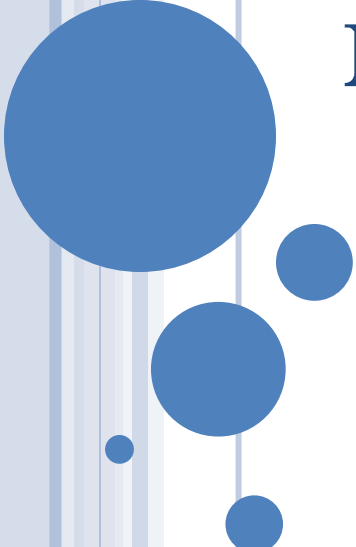




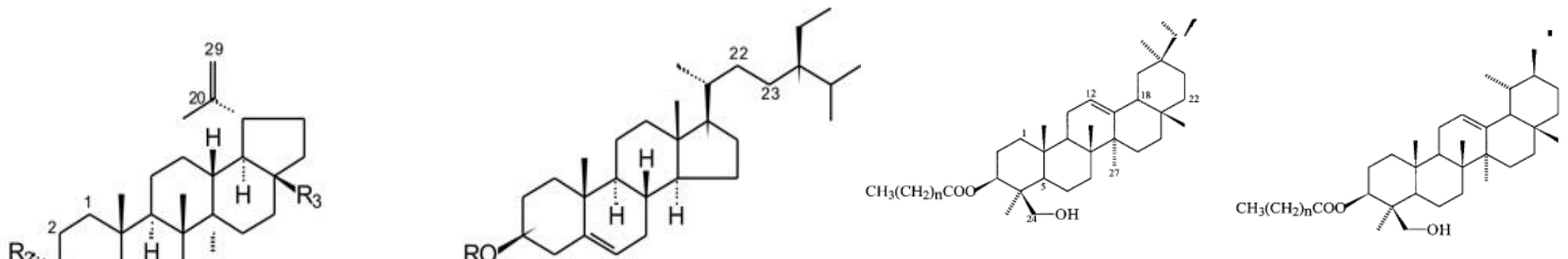
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS HIFENADAS A TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

Prof. Dr. João Henrique G. Lago

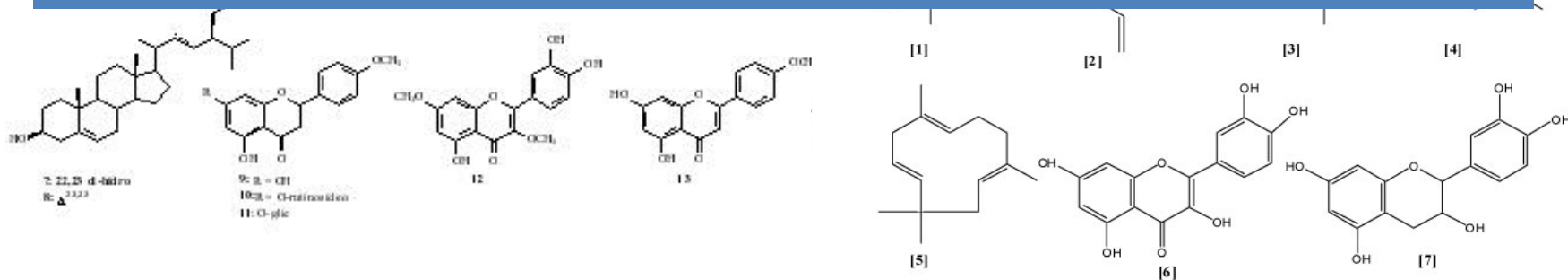
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

E-mail: joao.lago@ufabc.edu.br

A QUÍMICA DOS PRODUTOS NATURAIS CLÁSSICA....



ISOLAMENTOS E DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS



Tendências na área

evitar o isolamento de compostos conhecidos e de ampla ocorrência e buscar novas substâncias (estruturas inéditas e/ou com valor agregado, por exemplo, bioatividade)

COMO OTIMIZAR???



EXTRATO - matriz complexa

Realizar uma busca dos compostos presentes na matriz sem necessidade de isolamento e caracterização estrutural posterior

COMO???

ASSOCIAR
TECNICAS CROMATOGRAFICAS +
TECNICAS
ESPECTROSCÓPICAS/ESPECTROMÉTRICAS



TÉCNICAS HIFENADAS

- Acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas (técnicas de separação e detecção), com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais.





ELSD



GC



LC



FT-IR



ICP



NMR



MS



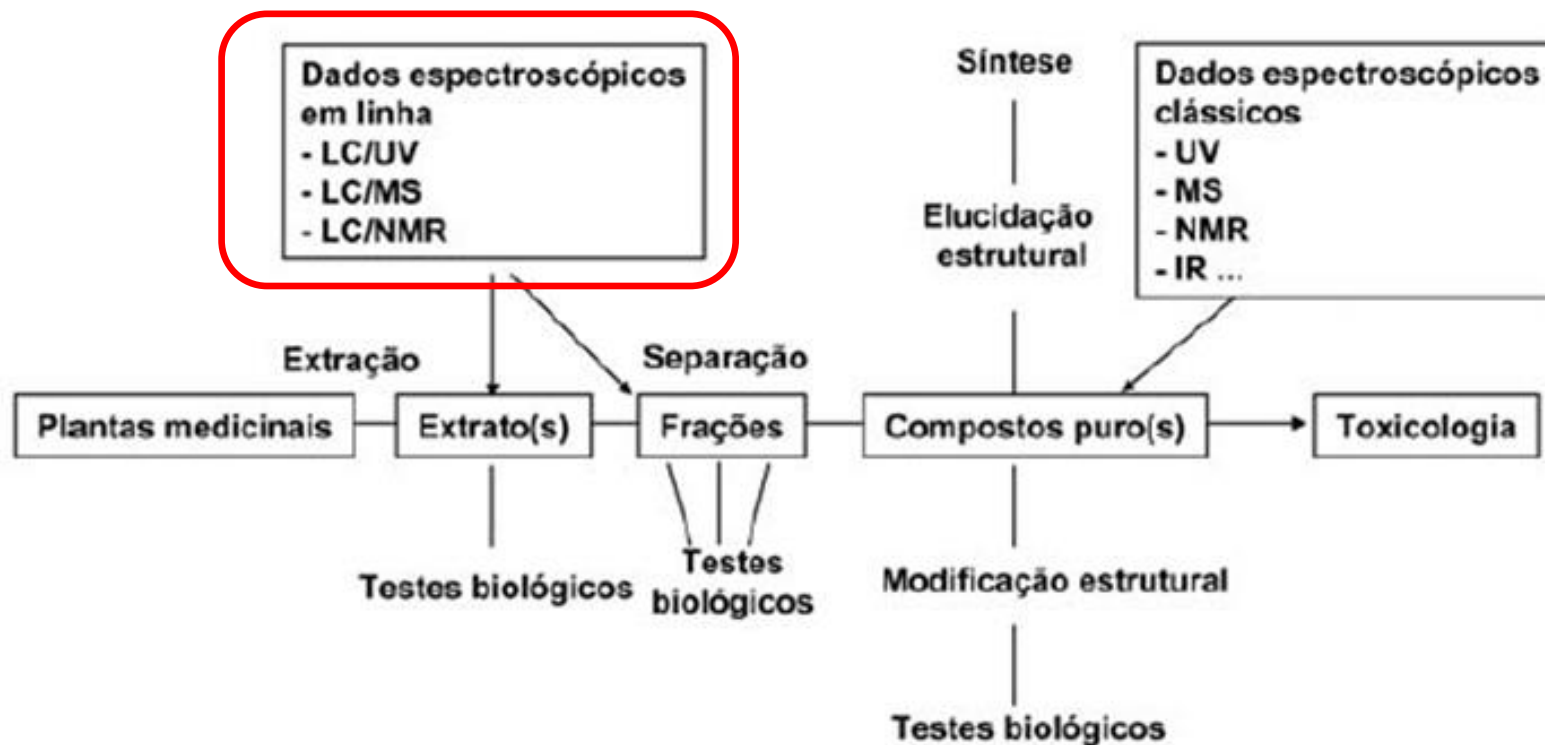
DAD



UV-VIS



A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS MODERNA



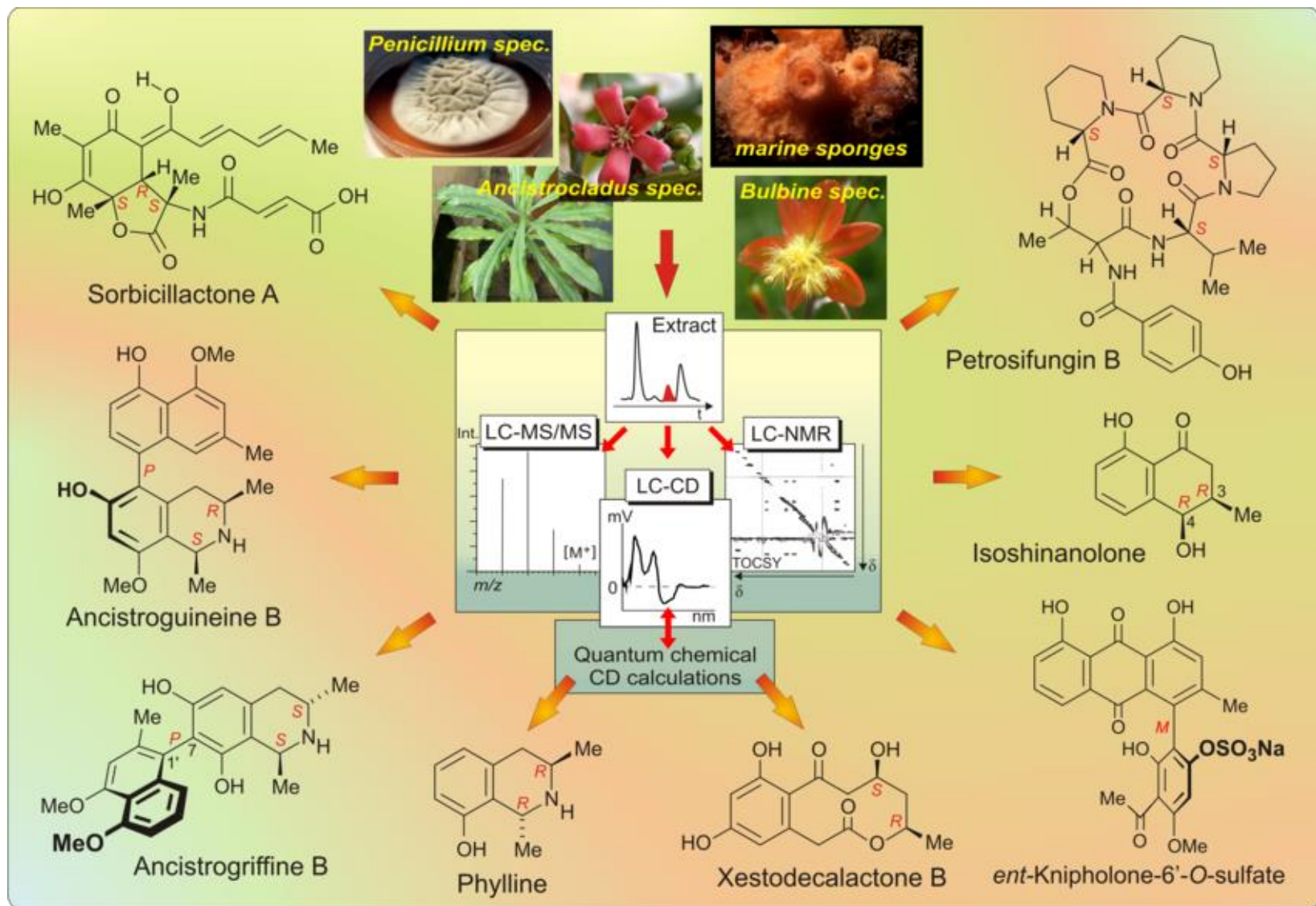
TÉCNICAS HIFENADAS

VANTAGENS

- Não necessita de uma grande quantidade do analito na sua forma purificada;
- Seletividade da amostra pode ser ajustada, levando a uma maior velocidade de análise ou uma melhora nos limites de detecção;
- Maior sensibilidade;
- Ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais.



NO CASO DOS PRODUTOS NATURAIS...



TÉCNICAS HIFENADAS

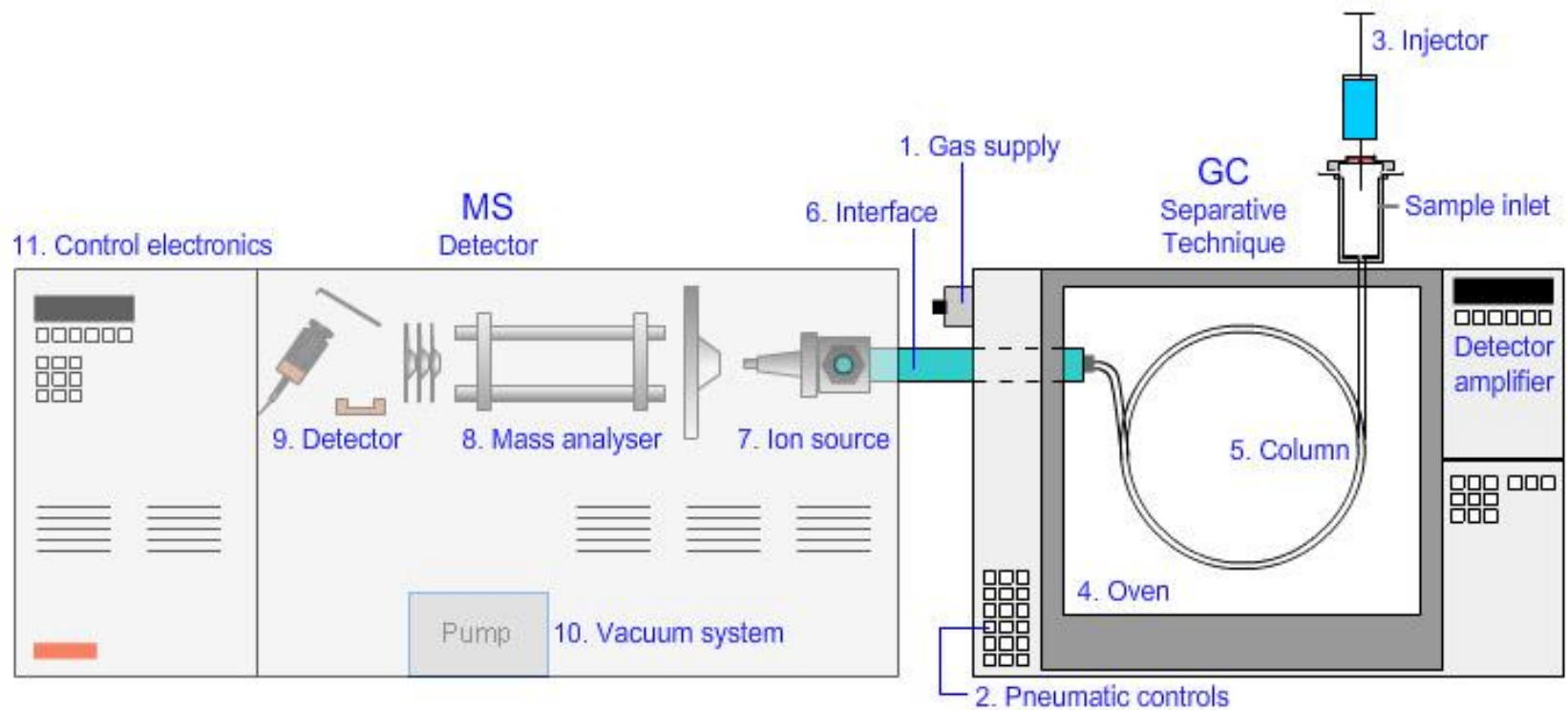
CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

- Refere-se ao acoplamento de um cromatógrafo a gás (CG) com um espectrometro de massas (EM).
- A cromatografia em fase gasosa foi a primeira técnica a ser interfaceada com o detector de massas, devido a facilidade do manuseio do efluente gasoso do cromatógrafo.
- Os espectros de massa obtidos por esta técnica hifenada oferece informações mais estrutural com base na interpretação de fragmentações.
- Os íons do fragmento com diferentes abundâncias relativas podem ser comparados com os espectros de biblioteca.

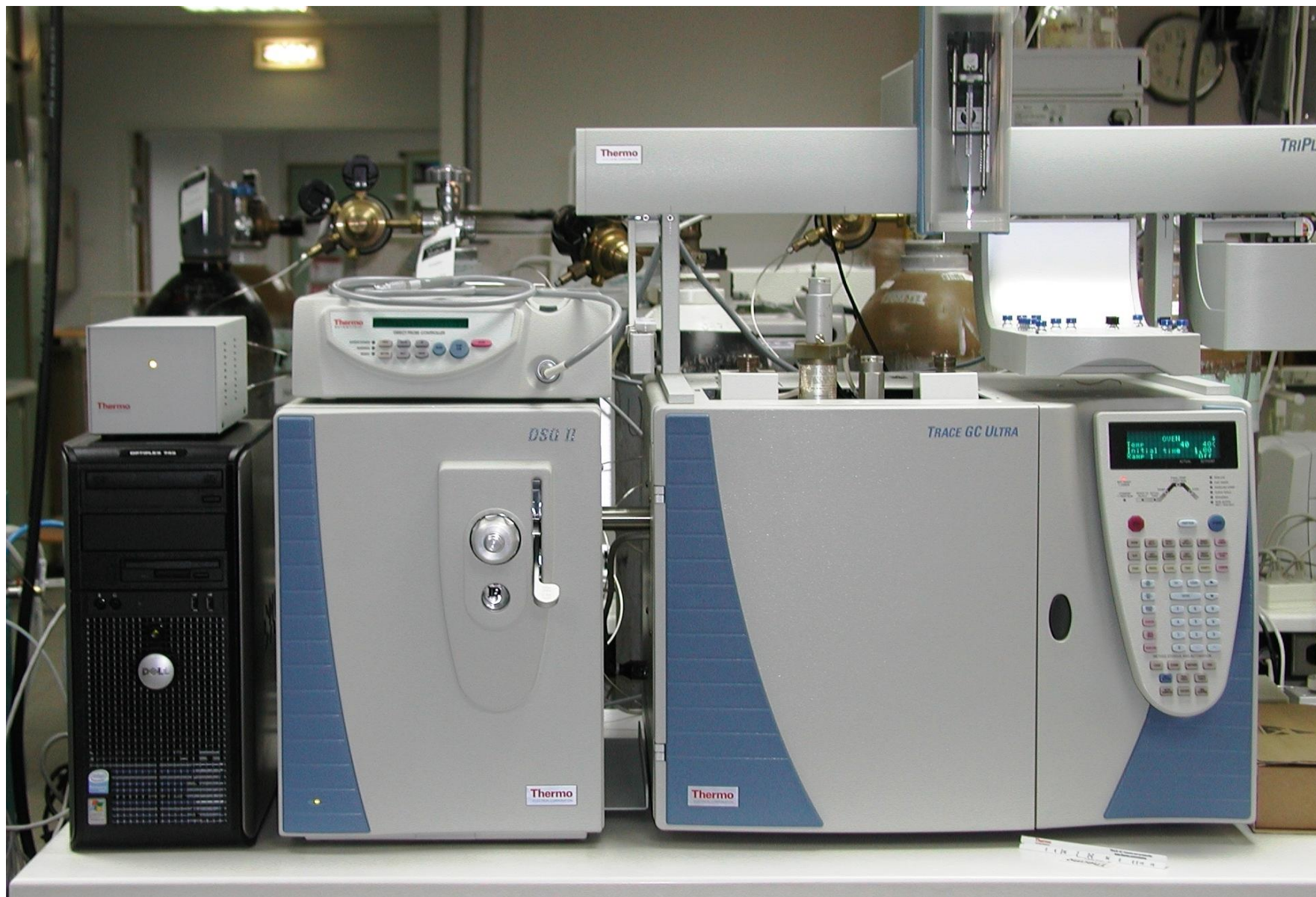


TÉCNICAS HIFENADAS

CG-EM



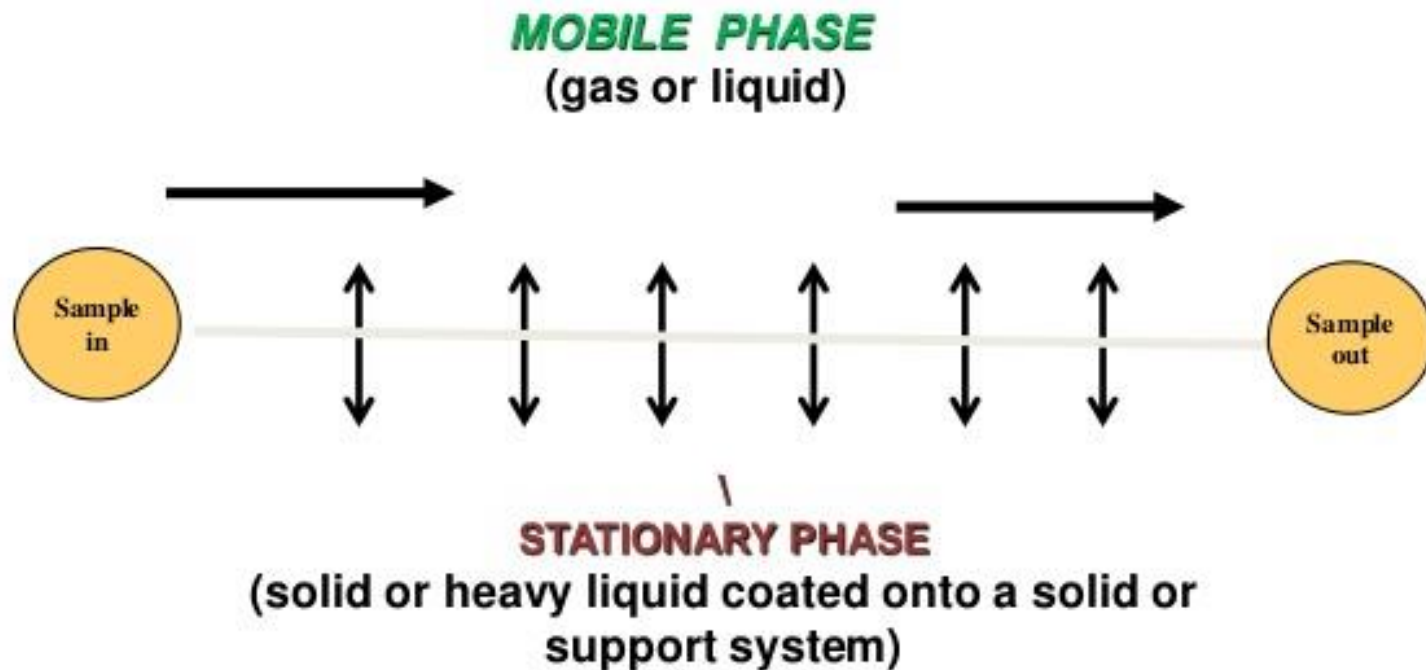
- O equipamento de CG/EM



Principle of GC

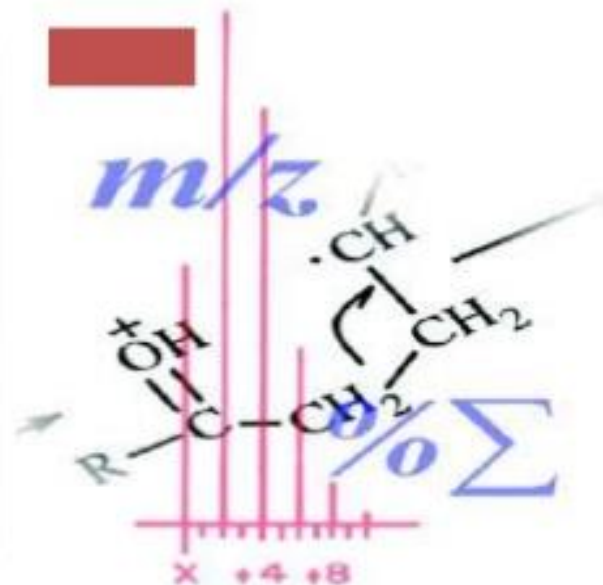
In GC the main principle of separation is **partition**.

The chromatographic process – partitioning



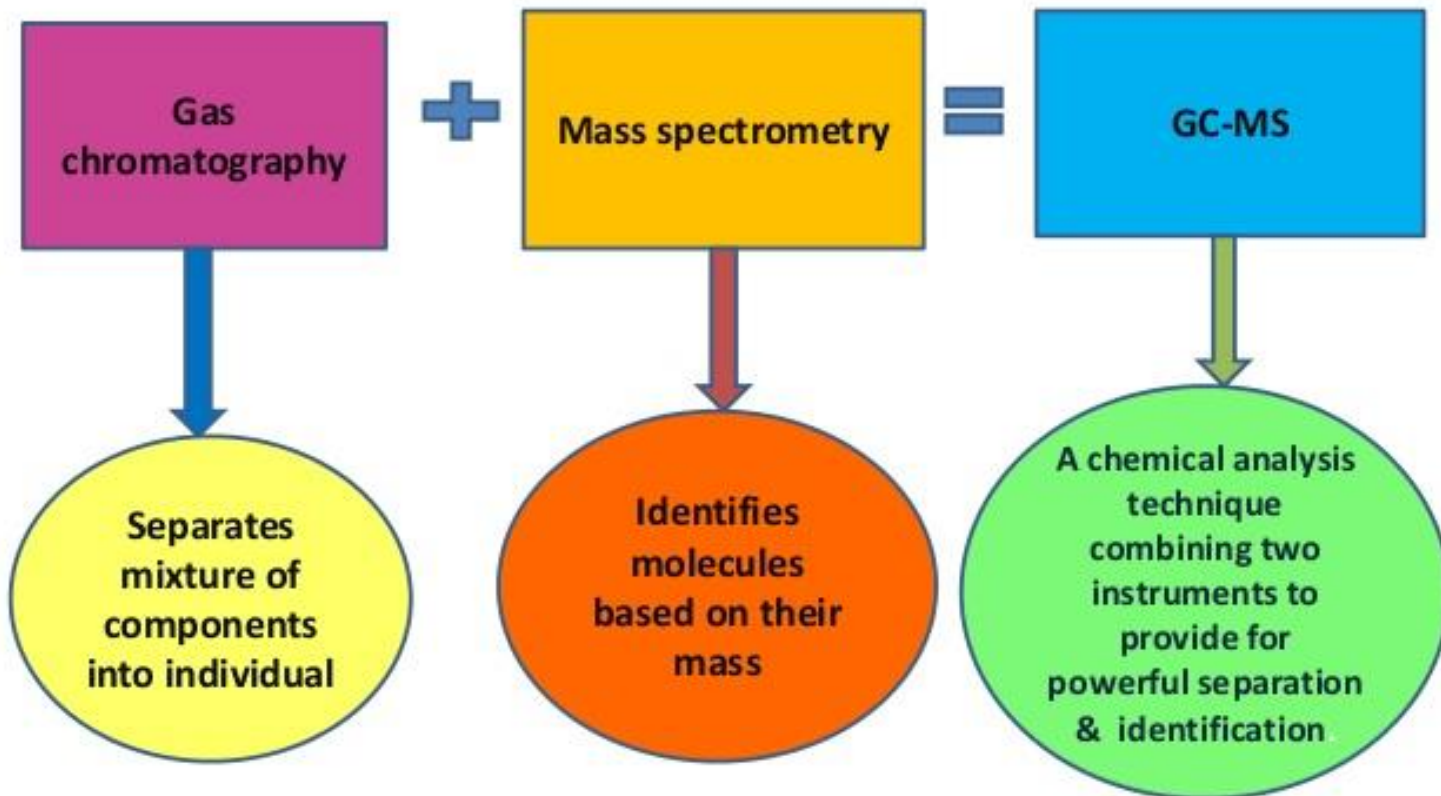
Mass Spectrometry

- Analytical method to measure the molecular or atomic weight of samples



GC-MS – A BRIEF

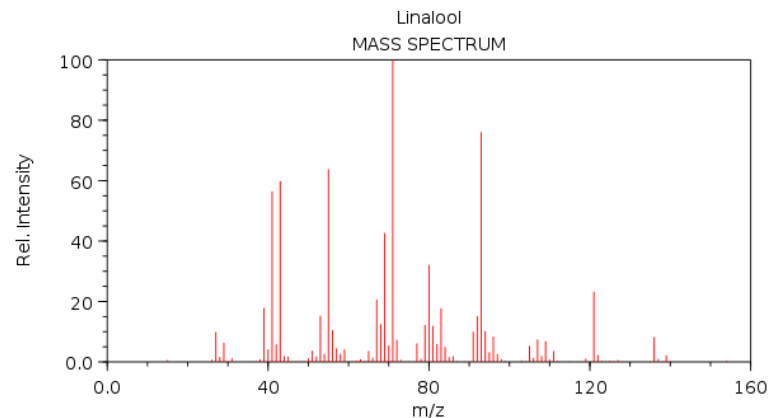
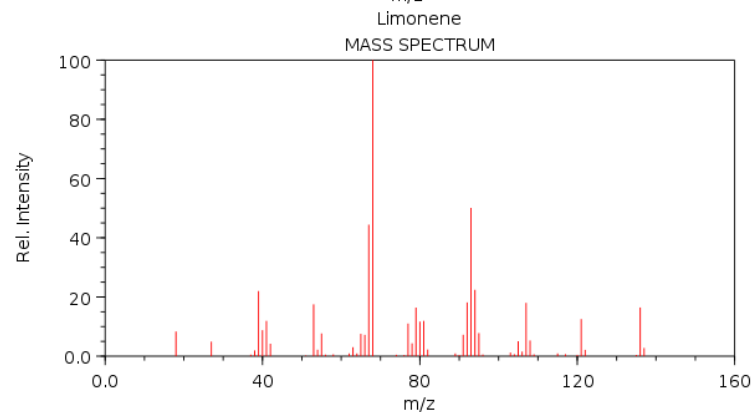
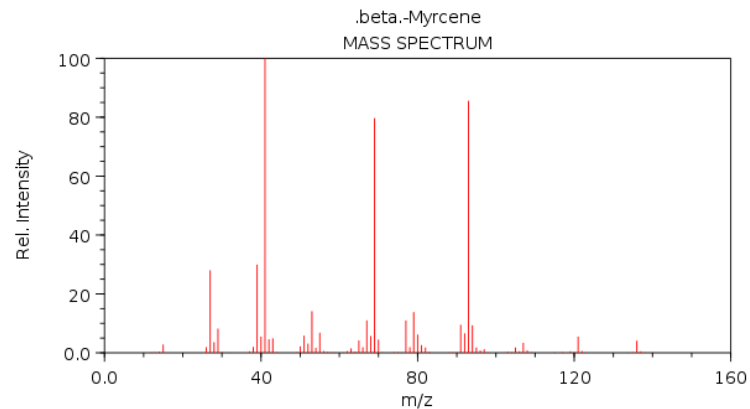
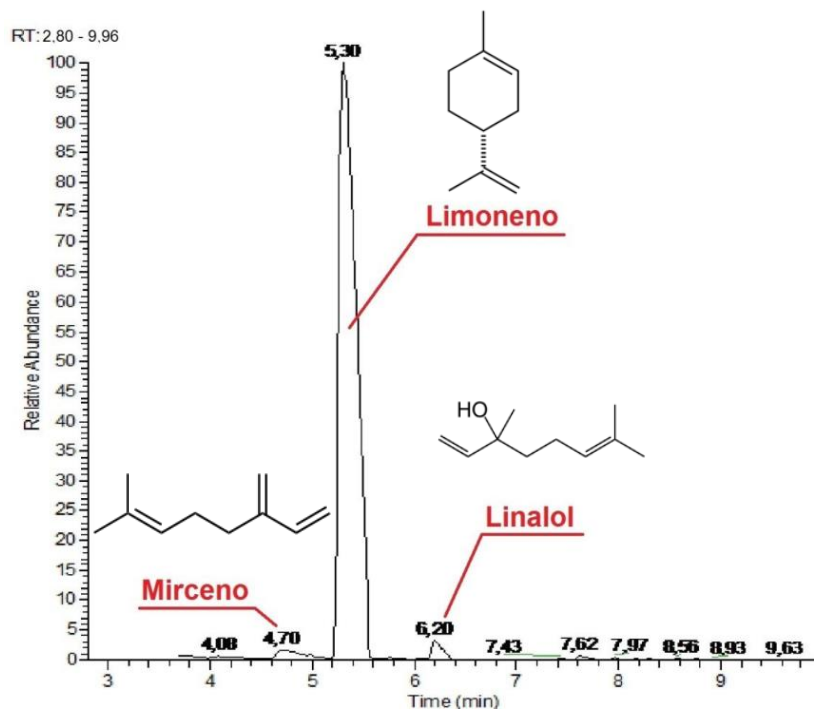
- It's a Hyphenated Technique
- Invented By James & Martin in 1952



TÉCNICAS HIFENADAS

CG-EM – APLICAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

Análise do óleo essencial do limão



TÉCNICAS HIFENADAS

CG-EM – APLICAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

Quim. Nova, Vol. 25, No. 1, 15-19, 2002.

CGAR E CGAR-EM NA ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DO EXTRATO HEXANICO DE *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE)

Alexsandro Branco e Moacir G. Pizzolatti*

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis - SC

Recebido em 20/9/00; aceito em 6/7/01

HRGC AND HRGC-MS IN THE ANALYSIS OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS ISOLATED FROM HEXANIC EXTRACT OF *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE). The fractionation column with SiO₂ of the hexane extract of *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae) yielded fractions containing hydrocarbons, carboxylic acids, sterols and pentacyclic triterpenes. Besides, one fraction showed the presence of several methyl esters, including four uncommon long chain palmitate esters as minor components. The characterization of these chemical constituents have been done by High Resolution Gas Chromatography (HRGC) and HRGC coupled to Mass Spectrometry (GC/MS). Campesterol, stigmasterol, b-sitosterol, glutin-5-en-3-ol were identified by HRGC co-injection with standards.

Keywords: *Sebastiania argutidens*; triterpenes; HRGC-MS.



Análise de extratos vegetais - compostos de baixa polaridade



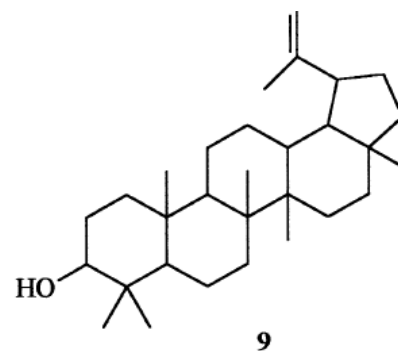
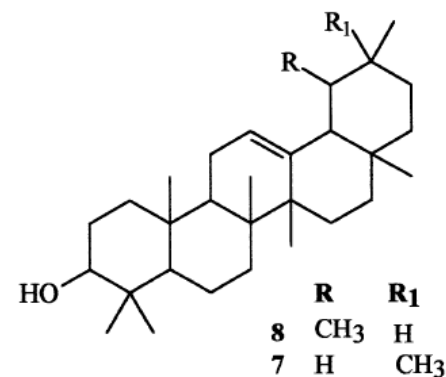
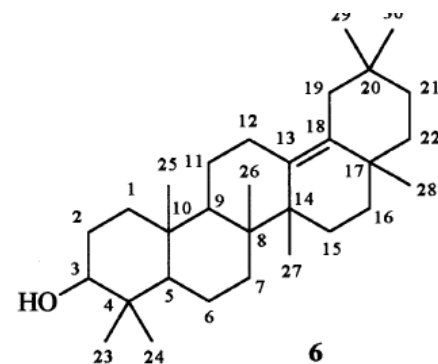
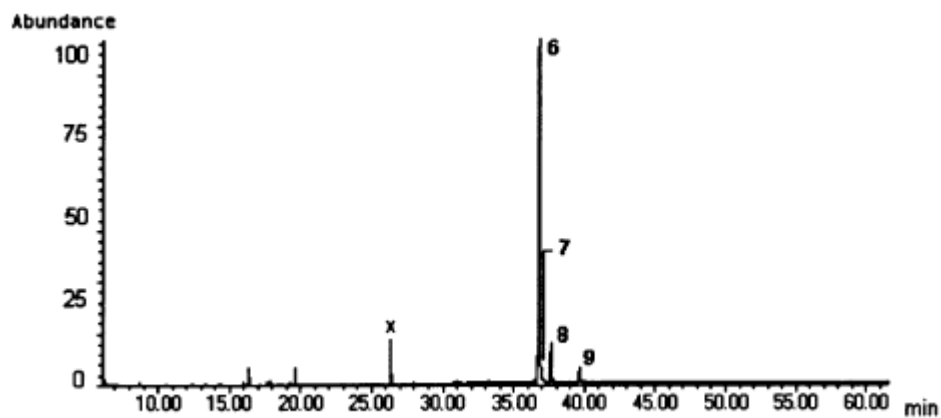
2 folhas de *S. argutidens*



Extrato hexânico



Análise por CG/EM



Vantagens

- EI fornece fragmentos / Ion molecular
- GC tem alta resolução
- Quantificação feita através de monitoramento de 1 ou mais íons
- Maior a massa → Maior seletividade

Desvantagens

- Tempos razoavelmente longos
- Necessidade de derivatização em vários casos



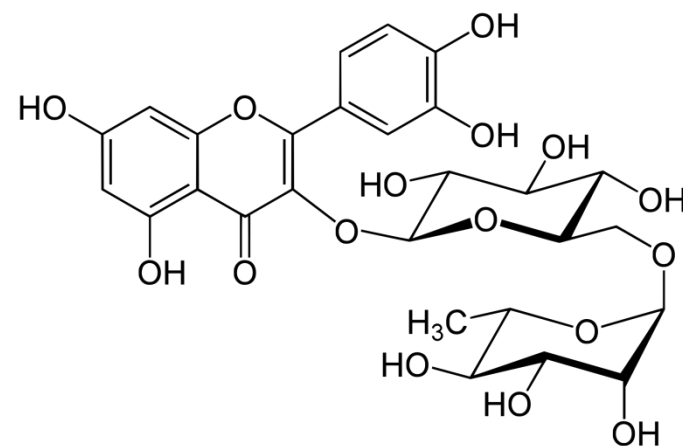
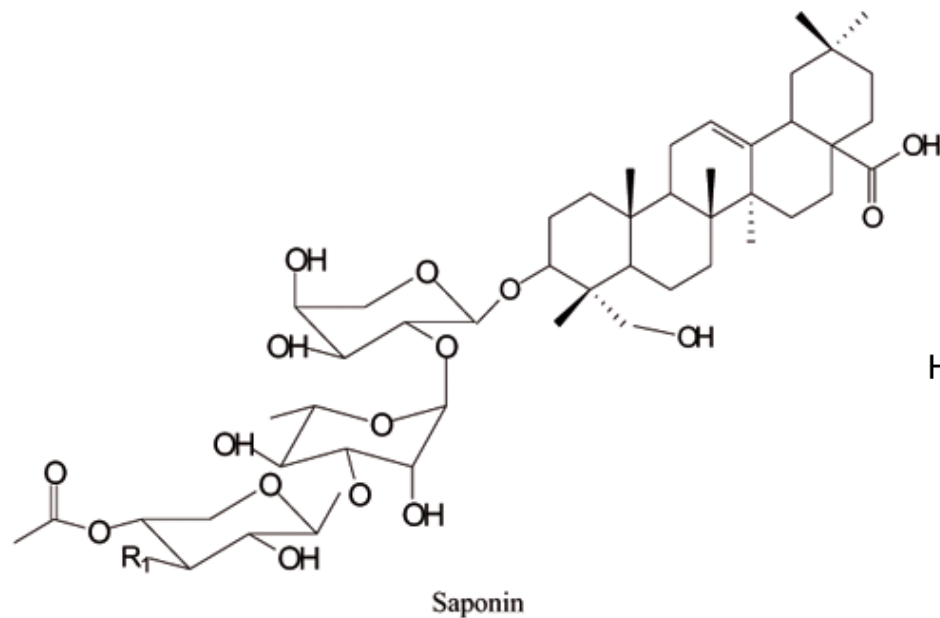
TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-EM

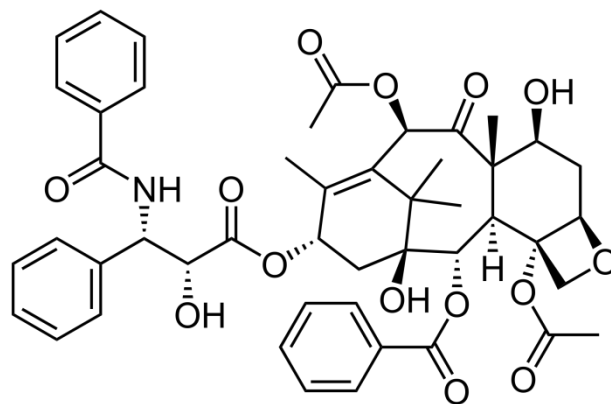
- Refere-se ao acoplamento de um cromatógrafo líquido (CLAE) com um espectrometro de massas (EM).
- Quando os compostos a serem analisados têm baixa volatilidade ou são muito polares para análise por CG, o método de escolha é CLAE.
- As amostras separadas pela cromatografia podem ser identificadas com base em seus dados de espectro de massas, confirmando suas identidades moleculares.



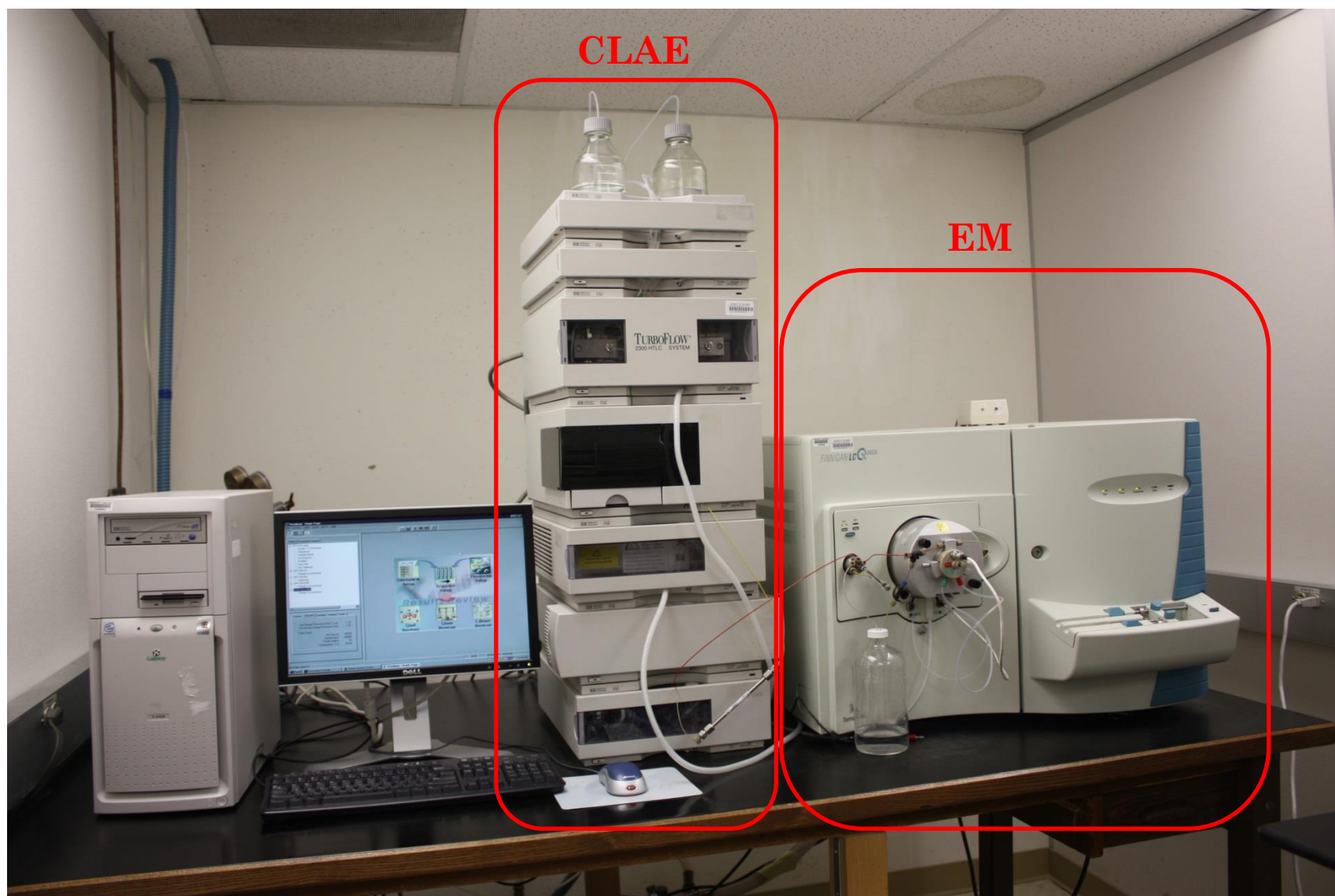
☐ Análise de compostos polares e com elevada massa Molecular.



Saponin 1 $R_1 = \text{OH}$
 Saponin 2 $R_1 = \text{OAc}$



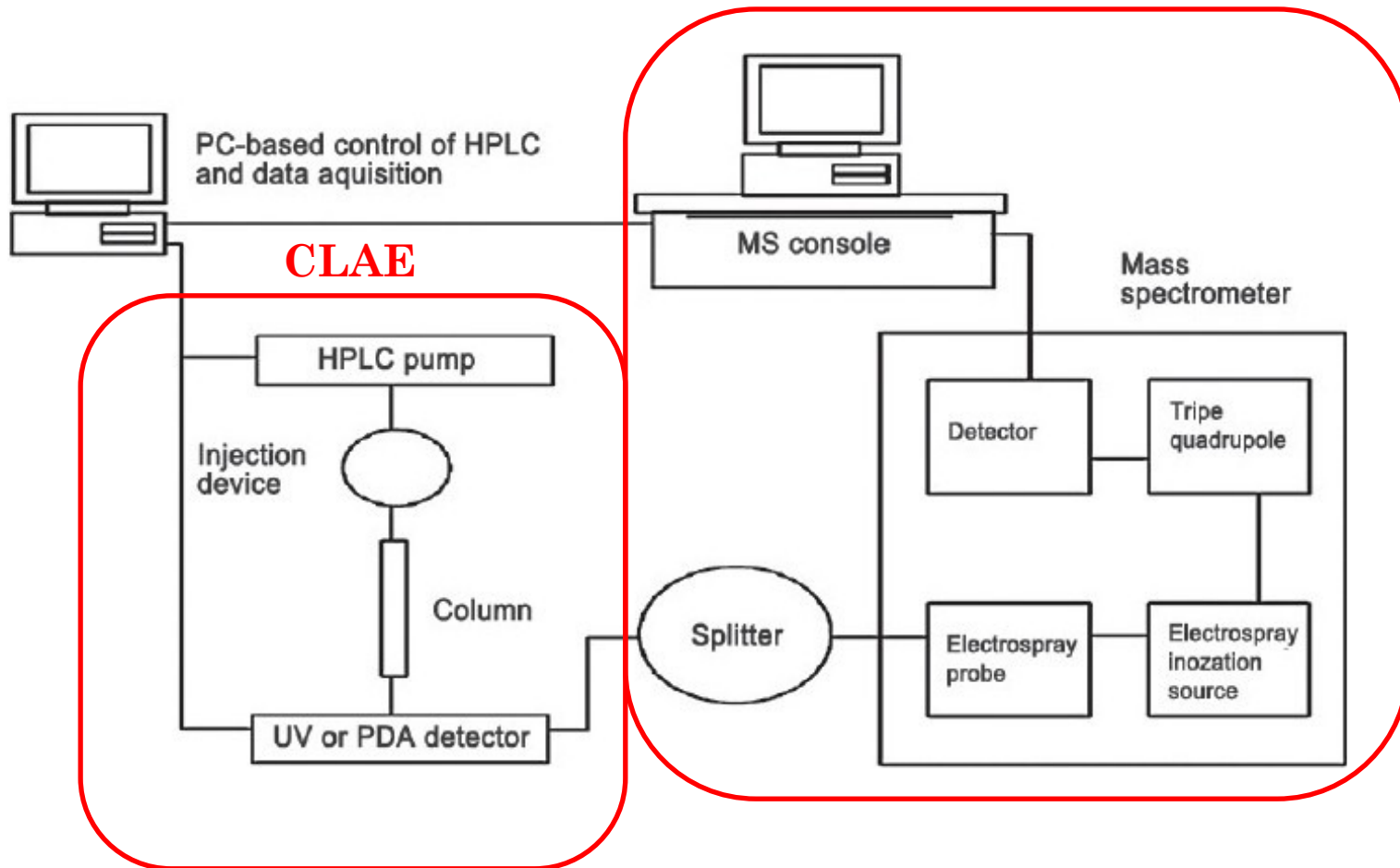
O equipamento de CLAE/EM



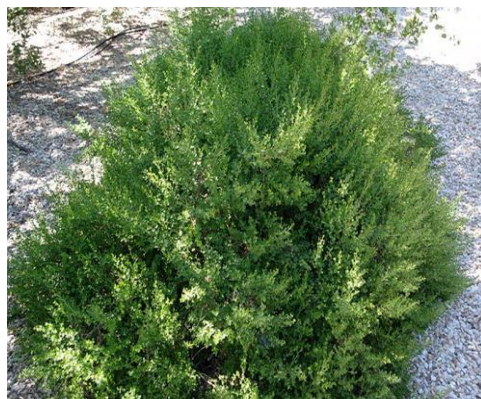
TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-EM

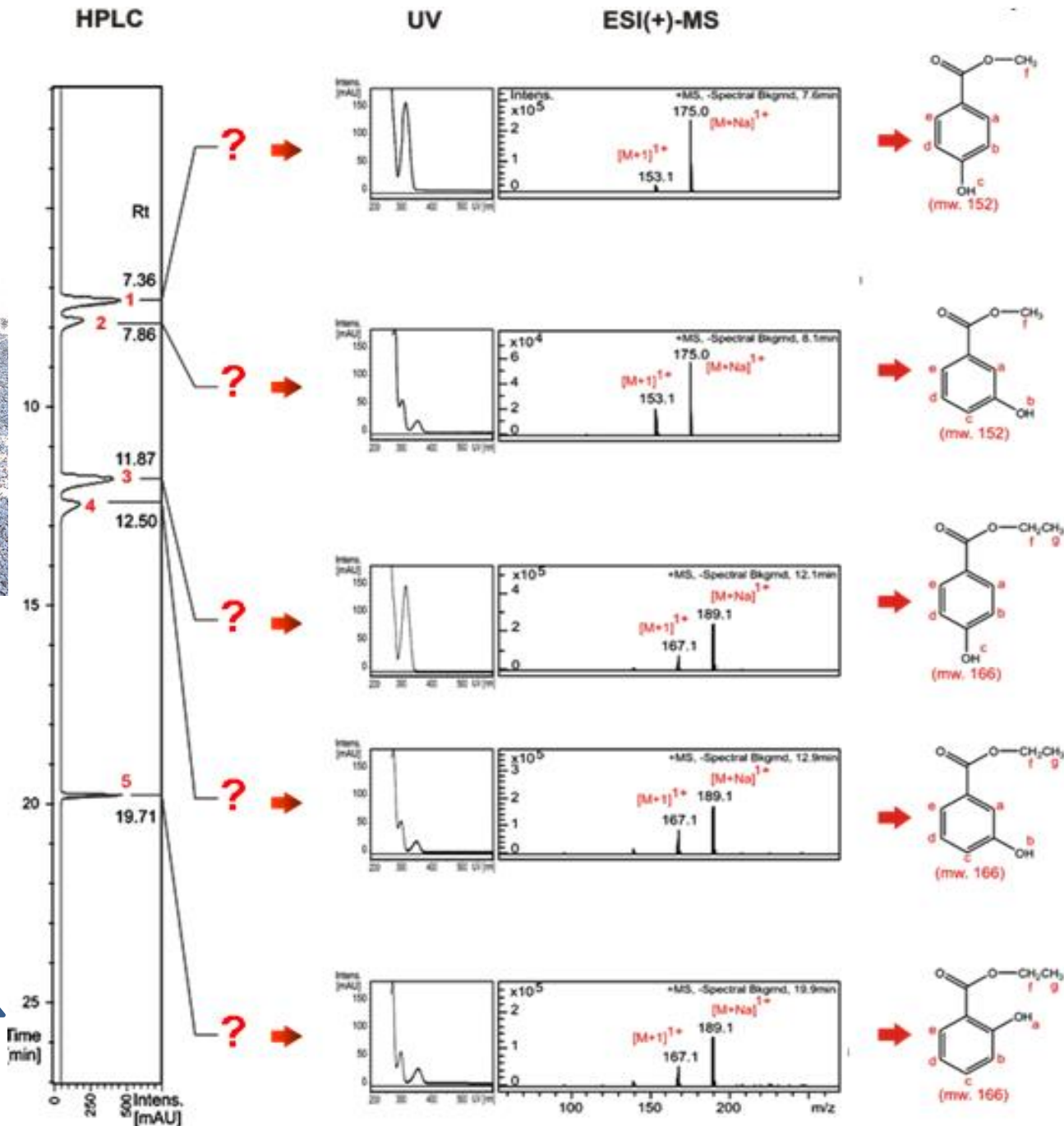
EM



Analysis of benzoic acid derivatives from *Baccharis* sp.



Preparation of crude extract (5 mg of leaves in MeOH)



TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-EM - APLICAÇÃO

Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis
from *Curcuma longa* by LC–MS/MS

Kuo-Yi Yang^a, Lei-Chwen Lin^{a,b}, Ting-Yu Tseng^c,
Shau-Chun Wang^d, Tung-Hu Tsai^{a,e,*}

^a Institute of Traditional Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

^b National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan

^c Ho-Ping Branch, Taipei City Hospital, Taipei, Taiwan

^d Department of Chemistry and Biochemistry, National Chung Cheng University, Chia-Yi 621, Taiwan

^e Department of Education and Research, Taipei City Hospital, Taipei, Taiwan

Received 1 January 2007; accepted 8 March 2007

Available online 18 March 2007

Journal of Chromatography B, 853 (2007) 183–189



Curcuma longa
AÇAFRÃO DA TERRA



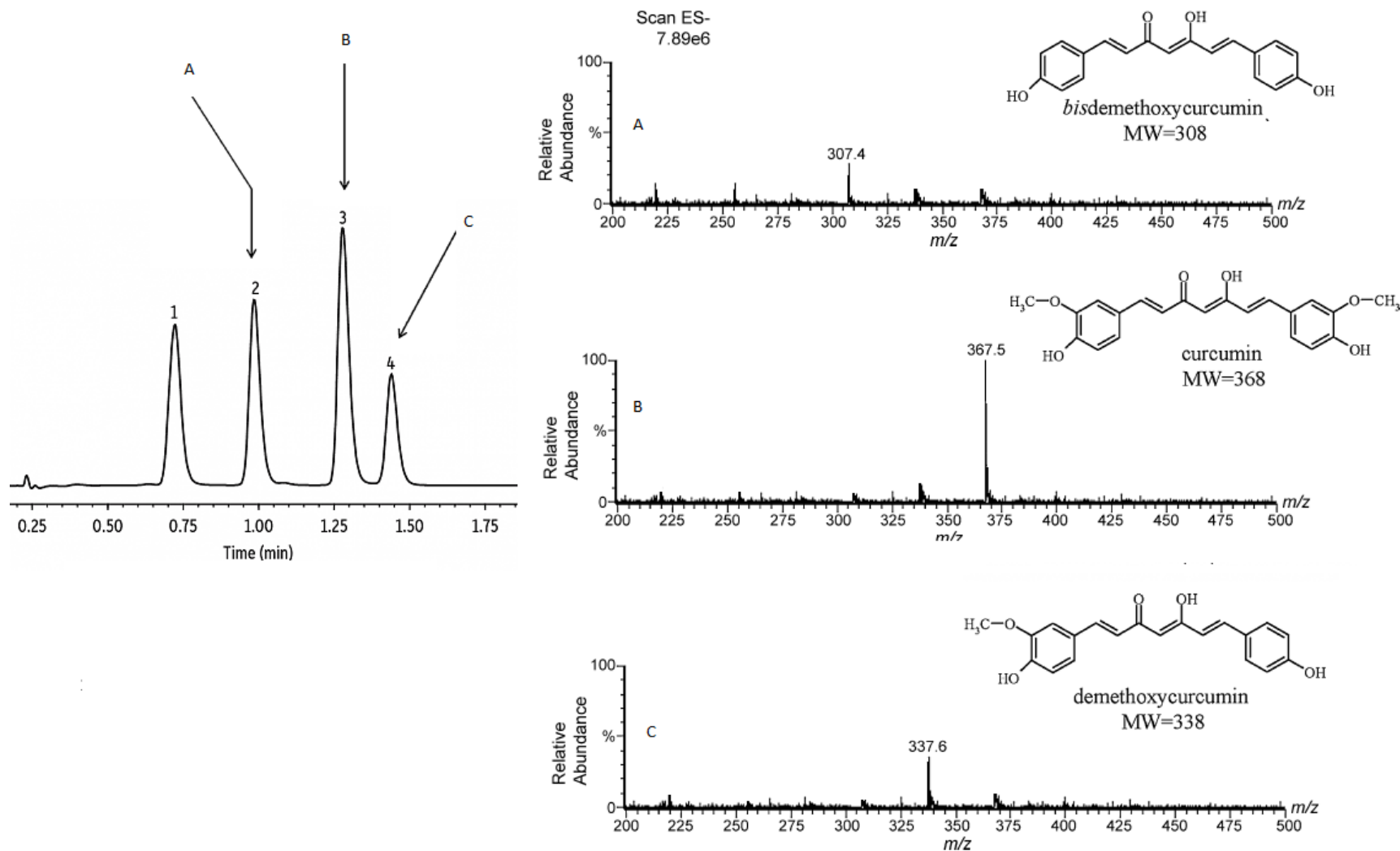


Fig. 1. The full scan mass spectrum of curcuminoid mixture, containing curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The molecular ion peaks of these three major ingredients are marked. The chemical structures of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin and their molecular weights are illustrated on the top of mass spectrum.

TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-EM - APLICAÇÃO



Pergamon

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

biochemical
systematics
and ecology

Biochemical Systematics and Ecology 31 (2003) 813–843

www.elsevier.com/locate/biochemsyseco

The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes

G.C. Kite *, N.C. Veitch, R.J. Grayer, M.S.J. Simmonds

Royal Botanic Gardens Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK





Figostigma

- Calabar bean

- Historical 'ordeal' bean in the Calabar area of Nigeria
- Given to people on trial – if died, were guilty, if vomit & live, not guilty

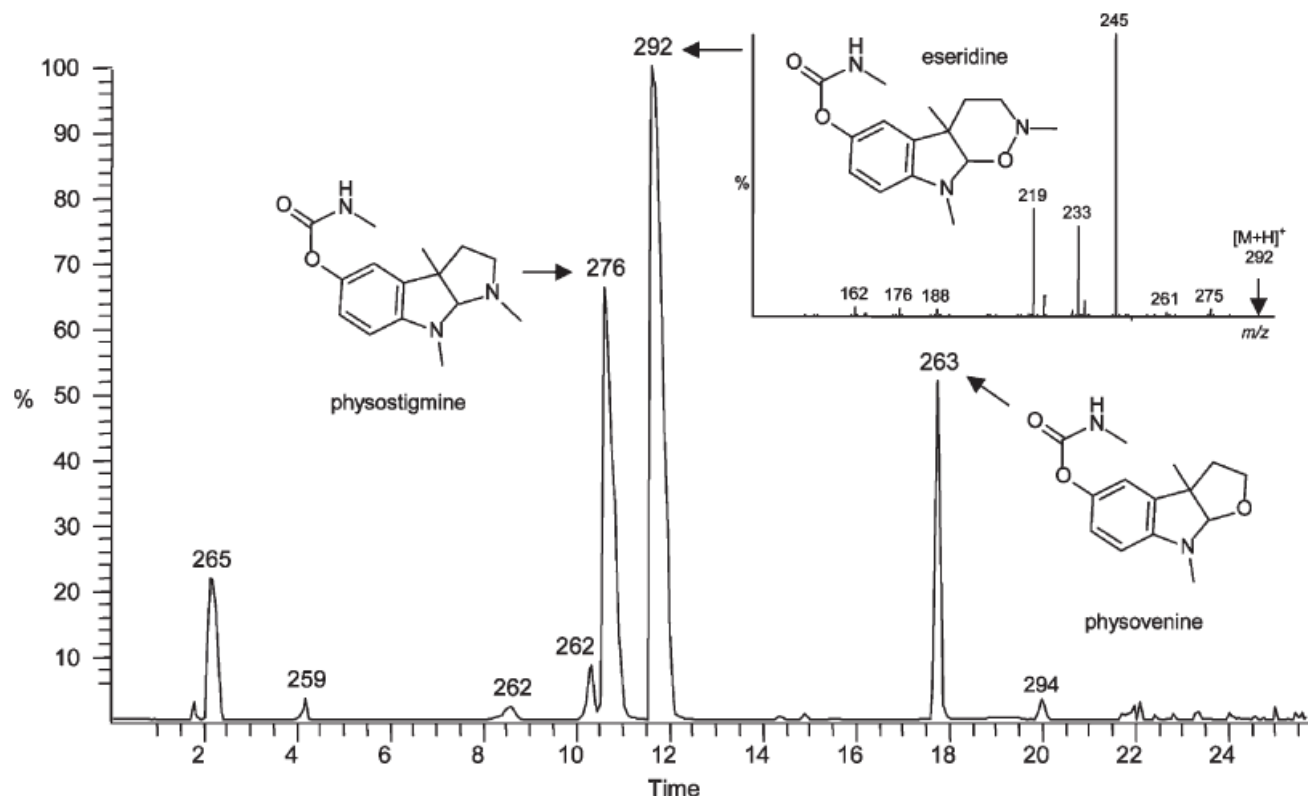


Fig. 7. LC-APCI-MS analysis of a crude methanol extract from seeds of *Physostigma venenosum* showing acceptable chromatography of alkaloids on a hydrophilic endcapped, ether-linked phenyl phase column using a simple aqueous methanol mobile phase gradient. Numbers above the peaks are the m/z values of the $[M+H]^+$ ions observed as the base ion in the mass spectra. The CID spectrum (recorded by MS-MS) of eseridine is shown as an example.

TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-RMN

- Refere-se ao acoplamento de um cromatógrafo líquido (CLAE) com um equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN).
- O uso de CLAE-EM nem sempre é suficiente para a identificação de compostos, muitas vezes, faltam informações estruturais conferidas pela CLAE-RMN.
- O método permite a identificação de muitos compostos numa só análise.
- Compostos de ampla faixa de polaridade podem ser analisados por CLAE-RMN incluindo aqueles que não podem ser analisados por CG-EM
- A resposta obtida por CLAE-RMN reflete diretamente a concentração do analito, enquanto que, em CLAE-EM, a resposta depende da eficiência de ionização, ou seja, das propriedades químicas do analito.
- Entre as técnicas hifenadas disponíveis até então, CLAE-RMN é o menos sensível e um dos mais caros, sendo portanto, de utilização restrita.

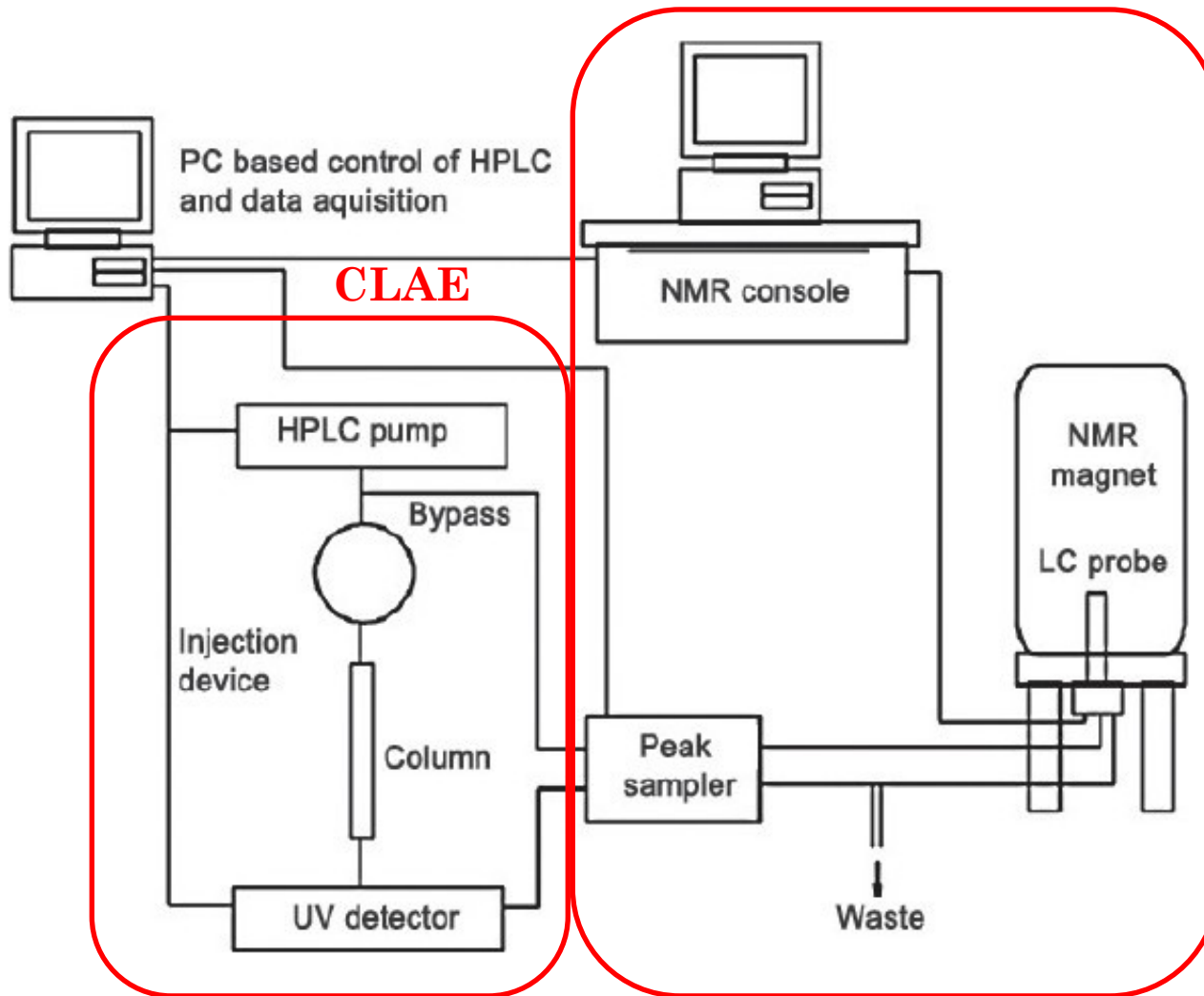
RMN

CLAE

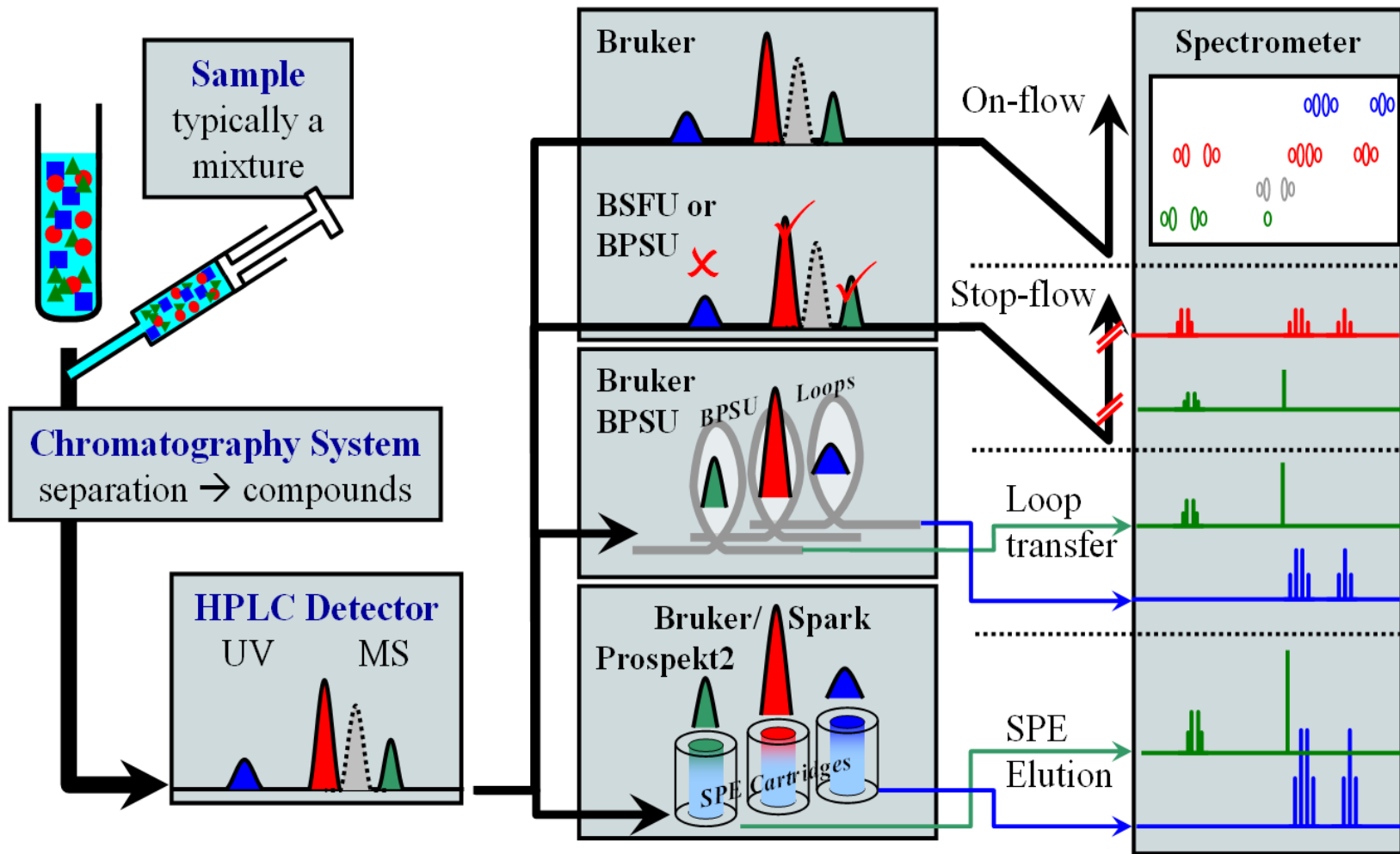


TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-RMN



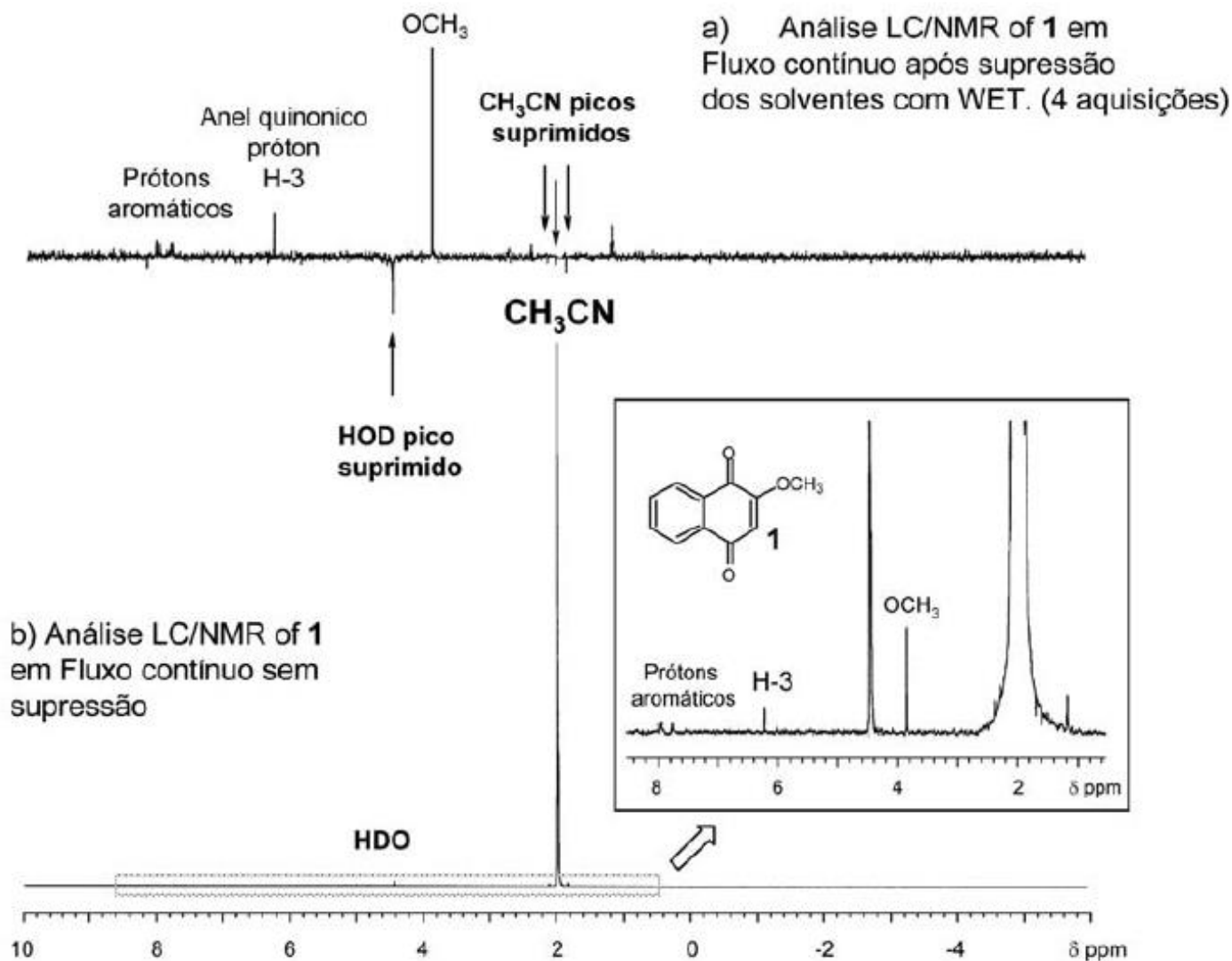
Measurements - Schematic view



TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-RMN - APLICAÇÃO

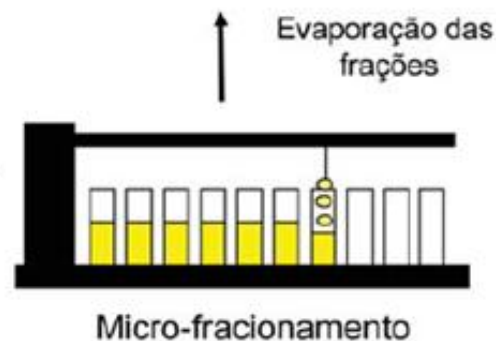
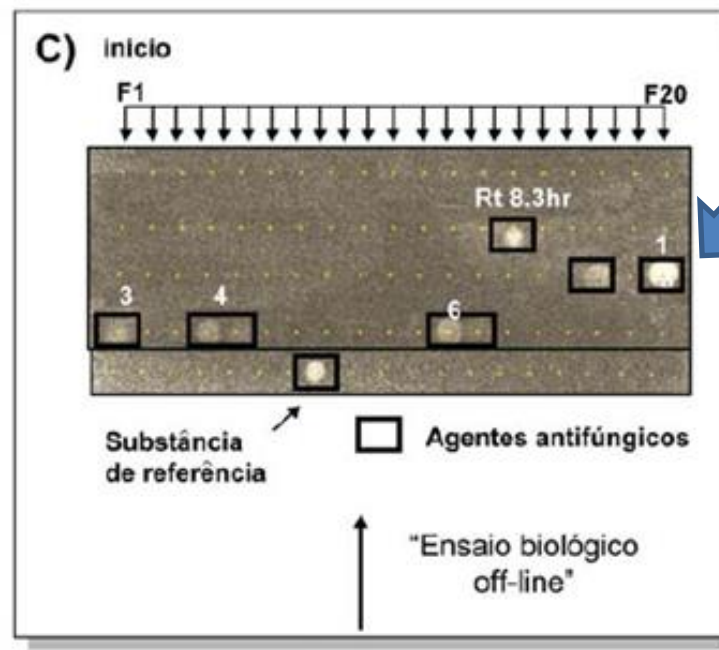
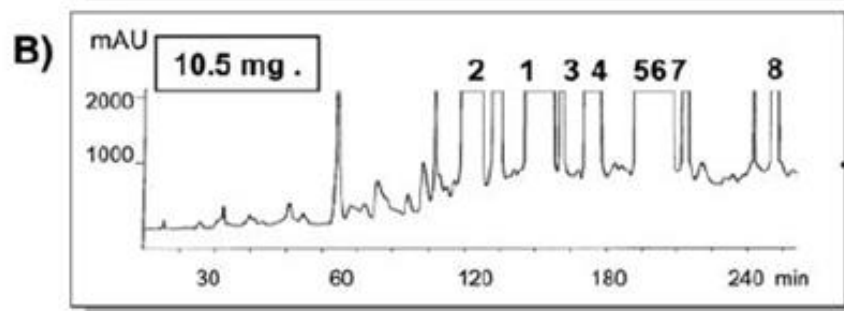
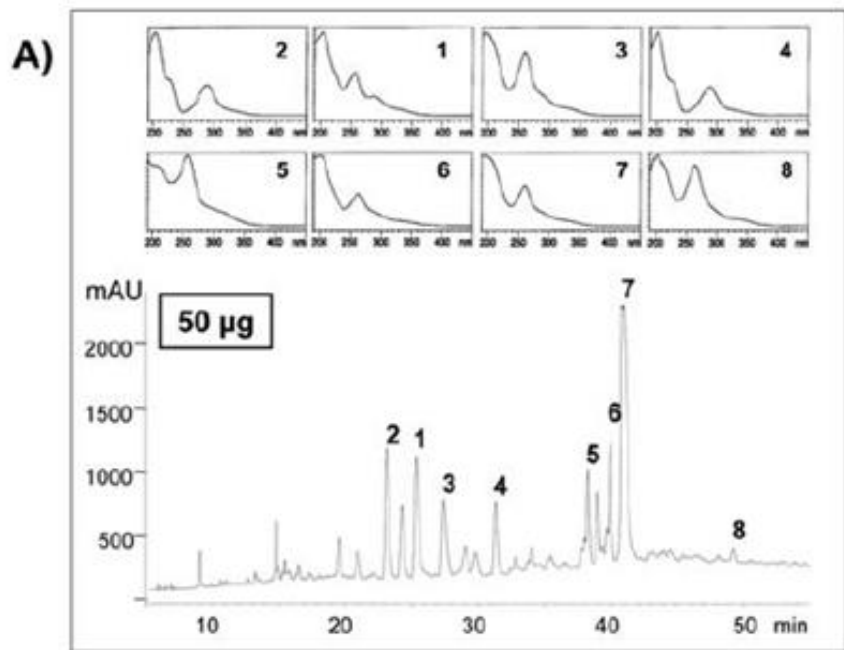
Identificação de benzoquinonas de *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae)



TÉCNICAS HIFENADAS

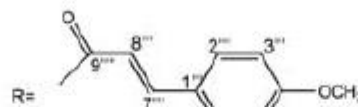
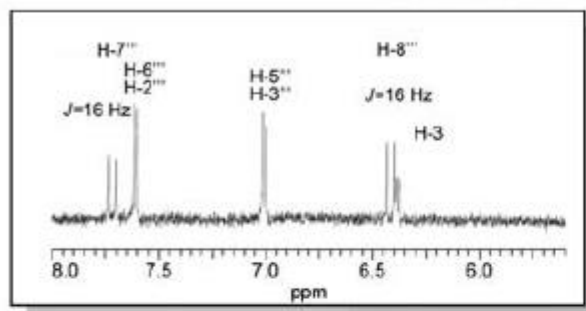
CLAE-RMN - APLICAÇÃO

Seleção de compostos bioativos de *Genipa americana* (Rubiaceae)

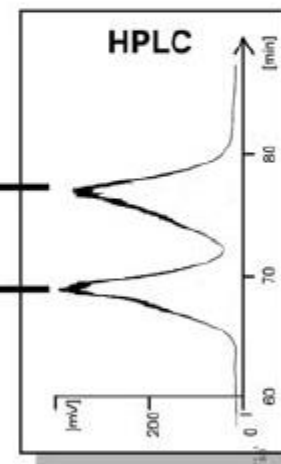
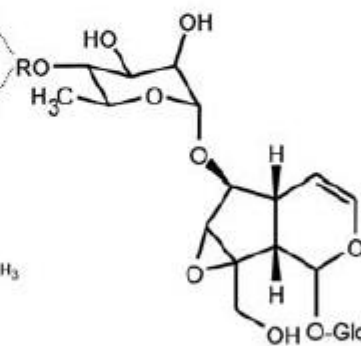
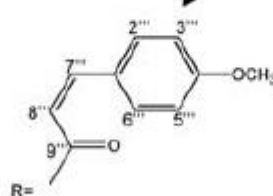
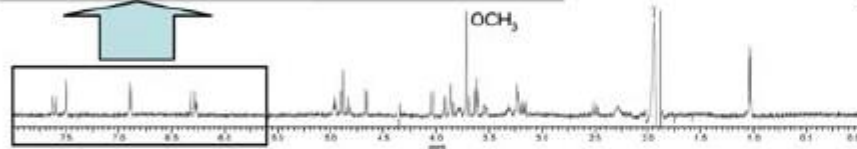


Análise de CL/RMN (em MeCN:D₂O)

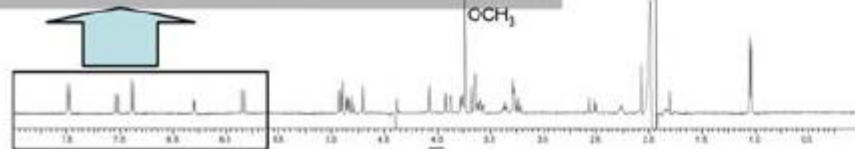
¹H-RMN



CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS !!



¹H-RMN



TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE-RMN - APLICAÇÃO

Journal of Chromatography A, 1020 (2003) 75–89

On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography–UV detection–multiple mass spectrometry and liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectrometry

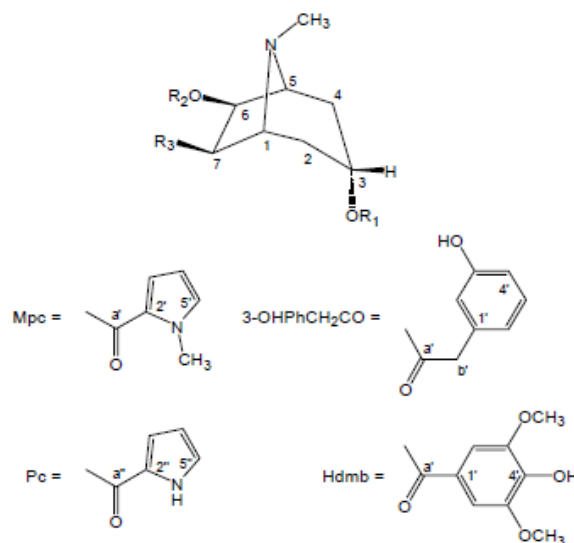
B. Zanolari^a, J.-L. Wolfender^a, D. Guilet^a, A. Marston^a,
E.F. Queiroz^a, M.Q. Paulo^b, K. Hostettmann^{a,*}

^a Institut de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Lausanne, BEP, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^b Laboratório de Química de Produtos Naturais, CCEN, Departamento de Química,
Universidade Federal de Paraíba, 58059 João Pessoa, Paraíba, Brazil

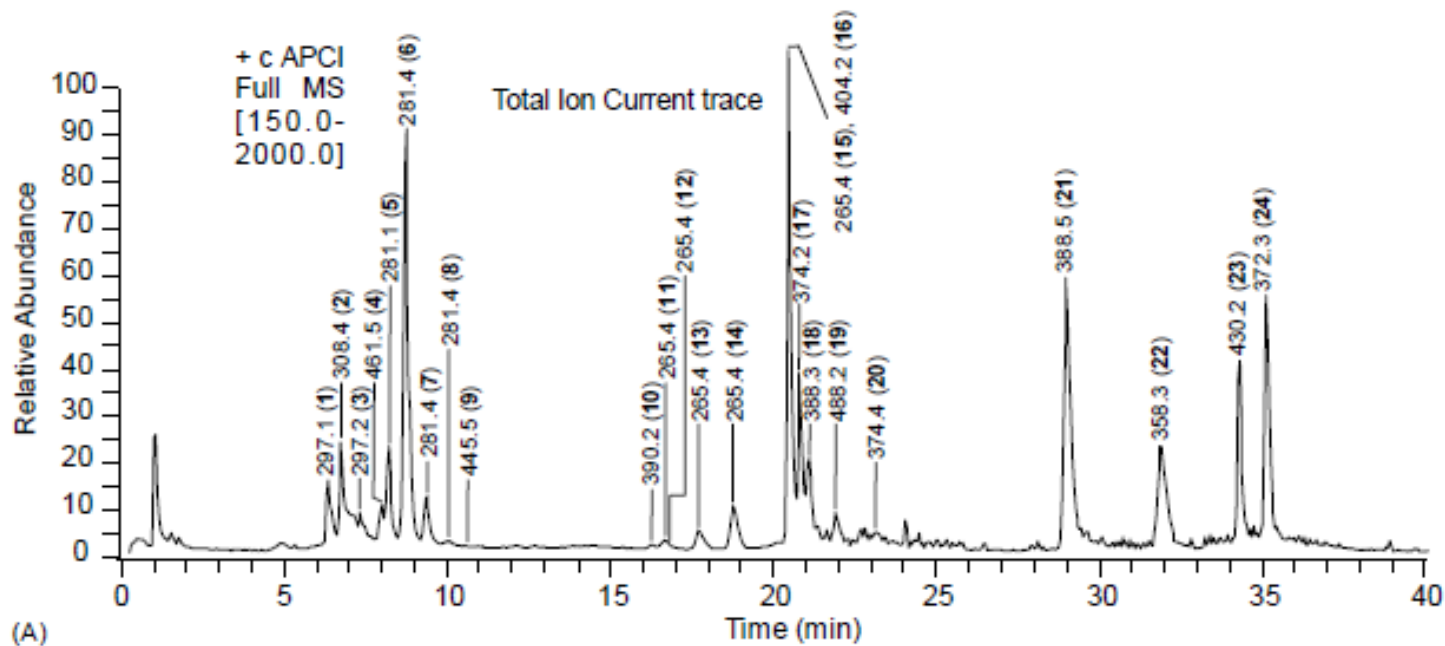
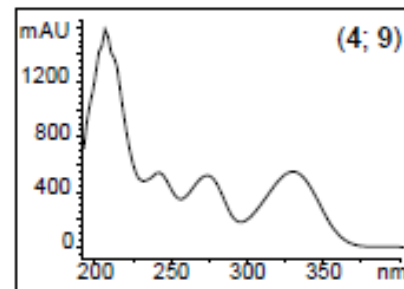
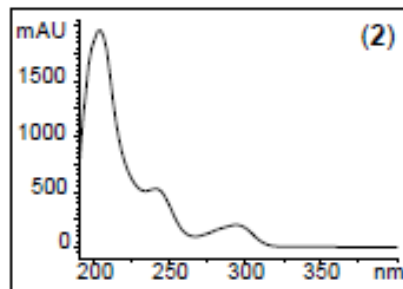
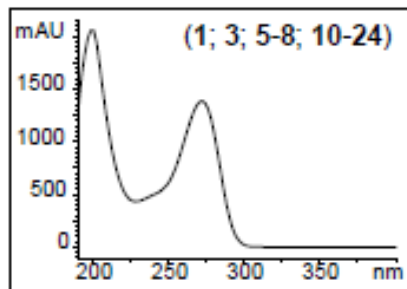


catuaba



TÉCNICAS HIFENADAS

CLAE/RMN - APLICAÇÃO



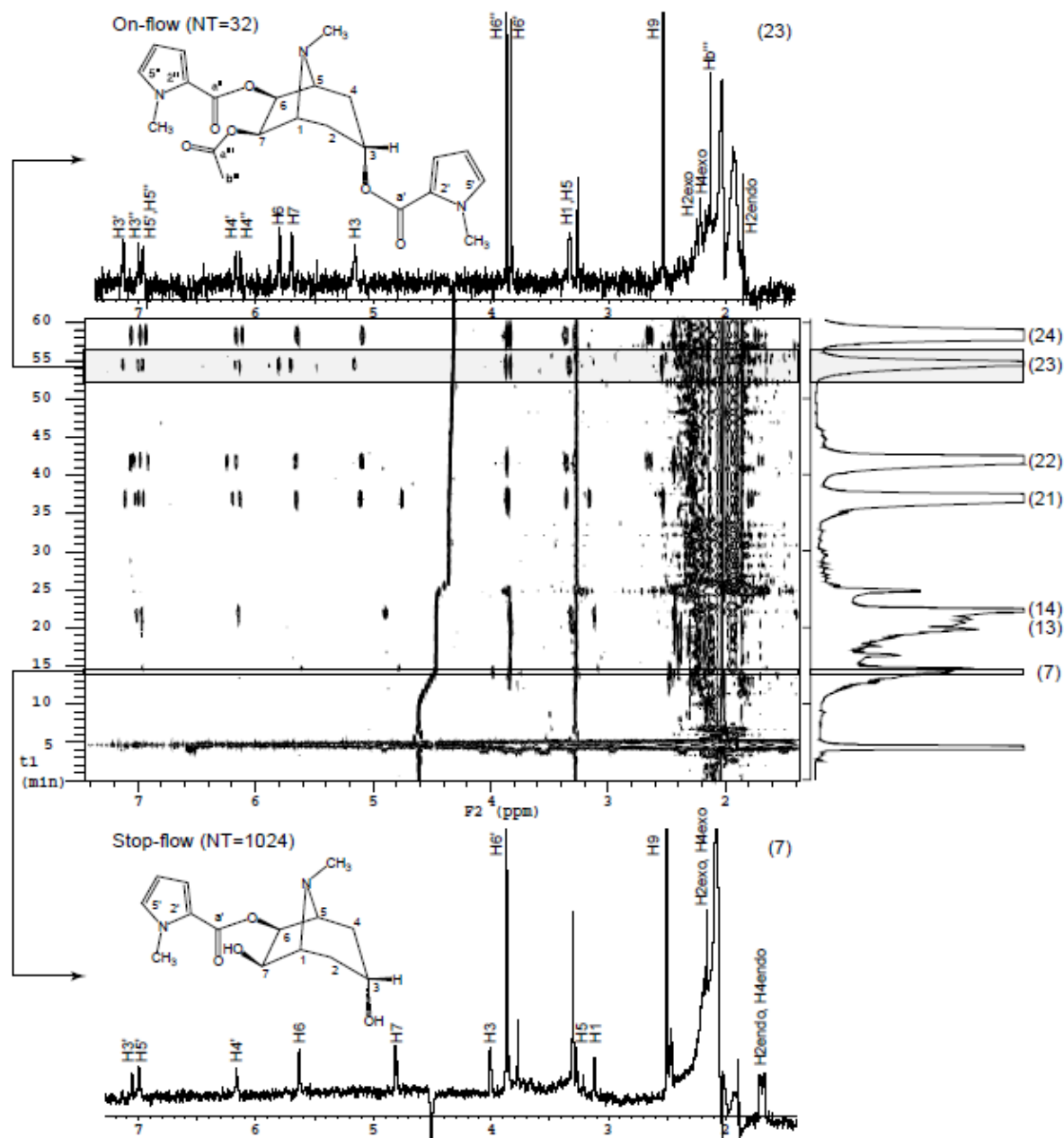


Fig. 3. On-flow LC-NMR contour plot of the alkaloid extract of *E. vacciniifolium*. On this two-dimensional plot all ^1H NMR resonances of the analytes appear as dots. ^1H NMR spectra of compounds 7 and 23 are shown as examples of resolution for on-flow and stop-flow analyses, respectively.

TÉCNICAS HIFENADAS

PANORAMA GERAL

Técnica	Característica	Vantagens	Desvantagens
CG-EM	Identificação de compostos voláteis. Fornece informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.	- Fornece fragmentos / íon molecular - Alta resolução (CG) - Quantificação feita através de monitoramento de 1 ou mais íons - Maior a massa → Maior seletividade	- Tempos razoavelmente longos - Necessidade de derivatização em vários casos - Eficiente apenas com compostos voláteis.
CLAE-EM	Utilizado para compostos de baixa volatilidade. Confirmação de identidade molecular.	- Fornece fragmentos / Íon molecular - Analisa compostos com ampla faixa de polaridade	- Não confere diretamente a concentração do analito
CLAE-RMN	Fornece informações estruturais.	- Confere informações estruturais - Analisa compostos com ampla faixa de polaridade - Confere diretamente a concentração do analito - Identifica vários analitos em um só espectro	- Baixa sensibilidade - Alto custo

OBRIGADO!!!

