

Ўзбекистан Республикасы жоқары ҳам орта арнаўлы билимлендириў
министрлиги

Қарақалпақ мәмлекетлик университети

Химия-технология факультети

«Физикалық ҳәм коллоид химия» кафедрасы

Абдуллаева Сарбиназдың

5440400 – Химия бағдары бойынша бакалавр дәрежесин алыў ушын
«Жүзимниң Қарақалпақстанда өсетуғын айырым түрлериниң
тухымларындағы полифеноллар курамын үйрениў» темасындағы

ПИТКЕРИЎ ҚӘНИГЕЛИК ЖУМЫСЫ

Басшы: «Физикалық ҳәм коллоид
химия» кафедрасы доценти,
х.и.к.

А.Пирниязов

Кафедра баслығы: х.и.к.

А.Пирниязов

Нөкис - 2014

Мазмуну

Кирисиў	5
1. Әдебият мағлыўматлары	4
1.1. Катехинлер ҳаққында қысқаша мағлыўмат	4
1.2. Полифенол бирикпелерди бөлип алыу усыллары	7
1.2.1. Өсимликлердеги феноллы бирикпелерди ажратыудың экстрациялық усылы	8
1.3. Колонкалы хроматография усылы	10
1.4. Кагаз хроматографиясы усылы	13
1.5. Дубил затлардың спектроскопиясы	17
1.6. 1.6. Изертлеўдиң спектрал усыллары	24
2. Алынған нәтийжелерди талықылаў	30
3. Тәжирийбе бөлими	35
3.1. Ванилин реактивин таярлаў	35
3.2. ?Берлин көги? реактивин таярлаў	35
3.3. Проантоцианидинниң силтили гидролизи	36
3.4. Проантоцианидинниң кислоталы гидролизи	36
3.5. Проантоцианидинниң тиолитик гидролизи	37
Жуўмақ	38
Қолланылған әдебиятлар	39

Кирисиў.

Өсимликлер әлеминде биологиялық активликти көрсететуғын хәр қыйлы қурылысқа ийе химиялық бирикпелер ушырасады. Солардың арасында полифенол бирикпелер қатарына жататуғын шийки терини қайта ислеўде қолланылатуғын бирикпелер дубил затлары белгили орын тутады.

Тәбий дубил затлары бир неше компонент бирикпелерден қуралып, олардың қурамындағы тийкарғы химиялық бирикпелер проантоцианидин бирикпелердин олигомер хәм полимер флаванлар ямаса флаван 3-оллар болып табылады. Проантоцианидин бирикпелери бир неше мономер катехинлер ямаса флаван 3-оллардың бир бири менен А халқасындағы С-4 углерод атомы менен В халқасындағы С-6 углерод атомы менен углерод-углеродлық байланыс пенен байланысқан олигомер ямаса полимер бирикпелер болып табылады. Дубил затлардың бирден-бир әхмийетли тәрәпи, олардың шийки терини былғаў қәбилети болып табылады. Олар өсимликлерде әхмийетли орын тутады. Сондай ак өсимликлерден алынған биологиялық актив қосымталардың тийкарғы қурам бөлеги болып табылады. Ақырғы ўақытлары томен молекуляр массаға ийе проантоцианидинлер өзлериниң хәр қыйлы биологиялық активлиги атап айтқанда, атеросклерозға қарсы хәм еркин радикалларды жойыў қәбилети арқалы илимпазлардың қызығыўшылығын арттырады.

Химиялық тәрәптен бул бирикпелерди анықлаўдың хәр қыйлы усыллары усынылған. Олардан ванилин реактиви усылы, бутанолда дуз кислотасы араласпасы менен полимерлерди изоляциялаў усылы, р-диметиламино цианнаматальдегид реакциясы, Фолин-Чокальто усылы көплеп қолланылады. Фолин-Чокальто усылы фенол гидроксил топарларының күшин пәсейтириўге тийкарланған. Бул усыл жүдә специфик емес болып барлық фенол бирикпелерди анықлаўға қолланылады.

Жұмыстың **мақсети** проантоцианидин бирикпелерди Қарақалпақстан аймағында жетистирилетуғын жүзим өсимлигиниң дәнешели қурамында бар екенлигин ашып бериў хәм оларды үйрениў болып табылады.

Үйрениўде хәм изертлеў өткеріў ушын тийкарғы мақсетимизге ерисиў ушын өз алдымызга төмендеги ўазыйпаларды белгилеп алдық:

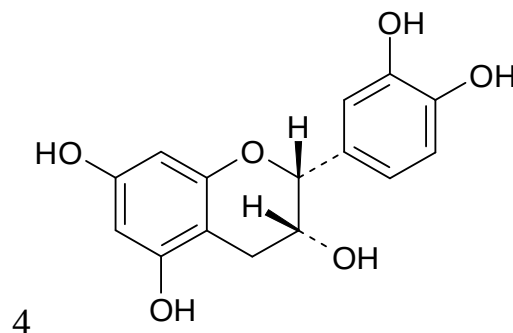
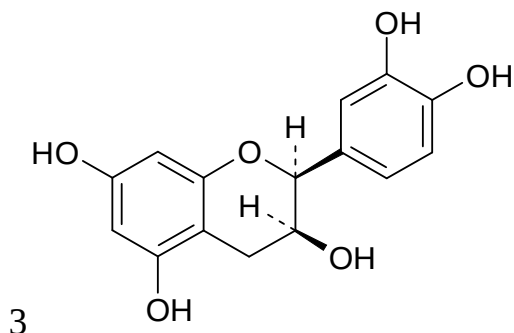
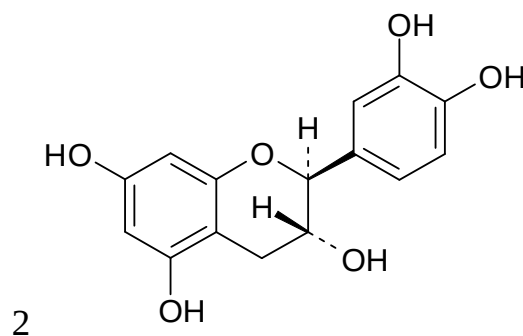
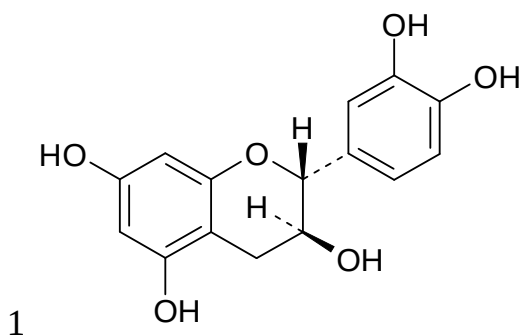
1. Үйрениў объекти болған проантоцианидин бирикпелерди ажыратып алыў;
2. Алынған бирикпелерди хроматографиялық жол менен идентификациялаў;
3. Химиялық усылларды қолланып қурам бөлеклерге ажыратыў хәм оларды үйрениў;

Питкеріў қәнигелик жұмысы мазмұны, әдебиятлар шолыўы, алынған натийжелерди талқылаў, тәжирийбелер бөлими, жуўмақ хәм пайдаланылған әдебиятлар бөлимлеринен ибарат.

1. Әдебий шолыў.

1.1. Катехинлер ҳаққында қысқаша мағлыўмат

Катехинлер – булар реңсиз бирикпелер, өзінде еки ассиметрик углерод атомын (C-2 ҳәм C-3) тутады, сонлықтан катехинлердиң ҳәр бири төрт оптик изомер менен көрсетилиўи мүмкин: (+)- катехин (1), (-)-катехин (2), (+)-эпикатехин (3), (-)-эпикатехин (4) ҳәм еки рацемат түринде болады.



Бир-биринен изомерлер тек ғана физикалық қәййетлери бойынша емес, ал биологиялық тәсири, өсимликлерде ушырасыўы менен өзгешеленеди.

Өсимликлерде еки изомер түри көп тарқалған: (+)-катехин ҳәм (-)-эпикатехин, сондай-ақ олардың галлоил эфирлери, метилленген, гликозилленген тәбиий туўындылары.

Кейинги жылларда өсимликлерде басқаша эфирлери де түрлери ушырасқан. Өсимликлердиң изертленген барлық бөлимлеринен катехинлер табылған: жапырақларда, пақалында, тамырының ҳәм пақалының қабығында, гүллеринде, туқымы ҳәм мийўелеринде [4]. Өсимликлердиң

раўажланыўының басланғыш фазасында олардың бөлімлерінде флаван-3-оллар көп болады. Кейінгі өсіуінің фазасында олардың мұғдары пәсейеди, ал проантоцианидинлердің мұғдары өсип барады. Катехинлар белоклар менен водород байланыслар дүзиўге уқыплы, соның менен бирге белоктың β -формасын стабиллейди. Олар буннан тыскары антикоагулянт сыпатында биологиялық активлик көрсетиўи мүмкин. Баска флавоноидлар менен бир қатарда катехин витамин Р қәсийетлерин көрсетеди.

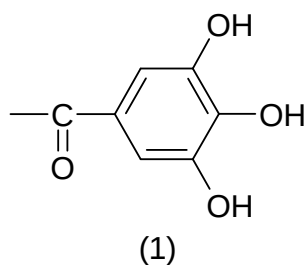
Катехинлер күн жақтысы хам қыздырғанда аңсат окисленеди. Әсиресе, катехинлердің окислениўи силтили орталықта хам окислеўши ферментлердің тәсиринде (фенолоксидаза хам пероксидаза) тез өтеди.

Лейкоантоцианидин молекуласы үш ассиметрик углерод атомын өзінде тутады (C-2, C-3 хам -4), сонлықтан лейкоантоцианидинлердің хәр бири сегиз изомер хам төрт рацемат көринисинде болыўы мүмкин. Лейкоантоцианидинлер реңсиз, әдетте аморф бирикпелер. Суйылтырылған минерал кислоталар менен қыздырылғанда ашық реңли антоцианидинлерди пайда етеди. Лейкоантоцианидинлер суўда, этанол, ацетонда жақсы, этилацетата аз ерийди, катехинлерден тыскары диэтилэфирде еримейди.

1.2. Полифенол бирикпелерди бөліп алыу усуллары

Дубил затлардын курам болеги болган фенол бирикпелердин сапа курамын аныклаудын коплеген турлеринин бири булл жука кабатлы хроматографиясы болып табылады.

Коплеген галлоил (1) топары жалганган танинлерди кислоталы системаларда уграслаганда таза метчиклерди колланыу тийкаргы фактор болып есапланады. Себеби бундай жагдайларда танинлер анык айкынланбайды



Танинлерди полиамид хэм селикагельдин жука кабатындагы хроматографиясын томендеги системаларда откизеди : Бензол – этанол (1:1); бензол – метанол – пиридин (80:10:5); бензол – этанол – пиридин (9:3:1); ацетон - суу – пирдин (100:20:5); [1,2] Соныда айтып отиуимиз керек, бул методлардын танинлерди уйренгенде эффекти томен болып есапланады, бирак, мономер фенол бирикпелерде баскаша болады. Осимликлерде танинлердин курамына маусимлик озгерислер тасир етиуи белгили [3. 4] Осимлик танинлеринин курамын аныклау ушын кейинги уакытлары жокары басымдагы суйыклык хроматографиясы (ЖБСХ) усылы колланылмакта [5 . – 16]. Бул усылды биринши марте Т.Окуда колланган [17 – 19].

ЖБСХ характерли тарепи сонда, бунда еритпелердин аз мугдарын колланыу (1-6 мл) хэм олардын киши концентрациячын (0,1 – 0,5 г.мл) сондай – ак аныклау тезлиги (20 – 30 мин) ЖБСХ усылы ажратып алып болмайтугын бирикпелерди жеткиликли мугдарда хэм зарур препарат пенен

жокары дарежеде тазалау, хэм усы колланып атырган процести анализ етиу барысында ишки стандартлардын жетиспеушилиги менен тамамланда. Дубил затлардын араласпасынан болек бирикпелерди ажыратып алып аныклауда жетиспеушилике карамастан калонналы хроматография тийкаргы усыл болып калады.

Конденсирленген танинлерди ажратып алыуда колонкалы хроматографиясында сафадекс G-25 элюция 50 % ли суулы ацетон колланылады.

Дубил затларды болип алыу хэм ажратыуда кен турде колонкалы хроматография баска адсорбентлер—целлюлоза хэм полиамидте колланылады.

1.2.1. Осимликлердеги феноллы бирикпелерди ажратыудың экстракциялык усылы

Кандай да бир затты ямаса затлар топарын ажратып алыудын ен коп колланылатугын хэм колайлы усылы осимлик затын еритпе (экстракция) халына келтириу.

Блажей хэм Ковар (20) диэлектрикли тураклы еритпелерден мугдарга багынышлы экстрактлы затлардын хар турли дубил экстрактларда колланды.

Дубиллик экстрактларды органикалык ериткишлерде экстракциялаў шығымы

Дубили экстракт	Колланылып атырган ериткишке карап экстрактлы затлардын мугдары % те кургак калдыктан						
	бензол	эфир	хлорформ	этилацет	ацетан	этанол	метанол
Квебрахо	0,29	0,38	0,65	15,0	78,7	93,4	91,4
Ель	0,41	0,59	0,78	4,8	29,8	40,1	64,2

Мумаза	0,20	0,56	0,69	4,9	72,4	83,2	88,2
Каштан	0,30	0,47	-	-	-	37,3	77,3
Кайын	0,32	0,52	-	-	-	31,1	50,5

Таблицада экстрактлы затлардын мугдары диэлектрикли тураклы еритпе менен бирге котерилгенин коремиз, буган себеп хар турли полярлык. Демек араласпа курамында (экстракция) хар кыйлы. Араласпадагы компонентелрди кундай да бир еритпелер менен шыгары мумкин емес мысалы, егер оны алдын – ала дурыслап тазаласак, онда тек бизке керекли экстрактланган калдыктан улги алыуга болады. Сонда даслеп липидли курамлы болимлер, полярсыз еритпе петролей эфири жогалады

Блажей хэм Ковар затлар бундай типтеги экстракцияда бензолды колланыуды усынады, бунда барлык полярсыз затлар жгалады.

Беккер хэм Курт бензол экстрактынан гексаннын жогалыуын алып барды. Жане де бул авторлар бензол экстракциясынан этанал эфирин затларды кызыл ренге экстрактлайтын флавоноидлар фенолокиалоталар : сонынан ыссы сууда дубил затлар хэм флабафенлер, кантлы смолалар хэм жокары конденсирленген дубил затларды тазалауды усинды.

Блажей усынылган боягыш зат усылына этил эфири экстракциясын жибередиди, эпиуайы фенолы бирикпелер, дубил затлар, дубил емес полифеноллар, моносахаридлер олигосахаридлер хэм баскада спирте ерийтугын затлар этаналда жок болады. Оннан кейин ыссы суда тазалайды. Этанол мен бирге метанол, базыда ацетон колланылады, кейининен хроматографияда колланыу ансат хэм тазалау колайлы болады.

1.3. Колонкалы хроматография усылы

Бул хроматография усылы флавоноидларды изертлеу аркалы баска хроматографиялы усыллардан бурын киргизилди хэм кеннен уйренилди. Колонкалы хроматографиянын кагаз хроматографиясынан айырмашылыгы белили усыллары хэм эдетлери, мысалы адсорбентти сайлау хэм таярлау, ериткишти майлап алыу, онын кириу тезлиги, корсетиу усылын сайлау булл барлык техникаларды озлестириу ушын коп уакыт керек. Биракта колонкалы хроматографияда кристаллык затты араласпадан улгисин ажратып алыу биршама мугдарлыкты – бирнеше миллиграмнан бирнеше граммга дейин корсетеди. Усы усыл менен флавоноидлардын барлык типин, сонын ишинде антоцианинлер, катехинлер, флавононлы хэм флавонононлы англиконлар хэм гликозидлер, изофлавононлар. Флавононлар, халконлар, ауронлар, лейкоантоцианинлер хэмде метиллирленген туындыларында ажратып алган. Алдын ала флавоноидлы бирикпелердин болимин органикалык емес ямаса суда жаксы ериуинен органикалык затлардан полиамидин ямаса ион алмасатугынын колонка аркалы суулы соргышка киргизууге болады.

Копшилик уакытлары фенолы бирикпелерди эпиуайы, классификациялык усыл менен мысалы элстракцияны тундыруу жаксы нәтийжелерди корсеткен

Феноллы бирикпелерди колонкалы хроматографияда колланылганда полиамид, силикатель целлюлоза кукини хэм ион алмасыушы смола колланылады. Катекс смоласы осимлик экстрактын алдынан тазалауда колайлы, ол барлык суудагы флавононлы бирикпелерди жутады, Сонда дузлар хэм кислоталар коп мугдарда суда тазаланып жууылганда жок болады.

Глюкозидлерди дэслеп суулы спиртли колонкада элюирлейди мыссалы 20 % ли изопропил, оган 95 % ли англикон спирти комегимен тазаланады. Бундай усыл менен флавоноидлы бирикпелерди мийуелери, жапырак, агаш

хәм онын кабыгынын экстрактынан болип алады. Бунын ушын смолага амберлитлер дауекс хәм аналоглары косылады. Бул толықтырыушы тип пенен флавоноидлар металлдын дузларын таркатыуда колланыуга болады, бундай еркин фенолларды металл ионларынан спирт пенен жууы аркалы алынады. Силикагелди болистириуши хроматографияда антоцианидинлер хәм баска флавоноидларга колланыуга болады. Антоцианидинлер ушын тыныш фаза сыпатында фосфор кислотасынын 10 % ли суулы еритпеси алынады, ал айластырыу элюирлеу ушын органикалык еритпелер, мысалы, бутанол сирке кислотасы хәм суу араласпасы (4 ; 1 ; 5) колланылады. Силикагелде ыгал эфир мен ямаса этилацетан хәм 4 хлор углерод араласпасы менен) жууы хәм элюирлеуде дубил затлар хәм катехинлер жаксы ажралады. Ол флавононлар ушын эффектив емес. Флавононлар хәм флавононлар гликозидлер ушын силикагелдин орнына сентетик гидратланган препараты магний кышкыл кремнийди колланыуга болады. Оны биринши гезекте флавононлар, флавононлар, флавононлар хәм олардын гликозидлерин осимлик экстрактлеринен ажратуу хәм тазалауда сондай – ак метили туындылар халконлар хәм антоцианинлерден ажратууда колланылган. Нейтроллы фенолы хәм кислоталы болимлерди онын болистириуге мысал сыпатында томендеги усулды корсетиуге болады :

а) Томендеги элюотроплы катарды колланып нейтралы болимди силикагель менен колонкада ажырытылады : петролей эфир – петролей эфир : толуол 1 : 1 – толуол – толуол: метанол 100 : 3 – 20 : 1 – 10 : 1 – 1: 1

б) Фенолы болим ушын : хлорофорл : метанол : сирке кислота 100:0:0 – 100:1:0 – 100:100:3:0 – 100:10-1–100:20:2.

Инерт тутыушы сыпатында болистириуши хроматографияда кукин таризли целлюлозань флавоноидлардын барлык типии ушын ериткишлерди кен топлап кагаздагы хроматографияда колланыуга болады. Кышкыл суулы спиртлерди кобинесе антоцианидинлер ушын коланады ал бутанол – баска флавоноидлар ушын коланылады. Целлюлозды колонкадон бояушы затлардан кант хәм осимлик экстрактлеринен ажыралган баска хәм осимлик

экстрактлеринен ажыралган баска бирикпелерден ажратыуда хэмде бояушыларды фракцияларды пайдаланыуга болады. Булл колонкаларды антоцианинлер, лейкаантоцианинлер, фловонлар катехинлер, дубили затлар ушын бирак ен биринши гезекте флавоноидлар, флавоноидлар, флавоноидлар хэм олардын гликозидлери ушын колланылган.

Полиамид – булл копсандагы экстракт онимерин ажратыу ушын хэм флавоноидлар, дубилли затлар хэм баска фенолы бирикпелерди алдын ала ажыратыуда колайлы адсорбент есапланады. Бунын себеби, феноллык гидроксид хэм амидли топар арасында водород байланысынын пайда болуу мумкиншилиги болып бундай колонкалар эпиуайы адсорбционга караганда 100 есе улкен сыйымлылыкка ийе.

Перколяцияны кушейтиу ушын полиамид пенен целлюлоза кукинин араластырыу керек. Бунан тыскары помалидти осимлик экстрактлары алынатунын суулы спиртли хэм ацетонлы еритпелер ушын колланыуга болады. Копшилик флавоноидларды ренине карап коринетугын ямаса ультрафиолет нурда ашады. Буларда айрыкшалыкты боялмаган флавоноидлар, катехинлер изофлавоноидлар курауы мумкин. Оларды колонкада сайкес реактивлер ямаса тамшы усыл элюатлар жәрдемінде ашыуга болады. Реагент сыпатында диазоны дузлары ванилин. Ванилик кислотасы, темир татыражы, хлорлы темир хэм кызыл хан дузы араласпасы колланылады.

Колонкада ажыралган курам болеклерди жуууу аркалы ажыратылады. Егер жуууу процеси кушсиз болса жутыушы столбасын болеклерге кесип, олардын хар бири ериткишке салынады. Егер кристалл оним алыу керек болса, элюатларды вакуумда пууландырылады ямаса пууландырылады. Идентификация (уграслык) кобинесе қағаздагы хроматография параллель турде алдын – ала белгили улги спектраль методлар жәрдемінде, айырым жагдайларда белгили ренли реакциялар (мысалы, антоцианидинлер) жәрдемінде эмелге асырылады. Улыумаластырып айтканда колонкадагы хроматография коп мугдардагы феноллы бирикпелердин тазалау хэм ажыратыуда жарамлы есапланады. Ион алмасыушы смалалар хэм полиомид

осимлик экстракт онимлерин алдын – ара ажратыу ушын ал, полиамид топарлык болиу ушын хэм колай есапланады.

1.4. Кагаз хроматографиясы усылы

Кагаз хроматографиясы бир канша ширекиншиликлерге ийе болганлыктан бугинги кунде кен колланылмакта. Бирикпелердин озлеринин коринетугын (ямаса ультрафиолет) нурдагы рени ямаса реактивлер жардеминде тез пайда болады, ренлери кагазга хар кыйлы болатугын бирикпелерди ажратыуга мумкиншилик береди .

Аныклау жудэ тез болып, хеш кандай кыйын курылмаларды талап етпейди. Булл усыл эсиресе курамында жудэ аз мугдардагы хар кыйлы компонентлерди туткан араласпалар ушын колайлы компонентлерди туткан араласпалар ушын колайлы. Колонкалы хроматографиядан парыклы турде кагазда тикелей уграслауга болады, бирак, булл методтан ажыратыу ушын да колланыуга болады.

Усылды туры танлау, келтирилген шартлерге байланыслы болады . Эпиуайы хроматографиядан бир ериткиш пенен араласпасынын алдын – ала анализи ушын танлап алынган еритпелердин жарамлылыгын аныклау ушын колланылады. Оны жэне таза заттын идеитификациясы, онын R_f ын аныклау хэм белгили хэм белгисиз ямаса оларды араласпасын салыстырыу ушын колланыуга болады. Еки олшемли хроматография осимликлердеги фловонидларды уйрениу ушын колайлы себеби олар дерлик барлык уакытта бир – бирине характери уксас затлар араласпасы туринде ушырасады.

Курамында флавононлар хэм халконлар болган араласпаларды еки олшемли хроматографияларын талкынлауда жуда абайлы болыу керек .

Флавононлар баска фловонидлы компонеитлер менен комплекс пайда ететин айырым турдеги талыпыларды корсетиу мумкин. Жокарыда корсетилген колонкадагы кукин сыяклы целлюлоза менен бир катарда кагаздагы препаративлик хроматографияда колланылады, бунда кагаздагы старт сызыгы еритпелердин тамшылары точка сыпатында емес, ал, толык

сызык етип корсетиледи. Хроматографиядан сон алынган тамшы кесип алынады, хэм туры келиуши ериткиш пенен элюирленеди.

Агликонлар 95 % ли спирт пенен гликозидлер хэм флавоноидлар гидроксилерленген каптал шынжырлы 40 – 70 * С ли спирт пенен : антоцианидинлер кышкыл элюирлеуши агентлер 20 % ли сирке кислота менен жууылады. Спектрофотометриялык аныклау ушын салыстырыу еритпесин алыу ушын таза кагазды сол усыл менен элюирлеу керек копшилик жагдайларда ватман № 1 коп мугдарлы жумыс ислегенде ватман 3М хэм 3ММ кагазлары колланылады. Базыда кагазды алдын – ала корсетиуши агентямаса баратлы – фосфатлы, сыяклы буфер еритпелер менен ыгаллайды.

Осимлик экстрактын тиккелей суртиудин орнына алдын – ала хеорофил хэм липидли затларды эфир ямаса лиграил менен алыу колайлы. Ферментлерди кыздыруу аркалы дезактивлеуге болады. Базыда осимлик кислоталары менен гликозидлер, гидролизин алдын алыу ушын CaCO_3 косылады. Ериткишлерди сайлау коплеген факторларга байланыслы болады. Копшилик жагдайда бутанол – сирке кислота – суу 4 : 1 : 5 катынастагы араласпа хэм жкарыдагы кабатка 5 – 10 % ли этанол косылып колланылады. Базыда 6:1:2 катынас алынады. Сондай-ак – таза таяарлаган бутанол хэм 20 % ли сирке кислотасы 1 : 1 катынаста алыу усынылады.

Буфер еритпелер ямаса AlCl_3 пенен кайта исленген кагазлар ушын суу хэм бутанолдык араласпасын пайдаланыуга болады. Айырым типтеги флавоноидлы бирикпелер ушын суу поляр емес ериткишлер, дубил затлар ушын курамында бийсульфид болган ериткишлер колланылады. Дакты озине тан рен менен салыстырыуга болады : маселен : Антоцианидинлер де хпм кушли боялган ауронлы хэм халконлы бояушыларда ультрафиолет жактылык флавонононлар, изафлавононлар, катехнинлер, лейкоантоцианидинлерден тыскары барлык флавоноидлерди ажратыуга мумкиншилик береді. Бояуды реагент, пуулары тасиринде ямаса шашыратыу аркалы кушейтиуге болады. Концентрленген аммиак пуулары жудэ колайлы себеби, изертленип отырган затты сонынан кагаздан элюирлеуге болады. Эдетте флавоноидлардын

характеристикасы ушын омилшак пуулары хэм ультрафиолет нурлар жактылыгы менен шыгарыу жеткиликти. Шашыратыу халсиз болган затлар жагдайында колайлы. Усындай жол менен флавоноидларды $AlCl_3$ еритпеси менен шашыратып, лейкоантоцианидинлерди Антоцианинлерге айланганнан кейин, кислота менен шашыратып аныклайды.

Таза затларды еки усул жәрдемінде : еритпе хэм кристаллизация аныклайды. Флавоноидлы бирикпелер идентификасы 2 физикалык характеристика рен хэм кагаздагы жылысыуына (R_f манисине), байланысly. Идентификация тийкарынан флавоноид типин аныклау ягный онын гликозидли ямса англикон екенин аныклау хэм ренли реакция хэм R_f манисин бирнеше ериткишлерде гидроксил топарынын шамалау сонны менен белгиленеди. Сонында барлык уакытта белгисиз затты сыпатындагы белгили зат пенен салыстырыу зәрур. Егер булл усулда пайда бермесе. Бузыушы тәсирди колланыу керек, мәселен ацетилленген туындылардын силтили гидролизи, курамалы эфирлердин ферментативлик гидролизи, силтили балкытыу, лейкоантоцианидин дубил затлардын антоцианинге айланыуы. Таркалган онимди жане кагаз хроматографиясы және баска усуллар менен керекли нәтийжеге ериспегенше аныклайды.

Феноллык бирикпелерди аныклауда лигнинди изертлеуде таркалыу реакциясынан кейин колонкадагы хэм кагаздагы хроматографияны колланады. Энквиист томендеги шартлерди келтиреди:

а) Якко Халмекокси бойынша натрий молибдат ямаса вольфраматына толтырылган кагаз.

б) Фрейдберг Лейманд бойынша формамид хэм ксилол хэм метил этил кетон ериткишлерин толтырылган кагаз.

в) Формамидге батырылган кагаз, хлороформ ямаса лигроиннын 2 % ли ксилол араласпасы менен элюирлениуи

г) рН - хар кыйлы болган буфер оросфатлы еритпелер хэм курамалы болмаган шыгарыушы состав : 2 % ли сирке кислотасы, омилшактын спиртли еритпеси, бутанолга батырылган кагаз.

д) Унтак сыяклы полипролактам ямаса перлон менен толтырылган калонкалар ушын ериткиш сыпатында трассман бойынша метанолдын курамы отиуши суды колланылады.

е) Формалидге батырылган полипролакталимлы унтак пенен хлороформ ямаса баска ериткишлерде формалидти араластырылмаган халда элюирлегенде жаксы нәтийжеге ерисилди.

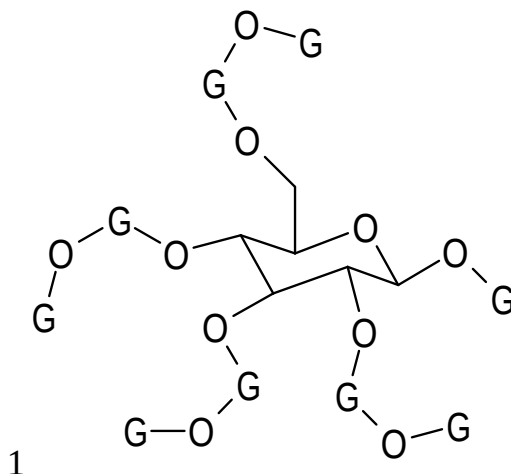
1.5. Дубил затлардың спектроскопиясы

Өсимлик дубил затларын колориметрик үйрениу кең қолланылады хәм көплеген илимпазлардың итибарын тартқан. Рассел мимоза өсимлигиниң экстракты УФ спектрларында максимум 280 нм болған анық жутылыу бар екенлигин анықлаған. Сондай ақ, сол толқын узынлығында пихта, квебрахо өсимликлериниң таннинлериниң жутылыуларын гүзеткен. Бредфилд чай, галлокатехин, катехингаллат хәм галлокатехингаллат бирикпелерин спектроскопиялық изертлеген. Зон атлы илимпаз квебрахо, мимоза, сумах, дуб, каштан өсимликлериниң таннинлерин изертлеген хәм пирокатехинли дубил затлары деп табылған затлар 260 нм де минимумы хәм 280 нм де максимумы болатуғынын изертлеген. Пирогаллол дубил затлары қатарына киретуғын каштан хәм дуб өсимликлериниң дубил бирикпелери спектроскопиялық үйренилгенде минимум көрсетпеуи анықланған. Дубил бирикпелерди анализлегенде толқын узынлығы 280 нм де дубил затларды анализлеген мақсетке мууапық деген болжаулар жүзеге келди хәм Руа хәм кәсиплеслери усыл ислеп шығады. Бул мийнетлерге тийкарланып Кинт хәм Уайт деген илимпазлар бул усылдан алдын қағаз хроматографиясы жәрдемінде уғраслап алынған еки экстракты салыстырып анықлауда қолланыу мүмкиншилигин көрсетип берди.

Польша республикасы илимпазы Блажей дубил затлардың спектрофотометрик қәсийетлерин қолланып, муғдар анализде қолланыуды усынды. Ель ағашынан ол арнаулы эталон дубил затын ажыратып алып стандарт сыпатында дубил бирикпелерди колориметриялық анықлауда қолланды. Бундай муғдар анализде хәм экстракт хәм эталон ушын Ламберт-Бер нызамы тууры келетуғынын анықлады. Лекин дубил затлар қайсы өсимликтен алынғанына қарай, сол өсимликтен ажыратылған бирикпелер ушын эталон таярланыу кереклиги айтып өтилген.

Изертленген дубил затларды олардың қасиеті бойынша 3 топарға бөліуі ұсынылған.

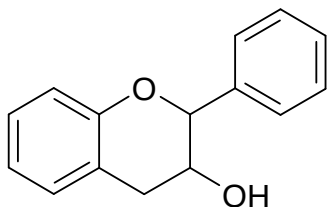
1-топар: Қытай таннини, сумах өсімлігі экстрактлары 270-280 нм толқын ұзындығында характерли жутылуға ийе, минимум толқын ұзындығы 235-240 нм де көринеди. Олардың жутылуы сызығы галл кислотасының сызығына максимум 266 нм, минимум 236 нм ға тең. Өзинің химиялық құрылысы бойынша бул топарға кируіши бирикпелер полигаллоилглюкоза скелетине ийе болады хәм галлотаннинлер топары болп табылады. Бул топар бирикпелеринде басланғыш бирикпе болып галл кислотасы хәм оның депсидлери (1) хызмет етеди.



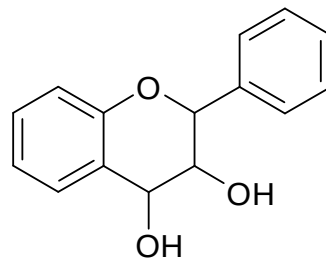
2 топарға каштан, дуб өсімліклеринің дубил бирикпелери киреди. Олардың жутылуы сызықлары характерли максимум ямаса минимумға ийе емес. Бул топар бирикпелеринің тийкарғы құрам бөлеги болып фенолкарбон кислоталар хәм полиоксифеноллар – флавоноидлар, олардың гликозидлери хәм поликонденсация тууындылары хызмет етеди: пиран циклында орынбасар тутпаған флаванның (2) қалпине келген формасын қосыу ұсынылды. Қалған барлық флавоноидлар катехинлерге (флаван-3-ол) (3), лейкоантоцианидинлерге (флаван-3,4-диол) (4), флаванон (5), дигидрохалкон (6), халкон (7), антоцианидин (8), флавононол (дигидрофлавоноллар) (9), флавонолар (10), флавонол (11) хәм ауронлар (12) жатады.

Флавоноидлардың ҳар түрлилігі сондай-ақ, пиран халқасындағы хираль углерод атомы менен түсиндириледі (катехинлар,

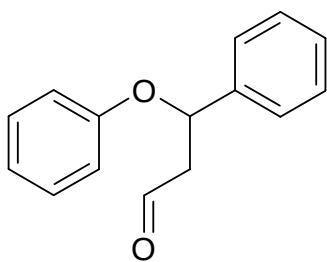
лейкоантоцианидинлар, флавонон хэм флавононол). Буннан тысқары, олардың тийкарғы түрлери гидроксиллениў, метиллениў, ациллениў, О- хэм С-гликозиллениўдиң хәр қыйлы жайласыўы хэм дәрежесине йие болыўы мүмкин.



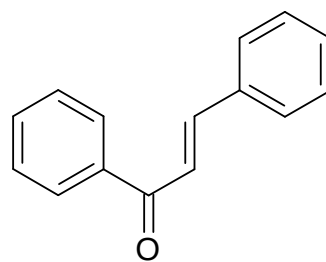
3.



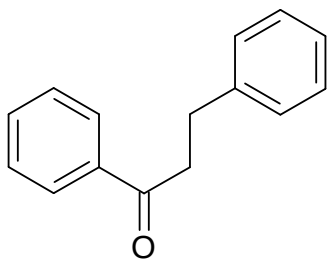
4.



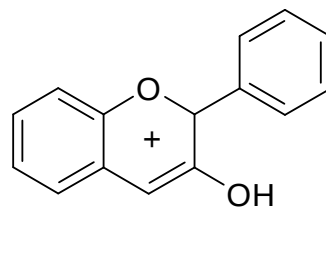
5.



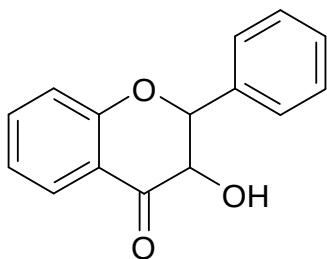
6.



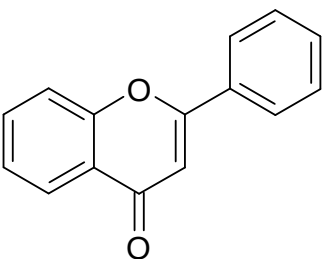
7.



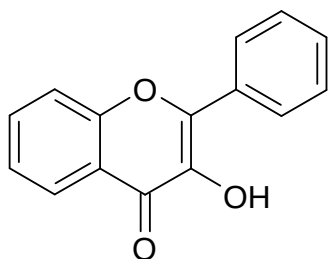
8.



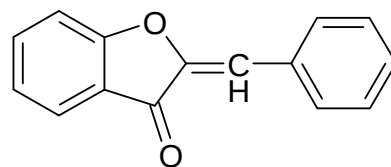
9.



10.



11.



12

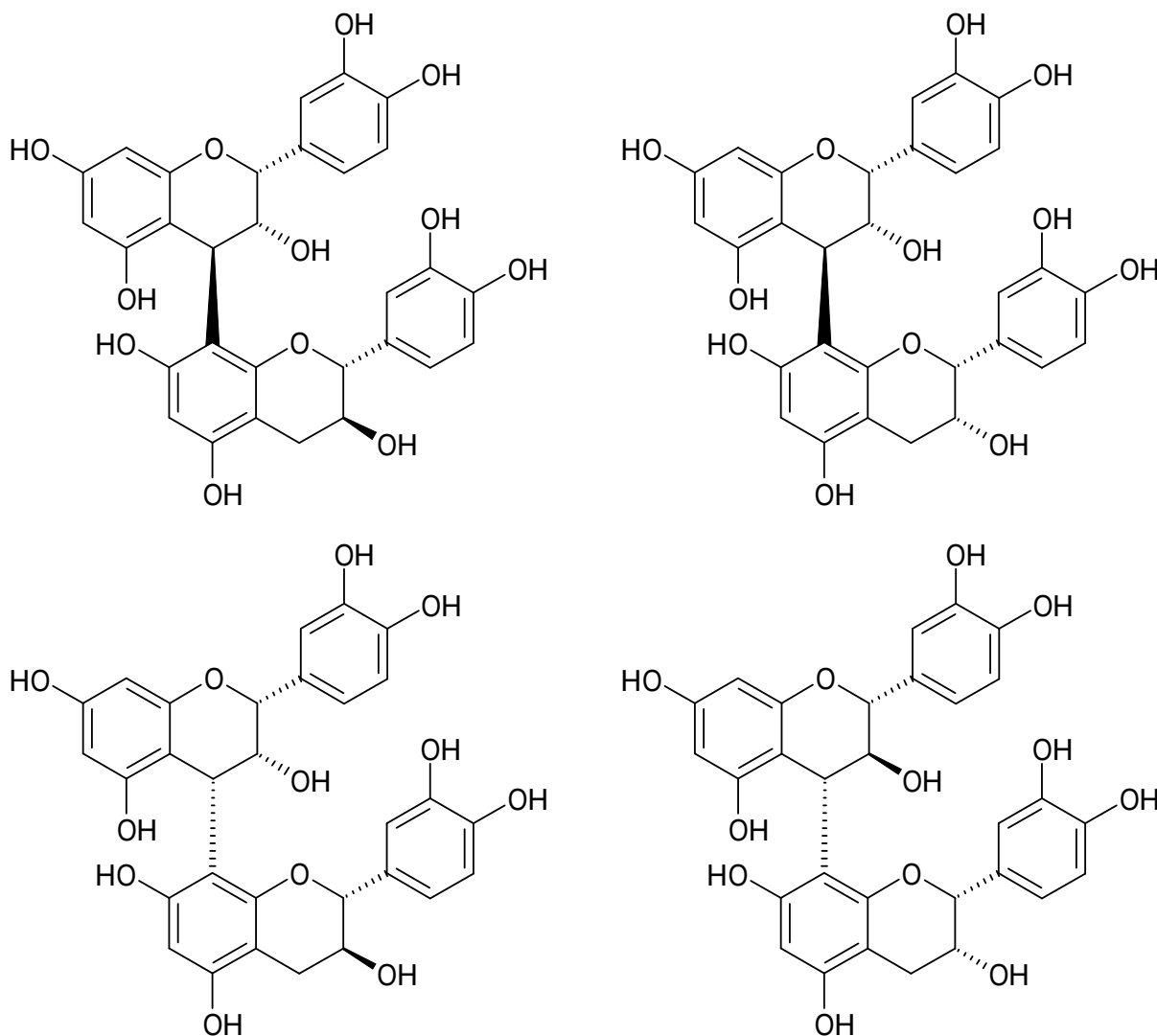
3 топарға мимоза, ель, квебрахо, гамбирь хәм катеху өсимликлери бирикпелери жатады. Буларда жутылыў 275-280 нм максимумы хәм 255-260 нм минимумы толқын узынлықларда байқалады..

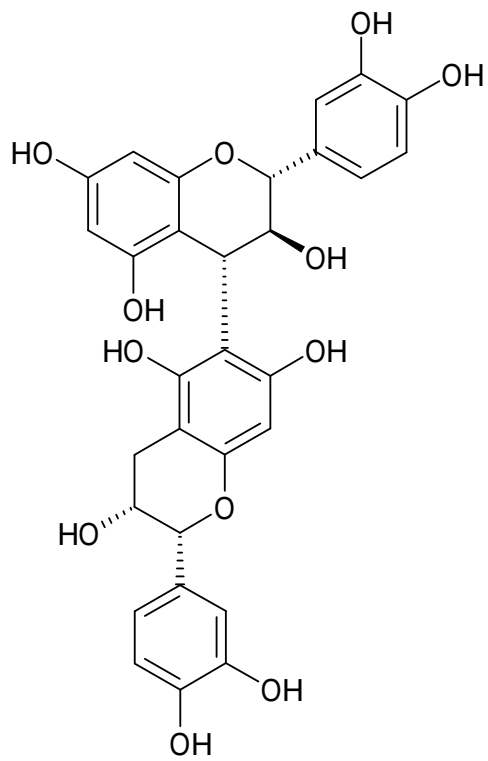
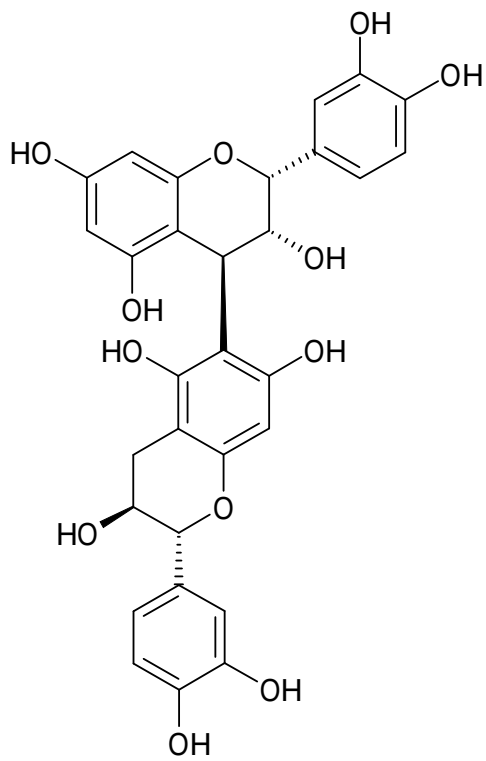
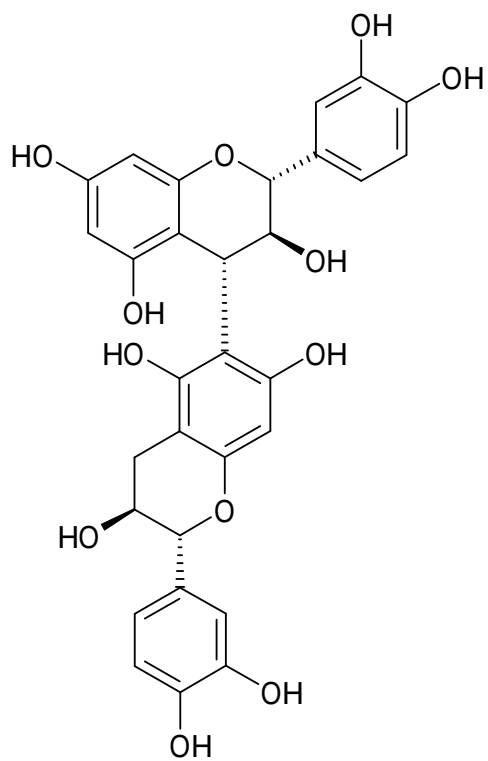
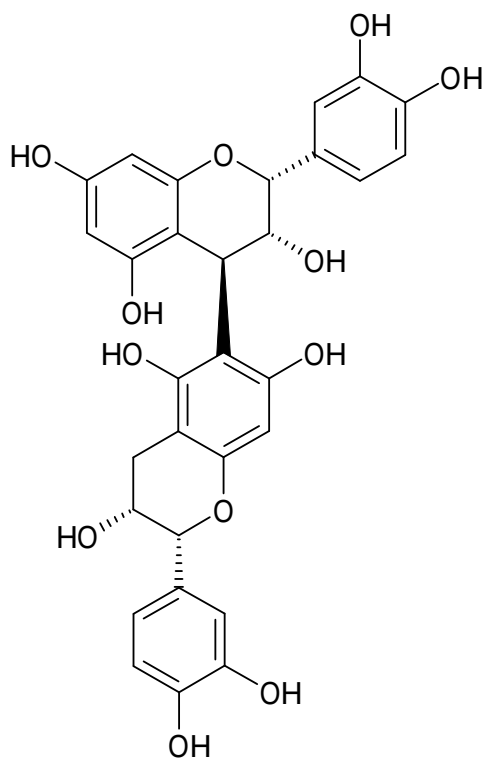
Максимум хәм минимумлардың формасы хәм жайласыўы катехинлардың спектрларына сәйкес келеди. Химиялық коз-қарастан бул топар флавоноидлар хәм олардың поликонденсация продукталары болып табылады.

Димер проантоцианидинлерди катехинлердин димерлери сыпатында, ямаса бир катехин молекуласының флаван-3,4-диолдың екинши молекуласы менен конденсацияланған өними сыпатында қараў мүмкин. Өсимликлерде димер проантоцианидинлер кең тарқалған болып, терини ийлеў қәсийети аз болған бирикпелер. Хәзирги ўақытта тәжирийбелик мағлыўматларға қарағанда димер проантоцианидинлер еки тийқарғы топарға бөлінген: бирнши топар В топар болып, суммар формуласы $C_{30}H_{26}O_{12}$, хәм екинши топары – бул А топары болып, суммар формуласы $C_{30}H_{24}O_{12}$. А топарына «жоқарғы» хәм «төменги» блоklar бир-бири менен көпир байланыслар менен байланыскан болады. Бул топар проантоцианидинлери өсимликте В-топар бирикпелерине қарағанда аз муғдарда болады. Димер хәм олигомер проантоцианидинлер өсимликлердин дерлик барлық бөлимлеринде кең тарқалған. Бул класс бирикпелер хаўа кислороды тәсиринде жеңил дегидрлененди, хәм бул процесс нәтийжесинде кызыл реңли полимерге айланады. Бундай реңге зыянланған мийўелер хаўада өзгередиди. Проантоцианидинлер вирусларға карсы активликке ийе. В-топар бирикпелеринде флаван аралық байланыс бир байланыс болады хәм әдетте ол «жоқары» блоктың С-4 менен «төменги» блоктың С-8 ямаса С-6 углерод атомлары арасында болады. Димер проантоцианидинлердин характерли үлгилери сыпатында (-)-эпикатехин хәм (+)-катехин тийқарында пайда болған В-1, В-2, В-3, В-4, В-5, В-6, В-7, В-8 процианидинлерин айтып өтсек болады. Процианидинлердин еритпелерин қышқыл орталықта қыздырғанда

«жоқарғы» блоктан цианидин, ал «төменгі» блоктан (+)-катехин хәм (-)-эпикатехин ажыралып шығады.

Димер процианидинлерден тысқары димер продельфинидинлер белгили. Мәселен, галлокатехин-(4 α -8)-галлокатехин, галлокатехин-(4 α -8)-эпигаллокатехин, галлокатехин-(4 α -6)-галлокатехин. Бул жағдайда, кислоталы гидролиз нәтижесинде проантоцианидин «жоқарғы» бөлегинен дельфинидин, ал «төменгі» бөлегинен – сәйкес галлокатехин пайда болады. Димер проантоцианидинлер бес хираль орайға ийе, соның салдарынан 32 диастереомер форма түринде болыуы мүмкин, солардан 8 түри тәбиятта табылған.





Димер проантоцианидинлердің құрылысын анықлау үшін тийкары 3 критерия бар болып табылады:

1. Гетероцикллардың стереохимиясын анықлау;
2. Ақырғы блоктың құрылысын орнату;
3. Молекуляр массасын анықлау;

C циклындағы орынбасарлардың стереохимиясын ЯМР ^1H спектрларында H-2, H-3 және H-4 протонларының спин-спин тәсірлесиінің константалар жәрдеминде және ЯМР ^{13}C спектрларында C-2 және C-4 углерод атомларының химиялық жылжыуын мәнісі менен анықласа болады. Бул усыллар жәрдеминде «төменгі» ақырғы блоklarдың структурасын анықлауға болады. Проантоцианидиннің мономер құрамын сондай-ақ химиялық усыллар жәрдеминде анықлауға болады: кислоталық және тиолитик ыдырату. Димер проантоцианидинлердің молекуляр массасы масс-спектрометрия жәрдеминде анықланады.

1.6. Изертлеудің спектрал усыллары

Протон-магнитлик резонанс спектроскопия

Флаван-3-оллардың хәм проантоцианидинлерди үйрениўдеги спектрал усыллардың ишинде ядролық-магнитлик резонанс (ЯМР) спектроскопия усылы жетекши орынды ийелейди. Бул түр спектроскопия жардеминде көплеген структуралық, стереохимиялық хәм конформациялық изертлеўлерди әмелге асырса болады. Молекуладағы атомлардың жайласыўына қарай олардың ядролары хәр қыйлы айқынланыўы мүмкин, сонлықтан бир түрдеги ядролардың, мәселен протонлар ямаса углеродтың ядролары, хәр қыйлы бөлимлерде айқынланады, яғный хәр қыйлы химиялық жылжыўларға ийе болады. Химиялық жылжыў (ХЖ) – ЯМР-спектрдің әҳмийетли параметри болып табылады. Басқа әҳмийетли параметри – бул спин-спин тәсирлесіў константалары (ССТК). Протонлық магнитлик резонанстағы олардың мәнислери көбинше циклдағы орынбасарлардың ориентациясынан, бул циклдың ямаса оның бир болегиниң конформациясына байланысly. (+)-катехинниң ПМР спектрлеринде Н-2 протон сигналлары әдетте 4,55-4,59 м.ү., Н-3 3,98-4,06 м.ү. химиялық жылжыў областында айқынласады. Н-4 α протоны шама менен 3 м.ү. сигнал береді, ал Н-4 β шама менен 2,5 м.ү. береді. (-)-эпикатехин спектрларында Н-2 протон сигналлары 4,84-4,92 м.ү. областында айқынласады, ал Н-3 протон сигналлары 4,19-4,22 м.ү. интервалында айқынласады хәм (+)-катехинниң химиялық жылжыў мәнислеринен айрылады. Лекин С циклындағы орынбасарлардың ориентациясын анықлаў ушын протонлардың спин-спин тәсирлесіў константалары әдеўир жақсырақ болып табылады. (+)-катехинда, яғный орынбасарлардың 2,3-транс-конфигурациясында $J_{2,3}$ шама менен 8 Гц ке тең, ал (-)-эпикатехинде болса бул константа көрсеткиши аз болады хәм шама менен 0-1 Гц ке тең болады.

Аромат протонлардың спектрал параметрлері С циклындағы орынбасарлардың конфигурациясынан аз ғарезли болады. Әдетте Н-6 протон сигналы Н-8 протон сигналына (6,0-6,2 м.ү.) карағанда күшли майданда (5,91-6,1 м.ү.) айқынланады. 4J Н-6 Н-8 спин-спин тәсирлесіу константасы еки еки ярым герц мәнисти корсетеди, ол болса өз гезегинде бир-бирине мета-жағдайда жайласқан протонларға характерли болады. Катехинлердин В циклындағы протонлар сигналлары әдетте 3' хәм 4' орынларда гидроксил топар тутқан флавоноидлар спектрлеринде ушырасатуғын параметрлерге жақын болады: әдетте Н-2' 6,9-7,0 м.ү. областында айқынланады, Н-5' протон сигналы 6,8-6,9 м.ү. интервалында, ал Н-6' протоны 6,7-6,8 м.ү. областында айқынланады. Бул протонлардың спин-спин тәсирлесіу константалары аромат циклдағы орынбасарлардың бундай жайласуына уғрас келеди: $^3J_{2,6}=2$ Гц; $^3J_{5,6}=8$ Гц.

Галлат система ушын В аромат циклындағы протонлар Н-2' хәм Н-6 әдетте екеуине тән бир шама менен 6,6 м.ү. сигнал береді. Тәбиятта 3 жағдайда галлоирленген флаван-3-ол хәм проантоцианидинлер салыстырмалы турде жийи ушырасады. (+)-катехин ушын галлоирлениу эффекти флаван-3-ол хәм басқа циклик спиртлердеги ацетирлениу эффектине жақын болады. Тап усындай жағдай (-)-эпикатехин ушында сәйкес болады.

Фенол гидроксил топарларын метиллеу аромат протонларын сигналларының әззи областқа жылжыуына алып келеди. (+)-катехиннің С-7 углеродында жайласқан гидроксил топарын ацетилирлегенде Н-6 хәм Н-8 деги орто протонлардың әззи областьқа жылжыуына алып келеди. С-6 ямаса С-8 углерод жағдайындағы катехиннің тууындыларыпроантоцианидинлерди химиялық ыдыратыу процессинде алынады. Флаван-3-оллардың С-4 углероды жағдайындағы тууындылары проантоцианидинлерди химиялық ыдыратыу продуктасы сыпатында алыныаы мүмкин, сондай-ақ тәбийи жағдайда болыуы да мүмкин.(+)-катехин хәм (-)-эпикатехиндеги орынбасарлардың ориентациясын $^3J_{3,4}$ манисинен анықлау мүмкин. 2,3-транс-

3,4-транс конфигурациялы (+)-катехин хәм (+)-галлокатехин туўындыларының спектрлеринде $^3J_{3,4}$ маниси әдетте жоқары: 7-9 Гц.

Димер проантоцианидинлер ПМР спектрлары

Бирикпе	H-2	H-3	H-4	H-6	H-8
В-3 ^{1,2} ж	4,84 д $J_{2,3}=10$	6,10т	β 4,85д.д. $J_{4,3}=10,0$	6,47д.д. $J_{6,5}=8,5$	6,36д $J_{8,6}=2,5$
т	4,93д $J_{2,3}=10$	4,97м	$J_{4,5}=1,5$ 2,7м	$J_{6,8}=2,5$ 6,46с	-
В-6 ^{1,3} ж	4,64 $J_{2,3}=7,3$	4,36	α 4,72 $J_{4,3}=5,0$	6,43 $J_{6,5}=8,4$	6,51 $J_{8,6}=2,5$
т	4,75 $J_{2,3}=1,0$	-	β 4,89 $J_{4,3}=8,0$	-	6,45 $J_{8,6}=1$
В-4 ж	4,80д $J_{2,3}=8,0$	4,68м	β 4,55д.д. $J_{4,3}=10,02,7=3,0м$	5,8-7,4м	5,8-7,4м
т	5,09 с 4,60 д $J_{2,3}=8,0$ 5,06с	4,33с 4,48м 4,19с	β 4,48 -	5,8-7,4 5,8-7,4м	5,8-7,4 5,8-7,4м

¹ Белгиленген блоклар – физетинидол

² метил эфириниң ацетаты

³ «Төменги» - 3 β ,4 α ,7,3',4' – пентаоксифлаван (лейкофисетинидол)

УФ, ИҚ-спектроскопия, масс-спектрометрия

УФ-спектроскопия. Полимер проантоцианидинлер сондай УФ-областында специфик спектрларды береді, оларды бундай бирикпелер классын идентификациялаў ушын қолланыў мүмкін. Суўда алынған полимерлер спектрлеринде 205 нм да максимум жутылыў байқалады.

Полимерлердің күшлі сұйылтырылған еритпелерінде 240 нм де хәм жоқары концентрациядағы еритпелерінде 270-280 нм де характерли сыныў байқалады. Бундай өзгешеликлер ароматикалық циклдың еки хромофоры болыўынан: дерлик барлық проантоцианидинлерде ушырасатуғын А хәм В халкасының болыўынан жүзеге келеди. Бул циклдың жутылыў полосасы дельфинидиннің (жоқары концентрацияда) спектрларындағы интенсивлиги дерлик үш есе көп болады процианидинлерге қарағанда.

Егерде полимер продельфинидин болса, яғный дельфинидин молекулаларынан ибарат болса, онда УФ-спектрдың узын толқынлы областы тарқалады хәм еки максимум пайда етеди: 278 нм деги интенсивлиги аз полоса А цикл хромофорына жуўап береді. Ал егерде, полимер тек ғана процианидин системаны өзінде тутса, онда УФ-спектрда 279 нм де тек ғана бир симметриялық полоса байқалады. А хәм В циклы хромофорлары байланыспаған осциляторлар болып табылса, онда $\lambda_{\max}$ 270 хәм 280 нм аралығында айқынланады. Бул дегени, процианидин хәм продельфинидин катнасынан келип шығады.

ИК-спектроскопия. Оптик спектроскопияның бул турин қолланыў проантоцианидин қурамындағы көплеген функциональ топарлар хәм фрагменлерин анықлаўға мумкиншилик жаратады. Молекулалар аралық водород байланысты пайда етиўши гидроксил топарлардың валентлик тербелислери 3500-3200 см^{-1} областында енли интенсив полосаны көрсетеди. 2935 см^{-1} шамасында жутылыўға алифатикалық углеводород бөлимлери жуўап береді, ал метилен топарларының деформацион тербелислери 1495 см^{-1} де айқынланады. 1250 см^{-1} областындағы жутылыў ArCOOR топарының қурамалы эфир топарына сәйкес болады. 1033 см^{-1} областындағы жутылыў полосасы екилемши гидроксил топарының С-О байланысларының валентлик тербелислерине жуўап береді. Екилемши углерод атомындағы қурамалы эфир топарының С-О-С байланысынаң деформациялық тербелислери 1105 хәм 1050 см^{-1} де полосалар береді. Егерде проантоцианидин қурамында галлокатехинлер бар болса, онда 1540-1520 см^{-1} де ароматикалық циклдың

скелет тербеліслерінің полосалары жүзеге келеді. Бул ароматикалық цикллар 1535 хәм 1520 см^{-1} де еки шоққы береді, ал катехин тутыушы полимерлер спектрлерінде тек ғана 1520 см^{-1} де бир жутылыу полосасы көрінеді. Бундай өзгешеліклер полимер проантоцианидинлердің спектрларында да көрінеді, хәм олардың қурылысын үйрениуде колланылады. Ароматикалық водород атомларының $780-730\text{ см}^{-1}$ деги деформациялық тербеліслери бул циклдағы орынбасарлардың орналасыуын анықлауға мүмкіншилик береді сондай ақ, процианидин менен продельфинидинлерди бир-биринен айырыуға имканият жаратады. 1675 см^{-1} жийилиги областында қурамалы эфир байланысын пайда етиуши аромат кислотаның карбонил топарының жутылыу интенсив полосасы көрінеді.

ИҚ-спектрде карбонил топар 1610 см^{-1} енлилеу жолақ түрінде көрінеді. Таннинлердің конденсирленген структурасына 1510 см^{-1} де интенсивлиги күшейиуі тән. 1535 , 1515 , 1150 , хәм 1040 см^{-1} жийиликтеги коринетуғын жолақлар 1,3,4-орын басқан аромат цикллерінің деформацион тербеліслерине тән болады. Феноллардағы гироксил топардағы О-Н байланыслары, сондай-ақ $=\text{C}-\text{O}$ байланысларының валентлик тербеліслери 1320 хәм 1200 см^{-1} областларында интенсив енли жутылыулар корсетеди. Әдетте О-Н-байланыслар $780-770\text{ см}^{-1}$ областында, ал $=\text{C}-\text{O}$ байланыслар 730 см^{-1} областында жутылыулар көрсетеди. Бул жолақлардың жутылыу интенсивлигин салыстырып полимер бирикпедеги катехин хәм ғаллокатехин бирликлерин (санларын) анықлауға болады. В аромат халқаның аралас түрдеги окислениу болған проантоцианидиннің ИҚ-спектріндеги 1535 , 1515 см^{-1} , хәм $770-730\text{ см}^{-1}$ еки екилик шоққының бар болыуы полимердің 60% ти проделфинидин блокларынан ибарат екенлиги аңлатады. $800-795\text{ см}^{-1}$ интервалындағы жутылыу катехин хәм галлокатехин бирликлерінің 2,3-дис хәм 2,3-транс конфигурациясын анықлауға мүмкіншилик жаратады.

Масс-спектроскопия. С-4-С-6 хәм С-4-С-8 димер проантоцианидинлерінің метил эфирлери ацетатлары ушын масс-спектрлер алыуға болады. $m/z\ 774$ те шоққы молекуляр ион береді. Соң электрон соққы

жағдайында сирке кислотасының еки молекуласы ажыралады хәм избытке 714 m/z ийе флаван хәм 654 m/z дифлаван пайда болады. 714 m/z болған иондың ретродиен тарқалыуы массасы 492 m/z болған фрагмент пайда етеди. Соң, массасы 327 хәм 165 болған фрагментлер пайда болады. Бул 4-8 байланыстың үзілгенлигин билдиреди.

Олигомер хәм полимер проантоцианидинлер ушын масс-спектроскопия қолланылғанда олардың массасы үлкенлигинен ионға тарқалыу хәм массасы киши болған фрагментлер алыу қыйын болады.

2. Алынған нәтижелерді талқылау.

Изертлеу объекти болған жүзим дәнелеринен полифеол бирикпелерді ажыратып алыу үшін экстракция усылы қолланылған болып, бунда хәр қыйлы ериткишлер қолланылды. Ажыратып алыудың схематик көриниси 1 схемада көрсетилген болып, басқышларының избе-излиги суўретленген.

Бирикпелерді ажыратып алыу үшін, шийки зат материалы, яғный, жүзим дәнелерин 230 грамм муғдарда анық өлшеп алынып, майдаланады. Хәр қандай өсимлик тухымы, дәнеси май бирикпелерин көп муғдарда тутатуғынлығы белгили. Бизлердің бул жумысымызды, полифенол бирикпелер аморф порошок түринде алынатуғын бирикпелер болып, алыу процессинде май бирикпелер оларға кесент тийгизеди. Сонлықтан, жүзим данешелириндеги майсыман бирикпелерді айырып алыу үшін алды менен хлороформ ериткишинде бир сутка даўамында салып қоямыз. Соң, фильтр арқалы майдаланған дәнелерді сүзип алып, хана температурасында сорыўшы шкаф астында бир сутка даўамында қурғатамыз. 3 литрлик түби думалақ колба ишине салынып, үстине 90 % ли этанолдан 2 литр қуйылады хәм суў банясында қайтарыўшы холодильник пенен үскенелеп 2 саат даўамында қыздырамыз. Бунда барлық бирикпелер ериткишке өтеди хәм ертикиш суўығаннан кейин таўар фильтр арқалы жүзим дәнелери сүзилип алынады. Қалған суў-спиртли экстракттан вакуум астында курамындағы спирт айдалып алынады хәм суўлы экстракт қалады. Бөлистриўши воронкада бир неше мәрте бутанол менен шайқатылып қайта исленеди. Барлық бутанол жыйындылар бирлестирилип вакуумда айдалып қурытылады. Соң 1:3 катнаста гексан менен араластырып, бутанолға өткен барлық бирикпелер шөктириледі, фильтрленеди хәм вакуумда кургатылады. Алынған бирикпелер бутанолда ериўши сумма аморф болып, ол 32 гр. курайды.

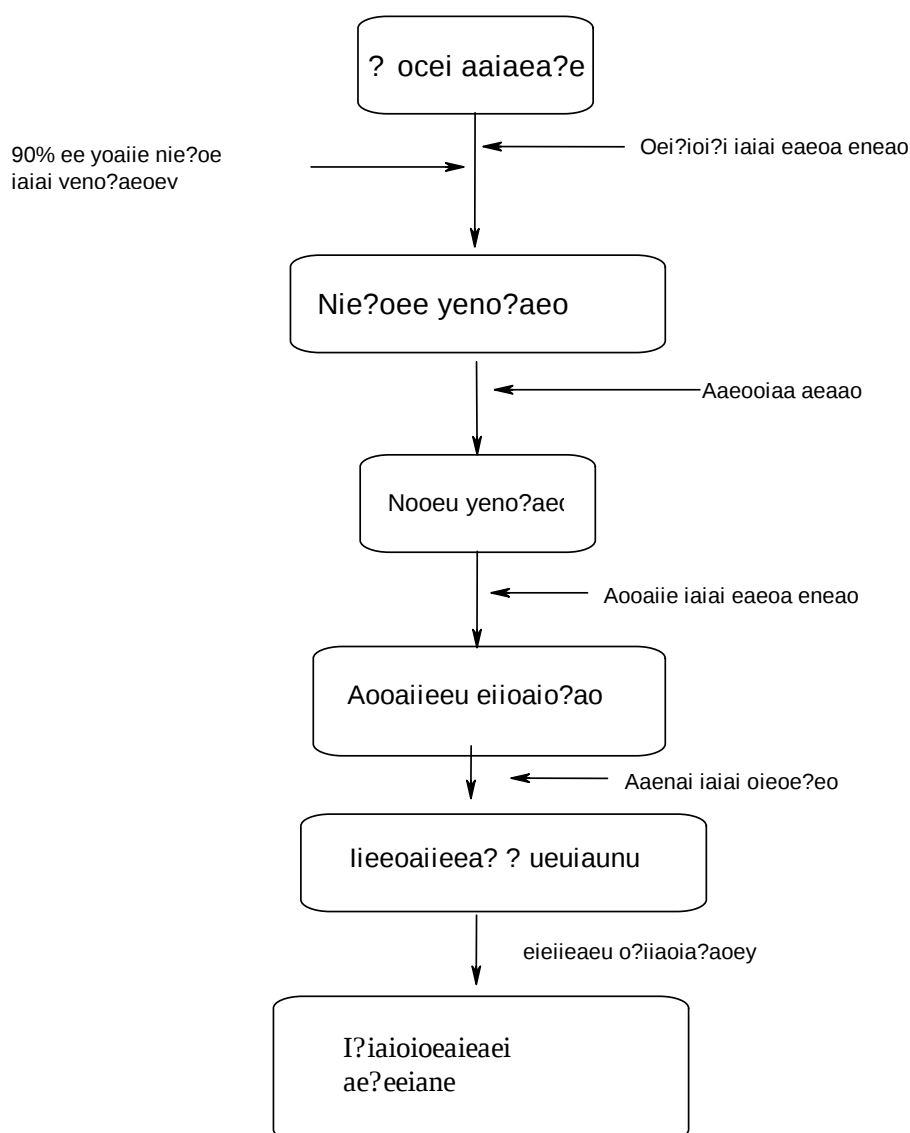
Ажыратып алынған бирикпедени полифенол бирикпелер қатарына жатыўшы екенлигин анықлау мақсетинде улыўма фенолларға тән сыпат

анализи өткериледи. Бунда Берлин көги реакциясы әмелге асырылады. 0,1 гр аморф бирикпе өлшеп алынып, азғана көлемдеги бутанолда еритиледи. Соң қағаз хроматографиясы усылы жәрдеминде старт сызығына капилляр түтикше арқалы дақ түсирилип Берлин көги реактиви үрленеди. Нәтийжеде ашық көк рең пайда болады. Бул ажыратып алған суммамыз полифенол тәбиятына ийе екенлигиниң айқын дәлийли болады.

Бизге керек болған проантоцианидин бирикпесин ажыратып алыў ушын G-50 маркалы сефадекс адсорбенти қолланылып гель-хроматография усылы менен колонкалы хроматография қолланылады.

1 схема

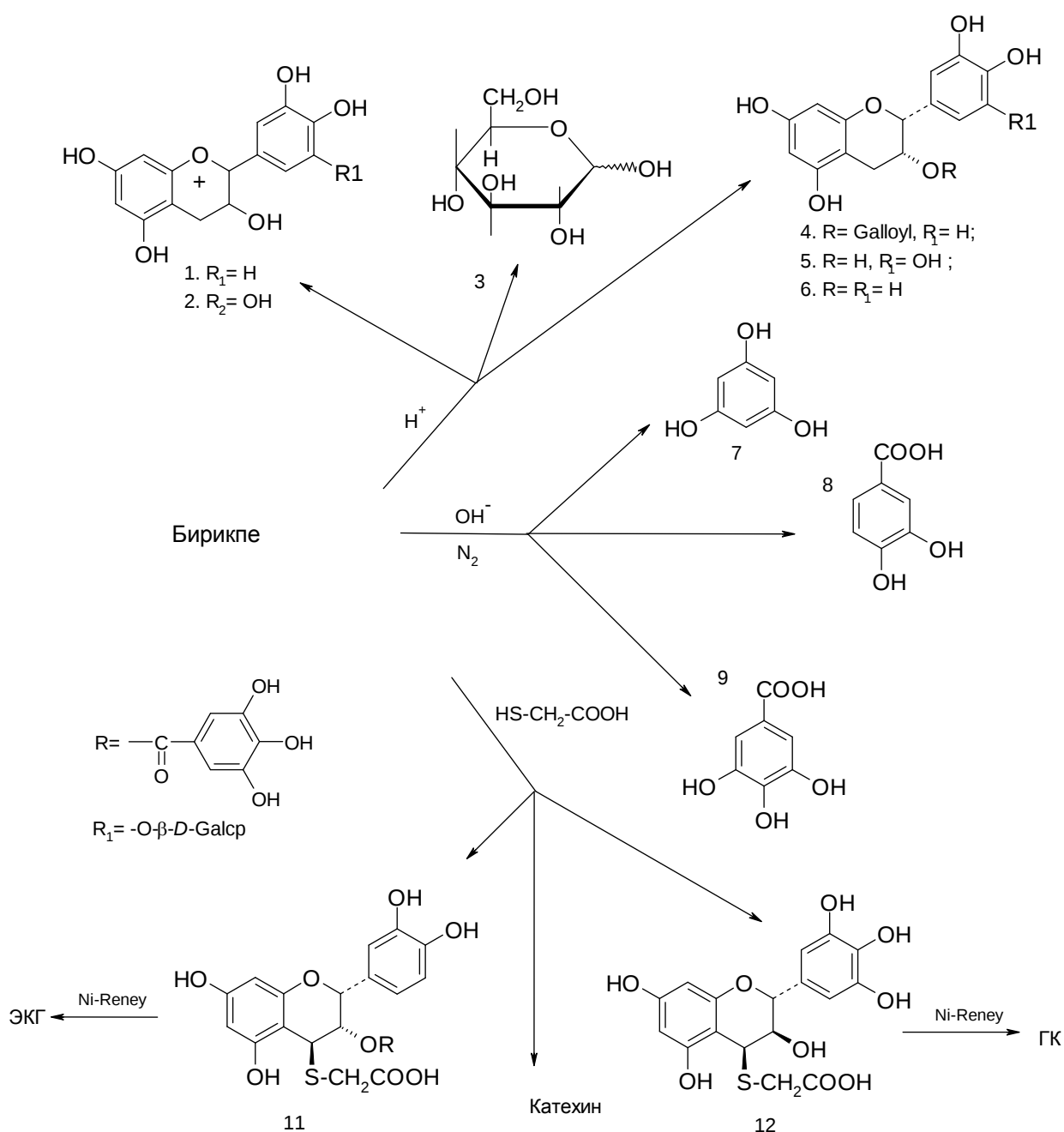
Полифенол бирикпелерди ажыратып алыў схемасы



Колонкалы хроматографияда жүріуші фаза сыпатында көтеріліуші концентрациялы метанол спирти менен элюирленеди. Шығып турған элюатлар 120 мл фракция менен жыйналып хәр бири ванилин реактиви менен қағаз хроматографияланады. Хроматограммада бир дақ пайда болған фракциялар бирлестірилип бирикпе шөктіріледі.

Ажыратылған бирикпе проантоцианидин бирикпеси болып оның курамындағы мономер флаван фрагментлерин анықлау үшін кислоталы, силтили, толитикалық гидролиз өткериледи.

2 схема

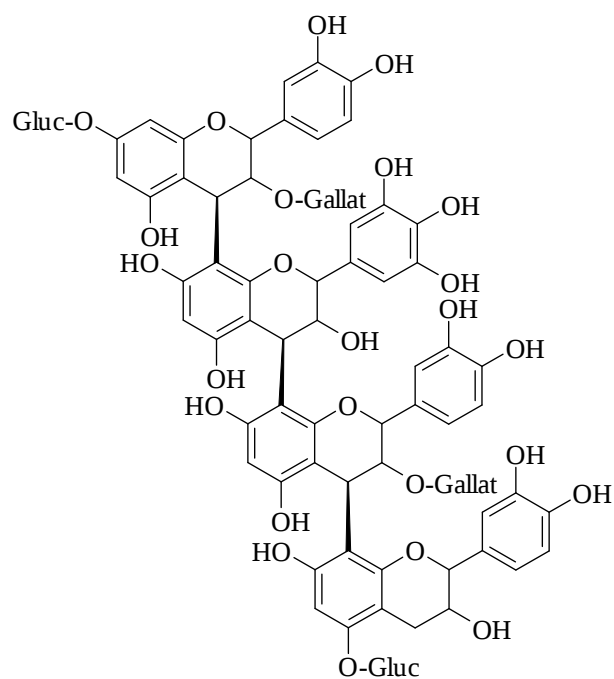


Алынған бирикпеден 0,012 гр. өлшеп алынып 2Н НСІ менен қыздырылып кислоталы гидролизге ушыратылады. Нәтижеде гидролизат суұытылып, нейтралланып хроматографияланганда, 2 бирикпе: антоциан бирикпелери цианидин (1) хәм делфинидин (2) екенлиги анықланды. 0,1 Н НСІ менен жумсақ шараятта кислоталы гидролиз қылынғанда (-)-эпикатехингаллат (4), (±)-галлокатехин (5), глюкоза (3) хәм катехин (6) ажыралып шығыу анықланды.

Бирикпени азот атмосферасында силтили гидролиз қылып хроматографиялық жол менен анализленгенде флороглюцин (7), протокатех (8) хәм галл (9) кислоталары анықланды

Бирикпе молекуласында жоқарғы хәм төменги фрагментлерин анықлау үшін тиоэфир менен гидролиз усылы қолланылды. Нәтижеде, молекуланың «төменги» тәрeпинен (+)-катехин (6) ажыралады, «жоқарғы» тәрeпинен тиоэфирлер араласпасы пайда болады. Тиоэфирлер араласпасы майсыман суйықлық болып, мономер бирикпелердин тио туұындылары болып табылады. Араласпаны қайта тиклеу үшін хәм мономер бирикпелерди анықлау үшін Реней-никели бирикпеси колланылады. Бунда тиоэфирлер тарқалып, катехинлар араласпасы пайда болады, хәм қағаз хроматография усылында бул бирикпелер (-)-эпикатехингаллат (4) хәм (±)-галлокатехин (5) бирикпелери менен идентификацияланады.

Алынған нәтижелерди талқылап отырып, проантоцианидинлерди кураушы мономер катехинлер бир бири менен С4-С6 углерод углеродлы байланыс пенен байланысқан болатуғынлығын есапқа алып, ажыратып алған бирикпемиз гликозидленген проантоцианидинлер қатарына жатады деп хәм оның курылысы (-)-эпикатехингаллат-7-0-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-(-)-галлокатехин-(4β→8)-эпикатехинингаллат-(4β→8)-(+)-катехин-5-0-(β-D-Glcp) болыуы мүмкин деген шешимге келиуимизге болады.



(-)-эпикатехингаллат-7-О-(β -D-Glcp)-(4 β $\rightarrow$ 8)-(-)-галлокатехин-(4 β $\rightarrow$ 8)-(-)-
эпикатехингаллат-(4 β $\rightarrow$ 8)-(+)-катехин-5-О-(β -D-Glcp)

3. Тәжірийбе бөлімі

Жұмысты алып барыуда үйрениу объекти болған жүзим дәнелери Нөкис қаласы, Орақ балға елатында өсип раўажланып атырған жүзим өсимлигинен 2013 жылы жыйнап алынды. Үйрениуде төмендеги реактивлер хәм ериткишлер системасы ислетилди:

Экстракция ушын

1. Этанол (хәр қыйлы концентрацияда)
2. Этилацетат
3. Бутанол

Хроматографиялық анализ ушын

1. Хроматографиялық қағаз
2. Ванилин реактиви
3. Берлин көги реактиви
4. Бутанол:уксускислота:суў 40:12:28
5. Бутанол:уксускислота:суў 4:1:5

3.1. Ванилин реактивин таярлау

а) 1г ванилин бирикпеси аз муғдардағы абсолют метанолда еритилип, толық еригеннен соң көлеми 100 мл ға шекем жеткериледи. Таяр болған 1% ли еритпе күн нуры түспейтуғын жерде қара шийше ыдыста сақланады.

б) 8мл конц HCl 100 мл абсолют метанолда әсте ақырынлық пенен араластырылады.

Хроматограмманы үрлеу ушын а) хәм б) реактивлерин 1:1 көлемлик катнаста араластырыу керек.

3.2. ?Берлин көги? реактивин таярлау

а) 3,24г суўсыз $FeCl_3$ өлшенип алынып 1л 0,10 М HCl кислотасында еритиледи. Көгилетир сарғыш реңди еритпе пайда болады.

б) 5,26г $K_3[Fe(CN)_6]$ 1л дистилленген сууда еритиледи. Сары реңли еритпе пайда болады. Хроматограмманы үрлеу үшін а) хәм б) еритпелерин көлемлик 1:1 қатнасында араластырылады.

Барлық айқынластырыушы реагентлер тәжірийбе қойылған күни таярланыуы لازم.

3.3. Проантоцианидиннің силтили гидролизи

Силтили ыдыратыу үшін думалақ түпли колбаға 50мг бирикпе салынады, үстине 5 мл 50%ли калий гидроксидинің еритпесин қосылады. 150-160°C болған май баясында қыздырыу 8 минут дауам етеди. Соң араласпа тез сууытылады. Гидролизат суу менен араластырылып, бөлистириуши шаршарда этилацетат пенен қайта исленеди. Этилацетатлы экстракт суусыз натрий менен кургатлып, ериткиш айдап алынады. Қалған қалдық колонкалы хроматографияланады.

3.4. Проантоцианидиннің кислоталы гидролизи

Бирикпеден 0,08 гр алып 4 мл этанолда еритемиз, үстине 1,5 мл 2н хлорид кислотасын куйылады, суу баямында қайтымлы холодильник пенен 2 саат дауамында қыздырылады. Реакцион араласпаны суу менен сууылтып, этилацетат пенен экстракциялаймыз. Суусыз натрий сульфат пенен курытып, ериткишти айдап аламыз. Қалған қалдықты сефадексли колонкада хроматографиялаймыз. 5 мг (+)-катехин алынды, $C_{15}H_{14}O_6$, Мм. 290, балқыу температурасы 178-180°C, $[\alpha]_D^{22} +21^0$ (с.0.51, ацетон:суу 1:1), λ_{max} 280нм, Rf 0.65. D-глюкоза (система бутанол-1-пиридин-суу, 6:4:3, Rf 0.50; айқынластырыушы анилинфталат) хәм глюкоза-6-О-галлат, $C_{13}P_{16}O_{10}$, б.т. 137-138°C, $[\alpha]_D^{23} +22^0$ (с.0.32, ацетон). Қағаз хроматографиясы жәрдемінде цианидин хәм дельфинидин анықланды.

3.5. Проантоцианидиннің тиолитик гидролизи

0,23 г бирикпе хәм 6,7 мл тиогликол кислотасы араластырылып, үстине музлы уксус кислотасынан 2,4 мл хәм 10 мл этанол қосылады, араласпа хана температурасында 48 саат даўамына қалдырылады. Бирнши 10 саат ишинде реакцияны жуқа қабатлы хроматография менен байқап барылды. Реакцион араласпаны қойылтып май тәризли қалдық алынады. Қалдықты сефадекс толтырылған колонкада хроматографиялаймыз, этанол менен элюирленеди. 0,014 мг (+)-катехин хәм тиоэфирлер араласпасы 110 гр муғдарында алынады.

Тиоэфирлерди тарқатыў. Тиоэфирлерди (110г) менен этанол-уксус кислота араласпасын 4 мл (9:1 қатнаста) араластырып, үстине Реней никели катализаторы салынады хәм 50⁰С температурада 1 саат даўамында қыздырылады. Соң, реакцион араласпа фильтрленип, қойылтып сефадекс толтырылған колонкада хроматографияланады. Элюент сыпатында ҳар қыйлы концентрациядағы этанол колланылады. Үш бирикпе алынды: (-)-эпикатехин, (+)-катехин хәм (+)-галлокатехин.

Жуўмақ

1. Үйренилген жүзим дәнелернен полифеноллар суммасы ажыратып алынып, хроматографиялық үйренилгенде бирикпелер проантоцианидин қатарына кириўши бирикпелер екенлиги анықланды.
2. Бутаноллы фракциядан проантоцианидин бирикпеси ажыратып алынды хәм оның химиялық өзгерислер өткерилгенде оны кураўшы мономер бирикпелер хроматографиялық жол менен идентификацияланды.
3. Алып барылған химиялық өзгерислер нәтийжесинде ажыратып алынған бирикпе алдын бөлип алынған (-)-эпикатехингаллат-7-О-(β -D-Glcp)-(4 β →8)-(-)-галлокатехин-(4 β →8)-(-)-эпикатехингаллат-(4 β →8)-(+)-катехин-5-О-(β -D-Glcp) бирикпеси екенлиги анықланды.

Пайдаланылган әдебиятлар

1. Bate-Smits. / Astrngent Tannins of Kosmos Bipinnatus // Pxitoshemshstri,- 1980,-V.19,-NS-P.982
2. Stallord N.A. Lester N.N, Porter J/Chemikal and Enzimatik Sintxesis of Monomerik Prokianidins (Leyrosianins oz 3¹, 4¹, 5, 7- Tetraxidroxi Flavoan-3,4-Diols) From (2R,3R)- Dinudroguersetin // Pxitochemistri,-1985, V.24 – R982.
3. Kurmukov A.G, Ayzikov M.N. Raximov S.S. / K farmakologii rastitelnogo polifenola epigallaxina // farmakologiya i toksikologiya,-1986, N.Z-S.45-48
4. Greissman T.A., Dittman X.F.K/ Proantianidin from avokado Siid //Pxitochemistri,- 1964,-V. 4-Pyu 359-368.
5. Xaslam E/ Plant Proantixokianidine-Strukture and Biosintzesis. Koni in Polipxenos garnano Qarda // Malino, 1975, Si, Sa-p 26-38.
6. Ueinges,Kalenxaser U., Marx X.D., Nader F., Parner J. Seiler D/Zum Kenntis der Proantokuanidini X. Prokianidini aus Frechten// Ann. Chem-, 1968, Bel
7. Ueinges K., Qorissen X.,Lonti R. /Les Prokiyanidini dimeres naturelles // Ann. Pxizisial Veget-, 1969- V.d.//p.67-85.
8. Ueinges K., Ueld R., Kaltenxaaiser U/Uder Strukturentsexung and Vedeutung der Polipxenoli in Fruchten and Fruchtsaften. XXI. Mitt. Zur kenntnis der Proaantokuanide // Z. Lebensmittel. Unter-such und Forsch-,1969-Vd.140. 13-r. 129-134.
9. Peter E. L/ Flauonoid Viokdes: Pxitoalexin Analogues from Kondensed Tannir ns// Pxitochemistru, 1987-V.26-N.6-p.
- 10.Takechi M., Tanaka V., Takexara M., Nonaka Q., Nichioka J. (Strukture and Antiperpetik Aktiviti Among ze Tannins // Pxitochemistri-1985, V.24,-T10,-p.2245-2250).
- 11.Tits M., Angenot , Poikens P., Uarin.,Dierktsens V., / Prodelpxinidins from Ribes Nigrum // Pxitochemistri-1992-V 31,-p.971-973.

12. Petereit F., Kolodziej X., Nanrstedt A. / Flavan-3-ols and Proanthosyanidins from *Qistus Incanus*|| *Phytochemistry*.-1991.-V.30.N.3.-p.981-985.
- 13.Nonaka Q., Miwa N/. Nishioka J/.| Stilbene glycoside gallates and Proanthocuanidins from *Polygonum multiflorum* || *Phytochemistru*.- 1982.- V/Z1-N/2.-p/429-432.
- 14.Nonaka Q.. Muta M, Nishoka I/ Myricatin a galloul flavanonol Sulfate and prodelphinidin gallates from *Myrica rubra*|| *Phutochemistru*.-1983,V.22,- P.237-241.
- 15.Махмаукулов А.В. Кулиев З.А. Водовин А.Д. Маликов В.М. // Проантоцианидины *Polygonum coriarum*. // *Химия природ. Coldin.* - 1994-С.233-244.
- 16.Кулиев З.А.Водовин А.В,Дю, Абдуллаев Н.Д. Махматкулов А.Б. Маликов В.М Изучение катехинов и проантоцианидинов *Quereus Robur* // *Химия природ соедин.*,-1997,N.6-С819-833.
- 17.Kashiwada Y.. Nonaka Q., Nishioka I.. / Tannins and Relation Compounds. XLV. Rhubarb (5). Isoliation and characterization oa Flavon -3-ol and Procyanidin Gkucosides || *Chem Pharm. Bull*.1986,V.34.-P.3208-32222.
- 18.Morimoto S.. Nonaka G-I., Nishioka I./Tannins and Related Conpounds XXXIX. Procyanidin C- glucosiedes and on acylated flavan-3-ol Glucosiede from the Barks of *Cinnamomum cassia Brute* and *C.obtusifolium Nees* // *Chem.Pharm.Bull*-1986-vol.34-p 643-649
- 19.19. Проантацианидины *Rhobiola sementova* / Ким Хван Хи, Кулиев З.А Вдовин А.Д. Ягудаев М.Р., Маликов В.М.// *Химия Природ, Соедин.*- 1991,-С.771.
- 20.Ilsu F.L., Nonaka G., Nishioka I. *Salix Siedoldiana* // *Phytochemistry*-1985, V.24,-P. 2089-2092