



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
"СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"**

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
Катедра по органична химия и фармакогнозия

Розалина Пенкова Керемедчиева

***Синтез на йонни течности. Екстракция на
природни съединения с йонни течности***

АВТОРЕФЕРАТ

на

дисертация за присъждане на научната и образователна степен
"Доктор"

по професионално направление 4.2. – Химически науки (Органична химия)

Научен ръководител: доц. д-р Милен Богданов

София, 2017 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от катедрен съвет на Катедра по органична химия и фармакогнозия, Факултет по химия и фармация към Софийски университет "Св. Климент Охридски", състоял се на 30.01.2017 г.

Дисертационният труд е написан на 112 печатни страници, съдържа 5 схеми, 7 таблици и 36 фигури. Библиографската справка обхваща 121 литературни източника.

Съдържание

Въведение.....	1
2. Синтез, пречистване и охарактеризиране на йонни течности.....	4
3. Растителна суровина, алкалоиден състав на <i>Gl. flavum</i> и количествен анализ на <i>glaucine</i>	12
4. Екстракция на <i>glaucine</i> с йонни течности – оптимизация на екстракционните условия	14
4.1. Влияние на химическата структура на аниона.....	14
4.2. Влияние на температурата.....	17
4.3. Влияние на катиона	19
4.4. Влияние на концентрацията	20
4.5. Влияние на съотношението твърдо вещество (растителен материал) - екстрагент	21
5. Разработване на нов HPLC метод за количествено определяне на <i>glaucine</i> в жълт мак	23
5.1. Сравняване на методи за количествено определяне на <i>glaucine</i>	23
5.2. Аналитично представяне на предложения HPLC метод.....	24
5.3. Регенериране на йонни течности след екстракция.....	26
6. Дизайн на цялостен процес за изолиране на <i>glaucine</i> с помощта на йонни течности	28
6.1. Екстракция на растителен материал посредством последователни екстракции.....	28
6.2. Изолиране на <i>glaucine</i> и регенериране на йонна течност.....	31
6.3. Разделяне на <i>glaucine</i> във водни двуфазни системи.....	34
7. Потенциал за трансфер на знания и приложимост на резултатите (вместо заключение).....	39
Обобщение и изводи.....	43
Използвана литература.....	45
Публикации, забелязани цитати и участия в научни форуми.....	50

ВЪВЕДЕНИЕ

Микроорганизмите, растенията и животните представляват устойчив източник на полезни за човека природни продукти, като растителното царство предлага разнообразие от видове, използвани от хилядолетия в народната медицина при лечение на многобройни заболявания в различни области по света. Дори днес, те все още са основен източник на идеи за разработването на нови лекарствени препарати, функционални храни и хранителни добавки [1]. Вторичните метаболити са биоактивни природни съединения, които се синтезират в живите организми в резултат на външни стресови въздействия като засушаване, механично нараняване, патогенна инвазия и др. Фитохимичното производство на природни продукти се осъществява по добре утвърдени технологии [2, 3], като методите за тяхното изолиране обикновено започват с изчерпателна екстракция с молекулни разтворители (наситени въглеводороди, алкохоли, алкилхалогениди и др.) и последваща допълнителна химическа обработка на получените екстракти, с цел получаването на желаните съединения в чист вид. В общия случай, тези процеси са трудоемки, изискват продължително производствено време, висока консумация на енергия и сложно оборудване. Освен това, използваните органични разтворители са токсични, пожароопасни, взривоопасни, с ограничени възможности за рециклиране и биоразграждане, което поставя сериозни проблеми от технологичен и екологичен характер, и е в противоречие с универсално възприетите днес принципи на Зелената химия [4]. В частност, според петият принцип, използването на по-безопасни спомагателни вещества като разтворители, катализатори, разделящи агенти и др., би трябвало да е предпочетено в лабораторната практика и индустриалните процеси.

Възможно решение на гореописаните проблеми е разработването на нови материали и технологии за екстракцията на природни продукти. Йонните течности (ЙТ) се разглеждат като моделируеми „зелени разтворители“, които превъзхождат класическите молекулни разтворители с това, че са нелетливи, ниско токсични, с възможност за рециклиране и повторно използване, биоразграждащи се и безвредни за околната среда [5].

По дефиниция йонните течности са соли с температура на топене под температурата на кипене на водата (100 °C) [5]. Огромният интерес към тях се дължи на уникалните им свойства: пренебрежимо ниско парно налягане, ниски

температури на топене, широк температурен диапазон, в който те се намират в течно състояние, термо- и електрохимична стабилност, висока йонна проводимост и др. Йонните течности са описвани често като „моделируеми“ разтворители, тъй като чрез промяна в структурата на катиона или аниона, свойства като разтворимост в други разтворители, плътност, вискозитет, полярност и др., могат да бъдат променени така, че да отговарят на специфичните изисквания на конкретен процес [9, 10]. Друго забележително свойство на ЙТ е, че тяхната вторична структура може да бъде „фино настроена“ [11-14] чрез осмислен подбор на йоните и добавяне на допълнително количество вода или органичен разтворител, като по този начин системата може да се „настрои“ за селективно взаимодействие с определени вещества. Тези свойства на ЙТ определят употребата им в различни сфери на химията като синтез и катализ [6], електрохимия [7], нанотехнологии [8], аналитична химия [9] и др. Също така, ЙТ са успешно прилагани в различни процеси на разделяне, включващи течно-течна екстракция [10, 11, 12] и твърдо-течна екстракция [13].

Прегледът на научната литература показва, че интересът към употребата на ЙТ при екстракция на природни съединения нараства значително през последните години. За периода 2011-2016 г. (данни от SCOPUS) са публикувани над 150 научни съобщения, описващи приложението на ЙТ в тази сфера. Първата статия, отразяваща разглежданата тематика, е публикувана през 2006 г. от Larkin и съавтори [15], където авторите прилагат 2 протонни ЙТ за екстракция на биологично активното съединение artemisinin – изходна суровина за синтеза на антималярийни лекарствени препарати. През 2007 г. Du и съавтори [16] докладват за употребата на ЙТ при екстракцията на *trans-resveratrol* (мощен антиоксидант) от растителен материал. След тези две публикации, различни изследователски групи (предимно китайски учени) започват интензивна работа по използването на ЙТ като екстрагенти на природни съединения, като показват техния потенциал за екстракция на разнообразни вторични метаболити като алкалоиди [17], полифенолни съединения [18], сапонини [19], липиди [20], етерични масла [21], и т.н. Важно е да се отбележи, че към момента на изработване на настоящата дисертация не бяха намерени публикувани данни за разработен цялостен процес на екстракция с ЙТ, включващ разделяне на многокомпонентните екстракти и регенериране на йонната

течност, а натрупаният към момента опит в това поле представлява обещаваща основа за развитието на нови и подобрени методики за екстракция на природни съединения. Това определи и **основната цел на настоящия дисертационен труд**, а именно: *дизайн на цялостен процес, включващ разработване на систематична методика за получаване на растителни екстракти с йонни течности като екстрагенти, следващо изолиране на целевите природни съединения в чист вид и рециклиране на вложената ЙТ.*

Като моделно растение беше избрано *Glaucium flavum* Crantz (сем. Papaveraceae). То е познато още под наименованията жълт мак, жълт рогатец или жълта кадънка, и представлява двугодишен храст с дебели корени и височина около 50 cm, като от надземните му части се извличат биологично активни апорфинови алкалоиди. У нас, на базата на изолирания от жълт мак алкалоид *glaucine*, е създаден неогаленов препарат, наречен глаувент. *Glaucine* притежава силно изразено противокашлично действие, подобно на опиевите алкалоиди, но за разлика от тях не предизвиква привикване.

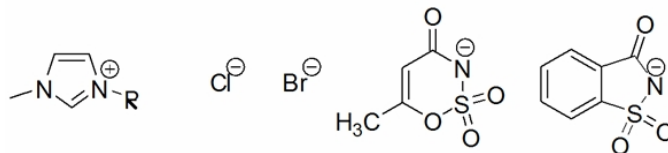
За успешното реализиране на поставената цел бяха дефинирани следните конкретни задачи:

- ⇒ Синтез и пречистване на серия от ЙТ в достатъчни количества за целите на скрининговите изследвания. Синтез и пречистване на избрана ЙТ в достатъчни количества за осъществяване целите на дисертационния труд;
- ⇒ Разработване на метод за количествен анализ на *glaucine* и сродни алкалоиди. Изследване на екстракции с конвенционални разтворители и ЙТ. Провеждане на сравнителен анализ и обосноваване на избор на ЙТ за целите на следващите изследвания;
- ⇒ Оценка влиянието на различни фактори върху екстракционната ефективност и намиране на оптимални условия за получаване на максимални добиви спрямо всеки фактор;
- ⇒ Разработване на ефективен метод за разделяне и изолиране на *glaucine*, и регенериране и пречистване на вложената ЙТ. Провеждане на експерименти за повторно използване на отработената ЙТ;
- ⇒ Валидиране на цялостния процес на екстракция на *glaucine* от растителен материал с помощта на ЙТ.

Екстракцията на вторични метаболити от растителни суровини зависи силно от условията на провеждане на процеса, и за да се постигнат най-добри резултати трябва да се вземат предвид редица фактори, контролиращи разпределението на целевите съединения. За реализиране на основната цел на настоящата дисертация е осъществен синтез на серия имидазолиеви ЙТ, съставени от биосъвместими йони, и са оценени шест променливи – видът на аниона, дължината на алкиловата верига в катиона, времето за екстракция, температурата, концентрацията на ЙТ и съотношението екстрагент - растителен материал върху екстракцията на биологично активния алкалоид gļaucine от надземни части от жълт мак. На база получените резултати е разработен нов метод за количественото определяне на gļaucine и е предложена алтернативна схема за неговото производство.

2. Синтез, пречистване и охарактеризиране на йонни течности

Най-широко прилаганият подход за синтез на ЙТ се състои от кватернизация на азот, сяра или фосфор съдържащи съединения с подходящ алкилиращ агент и следваща йонообменна реакция със соли на алкални или алкалоземни метали. За получаване на продукти с по-висока чистота е прието първата стъпка да се осъществява при нагряване и в отсъствието на разтворител. Този подход обаче, определя дълги реакционни времена, понякога седмици, поради затруднен масообмен вследствие постоянно повишаване на вискозитета на реакционната смес. Втората реакция протича значително по-бързо и обикновено се провежда в присъствието на органичен разтворител или вода. В изпълнение на първата задача по настоящата дисертация е синтезирана серия от хидрофилни (смесваеми с вода) 1-алкил-3-метилимидазолиеве йонни течности с хлориден, бромиден, ацесулфаматен и захаринатен анион (Фиг. 1).



Фигура 1. Структура на йоните, съставлящи използваните в настоящата дисертация ЙТ

Изборът на анионите бе определен от факта, че те са с добре проучен токсикологичен профил и съответните йонни течности могат да се разглеждат като биосъвместими – важен фактор при разработването на алтернативни процеси съгласно принципите на зелената химия.

– Синтез на 1-алкил-3-метилимидазолиев хлориди и бромиди

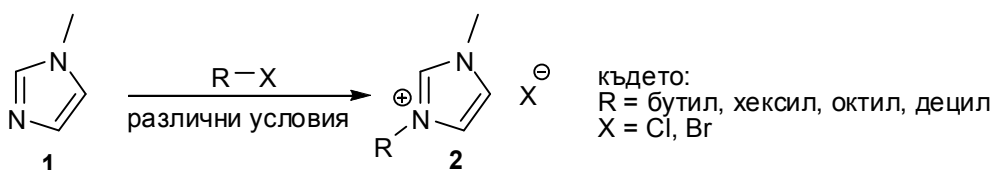


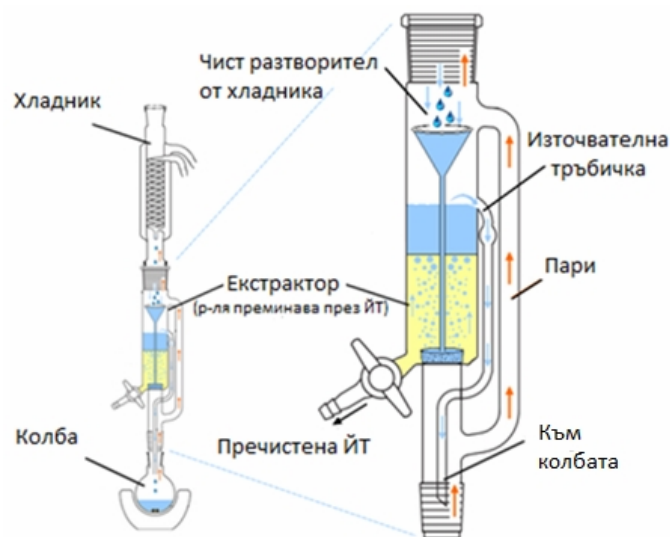
Схема 1. Обща схема за синтез на 1-алкил-3-метилимидазолиев халогениди

Реакциите на кватернизация на *N*-метилимидазол могат да бъдат проведени не само с хлориди, но и с бромиди и йодиди. В сравнение с последните два обаче, кватернизацията с алкилхлориди изисква високи температури и по-дълги реакционни времена – от порядъка на 70-100 h при нагряване и 2-3 месеца при стайна температура [6]. Реакциите с алкилбромиди са силно екзотермични и това причинява неудобства, особено при работа в по-големи количества. Въпреки че алкилирането с алкилйодиди протича бързо, дори и при стайна температура, те също са неподходящи, тъй като получените соли са чувствителни към светлина. От казаното до тук става ясно, че основният недостатък при употребата на алкилхалогениди за синтез на ЙТ са дългите реакционни времена. Както беше споменато, кватернизацията с алкилхалогениди се провежда при нагряването им в смес със съответния амин. Познати са и случаи за употреба на органични разтворители като ацетон, дихлороетан, толуен и др., но това не довежда до съкращаване на реакционните времена [22]. Учудващо, но в литературата има оскъдни данни за провеждане на този тип реакции в полярни апротонни разтворители като ДМФ или ДМСО, въпреки факта, че реакции на нуклеофилно заместване, при които от незаредени изходни вещества се получават заредени продукти, би следвало да се ускоряват от такъв тип разтворители. Наскоро Богданов и съавтори [14] показаха, че употребата на ДМФ в реакция на кватернизация води до значителна редукция на реакционните времена дори и със стерично запречени

нуклеофили, каквито са пентаалкилзаместените гуанидини. Следвайки описания подход, изследвахме получаването на 1-бутил-3-метилимидазолиев хлорид и бромид от тип **2** в среда от ДМФ. Тези моделни реакции показаха, че реакционните времена се съкращават драстично при използваните условия. Паралелното провеждане на кватернизация на *N*-метилимидазол (**1**) с бутилбромид при различни температури показа, че при достигане до 100 °С реакцията протича с количественото получаване на [C₄C₁im]Br за 15 min, докато [C₄C₁im]Cl беше получен за 12 h при температури от порядъка на 80-110 °С. Този интервал бе установен като оптимален, тъй като температура над 110 °С води до получаване на продукт с по-ниска чистота (поради протичане на странични реакции), а под 80 °С – до удължаване на реакционното време, непълно превръщане и съответно понижаване на добивите. Независимо от по-бързото получаване на [C₄C₁im]Br, последният се оказва неподходящ за провеждане на йонообменни реакции (вж. Фиг. 5) и поради тази причина въвеждането на бутилов, хексил, октил и децилов заместител в имидазолиевия пръстен бе осъществено със съответните алкилхлориди при намерените оптимални условия. Бе установено, че реакционните времена се повишават с увеличаване броя въглеродни атоми в алкиловата верига, но във всички случаи реакциите се реализират успешно в рамките на 12-20 h.

Пречистването на ЙТ е въпрос от изключително важно значение, тъй като наличието дори и на малки количества онечиствания води до драстични промени в техните физикохимични свойства [25]. Основните „замърсители“ на 1-алкил-3-метилимидазолиевите халогениди са остатъчни *N*-метилимидазол и алкилхалогенид, а тяхното отстраняване типично се осъществява посредством многократно провеждане на течно - течна екстракция с органичен разтворител и следващо продължително нагриване на продукта под понижено налягане. Важно е да се отбележи, че в зависимост от температурите на кипене на остатъчните алкилхалогениди, цялата процедура може да се повтаря неколkokратно, като по този начин пречистването на дадена ЙТ може да отнеме много време и консумация на немалки количества органични разтворители, особено когато се работи в по-големи обеми. За да преодолеем тези проблеми, ние конструирахме апаратура за пречистване на ЙТ посредством течно - течна екстракция (представена схематично

на Фиг. 2), която може да се разглежда като хибрид между Соклетов апарат и приставка на Дийн-Старк.

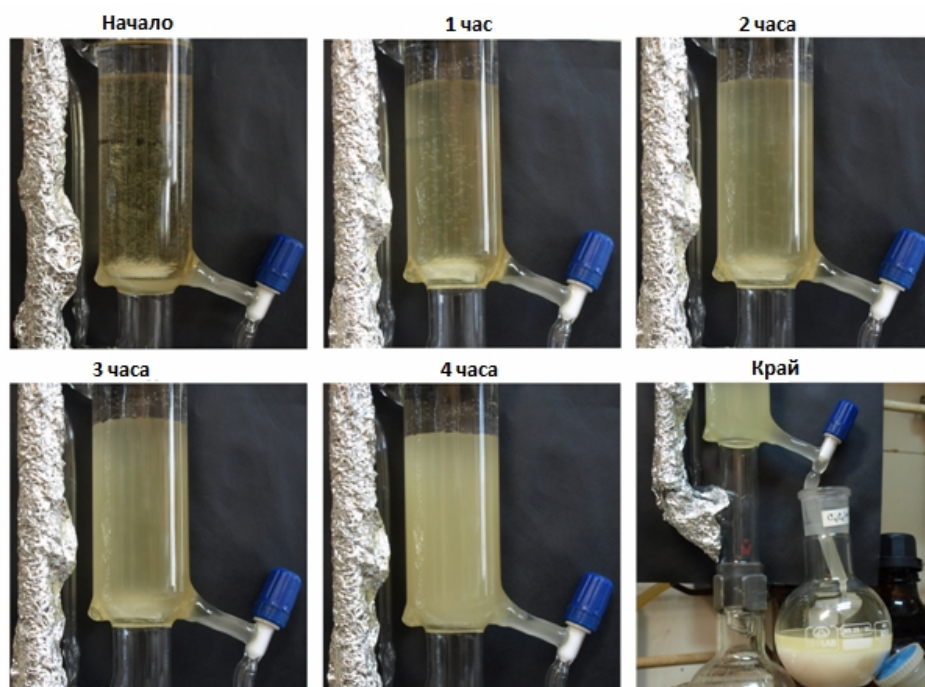


Фигура 2. Апаратура за пречистване на ЙТ

Подобен е и принципът на действие. Накратко, разтворителят се изпарява при нагряване и след кондензиране на парите му в обратния хладник се изкапва във фуния, завършваща с порьозен накрайник. При достигането на определена височина от разтворителя във фунията, започва отделянето на малки капки от накрайника, които преминават през обема на йонната течност и по този начин се осъществява процес на непрекъсната течно - течна екстракция. След натрупване на определено количество в обема на екстрактора, разтворителят се връща в дестилационната колба и процесът продължава до пълното пречистване на йонната течност. Проведените от нас опити показаха, че в рамките на 4-5 h дадена йонна течност се пречиства до такава степен, че започва процес на кристализация (ако ЙТ е с подходяща температура на топене) веднага след източването ѝ в отделен съд (вж. Фиг. 3). По този начин пречистването се осъществява за по-кратко време и със значително понижена консумация на органичен разтворител в сравнение с общоприетата процедура.

За ефективното реализиране на процеса на пречистване е необходимо да се познава разтворимостта на дадена йонна течност в различни молекулни разтворители. Този параметър бе определен за синтезираните от нас йонни

течности, а получените резултати са представени в обобщен вид в Таблица 1. Както се вижда, всички ЙТ се смесват напълно с полярни протонодонорни разтворители като вода, метанол и ацетон, както и с неполярните халогенсъдържащи хлороформ и дихлорометан. Неполярните циклохексан, диетилов етер и метил-*tert*-бутилов етер показаха много ниска растворимост в ЙТ и заедно с факта, че са по-леки от йонните течности ги определя като подходящи агенти за пречистване с помощта на конструираната от нас апаратура.



Фигура 3. Пречистване на $[C_4C_1im]Cl$ посредством непрекъснатата течно - течна екстракция с метил-*tert*-бутилов етер

Таблица 1. Разтворимост на ЙТ в различни разтворители

	H ₂ O	MeOH	CH ₃ COCH ₃	EtOAc	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	<i>t</i> -BuOMe	Et ₂ O	C ₆ H ₁₂
$[C_4C_1im]Cl$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_4C_1im]Br$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_4C_1im][Ace]$	+	+	+	+	+	+	-	-	-
$[C_4C_1im][Sac]$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_6C_1im]Cl$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_6C_1im][Ace]$	+	+	+	+	+	+	-	-	-
$[C_8C_1im]Cl$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_8C_1im][Ace]$	+	+	+	+	+	+	-	-	-
$[C_{10}C_1im]Cl$	+	+	+	-	+	+	-	-	-
$[C_{10}C_1im][Ace]$	+	+	+	+	+	+	-	-	-

– Синтез на 1-алкил-3-метилимидазолиеви захаринати и ацесулфамати

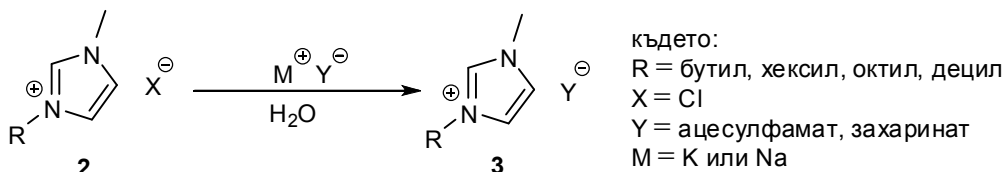


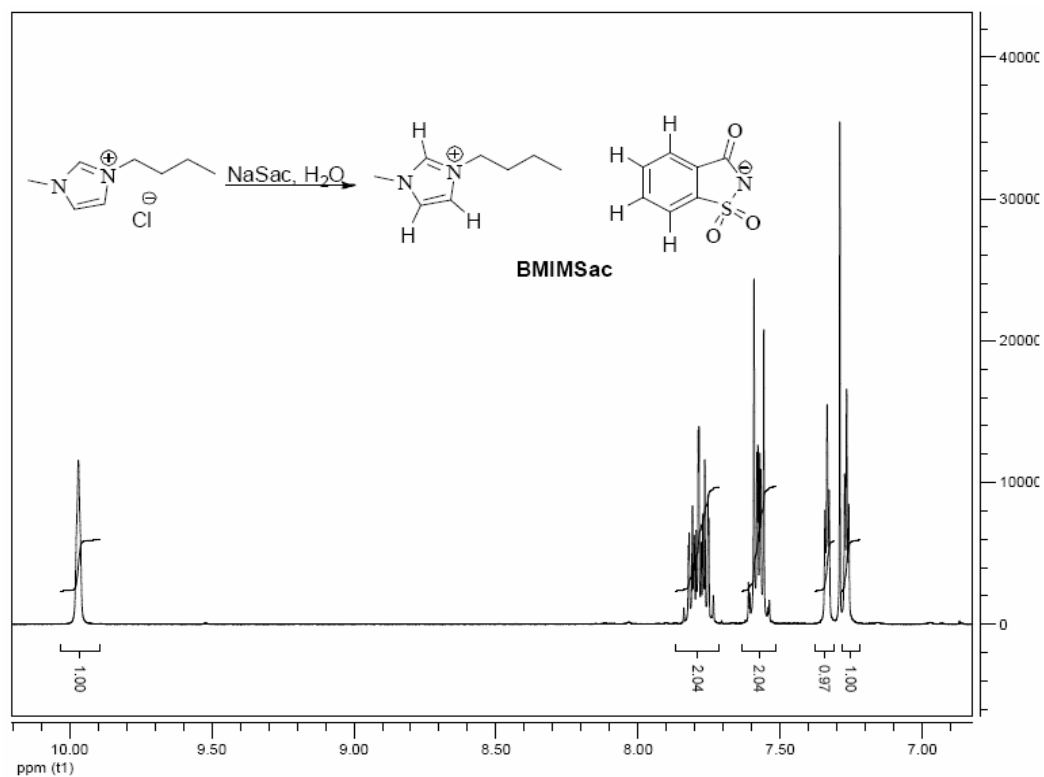
Схема 2. Обща схема за синтез на 1-алкил-3-метилимидазолиеви захаринати и ацесулфамати

Присъствието на аниони с добре изучени токсикологични профили в структурата на ЙТ биха повишили тяхната „зелена“ природа. Имайки предвид последното, Davis и съавтори [23] синтезират 15 соли, съдържащи органичен катион и захаринатен или ацесулфаматен анион – две често използвани като подсладители вещества в хранително - вкусовата промишленост. Получените соли са с температури на топене под 100 °C, а седем от тях са течни при стайна температура, което ги определя като йонни течности. Поради специфичната си структура, захаринатният и ацесулфаматният аниони притежават ясно изразена делокализация на отрицателния заряд, и съответно координират трудно метални йони, слабо базични са и показват характерни различия при образуването на водородни връзки [24]. Също така, тези аниони са евтини и лесно достъпни под формата на калиев ацесулфамат (KAcе) и натриев захаринат (NaSac). Споменатите до тук предимства ни насочиха към синтеза на ЙТ, съдържащи захаринатен и ацесулфаматен анион.

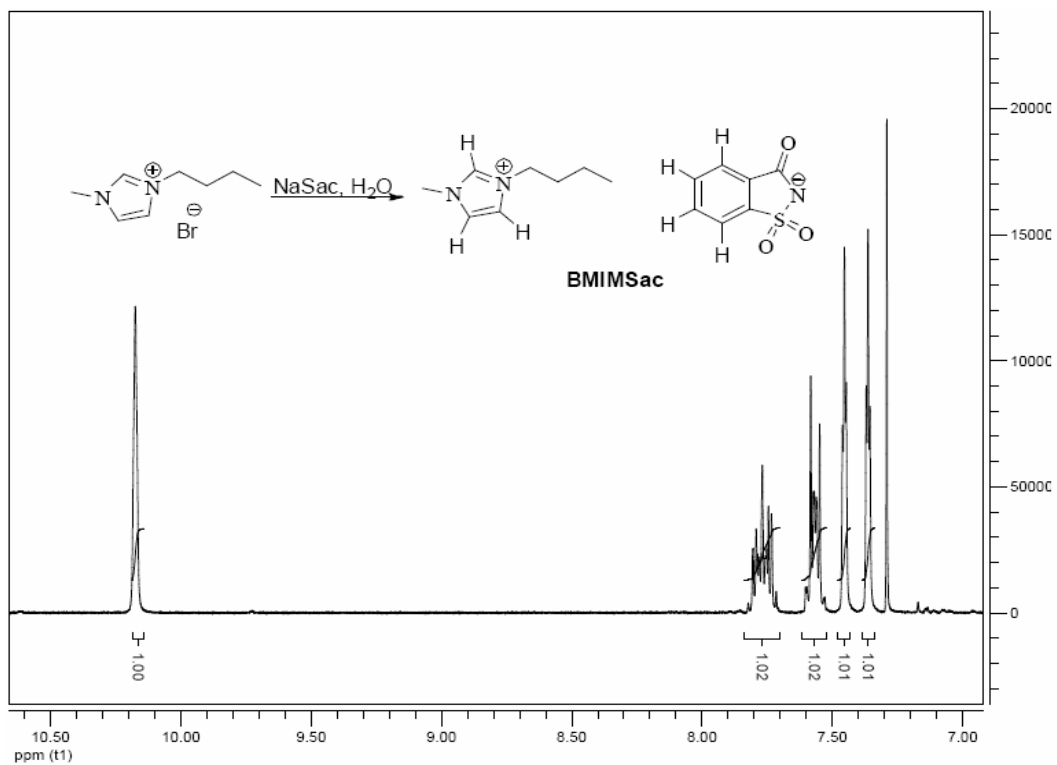
Първоначалните опити за йонообменни реакции бяха проведени с [C₄C₁im]Cl и [C₄C₁im]Br. Обменът бе реализиран в кипящ сух метанол, като разтвор на съответната ЙТ беше прикапван към суспензия от NaSac или KAcе при разбъркване в продължение на 4 h. След края на реакцията получената утайка беше филтрувана, метанолът бе отстранен под понижено налягане и остатъчните неорганични соли бяха повторно утаени и филтрувани от сух ацетон. Ацетонът бе избран като разтворител поради ниската разтворимост на съответните неорганични соли в него. Проведеният тест за наличие на хлоридни йони (със сребърен нитрат) и несъответствието между интегралните интензитети за протоните в катиона и съответните аниони показаха, че йонообменните реакции не протичат напълно при използването на метанол като разтворител. Алтернативно, обменът бе проведен във воден разтвор с последващо изпаряване на вода и утаяване съответно на KCl/Br или

NaCl/Br посредством добавяне на сух ацетон. Степента на превръщане отново бе определена с помощта на ЯМР спектроскопия, като в ^1H ЯМР спектрите на изолираните $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}][\text{Ace}]$ и $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}][\text{Sac}]$, получени от $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$, сигналите за характеристичните протони, съответно за катиона и аниона, са в отношение 1 : 1, което показва, че при използваните реакционни условия йонообменът протича количествено. Анализът на продуктите от реакциите с $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]\text{Br}$ обаче, отново показва непълен обмен, като желаната степен на превръщане не бе постигната дори и след повторна реакция на продукта с излишък от съответните неорганични соли. За илюстрация са показани протонни ЯМР спектри на $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}][\text{Sac}]$, получен съответно от $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]\text{Cl}$ (Фиг. 4) и от $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]\text{Br}$ (Фиг. 5). Наблюдаваните резултати могат да се обяснят с по-добрата разтворимост на Na/KBr в ацетон. По правило разтворимостта на много неорганични соли M^+X^- във вода и органични разтворители нараства в реда $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, което би следвало да се отразява и върху степента на анионния обмен. Не е за пренебрегване и фактът, че присъствието на ЙТ допълнително повлиява разтворимостите на неорганичните соли в органични разтворители [25]. От казаното до тук може да се направи заключението, че осъществяването на йонообменни реакции с имидазолиеви бромиди трябва да бъде избягвано. По тази причина синтезът на серията от 1-алкил-3-метилимидазолиеви ацесулфамати, необходима за отчитане влиянието на страничната алкилова верига върху екстракционните добиви (вж. раздел 3.3.3), бе осъществена със съответните 1-алкил-3-метилимидазолиеви хлориди.

В резултат от проведените синтетични изследвания бе получена серия от хидрофилни ЙТ, чиято структура е установена с помощта на ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия. В протонните спектри на 1-алкил-3-метилимидазолиевите халогениди се наблюдават сигнали единствено за имидазолиевия катион, като тези от ароматния пръстен, както и метиловата и метиленовата групи, свързани с азотните атоми, могат да се разглеждат като характеристични. В протонните спектри на захарината и ацесулфаматите се наблюдават и сигнали за анионите (вж. Фиг. 4 и 5), които освен като доказателство за структурата на получената ЙТ, могат да служат и като маркер за степента на протичане на йонообменната реакция, както бе описано по-горе.



Фигура 4. Част от ^1H ЯМР- спектр на $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{Sac}]$ (пълен обмен)

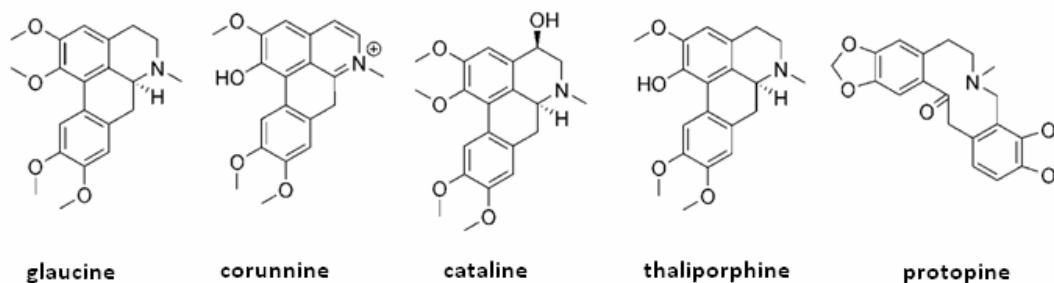


Фигура 5. Част от ^1H ЯМР- спектр на $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{Sac}]$, показващ непълн обмен

3. Растителна суровина, алкалоиден състав на *Glaucium flavum* Crantz и количествен анализ на *glaucine*

Като обект на изследването в настоящата дисертация беше избрано двугодишното тревисто растение жълт мак (*Glaucium flavum* Crantz, сем. Papaveraceae), разпространено в Североизточна България и Дунавската равнина и също така култивирано и отглеждано за нуждите на фармацевтичната промишленост. Апорфиновият алкалоид S - (+) *glaucine*, наричан за по-кратко само *glaucine*, е биологично активно съединение, съдържащо се в надземните части на *Gl. flavum*, който е индустриалния суровинен източник за неговото производство. *Glaucine* притежава подчертано противокашлично действие, но без ефект на привикване, и е основна биологично активна съставка в българските противокашлични препарати "Глаувент", "Глаутерпин" и "Бронхолитин".

За нуждите на настоящото изследване беше тестван изсушен и смлян растителен материал от надземните части на *Gl. flavum*, събран от различни части на България. Алкалоидният състав в пробите бе установен посредством високоефективна течно - течна хроматография (HPLC) чрез сравнителен анализ на времената на задържане на веществата в метанолни екстракти с тези на референтните алкалоиди, представени на Фиг. 6.

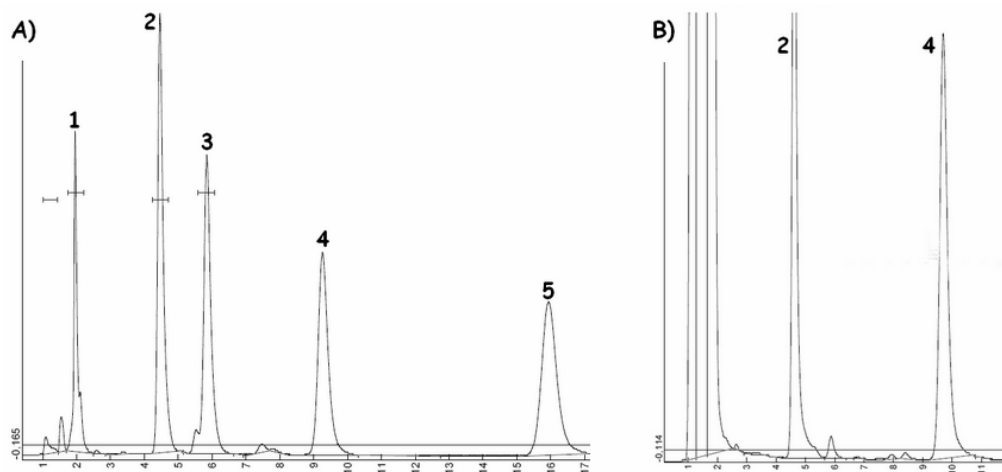


Фигура 6. Структура на често срещани алкалоиди в *Glaucium flavum* Crantz

Типични за *Gl. flavum* са апорфириновите алкалоиди *glaucine*, *corunnine*, *cataline*, *thaliporphine*, *protopine*. Важно е да се отбележи, че *glaucine* е единствения алкалоид с приложение във фармацевтичната индустрия и по тази причина е от голяма степен

на важност да се установи неговото количество, както и наличието на сродни алкалоиди.

За провеждането на HPLC анализите в настоящото изследване е използвана колона SUPELCO Ascentist-C₁₈; 5 микрона; 15x4,6 mm, УВ детектор (280 nm) и подвижна фаза ацетонитрил : 0,1% воден р-р на Et₃N в съотношение 40:60. При тези условия бе постигнато максимално добро хроматографско разделяне на моделна система, съдържаща glaucine и съпътстващите го алкалоиди (Фиг. 7а)



Фигура 7. (а) представителна хроматограма на смес от алкалоиди, съдържащи се в жълтия мак и (б) представителна хроматограма на йонно-течностен екстракт на жълт мак:

1 – corrunine, 2 – cataline, 3 – thaliporphine, 4 – glaucine, 5 – protopine.

На Фиг. 7а е представена хроматограма на смес от алкалоиди, присъстващи в жълтия мак, а на Фиг. 7б – на представителен екстракт, получен при екстракция с йонна течност. Както се вижда от двете хроматограми, пикът за glaucine (пик № 4) не се припокрива с други пикове, което прави разработения от нас хроматографски метод селективен и специфичен за дадения анализ.

За промишлено получаване на glaucine обикновено се използва растителна суровина от надземните части на *Gl. flavum* със съдържание на glaucine, надхвърлящо 1,3% (wt/wt). За провеждане на експериментите в настоящата дисертация бяха подбрани две растителни вещества, съответно със съдържание на glaucine 0,86 и 1,8% (wt/wt). Първата проба бе използвана за намиране на

оптимални условия за количествена екстракция с ЙТ, а втората за разработване на цялостния процес по изолиране на *glaucine*.

*4. Екстракция на *glaucine* с йонни течности – оптимизация на екстракционните условия*

Основна цел на настоящата дисертация е разработването на цялостен процес за извличане и изолиране на биологично активно вещество с индустриално значение с помощта на йонни течности като алтернатива на типично използваните органични разтворители в процеса на твърдо - течна екстракция. Успешното въвеждане на ЙТ в подобни процеси би ограничило употребата на токсични, пожароопасни и взривоопасни вещества и би повишило тяхната ефективност посредством съкращаване на технологичното време и редуциране на проблеми от технологичен и екологичен характер.

Синтезираните от нас 1-алкил-3-метилимидазолиеве йонни течности бяха използвани под формата на водни разтвори като екстрагенти в процеса на твърдо - течна екстракция на *glaucine* от надземни части на жълт мак. Изследванията обхващат оценка на влиянието на различни фактори върху ефективността на екстракцията – вида на аниона, дължината на алкиловата верига в катиона, времето за екстракция, температурата, концентрацията на ЙТ, съотношението растителен материал - екстрагент. Количественият анализ на получените екстракти бе осъществен с високоефективна течна хроматография с обърнати фази (RP-HPLC), както е описано в раздел 4.4 на настоящата дисертация. За целите на сравнителния анализ беше проведена и тоталната екстракция на *glaucine* със Соклетов апарат с метанол за 72 h, като полученият осреднен добив беше приет за 100% и бе използван като маркер за екстракционната ефективност. Всички еднотипни експерименти са проведени с една и съща партида от растителен материал.

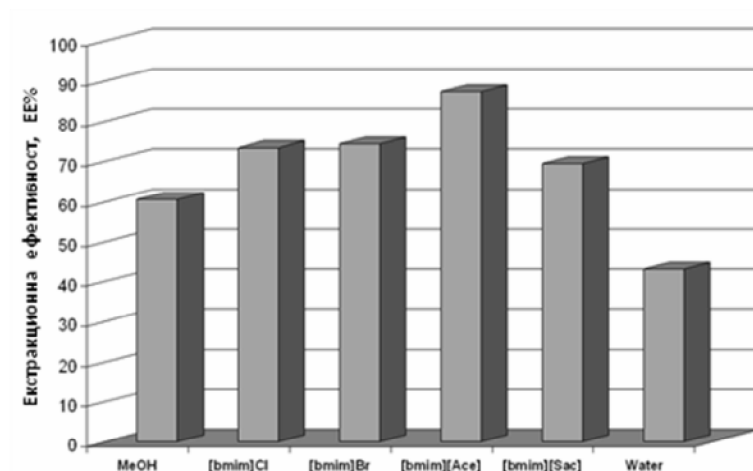
4.1. Влияние на химическата структура на аниона

Процесите на екстракция на природни съединения зависят до голяма степен от индивидуалните характеристики на целевите съединения и екстрагента, а именно полярност, разтворимост, дифузионен коефициент, способност за нековалентни

взаимодействия, вискозитет на средата и т.н. В растенията алкалоидите се намират предимно под формата на соли, което определя по-лесното им извличане от растителната матрица с протонни разтворители с висока полярност. В индустриалните процеси обикновено се използват вода, алкохоли (метанол, етанол и 1-бутанол) или техни смеси с вода. Водата е предпочетен разтворител за йонни съединения с по-малка молекулна маса, докато алкохолите са предпочетени при екстракцията на органични съединения с по-ясно изразен хидрофобен характер. Йонните течности също са полярни съединения [26, 27], съставени изцяло от йони, чиято структура има значително влияние върху проявяваните свойства. Добре известен факт е, че характеристики като вискозитет, плътност, полярност, повърхностно напрежение и други за серия от йонни течности с един и същ катион са силно зависими от аниона [14].

В началото на настоящото изследване бе направена оценка на влиянието на аниона върху екстракционната ефективност. За целта бяха проведени екстракции със синтезираните от нас 1-бутил-3-метилимидазолиеви ($[C_4C_1im]$) йонни течности, съдържащи съответно хлориден (Cl), бромиден (Br), захаринатен ([Sac]) и ацесулфаматен ([Ace]) анион. Металните соли на последните два органични аниона са широко използвани като изкуствени подсладители в хранителни продукти и имат добре установени токсикологични профили. Включени в състава на йонните течности, захаринатният и ацесулфаматният аниони проявяват поведение, което в някои отношения наподобява това на определени флуорсъдържащи аниони [22] – например драстично намаляват температурите на топене и вискозитетите на получените ЙТ. Освен това, въпреки наличието на прилики в химичната им структура, са установени ясни различия в способността на двата аниона да образуват водородни връзки [23], което е предпоставка за разлики в поведението им в екстракционния процес. За да се оцени екстракционната ефективност на изброените йонни течности, растителен материал от жълт мак бе екстрахиран с 0,5 М водни разтвори на ЙТ в съотношение растителен материал - екстрагент 1:30. Пробите бяха разбъркани в продължение на 1 h, за да се осигури пълно омокряне на растителната матрица, след което бяха оставени да престоят 12 h при стайна температура. За оценка на ефективността бяха проведени и независими екстракции при същите

условия с вода и метанол, като последният се използва като разтворител в индустриалния процес за производство на gļaucine. Получените резултати са представени на Фиг. 8.



Фигура 8. Оценка влиянието на структурата на аниона върху екстрахиращата способност.

Екстракционни условия: 0,5 g раст. материал, 15 mL 0,5 M водни разтвори на ЙТ, време на екстракция 12 h, стайна температура

Ясно се вижда, че йонните течности са по-ефективни екстрагенти от метанола и водата, като екстрахиращата способност намалява в реда: $[C_4C_1im][Ace] > [C_4C_1im]Cl \approx [C_4C_1im]Br \approx [C_4C_1im][Sac] > MeOH > H_2O$. Установената екстракционна ефективност при $[C_4C_1im][Ace]$ е около 85%, при $[C_4C_1im]Cl$, $[C_4C_1im]Br$ и $[C_4C_1im][Sac]$ е около 70%, а при MeOH и H_2O – съответно 60% и 40%. От една страна, тези наблюдения могат да се обяснят с реализирането на π - π , йон-йонни или донорно-акцепторни взаимодействия между имидазолиевия йон и gļaucine. От друга страна, трябва да се има предвид и възможността за допълнителни взаимодействия анион-gļaucine и анион-растителна матрица. Добре известен факт е, че чисти йонни течности могат да разтварят целулоза [28], като това им свойство се отдава основно на способността на анионите да взаимодействат с целулозата посредством водородни връзки. По аналогичен начин може да се обясни и ефектът на анионите в настоящото изследване. Наличието на йони, способни да взаимодействат с микрофibrилите в растителната матрица отслабват здравината на клетъчните стени и по този начин улесняват дифузията на екстрагента, а показаната най-висока

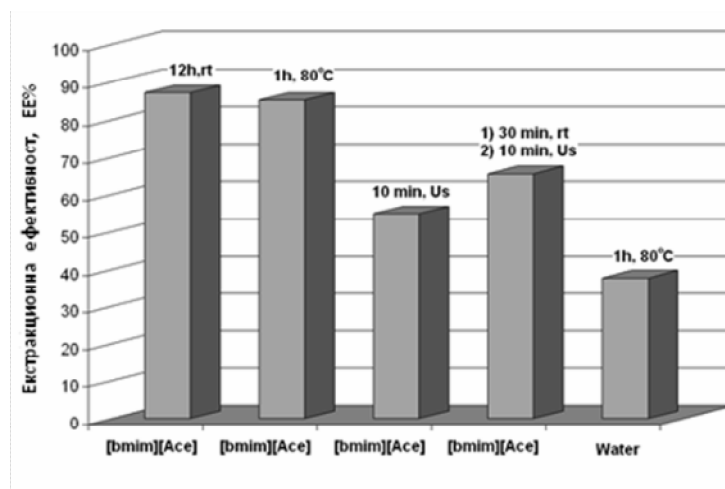
екстракционна ефективност на 1-бутил-3-метилимидазолиевия ацесулфамат може да се отдаде на комбинация от повишена хидрофобност в сравнение с Cl^- и Br^- и възможност за образуване на водородни връзки. Предвид получените резултати, ацесулфаматният анион бе избран за синтез на серия от йонни течности с нарастваща хидрофобност, необходими за целите на следващите експериментни по оптимизацията на процеса.

4.2. *Влияние на температурата*

Провеждането на процесите на екстракция при повишена температура е типичен индустриален подход за тяхното ускоряване. Високата температура понижава вискозитета на екстрагента, увеличава разтворимостта на целевите съединения и улеснява дифузията, но реализирането на такива условия може да доведе до замърсяване на получените екстракти, поради извличане на по-малко разтворими компоненти, окисление или разпадане на нестабилни продукти. Друга алтернатива е употребата на ултразвук, като в редица случаи е показано, че прилагането му значително съкращава екстракционните времена и консумацията на екстрагент [29]. Ултразвуковото облъчване улеснява омокрянето и достъпа на разтворител в растителната матрица чрез образуване и следващо разпадане на газови мехурчета във вътрешността на разтворителя. Този феномен предизвиква разширяване на порите на матрицата и разрушаване на растителните тъкани, като по този начин ускорява дифузията на целевите съединения. В допълнение използването на ултразвук осигурява ефективно смесване, бърз трансфер на енергия и позволява процесът да бъде проведен при стандартни условия. Последното е от изключителна степен на важност при екстракцията на термично нестабилни съединения.

За оценка на влиянието на различните условия върху екстракционната ефективност на екстракциите с йонни течности бяха проведени сравнителни експерименти при стайна температура, нагряване и облъчване с ултразвук. Като моделна йонна течност бе избран $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{Ace}]$, а като референтен екстрагент бе използвана вода. От резултатите, представени на Фиг. 9 може да се види, че йонната течност отново показва по-добра екстрахираща способност от водата и при

използваните екстракционни условия (0,5 М воден разтвор на [C₄C₁im][Ace] и съотношение растителен материал - екстрагент 1:30) екстракционната ефективност от 85% се постига за 12 h при стайна температура и за 1 h при 80 °С.



Фигура 9. Оценка влиянието на температурата върху екстрахиращата способност.

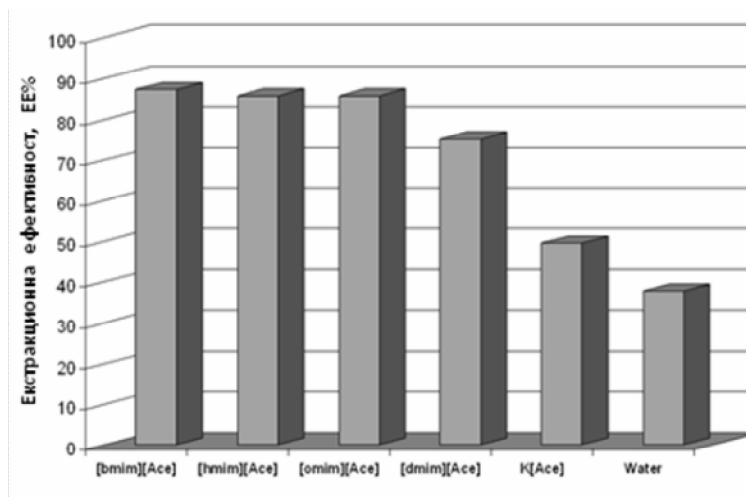
Екстракционни условия: 0,5 g раст. материал, 15 mL 0,5 М воден разтвор на [C₄C₁im][Ace]

Наблюдаваните зависимости могат да се обяснят от една страна с типичния ефект на температурата върху разтворимостта на целевото съединение, и от друга друга – с увеличаването на дифузионния коефициент. Последният може да се изрази като функция от температурата и вискозитета [30]: $D=f(K(T/\eta))$, от където ясно се вижда, че повишаването на температурата води до нарастването му. Освен това, вискозитетът на ЙТ намалява значително с повишаване на температурата [31], което също допринася за очевидното ускоряване на екстракцията. Значението на разтварянето на glaucine и неговата дифузия от растителната матрица може допълнително да се подчертае като се вземе предвид влиянието на ултразвуковото облъчване. Както може да се види, екстракционната ефективност е 50% при прилагането на ултразвук за 10 min. Възможна причина за по-ниския добив в случая може да е краткото време на екстракция, което е недостатъчно за пълното омокряне на пробата, но при направения допълнителен експеримент с проба, предварително омокрена за 30 min и последващо облъчване с ултразвук за 10 min се наблюдава слабо увеличаване на екстракционната ефективност, което доказва незначителното влияние на този фактор. Въз основа на тези резултати може да се направи

заклучението, че прилагането на ултразвук е неподходящо за изследваната система и препоръчителните условия за постигане на висока ефективност за кратък период от време са екстракция при нагриване и разбъркване. Именно този подход бе използван при следващите експериментни по оптимизацията на екстракционните условия.

4.3. Влияние на катиона

Удължаването на алкиловата верига в 1-алкил-3-метилимидазолиевия катион води до повишаване на неговата хидрофобност и дава възможност за реализирането на допълнителни нековалентни взаимодействия между йонната течност и екстрахираното вещество. За да оценим влиянието на този фактор върху ефективността на екстракцията на *glucine*, използвахме като екстрагенти синтезираната от нас серия от 1-алкил-3-метилимидазолиевии ацесулфамати, притежаващи алкилови групи с различна дължина – [C₄C₁im][Ace], [C₆C₁im][Ace], [C₈C₁im][Ace] и [C₁₀C₁im][Ace]. Екстракциите бяха проведени с 0,5 М воден разтвор на съответните йонни течности за 1 h при температура 80 °C. За сравнение бяха проведени при същите условия и сравнителни екстракции с вода и 0,5 М воден р-р на калиев ацесулфамат. Получените резултати са обобщени на Фиг. 10.



Фигура 10. Оценка влиянието на алкиловата верига върху екстрахиращата способност.

Екстракционни условия: 0,5 g раст. материал, 15 mL екстрагент, време на екстракция 1 h, температура 80 °C

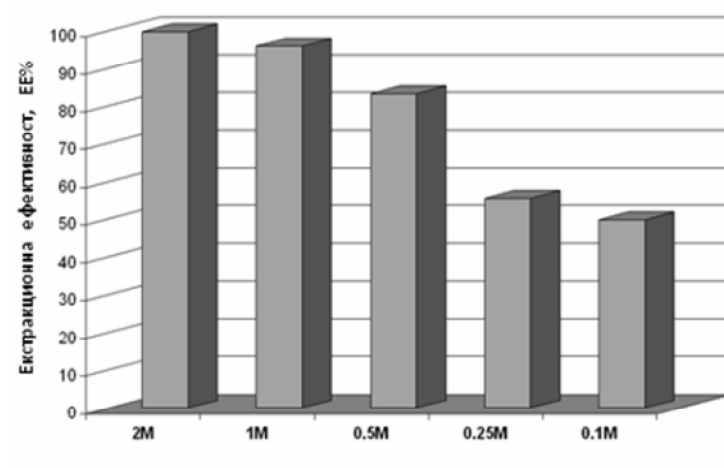
Както може да се види, екстрахиращата способност на използваните системи е в правопрпорционална зависимост с органичния характер на йонните съединения. Така, наличието на калиевия ацесулфамат (KAcе) в екстрагента довежда до по-високи добиви в сравнение с водата, а екстракционната ефективност достига своя максимум от 85% при [C₄C₁im][Acе]. Следващо нарастване на дължината на алкиловата верига не довежда до значителни разлики и йонните течности [C₆C₁im][Acе] и [C₈C₁im][Acе] показват екстракционна ефективност, сходна с тази на [C₄C₁im][Acе]. Интересно за отбелязване е, че въвеждането на децилов заместител води до слабо понижение на екстрахиращата способност на [C₁₀C₁im][Acе] до 75%. Подобно поведение е документирано в литературата и съответно може да се обясни с понижена подвижност и по-големия обем на децилзаместения имидазолиев йон, което затруднява навлизането на екстрагента в порите на растителната матрица. По този начин може да се направи заключението, че не само хидрофобността и органичната природа на екстрагента са от значение, а и ефективните обеми на йоните, съставлящи йонната течност.

Йонните течности са все още сравнително скъпи в сравнение с конвенционалните органични разтворители и всеки подход, довеждащ до понижаване на тяхната цена, би допринесъл за по-ефективното им приложение. От трите йонни течности, показали еднаква екстрахираща способност, [C₄C₁im][Acе] бе избран за провеждане на следващите експерименти, поради най-ниската цена на изходния алкилхалогенид, необходим за синтеза на междинния [C₄C₁im]Cl.

4.4. Влияние на концентрацията

Важен фактор, който оказва съществено влияние върху представянето на йонните течности в процесите на екстракция е тяхната концентрация. Например, влагането на недостатъчно количество йонна течност би довело до непълно извличане на целевите съединения и съответно до загуба на ценен ресурс, а употребата на повече от необходимите количества би оскъпило процеса по безсмислен начин. В допълнение, противно на интуитивното допускане, че екстракционните добиви се повишават постоянно с увеличаване на концентрацията на йонните течности, са докладвани редица случаи, в които се наблюдава

първоначално повишаване на добивите с повишаване на концентрацията, и следващо понижениe след достигане на максимум. По тази причина изучаването на концентрационната зависимост на екстракционния процес е от голямо значение. С цел изследване влиянието на този фактор върху ефективната екстракция на glaucine бяха проведени експерименти с водни разтвори на $[C_4C_{1im}][Ace]$ с различна концентрация (от 0,1 до 2 M). Представените на Фиг. 11 резултати показват, че екстракционната ефективност нараства с повишаване на концентрацията и достига своя максимум при 2 M $[C_4C_{1im}][Ace]$. Независимо от това, тъй като ефективността при 1 M разтвор на $[C_4C_{1im}][Ace]$ е близка до максималната (96%), а вложеното количество йонна течност е два пъти по-малко, последната концентрация бе избрана за оптимизиране на съотношението растителен материал - екстрагент.



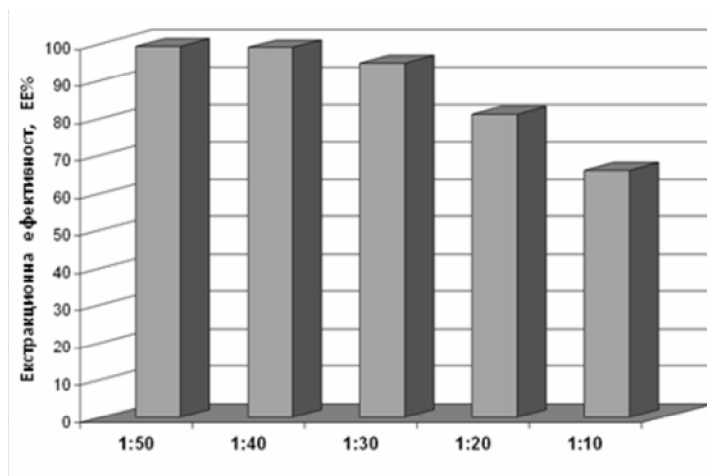
Фигура 11. Оценка влиянието на концентрацията върху екстрахиращата способност.

Екстракционни условия: 0,5 g растителен материал, 15 mL воден разтвор на $[C_4C_{1im}][Ace]$, време на екстракция 1 h, температура 80 °C

4.5. Влияние на съотношението растителен материал – екстрагент

Съотношението растителен материал - екстрагент също има важно значение от приложен аспект. Употребата на по-големи обеми от разтворител може да увеличи изискванията на екстракционната процедура от гледна точка на количество екстрагент, капацитет на екстрактора, съдове за съхранение и т.н., докато по-малкият обем може да затрудни определени технологични стъпки като например филтруване, и да доведе до непълна екстракция на целевото съединение. За да се

определи оптималното съотношение, в настоящото изследване бяха проведени серия от екстракции с 1 М $[C_4C_1im][Ace]$ за 1 час при температура 80 °С и различно съотношение растителен материал - екстрагент (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50). От резултатите показани на Фиг. 12 се вижда, че екстракционната ефективност нараства с увеличаване обема на екстрагента, достигайки своя максимум при съотношение 1:40, след което остава постоянна. Тези резултати отново дават предимство на 1 М $[C_4C_1im][Ace]$ в съотношение 1:40 пред 2 М разтвор в съотношение 1:30, тъй като общото количество йонна течност в първия разтвор е с около 30% по-малко. Независимо от това, в зависимост от капацитета на съдовете за екстракция и наличността на количества от необходимата йонна течност, и двете оптимизирани условия могат да се прилагат успешно.



Фигура 12. Оценка влиянието на отношението растителен материал-екстрактант върху екстрахиращата способност. **Екстракционни условия:** 1 М воден разтвор на $[C_4C_1im][Ace]$, време на екстракция 1 h, температура 80 °С

В обобщение проведените изследвания върху влиянието на аниона (хлориден, бромиден, ацесулфаматен и захаринатен), температурата, дължината на алкиловата верига в катиона, концентрацията, екстракционното време и съотношението растителен материал – екстрагент доведоха до намиране на оптималните условия за количествена екстракция на glaucine от надземните части на жълт мак в една технологична стъпка, а именно: 1 М $[C_4C_1im][Ace]$ като екстрагент, разбъркване и нагряване при 80 °С, 1 h време на екстракция и съотношение растителен материал - течност 1:40.

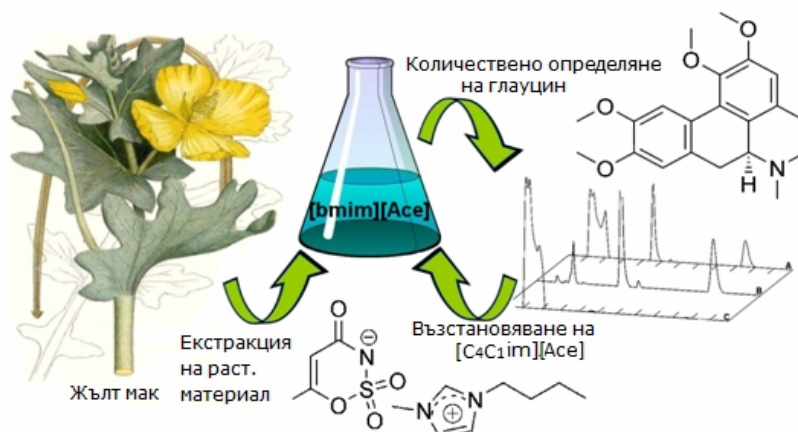
5. Разработване на нов HPLC метод за количествено определяне на glaucine в жълт мак

5.1. Сравняване на методи за количествено определяне на glaucine

Ретроспекцията на съществуващите методи за количествено определяне на glaucine в растителен материал от жълт мак показва, че те представляват многостъпкови процедури, което е предпоставка за индуциране на грешки по време на анализа. Дори общоприетият фармакопееен метод се основава на комбинация от предварително разделяне с тънкослойна хроматография на хлороформен екстракт, последвано от повторна екстракция и спектрално количествено определяне. Наскоро Lara и съавтори [32] предложиха алтернативен метод, при който се използва подкислена смес етанол - вода като екстрагент, но в съотношение растителен материал - течност 1:100 и без да разглеждат дали е екстрахирано цялото съдържание на glaucine от използвания материал. Друг метод [33] се основава на твърдофазно разделяне на суров екстракт и следващо определяне с RP-HPLC, но в този случай първоначалната твърдо - течна екстракция се провежда в алкална среда в комбинация с диетилов етер като екстрагент, което е предпоставка за окисление на съпътстващи фенолни съединения [34] и съответно за замърсяване на екстракта. Отделно, високата летливост на използваните при тези методи органични разтворители ги определя като опасни и вредни химикали, а съгласно общоприетите в наши дни принципи на зелената химия употребата на подобни химикали трябва на практика да бъде сведена до минимум, ако е възможно.

За преодоляване на описаните по-горе проблеми е необходимо създаването на алтернативни методи, а получените резултати в настоящата дисертация показват именно тази възможност. Намерените оптимални условия позволяват разработването на алтернативна аналитична процедура за количествено определяне на glaucine чрез предварителна екстракция на растителния материал с воден разтвор на $[C_4C_{1im}][Ace]$ и следващ HPLC анализ, като този метод би могъл да намери приложение във фармацевтичната индустрия. Идеята е представена схематично на Фиг. 13. Независимо от това, за да се докаже като надежден и адекватен за неговото предназначение, всеки нов аналитичен метод трябва да бъде

валидиран. В следващата секция са дискутирани някои аналитични аспекти на предложението от нас метод.



Фигура 13. Графично представяне на идеята за извличане на glicine от растителен материал и следващото му количествено определяне с Високоэффективна течна хроматография (HPLC)

5.2. Аналитична оценка на предложението HPLC метод

Валидирането на предложението от нас алтернативен метод за количествено определяне на glicine в растителен материал от жълт мак бе проведено съгласно процедура описана от LaBrutto и Petel [35] чрез определяне на параметри като: селективност, линейност, прецизност, възпроизводимост, повторяемост, граници на откриване и количествено определяне, и аналитичен добив.

За екстракцията на glicine бе използвана следната методика: В облодънна колба се поставят 0,5 g изсушен жълт мак и 20 mL 1 M воден разтвор на бутилметилимидазолиев ацесулфамат. Така приготвената суспензия се нагрява (80 °C) при разбъркване за 1 h и полученият екстракт се филтрува и разрежда до 50 mL с вода. Полученият разтвор се анализира посредством HPLC с UV детектор (280 nm), колона C₁₈ (Supelko, 150 mm, размер на частиците 5 μm) и подвижна фаза ацетонитрил-вода 60:40 с добавка на 0,1% триетиламин. Получените резултати са дискутирани в настоящия раздел.

Glicine в пробата бе определен чрез сравняване на времето му на задържане с това, получено за аналитичен стандарт. Представителни хроматограми са приложени като Фиг. 7. Трябва да се отбележи, че присъствието на йонна течност в екстрактите увеличава незначително времената на задържане на присъстващите в пробата алкалоиди glicine и cataline, но не повлиява реда на елуиране и площите

на съответните пикове. Както се вижда от Фиг. 7, при използваните условия всички познати алкалоиди са разделени, а пикът за glaucine (пик № 4) е симетричен и не се припокрива с други пикове.

За промишлени цели е прието да се използва растителна суровина от надземните части на жълт мак със съдържание на glaucine минимум 1,3% (wt/wt). Така, за определяне линейността на метода бяха приготвени шест стандартни разтвора с концентрации в диапазон 50-130% (68, 96, 117, 138, 160 и 180 $\mu\text{g/mL}$) от целевата концентрация на glaucine. Всяка точка е осреднена от пет анализа, а получената калибровъчната крива е с корелационен коефициент (r) 0,9996, y -отрез = 3,75 и остатъчното стандартно отклонение (RSD) 0,66% при 100%. Границите на откриване (LOD) и границите за количествен анализ (LOQ) на glaucine са експериментално определени, съответно 2,06 $\mu\text{g/mL}$ и 19,41 $\mu\text{g/mL}$, отговарящи на съотношение сигнал - шум съответно 3 и 10.

Възпроизводимостта на метода и стабилността на разтвора бяха оценени на база данни за времето на задържане и площта на пика на glaucine в екстракт (съдържание на glaucine 90,23 $\mu\text{g/mL}$), разделен на две части след пробоподготовка и съхраняван поотделно, съответно при стайна температура (25 °C) и в хладилник (5 °C). Определянето бе реализирано в четири последователни дни (0, 24, 48 и 72 h) с по пет повторения на анализа всеки ден. Относителните стандартни отклонения (RSD) за пробата съхранявана при 25 °C са 0,53-1,56% (от анализ до анализ) и 0,39% (от ден до ден) за площта на пика, и 0,06-0,22% (от анализ до анализ) и 0,40% (от ден до ден) за времето на задържане. Стойностите за RSD за пробата съхранявана при 5 °C са 0,63-1,84% (от анализ до анализ) и 1,19% (от ден до ден) за площта на пика, и 0,06-0,93% (от анализ до анализ) и 0,70% (от ден до ден) за времето на задържане. Възпроизводимостта на резултатите показва стабилност на пробата, независимо от начина ѝ на съхранение и възможност за съхранение минимум 72 h при нормални условия без това да се отрази върху качествата ѝ.

Точността на метода е демонстрирана посредством определяне на аналитичния добив на glaucine. Последният бе определен по метода на стандартната добавка.

Таблица 2. Аналитичен добив на glaucine от жълт мак

<i>Glaucine</i> - същинска концентр., $\mu\text{g/mL}$	<i>Glaucine</i> - намерена концентр., $\mu\text{g/mL}$	Аналитичен добив (среден \pm SD, %)	RSD %
157,31	155,89	99,10 \pm 0,76	0,78
136,03	132,43	97,36 \pm 0,61	0,74
114,75	110,66	96,44 \pm 1,43	2,04
93,47	89,00	95,01 \pm 0,29	0,51
77,51	70,53	91,00 \pm 0,27	0,58

Резултатите показват, че средния аналитичния добив е $95,78 \pm 3,06\%$ с RSD = 1,92% (Таблица 2).

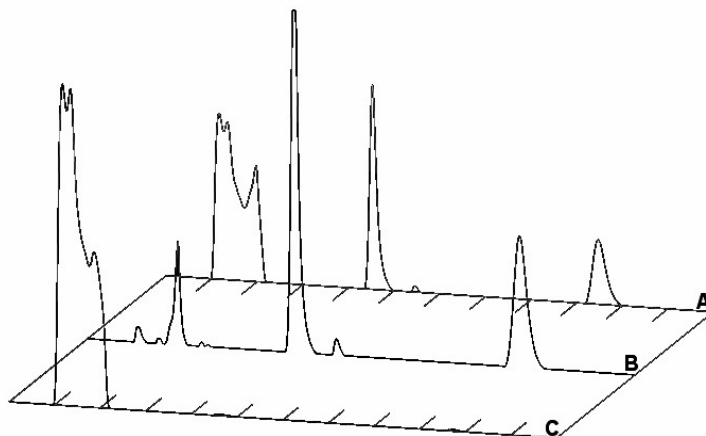
Прецизността на метода може да се изрази чрез повторемостта на инжектиране (първи етап) и повторемостта на анализа (втори етап). Този параметър бе проверен посредством провеждане на седем екстракции, пет от които в един и същ ден и две – в различни дни. Повторемостта на инжектиране е изчислена въз основа на резултатите за площта на пика на glaucine, получени от 25 анализа като RSD = 0,79%. Повторемостта на анализа е проверена въз основа на пет екстракции в един ден, като на всяка са направени пет анализа (RSD = 0,57%), а средната прецизност е определена на база резултати, получени от три екстракции в три различни дни (RSD = 0,20%).

Въз основа на представените до тук резултати, може да се направи заключението, че предложеният от нас метод за количествено определяне на glaucine в надземните части от жълт мак е достоверен.

5.3. Регенериране на йонни течности след екстракция

Въпреки че се доказват като отлични екстрагенти за извличане на природни продукти от растителни вещества, йонните течности все още са по-скъпи от класическите молекулни разтворители, поради което рециклирането им с цел повторна употреба е изключително важен въпрос. Възможните начини за регенериране след провеждане на екстракциите са изучени в много малка степен, като няколко подхода, отчитащи свойствата на ЙТ и екстрахираните вещества, са били успешно приложени в единични случаи. Накратко, утаяване с анти-разтворител може да се приложи при неразтворими в съответния разтворител съединения [15],

дестилация с водна пара при отделяне на летливи съединения [36], контролирано разпределение във водни двуфазни системи на база йонни течности [37] или употребата на твърдофазна екстракция посредством йонообменна смола или смола за селективно “улавяне” [38, 39]. Тези подходи обаче, са неприложими в нашия случай и показват необходимостта от реализиране на различен подход. Предвид факта, че $[C_4C_1im][Ace]$ принадлежи към групата на хидрофилните йонни течности, възможен начин за регенериране след екстракция на растителен материал от *Gl. flavum* е чрез обратна екстракция с органични разтворители. При проведените експерименти за оценка на смесваемостта на синтезираните от нас ЙТ бе установено, че такива разтворители са неполярните циклохексан, толуен, метил-*tert*-бутилов етер и етилацетат, като последният е най-приемлив от гледна точка на безопасността на работа и следващо регенериране. По тази причина етилацетатът бе избран за провеждане на първоначални опити за обратна екстракция на *glaucine* от суров екстракт. Проведените опити с трикратна екстракция на йонната течност с този разтворител показаха, че екстрахираният *glaucine* се разпределя предпочетено в етилацетатния слой и така осигурява пречистването на йонната течност. След отстраняване на водата под понижено налягане и утаяване на допълнително разтворени вещества от растителната матрица посредством дихлорометан, $[C_4C_1im][Ace]$ беше регенериран количествено. На Фиг. 14 са представени хроматограми на суров екстракт, етилацетатен екстракт и на регенерираната йонна течност, които показват ефективността на използвания от нас подход за едновременното извличане на *glaucine* и пречистване на $[C_4C_1im][Ace]$. В допълнение, чистотата на $[C_4C_1im][Ace]$ беше доказана и с ЯМР спектроскопия, а повторното провеждане на екстракция на *Gl. flavum* с регенерираната йонна течност показва, че тя демонстрира същата екстракционна ефективност. В продължение на тези първоначални изследвания, на по-късен етап бяха направени по-задълбочени опити за изолиране на *glaucine* в чист вид и регенериране на ЙТ. Резултатите са описани в раздел 3.5.2.



Фигура 14. Регенериране на $[C_4C_1im][Ace]$: А) екстракт - $[C_4C_1im][Ace]$ /вода; В) екстракт – етилацетат; С) $[C_4C_1im][Ace]$ – вода

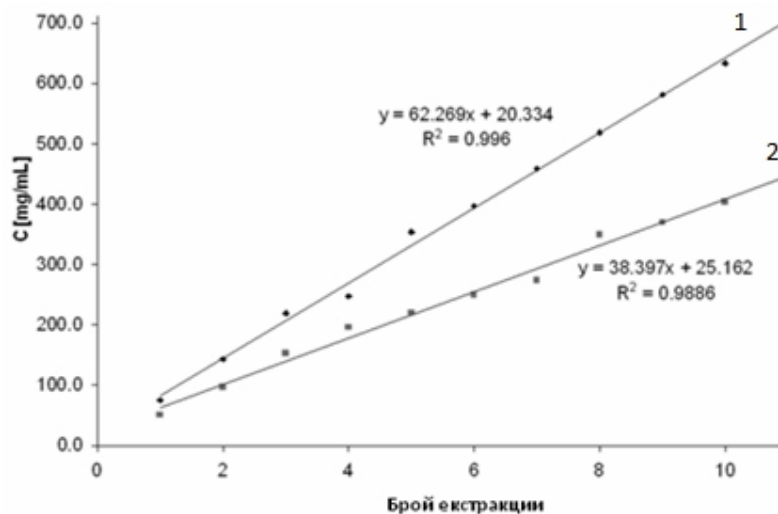
6. Дизайн на цялостен процес за изолиране на *glaucine* с помощта на йонни течности

6.1. Екстракция на растителен материал посредством последователни екстракции

В изследванията до тук бе показано, че $[C_4C_1im][Ace]$ превъзхожда традиционно използвания метанол и останалите имидазолиеве йонни течности при екстракцията на *glaucine* от растителен материал на жълт мак, както и че неговото количествено извличане може да се постигне чрез екстракция с 1 М воден разтвор в рамките на 1 h при нагряване. Оптималното отношение растителен материал – екстрагент при стъпката на твърдо - течна екстракция бе определено 1:40. Това отношение, макар и приемливо за аналитични цели, изглежда неподходящо за екстрахиране на целевия алкалоид в по-големи количества – например, за екстрахирането на 100 kg растителен материал са необходими 4000 L екстрагент! Последното показва необходимостта от оптимизиране на екстракционния процес с оглед минимизиране на съотношението, но без това да води до загуба на екстракционна ефективност.

Един от възможните начини за преодоляване на този проблем е провеждането на последователни екстракции с един и същ екстрагент на нови порции от растителен материал. По този начин реализирането на всеки успешен екстракционен цикъл ще понижава общата стойност на използваната йонна течност,

ще позволи акумулирането на целевото съединение в суровия екстракт и ще елиминира нуждата от рециклиране на йонната течност след всяка екстракция. За да проверим валидността на горното допускане, бяха проведени поредица от 10 екстракции при намерените оптимални условия, а за оценка на ефективността беше направено и сравнително изследване за представянето на метанол като екстрагент. Опитите бяха проведени, както е описано в раздел 4.3.2, а обобщените резултати са представени на Фиг. 15.



Фигура 15. Сравнително проучване на екстракционната способност на $[C_4tmim][Ace]$ (1) и MeOH (2) в поредица от екстракции. **Екстракционни условия:** 2,5 g раст. материал, 100 mL 1 M воден разтвор на $[C_4C_1im][Ace]$, време на екстракция 1 h, температура 80 °C

Както се вижда, концентрацията на glaucine нараства линейно с всеки екстракционен цикъл и за двата използвани разтворителя, но краткият анализ на резултатите показва по-доброто представяне на системата с йонна течност, която демонстрира по-висока екстракционна ефективност (около 35%) при всеки цикъл в сравнение с метанола. Подобно поведение е документирано в скорошно изследване от Богданов и Свиняров [40], като повишената екстракционна ефективност на йонния екстрагент е отдадена на способността на йонната течност, макар и във воден разтвор, да разрушава растителните тъкани и така да позволява изтощаването на растителния материал в една екстракционна стъпка.

Въпреки че провеждането на последователни екстракции осигурява едновременно количествено извличане и акумулиране на целевия алкалоид в

екстрагента, важен фактор от технологична, икономическа и екологична гледна точка, а именно загубата на йонна течност в остатъчната биомаса, трябва да бъде взет под внимание. При проведените опити бе наблюдавана постоянна загуба на екстрагент (около 2%) след всяко филтруване, което може да се отдаде на абсорбцията на йонната течност в микропорите на растителния материал. Доколкото ни е известно, този въпрос не е бил обсъждан в детайли до днес, а само бегло споменат от Yan и съавтори [41]. Те отбелязват, че абсорбцията на използвани като екстрагенти йонни течности е силно зависима от специфичната повърхност на растителната матрица и колкото по-голям е размерът на частиците, толкова повече йонна течност се абсорбира в тях. Следователно, размерът на частиците има важно значение в екстракционения процес с йонни течности, тъй като показва необходимостта от въвеждането на допълнителна технологична стъпка по извличане на абсорбираната йонна течност чрез допълнителна обработка на остатъчната биомаса. Освен това, в случай на провеждане на последователни екстракции, изходният обем на системата трябва да се възстановява след всеки цикъл, за да се достигне отново оптималното съотношение растителен материал - екстрагент, необходимо за количествена екстракция в следващата стъпка. В настоящото изследване, за да се намали загубата на glaucine и възстанови началният обем на системата, филтруваната биомаса бе промита трикратно със свежи порции от изходния воден разтвор на [C₄C₁im][Ace]. След анализ с цел определяне количеството на акумулирания glaucine в екстракта, полученият филтрат бе успешно използван в следващия екстракционен цикъл.

За извличане на йонната течност, в края на процеса бяха проведени допълнителни екстракции с топла и студена вода на събраната от всички експерименти остатъчна биомаса. Получените резултати показаха, че при еднократно третиране с гореща вода (80 °C) в съотношение 1:10 се възстановява 87% от теоретично изчислената загуба на йонна течност, докато със студена вода (25 °C) – 58%. По този начин бе показано, че изгубеният [C₄C₁im][Ace] може да бъде успешно възстановен от остатъчната биомаса чрез въвеждане на допълнителна технологична стъпка, включваща промиване с вода.

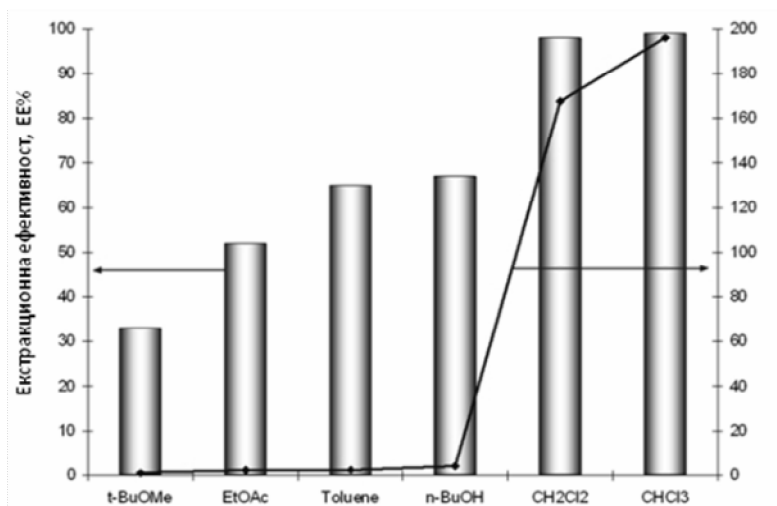
От казаното до тук може да се направи заключението, че [C₄C₁im][Ace] може да замести успешно метанола като екстрагент за извличането на glaucine от растителен материал на жълт мак. Предложената от нас процедура осигурява постоянно по-висока екстракционна ефективност за значително съкратено екстракционно време и позволява натрупването на glaucine от поне 10 последователни екстракции в една и съща екстракционна система, като същевременно намалява тоталното количество вложена йонна течност чрез редуция на съотношението растителен материал - екстрагент от 1:40 на 1:7,2 без загуба на ефективност.

6.2. Изолиране на glaucine и регенериране на ЙТ

За разлика от някои представители на въглехидратите, които са успешно изолирани посредством утаяване с анти-разтворител [42], фенолните съединения, за които контролирано разделяне е постигнато с водни двуфазни системи [37, 43] или етеричните масла, които могат директно да се дестилент от водни разтвори на йонна течност [36], извличането на алкалоиди от сурови екстракти е проучено в много ограничена степен, като съгласно публикуваните до момента научни трудове [40, 44, 45], единственият приложим подход е провеждането на течно - течна екстракция с органични разтворители.

На по-ранен етап проведохме предварителни изследвания [40] и показахме, че glaucine може да бъде извлечен от йонния екстракт с етилацетат, което осигурява и едновременното пречистване на йонната течност. Тези изследвания имаха за цел да се покаже, че пречистването и повторното използване на вложената йонна течност е постижимо, а опити за изолиране на целевото съединение в края на процеса не бяха проведени. Като продължение осъществихме по-задълбочено проучване върху способността за обратна екстракция на glaucine със серия органични разтворители. Въз основа на получените резултати доразвихме цялостен протокол за регенерирането на [C₄C₁im][Ace] и изолирането на алкалоида в чиста форма [40]. За целта бяха проведени експерименти с няколко несмесващи се с вода органични разтворители – етилацетат, диетилов етер, хлороформ, дихлорометан, толуен, 1-бутанол и метил-*tert*-бутилов етер. Опитите бяха осъществени чрез

поставяне на всеки от тях в условията на течно - течна екстракция със суров екстракт, съдържащ акумулирано от 10 екстракции количество glaucine в обемно отношение 1:2. Обобщените резултати за съответните коефициенти на разпределение (K) и екстракционна ефективност (EE%) са представени на Фиг. 16.



Фигура 16. Обратна екстракция с органични разтворители

Както се вижда, нехлорираните разтворители показват ограничена екстрахираща способност ($K = 1-4,1$, $EE = 33-67\%$), докато халогенсъдържащите водят до количествено извличане на glaucine ($K = 168$ и 196 , $EE = 98$ и 99% , съответно за CH_2Cl_2 и $CHCl_3$) в една екстракционна стъпка. Важно е да се отбележи, че при провеждане на екстракциите на суровия екстракт с дихлорометан бе наблюдавано образуването на стабилни емулсии, което може да се разглежда като недостатък от индустриална гледна точка. Поради тази причина $CHCl_3$ бе избран като разтворител, който да осигури селективното разделяне на glaucine в органичната фаза. Следвайки тази едностъпкова процедура (за подробности раздел 4.3.3), изолирането на glaucine в чист вид бе постигнато съгласно патентован протокол [46]. Накратко, след отстраняването на хлороформа под понижено налягане, остатъкът бе разтворен в етанол и подкиселен с бромоводород. По този начин целевият алкалоид бе утаен под формата на бромоводородна сол – формата, под която glaucine се предлага на пазара. Чистотата на получения продукт бе $> 95\%$, което бе доказано с HPLC и ЯМР анализи и сравняване на температурата на топене с литературни данни [46]. Получените резултати показват, че разработената

процедура е подходяща за производството на целевия алакалоид с добър добив и висока чистота.

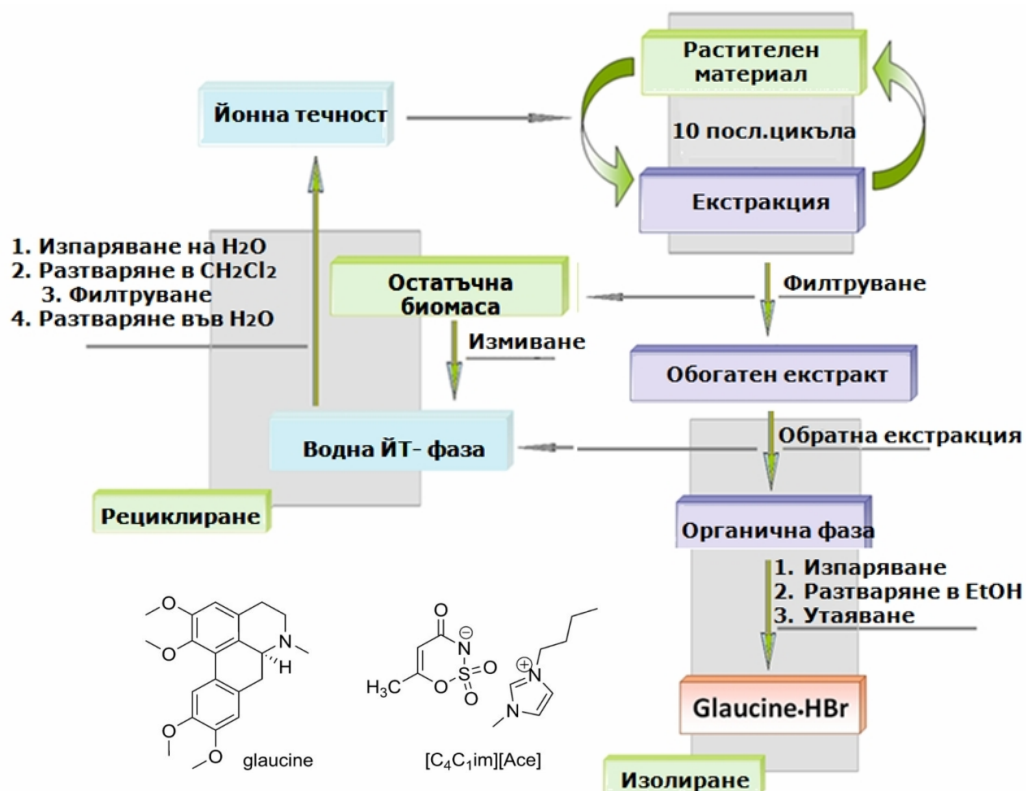


Схема 3. Блок схема за изолиране на glaucine посредством йонни течности

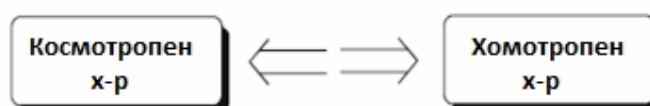
След изолирането на glaucine от суровия екстракт, бе обърнато допълнително внимание на възможността за рециклиране и повторно използване на $[C_4C_{1im}][Ace]$. За да се реализира това, водата от обединените водни разтвори на йонната течност бе отстранена под понижено налягане, а полученият тъмен остатък бе разтворен повторно в дихлорометан с цел утаяване на натрупаните полярни примеси от последователните твърдо - течни екстракции. След отстраняване на органичния разтворител бе установено, че първоначално вложената йонна течност се регенерира количествено, а нейната идентичност и висока чистота бяха доказани с ЯМР спектрални анализи. Следвайки до тук описаната процедура, целият екстракционен цикъл бе реализиран трикратно (след повторно разтваряне на регенерирания $[C_4C_{1im}][Ace]$), като резултатите показаха, че екстрахиращата способност на йонната течност не се променя. Сумарно, 25 g растителен материал, съдържащ 0,44 g glaucine (1,8% (wt/wt)) бяха екстрахирани с 54 g $[C_4C_{1im}][Ace]$ (180

mL 1 M воден разтвор) посредством 10 последователни екстракции. Glaucine бе изолиран с добър добив (60%) и чистота (>95%) от получения суров екстракт, а йонната течност бе успешно рециклирана и отново вложена без загуба на ефективност. За по-голяма яснота разработеният от нас процес е представен като блок схема на Схема 3.

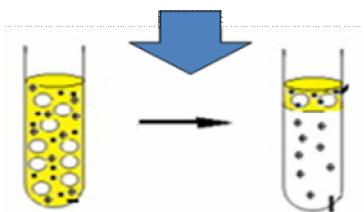
6.3. Разделяне на glaucine във водни двуфазни системи

В настоящата дисертация беше изследвана и алтернативна възможност за възстановяване на glaucine от растителен екстракт посредством формирането на водни двуфазни системи, базирани на йонни течности (Ionic Liquid-based Aqueous Biphasic Systems, IL-ABS) [40]. През 2003 г. Rogers и сътрудници [28] показаха, че водни разтвори на хидрофилни йонни течности образуват IL-ABS при въвеждане в разтвора на определено количество от дадена космоетропна сол. Движещата сила на процеса може да се опише от една страна с ефекта на изсолване, и от друга със способността на неорганичната сол да структурира водните молекули, предизвиквайки по този начин формиране на две взаимно несмесващи се фази, където горната фаза (в повечето случаи) съдържа основно йонна течност, а долната – концентрирана неорганична сол (вж. Фиг. 17).

Аниони: $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$



Катиони: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$



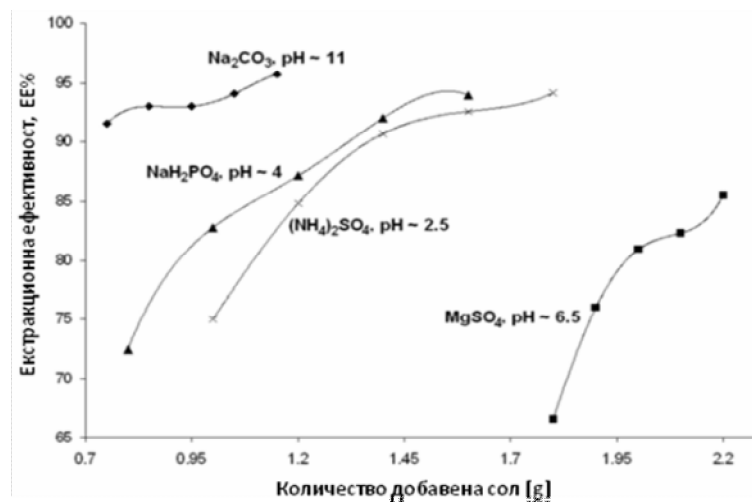
Фигура 17. Формиране на ЙТ- двуфазни системи

Водните двуфазни системи може да се разглеждат като алтернатива на широко използваната конвенционална течна - течна екстракция с органични

разтворители, тъй като те могат да осигурят едновременно концентриране, разделяне, пречистване и изолиране на определена молекула. Всъщност, системи от такъв тип са приложени успешно за извличане на различни типове съединения като белтъци [47], въглеhidрати [48], ензими [49], антибиотици [50], фенолни съединения [37], алкалоиди [51, 52] и други. В допълнение в някои случаи е постигнато и контролирано разпределение на изследваните съединения между двете фази, посредством вариране на състава на системата или стойностите на рН, което допълнително разширява обхвата на потенциални приложения.

Важно е да се отбележи, че към момента на изработване на настоящата дисертация в научната литература не бяха намерени данни за приложението на IL-ABS за изолиране на вещества от растителни екстракти и всички налични данни са за моделни системи и съединения. За да проверим възможността за едновременно концентриране, пречистване и изолиране на glaucine от обогатен растителен екстракт, но без употребата на органични разтворители, бяха проведени опити, целящи да проверят възможността за контролирано разпределение в ЙТ-базирани водни двуфазни системи. За формирането на последните бяха използвани четири соли с ясно изразен космоотропен характер, а именно: Na_2CO_3 , NaH_2PO_4 , MgSO_4 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Тези соли осигуряват различни рН стойности в системата, което позволява да се оцени влиянието и на този фактор върху разпределението на glaucine. Също така, присъствието на неорганични йони със специфични солватирани свойства предполага, че разпределението на glaucine може да бъде манипулирано посредством различни типове взаимодействия [53]. Експериментите бяха проведени чрез добавяне на порции от всяка сол към обогатен екстракт до достигане на насищане. По този начин бе оценено и влиянието на концентрационния фактор върху фазовото отношение и екстракционната ефективност. За изследваните системи не бяха построени фазови диаграми, тъй като концентрацията на йонната течност е фиксирана за оптималните условия на твърдо - течната екстракция (1 M) и е в диапазона на концентрациите, установени в болшинството описани в литературата моделни двуфазни системи. Получените резултати за определените количества добавена сол, фазовите отношения, коефициентите на разпределение и

екстракционната ефективност са систематизирани в Таблица 3, а за по-добро онагледяване са представени в обобщен вид във Фиг. 18.



Фигура 18. Влияние на pH и концентрацията на солта върху разделянето на glaucine в IL-ABS

Както се вижда, способността на използваните соли да образуват две фази (представени като количество добавена сол [%wt/wt]) е в следния ред: Na₂CO₃ (8,18) ≈ NaH₂PO₄ (8,68) > (NH₄)₂SO₄ (10,62) >> MgSO₄ (17,61), което е в съответствие с реда на Hofmeister [54]. Коефициентите на разпределение K са по-високи от единица независимо от стойността на pH на системата и се увеличават с нарастване концентрацията на солта. Получените данни са сходни на тези, докладвани по-рано за други алкалоиди [51, 52] и показват, че йонните взаимодействия, както и водородните връзки не са преобладаващата движеща сила за извличането на glaucine, тъй като независимо от неговия заряд (pK_a = 6,4 [55]), целевият алкалоид предпочетено мигрира в богатата на йонна течност фаза. Следователно, това явление може да се припише на подчертаните хидрофобни взаимодействия на glaucine с йоните [C₄C₁im]⁺ и [Ace]⁻, които включват π-π или дисперсен тип взаимодействия между ароматните пръстени или метиловите групи на алкалоида и съответните алкилови вериги в йоните на йонните течности. Това предположение може допълнително да се осмисли чрез сравняване на стойностите на K за всички системи при първоначално оптимизираната концентрация на неорганичната сол. За системата с Na₂CO₃ (pH около 11), където glaucine съществува под формата на база, наблюдаваното R (13,54) е почти три пъти по-високо в сравнение с останалите (5,76,

5,36 и 4,28, Таблица 3), където неговата протонирана форма е преобладаваща (рН е в диапазон 2,5-6,5). Така, с формираната система се постига почти количествено извличане на glaucine в богатата на йонна течност фаза (ЕЕ = 94%) в сравнение с другите (ЕЕ е в диапазон около 67-75%) в една екстракционна стъпка. Понататъшното повишаване на концентрацията на неорганичната сол в известна степен засяга фазовото отношение R, като причинява едновременно увеличаване на коефициента на разпределение K и на екстракционната ефективност ЕЕ%. Последното показва по-добрата изсолваща способност на неорганичните добавени вещества върху glaucine и ЙТ.

Таблица 3. Фазоформираща способност на космоотропните соли и тяхното влияние върху разпределението на glaucine във водни двуфазни системи

ЙТ-ДФС	Добавена сол [g]	Фазово отношение [R]	Коефициент на разпределение [K]	Екстракционна ефективност [ЕЕ%]
[C ₄ C ₁ im][Ace]/Na ₂ CO ₃ (pH=11)	0,75	13,54	80,00	92
	0,85	17,18	78,00	93
	0,95	18,62	72,00	93
	1,05	24,69	65,00	94
	1,15	36,09	63,00	96
[C ₄ C ₁ im][Ace]/MgSO ₄ (pH=6,5)	1,80	4,28	47,00	67
	1,90	6,11	52,00	76
	2,00	8,20	52,00	81
	2,10	9,00	52,00	82
	2,10	11,43	52,00	86
[C ₄ C ₁ im][Ace]/(NH ₄) ₂ SO ₄ (pH=2,5)	1,00	5,76	21,00	55
	1,20	17,90	31,00	85
	1,40	29,29	33,00	91
	1,60	37,00	34,00	93
	1,80	47,77	34,00	94
[C ₄ C ₁ im][Ace]/NaH ₂ PO ₄ (pH=4)	0,80	5,36	49,00	72
	1,00	9,63	50,00	83
	1,20	13,62	50,00	87
	1,40	24,00	48,00	92
	1,60	22,55	49,00	92

От изложените до тук резултати може да се обобщи, че преминаването на glaucine в богатата на ЙТ фаза се благоприятства при алкално рН, и че търсеното контролирано разпределение между фазите чрез вариране стойността на рН на системата или вида на неорганичната сол е непостижимо. Последното показва, че за изолирането на glaucine в чист вид трябва да се осъществи допълнителна технологична стъпка. Независимо от това, получените резултати могат да послужат като платформа за бъдещо развитие на нови процедури за регенериране на йонни течности от сурови растителни екстракти чрез предизвикване на фазово разделяне посредством добавяне на определена неорганична сол. Това може да бъде с огромно значение от приложна гледна точка, тъй като отстраняването на вода от водни разтвори обяснява високите производствени разходи на подобни индустриални процеси [56]. За да проверим направеното допускане, проведехме допълнителни предварителни експерименти с обогатен екстракт за едновременното регенериране на ЙТ и извличане на glaucine. Както се вижда от Фиг. 18, Na_2CO_3 притежава най-добра фазоформираща способност сред останалите соли и определя предпочетена рН стойност (около 11) за преминаването на glaucine в по-хидрофобната богата на ЙТ фаза и по тази причина бе избран за провеждане на експериментите. Като органичен разтворител за формиране на трета фаза и съответно за екстракция на glaucine бе избран бутилацетат, тъй като е по-приемлив от екологична гледна точка в сравнение с хлороформ. Изследванията бяха проведени подобно на експериментите с водни двуфазни системи, като след добавяне на космотропната сол и съответно фазово разделяне установихме, че около 90% от йонната течност се отделя като отделна (средна) фаза и 68% от целевия алкалоид се извлича в органичния разтворител. След отчитане обемите на фазите и тяхното разделяне, богатата на ЙТ фаза бе двукратно екстрахирана с нови порции бутилацетат (съотношение 1:1), което доведе до количествено извличане на целевия алкалоид. Последният бе изолиран съгласно начина описан в раздел 3.5.2. В обобщение предложения подход осигурява едновременно количествено извличане на glaucine и регенериране на вложената йонна течност, както и отстраняване на около 85% вода в една технологична стъпка.

7. Потенциал за трансфер на знания и приложимост на резултатите (вместо заключение)

Утвърдените промишлени методи за екстракция на природни продукти включват използването на органични разтворители, като наситени въглеродороди, алкохоли, хлороалкани и др. Не винаги обаче тези процеси протичат с пълно извличане на целевите съединения, дори и при високи температури и продължителни екстракционни времена, което налага многократно повторение на стъпката на твърдо-течна екстракция до пълното изтощаване на растителния материал. В резултат – процесът се оскъпява значително, а възможността за рециклиране на вложените органични разтворители се понижава поради загуби във всяка технологична стъпка. Също така в отработената биомаса остават значителни количества от целевите съединения. Въз основа на казаното, употребата на органични разтворители може да се разглежда като неефективно, и същевременно оказващо негативно влияние върху работната и околната среда. Още повече, изискването екстракциите да бъдат провеждани при високи температури и продължително време създава предпоставка за разпадане на целевите или други съединения, което довежда до замърсяване на получените екстракти и налага включването на допълнителни технологични стъпки по тяхното пречистване.

В тази връзка е и основната цел на настоящата дисертация, а именно: създаването на ефективен процес за екстракция на природни съединения с ЙТ. Осъществяването на подобен процес има огромен потенциал за последващо внедряване в индустрията, тъй като употребата на ЙТ вместо конвенционални органични разтворители ще повиши добивите на целевите съединения, ще повиши качеството на труд и ще минимизира екологичния риск при производството на природни продукти.

Друга цел в дисертацията е насочена към разбиране поведението на ЙТ в процесите на екстракция на фундаментално ниво, което е предпоставка за разработването на нови технологии с потенциална пазарна реализация. Въвеждането на ЙТ в екстракционния процес дава възможност за бързото извличане на целевите съединения, което ще доведе до значително подобрение на технологичния процес чрез понижаване нивата на вложения труд, енергия и

отделените в околната среда вредни емисии. Още повече, ЙТ позволяват количествена екстракция на целевите съединения при стандартни условия, което също определя широка употреба в практиката.

Получените резултати могат да послужат за създаване на безвредни и ефективни методики за стандартизирани анализи на растителен материал, като са предпоставка за реализиране на бъдещи съвместни проекти с научни групи от водещи европейски университети или фирми, представени на българския пазар.

Основно предимство на ЙТ пред конвенционалните разтворители е тяхното пренебрежимо ниско парно налягане – на практика те не се изпаряват при стандартни условия. Това им свойство е от голяма степен на важност, тъй като минимизира риска от производствени аварии (взрив, пожар, отравяне), с което се повишава безопасността на работната среда и едновременно с това има голям принос към опазването на околната среда заради практическото отсъствие на вредни емисии, водещо до подобряване на здравното състояние на населението като цяло. Въвеждането на ЙТ в производствени процеси може да доведе до значителна икономия на енергия, тъй като позволява провеждане на екстракциите при стандартни условия, като едновременно с това осигурява количествени добиви за кратки времена. ЙТ може да се разглеждат и като възобновими ресурси, които позволяват количествено рециклиране и повторна употреба. Това понижава себестойността им с всеки следващ производствен цикъл и води до намаляването на разходите по цялостния процес.

От друга страна, ЙТ могат да бъдат внедрени във вече утвърден производствен процес с цел процесиране на отработена биомаса. Такъв подход няма да доведе до съществена промяна на наличната технология за производство, а по-скоро ще я допълва по изключително ефективен начин – съгласно прилаганите към момента методологии за екстракция на природни съединения, в резултат на непълна екстракция се реализира загуба на ценен ресурс, тъй като редица, иначе ценни компоненти се губят в остатъчния растителен материал, който подлежи на унищожаване. Очевидна е необходимостта от внедряване на допълнителна стъпка в производствения процес с цел неговото оптимизиране за максимално извличане на целевите (за процеса), както и на други съединения с потенциално промишлено

значение. Внедряването на ЙТ в този процес ще доведе до количествено извличане на целевите съединения без промяна на качеството на продукцията, от иначе отпадъчен материал, което от една страна позволява тяхното следващо влагане в готови пазарни артикули, и от друга – създава условия за реализация на безотпадна технология. Независимо, че внедряването на допълнителна стъпка би следвало да оскъпи производствения процес, успешната реализация и внедряване на ЙТ ще доведе до намаляване себестойността на продуктите като цяло, поради значително повишеното КПД на процеса. По този начин ще се реализира по-ефективна експлоатация на вложените природни ресурси, чрез повишаване на производителността, ще се спестят средства по складирането и унищожаването на отпадната биомаса. Също така, изтощеният растителен материал може да бъде използван за целите на други производства.

По отношение на получените в настоящата дисертация резултати, предложената от нас процедура позволява количественото екстрахиране на gļaucine, независимо от неговата концентрация в растителния материал, а концентрацията му в суровия екстракт се повишава без достигане на насищане при поне 10 последователни екстракции. Сравнена със сегашната индустриална процедура за производството на gļaucine, описаната от нас осигурява константно по-висока екстракционна ефективност (около 35%) при твърдо - течната екстракционна стъпка, което е решаващ фактор за приложимостта на процеса. Последното показва възможността водните разтвори на йонни течности да се използват като заместители на органични разтворители в добре установените индустриални процеси като мацерация и перколация, тъй като екстракционните добиви могат значително да се повишат.

Въпреки че основната цел на настоящата дисертация бе постигната, т.е. бе разработен подобрен процес (по отношение на оборудване, потребление на енергия, брой технологични стъпки, добив и чистота на продукт) за изолиране на gļaucine, трябва да се споменат някои важни фактори, засягащи неговата устойчивост и „зеленост“. Предложената от нас процедура все още изисква употребата в определени стъпки на молекулни разтворители с доказана токсичност за хората (дихлорометан и хлороформ) и това може да се приеме за недостатък.

Въпреки това, ние вярваме, че ако подобен протокол се приеме от индустрията, всяка стъпка ще бъде преразгледана по такъв начин, че да се постигнат оптимални резултати. Това включва: 1) заместване на хлорираните разтворители с безвредни; 2) намиране на по-евтина и лесно рециклируема йонна течност с доказани свойства от екологична гледна точка; 3) допълнително подобряване на процеса чрез провеждане на повече от 10 последователни екстракции; 4) провеждане на екстракциите в проточни реактори и т.н. Изследвания върху някои от изброените точки са понастоящем в ход в Лабораторията по хетероциклени съединения към Факултет по химия и фармация и получените резултати ще бъдат докладвани своевременно.

Обобщение и изводи

1. Изследвана е реакция на кватернизация на *N*-метилмидазол с алкилхалогениди в присъствието на ДМФ като разтворител. Установен е оптимален температурен интервал (80-110 °C), осигуряващ бързо протичане на реакцията (12-20 h с алкилхлориди и около 15 min с алкилбромиди), с което се минимизира получаването на странични продукти. Получените 1-алкил-3-метилимидазолиев халогениди са бледожълти съединения, някои от тях течни при стайна температура ЙТ. За пречистването им посредством течно - течна екстракция е конструирана апаратура, която намалява многократно обема на вложения органичен разтворител, необходим за провеждането на този процес.
2. За синтеза на ЙТ, изградени от биосъвместими аниони, са проведени реакции на анионен обмен. Изследвани са различни реакционни условия, а степента на протичане на реакциите е проследена с ЯМР спектроскопия. Установено е, че употребата на ЙТ с хлориден анион трябва да бъде предпочетена, тъй като аналогичната трансформация с бромиди не протича с пълна обмяна на йоните. В резултат на синтетичните изследвания са получени, пречистени и охарактеризирани 10 йонни течности от имидазолиев тип с вариращ алкилов заместител в имидазолиевия пръстен и аниони, и е установена смесваемостта им с органични разтворители и вода. Структурата на получените съединения е установена посредством ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия.
3. Синтезираните хидрофилни 1-алкил-3-метилимидазолиев ЙТ са използвани като екстрагенти за ефективното извличане на биологично активния алкалоид *glaucine* от надземните части на растението *Gl. flavum*. Изследвано е влиянието на аниона, температурата, дължината на алкиловата веригата в катиона, концентрацията, екстракционното време и съотношението растителен материал - екстрагент. Установени са емпирични зависимости за влиянието на отделните фактори върху екстракционната ефективност. Проведен е сравнителен анализ за екстрахиращата способност на ЙТ и молекулни разтворители. Установено е, че ЙТ осигуряват високи добиви за по-кратко време на екстракция. Намерени са оптимални условия за количествена екстракция на *glaucine* в една технологична стъпка и е показано, че свежи порции от растителен материал могат да се екстрахират последователно с

- една и съща ЙТ. Този подход намалява нуждите на процеса, като се избягва стъпката на рециклиране на ЙТ след всяка екстракция и позволява акумулирането на glaucine в екстракционната система без достигне на насищане, с което се намалява и общото съотношение растителен материал - екстрагент, но без загуба на ефективност.
4. Разработен е нов HPLC метод за качествен и количествен анализ на растителни екстракти от жълт мак. Предложеният метод осигурява добро разделяне на алкалоидните компоненти и количествено определяне на glaucine. Пробоподготовката се базира на екстракция с воден разтвор на $[C_4C_{1im}][Ace]$ при намерените оптимални условия, последвана от HPLC-анализ. Предложеният метод е валидиран посредством определянето на параметри като: селективност, линейност, прецизност, възпроизводимост, повторемост, граници на откриване и количествено определяне, и аналитичен добив.
 5. Разработена е процедура за обратна екстракция на glaucine от йонно-течностен екстракт. Целевото съединение е изолирано в кристална форма като бромоводородна сол – формата, под която glaucine се влага в лекарствени препарати. Разработена е процедура за пречистване и количествено регенериране на вложената ЙТ и е показано, че същата може да се използва в повторен цикъл на екстракция на glaucine от свеж растителен материал.
 6. Изследвана е възможността за едновременно възстановяване на glaucine и отделяне на вложената ЙТ с помощта на водни двуфазни системи, получени чрез добавяне на космомотропни соли (Na_2CO_3 , $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NaH_2PO_4) към обогатен на glaucine екстракт. Установено е, че целевият алкалоид преминава преимуществено в богатата на ЙТ фаза независимо от вида на използваната сол, нейната концентрация или рН на средата, и че разпределението му в тази фаза се благоприятства при алкално рН. Получените резултати послужиха за разработването на екстракционна процедура, осигуряваща едновременно възстановяване на glaucine, рециклиране на вложената ЙТ и отстраняване на водата в една технологична стъпка. Този подход може да послужи като платформа за разработване на нови методи за количествено определяне на glaucine или други вещества в силно замърсени и/или разредени биологични проби, тъй като осигурява едновременно разделяне, пречистване и прекоцентриране на целевите съединения.

Използвана литература

1. G.M. Cragg, D.J. Newman, Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1830) 3670–3695.
2. J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426–436.
3. F. Bucar, A. Wube, M. Schmid, Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 525–545.
4. P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 686–694.
5. M. Freemantle, *An Introduction to Ionic Liquids*, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2009.
6. J.P. Hallett, T. Welton, Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. 2, *Chem. Rev.* 111 (2011) 3508–3576.
7. M. Opallo, A. Lesniewski, A review on electrodes modified with ionic liquids, *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 2–16.
8. J. Larionova, Y. Guari, A. Tokarev, E. Chelebaeva, C. Luna, C. Sangregorio, A. Caneschi, C. Guérin, Coordination polymer nano-objects into ionic liquids: nanoparticles and superstructures, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 3988–3996.
9. T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hanta, J.L. Anderson, Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives, *Anal. Chem.* 86 (2014) 262–285.
10. S. Li, S. Cai, W. Hu, H. Chen, H. Liu, Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 666–671.
11. M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Pérez, M.Á. González-Curbelo, J. Hernández Borges, Liquid phase microextraction applications in food analysis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7415–7437.
12. (a) M. Domínguez-Pérez, L.I.N. Tomé, M.G. Freire, I.M. Marrucho, O. Cabeza, J.A.P. Coutinho, (Extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids, *Sep. Purif. Technol.* 72 (2010) 85–91;
(b) A.F.M. Cláudio, M.G. Freire, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, J.A.P. Coutinho, Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 75 (2010) 39–47;
(c) L.I.N. Tomé, V.R. Catambas, A.R.R. Teles, M.G. Freire, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* 72 (2010) 167–173.
13. T.D. Ho, A.J. Canestraro, J.L. Anderson, Ionic liquids in solid-phase microextraction: a review, *Anal. Chim. Acta* 695 (2011) 18–43.

14. (a) M.G. Bogdanov, W. Kantlehner, Simple prediction of some physical properties of ionic liquids: The residual volume approach, *Z. Naturforsch.* 64b (2009) 215–222.;
 (b) M.G. Bogdanov, B. Iliev, W. Kantlehner, The residual volume approach II: Simple prediction of ionic conductivity of ionic liquids, *Z. Naturforsch.* 64b (2009) 756–764.;
 (c) M.G. Bogdanov, D. Petkova, S. Hristeva, I. Svinyarov, W. Kantlehner, New guanidinium-based room-temperature ionic liquids. Substituent and anion effect on density and solubility in water, *Z. Naturforsch.* 65b (2010) 37–48.;
 (d) M.G. Bogdanov, I. Svinyarov, H. Kunkel, C. Steinle, M. Arkhipova, W. Kantlehner, G. Maas, Empirical polarity parameters for hexaalkylguanidinium based room-temperature ionic liquids, *Z. Naturforsch.* 65b (2010) 791–797.
15. A.A. Lapkin, P.K. Plucinski, M. Cutler, Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1653–1664.
16. F.Y. Du, X.H. Xiao, G.K. Li, Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati.*, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 56–62.
17. (a) W. Ma, Y. Lu, R. Hu, J. Chen, Z. Zhang, Y. Pan, Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf, *Talanta* 80 (2010) 1292–1297;
 (b) L. Yang, H. Wang, Y. Zu, C. Zhao, L. Zhang, X. Chen, Z. Zhang, Ultrasound assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions, *Chem. Eng. J.* 172 (2011) 705–712;
18. F.Y. Du, X.H. Xiao, X.J. Luo, G.K. Li, Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants, *Talanta* 78 (2009) 1177–1184;
19. B.D. Ribeiro, M.A.Z Coelho, L.P.N Rebelo, Ionic liquids as additives for extraction of saponins and polyphenols from mate (*Ilex paraguariensis*) and tea (*Camellia sinensis*), *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 12146–12153;
20. Y.H. Kim, Y.K. Choi, J.Park, Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass, *Bioresour. Technol.* 109 (2012) 312–315.
21. T. Liu, X. Sui, R. Zhang, L. Yang, Y. Zu, L. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang, Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid, and essential oil from *Rosmarinus officinalis*, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8480–8489.
22. A.G. Böwing, A. Jess, Kinetics of single- and two-phase synthesis of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, *Green Chem.* 7 (2005) 230-235.
23. E.B. Carter, S.L. Culver, P.A. Fox, R.D. Goode, I. Ntai, M.D. Tickell, R.K. Traylor, N.W. Hoffman, J.H. Davis Jr., Sweet success: ionic liquids derived from nonnutritive sweeteners, *Chem. Commun.* (2004) 630–31.

24. P. Nockemann, B. Thijs, K. Driesen, C.R. Janssen, K. Van Hecke, L. Van Meervelt, S. Kossmann, B. Kirchner, K. Binnemans, Choline saccharinate and choline acesulfamate: ionic liquids with low toxicities, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 5254–5263.
25. M.J. Earle, K.R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391–1398.
26. C. Reichardt, T. Welton, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, 4th edn. Wiley, Weinheim (2011)
27. C. Reichardt, Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes, *Green Chem.* 7 (2005) 339–351.
28. K.E. Gutowski, G.A. Broker, H.D. Willauer, J.G. Huddleston, R.P. Swatloski, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6632–6633.
29. K. Vilku, R. Mawson, L. Simons, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2008) 161–169.
30. J.C.M. Li, P. Change, Self-diffusion coefficient and viscosity in liquids, *J. Chem. Phys.* 23 (1955) 518–520.
31. J. Jacquemin, P. Husson, A.A.H. Padua, Density and viscosity of several pure and water-saturated ionic liquids, *Green Chem.* 8 (2006) 172–180.
32. G.B. Lapa, O.P. Sheichenko, A.G. Serezhchkin, O.N. Tolkachev, HPLC determination of glaucine in Yellow horn poppy grass (*Glaucium flavum* Crantz), *Pharm. Chem. J.* 38 (2004) 441–442.
33. B. Pekic, Z. Lepojevic, B. Slavica, S.M. Petrovic, High-performance liquid chromatographic determination of glaucine in *Glaucium flavum* Crantz, *Chromatogr.* 21 (1986) 227–228.
34. V. Chervenкова, N. Mollov, S. Paszyc, Source of some minor alkaloids in *Glaucium flavum*, *Phytochem.* 20 (1981) 2285–2287.
35. R. LaBrutto, T. Patel, Method Validation, in: Y. Kazakevich, R. LaBrutto (Eds.), John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey (2007) 455–502.
36. J. Jiao, Q.Y. Gai, Y.J. Fu, Microwave-assisted ionic liquids treatment followed by hydro-distillation for the efficient isolation of essential oil from *Fructus for sythiae* seed, *Sep. Purif. Technol.* 107 (2013) 228–237.
37. Z. Tan, F. Li, X. Xu, Isolation and purification of aloe anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system, *Sep. Purif. Technol.* 98 (2012) 150–157.
38. S. Zhu, C. Ma, Q. Fu, Application of ionic liquids in an online ultrasonic assisted extraction and solid-phase trapping of rhodiosin and rhodionin from *Rhodiola rosea* for UPLC, *Chromatogr.* 76 (2013) 195–200.

39. R. Zirbs, K. Strassl, P. Gaertner, Exploring ionic liquid–biomass interactions: towards the improved isolation of shikimic acid from star anise pods, *RSC Adv.* 3 (2013) 26010–26016.
40. (a) M.G. Bogdanov, I. Svinyarov, R. Keremedchieva, A. Sidjimov, Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr.(Papaveraceae), *Sep. Purif. Technol.* 97 (2012) 221–227.
 (b) M.G. Bogdanov, I. Svinyarov, Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. II. Kinetics, modeling and mechanism of glaucine extraction from *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae), *Sep. Purif. Technol.* 103 (2013) 279–288.
 (c) M.G. Bogdanov, R. Keremedchieva, I. Svinyarov, Ionic liquid-supported solid-liquid extraction of bioactive alkaloids. III. Ionic liquid regeneration and glaucine recovery from ionic liquid-aqueous crude extract of *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae), *Sep. Purif. Technol.* 155 (2015) 13–19.
 (d) R. Keremedchieva, I. Svinyarov, M.G. Bogdanov, Ionic Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems—A Facile Approach for Ionic Liquid Regeneration from Crude Plant Extracts, *Processes* 3 (2015) 769-778.
41. W. Yan, L. Ji, S. Hang, New ionic liquid-based preparative method for diosgenin from *Rhizoma dioscoreae nipponicae*, *Pharmacogn. Mag.* 9 (2013) 250–254.
42. A.P. Carneiro, O. Rodriguez, E.A. Macedo, Separation of carbohydrates and sugar alcohols from ionic liquids using antisolvents, *Sep. Purif. Technol.* 132 (2014) 496–504.
43. A.F.M. Cláudio, C.F.C. Marques, I. Boal-Palheiros, Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Green Chem.* 16 (2014) 259–268.
44. A.F.M. Cláudio, A.M. Ferreira, M.G. Freire, Enhanced extraction of caffeine from Guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids, *Green Chem.* 15 (2013) 2002–2010.
45. A.K. Ressmann, R. Zirbs, M. Pressler, Surface-active ionic liquids for micellar extraction of piperine from black pepper, *Z. Naturforsch. B.* 68 (2013) 1129–1137.
46. A.G. Maasbol, L-Glaucine containing composition for cough relief, Patent US4370331 A, 25 January 1983.
47. Z.J. Tan, F.F. Li, X.L. Xu, J.M. Xing, Simultaneous extraction and purification of aloe polysaccharides and proteins using ionic liquid based aqueous two-phase system coupled with dialysis membrane, *Desalination* 286 (2012) 389–393.
48. K. Tordova, Separation of poly- and disaccharides by biphasic systems based on ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* 89 (2012) 57–65.

49. F.J. Deive, A. Rodríguez, A.B. Pereiro, J.M.M Araújo, M.A. Longo, M.A.Z. Coelho, J.N. Canongia Lopes, J.M.S.S. Esperança, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction, *Green Chem.* 13 (2011) 390–396.
50. C.F. Marques, T. Mourão, C.M. Neves, Á.S. Lima, I. Boal-Palheiros, J.A. Coutinho, M.G. Freire, Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and sodium carbonate as enhanced routes for the extraction of tetracycline, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 645–654.
51. M.G. Freire, C.M.S.S. Neves, I.M. Marrucho, J.N. Canongia Lopes, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids, *Green Chem.* 12 (2010) 1715–1718.
52. M.G. Freire, A.R.R. Teles, J.N. Canongia Lopes, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Partition Coefficients of Alkaloids in Biphasic Ionic-Liquid-Aqueous Systems and their Dependence on the Hofmeister Series, *Sep. Sci. Technol.* 47 (2012) 284–291.
53. K. Tnova, I. Svinyarov, M.G. Bogdanov, Hydrophobic 3-alkyl-1-methylimidazolium saccharinates as extractants for L-lactic acid recovery, *Sep. Purif. Technol.* 125 (2014) 239–246.
54. S. Shahriari, C.M. Neves, M.G. Freire, J.A. Coutinho, Role of the Hofmeister Series in the Formation of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 7252–7258.
55. A. Petruczynik, M. Waksmundzka-Hajnos, M.L. Hajnos, The Effect of Chromatographic Conditions on the Separation of Selected Alkaloids in RP-HPTLC, *J. Chromatogr. Sci.* 43 (2005) 183–194.
56. C.S. López-Garzón, A.J.J. Straathof, Recovery of carboxylic acids produced by fermentation, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 873–904.

ПУБЛИКАЦИИ, ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации, включени в дисертационния труд

1. Bogdanov, M.G., Svinarov, I., Keremedchieva, R., Sidjimov, A. (2012) Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae), *Separation and Purification Technology*, 97, pp. 221–227.
2. Керемедчиева, Р., Богданов, М.Г. (2013) Екстракционни процеси с йонни течности, *Българско списание за химия*, 2, pp. 15-24.
3. Bogdanov, M.G., Keremedchieva, R., Svinarov, I. (2015) Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. III. Ionic liquid regeneration and glaucine recovery from ionic liquid-aqueous crude extract of *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae) *Separation and Purification Technology*, 155, pp. 13–19.
4. Keremedchieva, R., Svinarov, I., Bogdanov, M.G. (2015) Ionic Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems – A Facile Approach for Ionic Liquid Regeneration from Crude Plant Extracts *Processes*, 3, pp. 769–778.

Забеязани цитати по статиите, включени в дисертационния труд

M. G. Bogdanov, I. Svinarov, R. Keremedchieva, A. Sidjimov, Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae). *Sep. Purif. Technol.* 97 (2012) 221.

1. R. Wang, Y. Chang, Z. Tan, F. Li
A novel combined process for extracting, separating and recovering flavonoids from flos sophorae immaturus
(2017) *Separation and Purification Technology*, 172, pp.422–432.
2. X. Zhang, Y. Bai, R. Yan, H. Gao
Progress in ionic liquids for extraction of organic compounds
(2016) *Chemical Industry and Engineering Progress*, 35, pp. 1587–1605.
3. A.M.Arafa, M.El-S. Mohamed, S.I. Eldahmy
The Aerial Parts of Yellow Horn Poppy (*Glaucium flavum* Cr.) growing in Egypt: Isoquinoline Alkaloids and Biological Activities
(2016) *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8, pp. 323-332.
4. A.K. Ressmann, K. Bica, *Leaching of Active Ingredients from Plants with Ionic Liquids.* – in **Ionic Liquids for Better Separation Processes, 2015**, Chapter 7, pp. 135-165. Ed. H. Rodrigues, Published by Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016. Print ISBN: 978-3-662-48518-7;
5. A.M. Lopes, L.B. Roserio, R. Bogel-Lukasik, *Relevance of Ionic Liquids and Biomass Feedstocks for Biomolecule Extraction.* – in **Ionic Liquids in the Biorefinery Concept : Challenges and Perspectives, 2015**, Chapter 5, pp. 121-167. Ed. Rafal Bogel-Lukasik, Published by The Royal Society of Chemistry, 2016.

6. | T.-T. Zhang, L. Yang, J.-G. Jiang
Bioactive comparison of main components from unripe fruits of *Rubus chingii* Hu and identification of the effective component
(2015) *Food & Function*, 6 pp. 2205–2214.
7. | Г.Т. Жарылгасина, Ж.С. Нурмаганбетов, А.Ж. Турмухамбетов, С.М. Адекенов
Современные способы выделения алкалоидов из растительного сырья
(2014) *Фармацевтический бюллетень*, 3-4, pp. 105–122.
8. | M.E. Mohamed, A.M. Arafa, S.S. Soliman, S.I. Eldahmy
Plant germination and production of callus from the yellow hornpoppy (*Glaucium flavum*): the first stage of micropropagation
(2014) *Pharmazie* 69(9) pp. 715–720.
9. | H. Passos, M. G. Freire, J. A.P. Coutinho
Ionic liquids solutions as extractive solvents of value-added compounds from biomass
(2014) *Green Chemistry*, 16 pp. 4786–4815.
10. | T. Hu, X. He, J. Jiang and X. Xu
Efficacy evaluation of a Chinese bitter tea (*Ilex Latifolia* Thunb.) via analyses on its main components
(2014) *Food & Function*, 5 pp. 876–881.
11. | A.K. Ressmann, R. Zirbs, M. Pressler, P. Gaertner, K. Bica
Surface-active Ionic Liquids for Micellar Extraction of Piperine from Black Pepper
(2013) *Z. Naturforsch.* 68b, pp. 1129–1137.
12. | B.D. Ribeiro, M.A.Z. Coelho, L.P.N. Rebelo, and I.M. Marrucho
Ionic Liquids as Additives for Extraction of Saponins and Polyphenols from Mate (*Ilex paraguariensis*) and Tea (*Camellia sinensis*)
(2013) *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, pp. 12146–12153.
13. | F. Hadjiakhoondi, S.N. Ostad, M. Khanavi, A. Hadjiakhoondi, B. Farahanikia, A. Salarytabar
Cytotoxicity of two species of glaucium from Iran
(2013) *Journal of Medicinal Plants*, 12, pp. 85–92.
14. | F. Bucar, A. Wube, M. Schmid
Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds
(2013) *Natural Product Reports* 30, pp. 525–545.
15. | Z. Wei, Y. Zu, Y. Fu, W. Wang, M. Luo, C. Zhao, Y. Pan
Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis
(2013) *Separation and Purification Technology*, 102, pp. 75–81.

Bogdanov, M.G., Keremedchieva, R., Svinyarov, I. Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. III. Ionic liquid regeneration and glaucine recovery from ionic liquid-aqueous crude extract of *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae), *Sep.Purif. Technol.* (2015) 155, pp. 13–19.

16. | Z. Liu, L. Qiao, H. Gu, F. Yang, L. Yang
Development of Brönsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels
(2017) *Separation and Purification Technology*, 172, pp. 326–337.

17. | R. Wang, Y. Chang, Z. Tan, F. Li
A novel combined process for extracting, separating and recovering flavonoids from flos sophorae immaturus
(2017) *Separation and Purification Technology*, 172, pp. 422–432.

18. | X. Zhang, Y. Bai, R. Yan, H. Gao
Progress in ionic liquids for extraction of organic compounds
(2016) *Chemical Industry and Engineering Progress*, 35, pp. 1587–1605.

19. | F. Chen, X. Zhang, X. Du, L. Yang, Y. Zu, F. Yang
A new approach for obtaining *trans*-resveratrol from tree peony seed oil extracted residues using ionic liquid-based enzymatic hydrolysis *in situ* extraction
(2016) *Separation and Purification Technology*, 170, pp. 294–305.

20. | Z. Yang, Z. Tan, F. Li, X. Li
An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaves using acidic ionic liquids
(2016) *Industrial Crops and Products*, 89, 78–86.

21. | L. Ge, H. Huang, Y. Qin, F. Xia, K. Yang
Selective adsorption of luteolin and aloe-emodin on ionic liquids-bonded silica
(2016) *Adsorption*, 22, pp.871–878.

22. | Z. Tan, Y. Yi, H. Wang, W. Zhou, C. Wang
Extraction, Preconcentration and Isolation of Flavonoids from *Apocynum venetum* L. Leaves Using Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Coupled with an Aqueous Biphasic System
(2016) *Molecules*, 21, pp. 262–273.

23. | J.-P. Fan, B. Zheng, Y. Qin, D. Yang, D.-D. Liao, X.-K. Xu, X.-H. Zhang, J.-H. Zhu,
A superparamagnetic Fe₃O₄-graphene oxide nanocomposite for enrichment of nuciferine in the extract of *Nelumbinis Folium* (Lotus leaf)
(2016) *Applied Surface Science*, 364, pp. 332–339.

24. | Z.-J. Tan, C.-Y. Wang, Z.-Z. Yang, Y.-J. Yi, H.-Y. Wang, W.-L. Zhou and F.-F. Li
Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with Further Purification by an Aqueous Two-Phase System
(2015) *Molecules*, 20, pp.17929-17943.

2016

1. | *4th International Conference on Methods and Materials for Separation Processes, September 04-08, 2016, Brunow, Poland*
*Oral presentation: **Ionic liquids as alternative extractive systems for quantitative determination of natural products in plants***
*Authors: I.Svinyarov, R. Keremedchieva, A. Nedelcheva, M.G. Bogdanov**
2. | *Advanced Functional Materials, October 14-16, 2016, Pravets, Bulgaria*
*Oral presentation: **Green approaches for the preparation and characterization of value added heterocyclic compounds***
*Authors: I. Svinyarov, R. Keremedchieva, A. Nedelcheva, M.G. Bogdanov**
3. | *9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries – СМАРSЕЕС, May 26-29, 2016, Plovdiv, Bulgaria*
*Oral presentation: **Ionic liquids vs. molecular solvents in the production of value added natural products***
*Authors: I. Svinyarov, R. Keremedchieva, M.G. Bogdanov**
4. | *Научен семинар на Катедра фармацевтична и приложна органична химия, 3-5 Юни 2016, Гюлечица, България*
*Доклад: **Ionic liquid-based aqueous biphasic systems – A facile approach for ionic liquid regeneration from crude plant extracts***
Автори: R. Keremedchieva, I. Svinyarov, M.G. Bogdanov*
5. | *26th EUCHEM on Molten Salts and Ionic Liquids, July 3-8, 2016, Vienna, Austria*
*Oral presentation: **Ionic liquid-assisted recovery of value added alkaloids from plant materials***
Authors: M.G. Bogdanov, I.Svinyarov, R. Keremedchieva*

2015

6. | *63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, August 23-27, 2015, Budapest, Hungary*
*Poster presentation: **Ionic liquid-assisted extraction as a sample preparation technique for HPLC determination of biologically active alkaloid galantamine in *Leucojum aestivum* L. (Summer snowflake)***
Authors: R. Keremedchieva, I.Svinyarov, M.G. Bogdanov*
7. | *17th International Conference on Chemistry, Chemical Engineering and Chemical Process, April 13-14, 2015, Venice, Italy*
*Oral presentation: **Back Extraction and Isolation of Alkaloids from Ionic Liquid-based Extracts***
Authors: R. Keremedchieva, I.Svinyarov, M.G. Bogdanov*
8. | *XIV^{ma} Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 20-22 май 2015, София, България*
*Доклад: **Екстракция на галантамин от блатно кокиче чрез водни разтвори на йонни течности***

9. | *Автори: Р. Керемедчиева**, И. Свињаров, М.Г. Богданов
 3rd International Conference on Methods and Materials for Separation Processes,
 September 06-10, **2015**, Karpacz, Poland
 Poster presentation: **Ionic liquid-assisted extraction as a sample preparation technique
 for HPLC determination of biologically active alkaloid galantamine in *Leucojum aestivum*
 L. (Summer snowflake)**
 Authors: R. Keremedchieva*, I. Svinjarov, M.G. Bogdanov
10. | 3rd International Conference on Methods and Materials for Separation Processes,
 September 06-10, **2015**, Karpacz, Poland
 Oral presentation: **Ionic liquid as alternative solvents for selective extraction of
 secondary metabolites from plant materials: A case study**
 Authors: R. Keremedchieva, I. Svinjarov, M.G. Bogdanov*

2014

11. | 2nd International Conference on Ionic Liquids in Separation and Purification Technologies,
 June 29- July 2, **2014**, Toronto, Canada
 Oral presentation: **Kinetics, modeling, and extraction mechanism of ionic liquid-
 supported extraction of bioactive alkaloid glaucine from *Glaucium flavum* Cr.
 (Papaveraceae)**
 Authors: M.G. Bogdanov*, R. Keremedchieva, I. Svinjarov
12. | Workshop "Advance functional materials", September 03-06, **2014**, Nesebar, Bulgaria
 Oral presentation: **Back extraction and isolation of glaucine from ionic liquid-based
 extract**
 Authors: R. Keremedchieva, I. Svinjarov, M.G. Bogdanov*
13. | Workshop "Advance functional materials", September 03-06, **2014**, Nesebar, Bulgaria
 Poster presentation: **Ionic liquid-supported extracton of galantamine from *Leucojum
 aestivum***
 Authors: R. Keremedchieva*, I. Svinjarov, M.G. Bogdanov
14. | XIII^{ma} Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 21-23 май
2014, София, България
 Доклад: **Екстракция на алкалоиди с йонни течности. Обратна екстракция и
 изолиране на глауцин от водни разтвори на йонна течност**
 Автори: Р. Керемедчиева*, И. Свињаров, М.Г. Богданов

2013

15. | Научен семинар на Катедра приложна органична химия, **2013**, Гьолечица, България
 Доклад: **Kinetics, modeling, and extraction mechanism of Ionic liquid-supported
 extraction of bioactive alkaloid glaucine from *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae)**
 Автори: М.Г. Богданов, И. Свињаров, Р. Керемедчиева*, А. Сиджимов

2012

16. | Научен семинар на Катедра приложна органична химия, 8-10 Юни **2012**, Гьолечица
 Доклад: **Нов HPLC метод за количествено определяне на глауцин в
 растителен материал от *Glaucium flavum***
 Автори: М.Г. Богданов, Р. Керемедчиева*, И. Свињаров, А. Сиджимов