تطبيقاً، نظراً لما تقدمه من معلومات تفصيلية عن بنية المركبات العضوية.

❖ أطيف الكتلة Mass spectroscopy

تعطي أطيف الكتلة من الطرق الفيزيائية الجيدة التي تقدم المعلومات الجمة عن بنية المركبات العضوية إذ يمكن يتمكن دارس الكيمياء العضوية، وفقاً لهذه الطريقة، من تقدير الوزن الجزيئية بواسطة جهاز يدعى مطياف الكتلة الذي يمكن بواسطته قياس طيف الكتلة لمادة عضوية في بضع دقائق، وبصورة دقيقة يتم الوزن الجزيئي لهذه المادة مقارنة بالطرق الأخرى المألوفة لتقدير الأوزان الجزيئية.

❖ طيف الأشعة فوق البنفسجية UV spectroscopy

