

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Кафедра фармации

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕ-
СКОГО ФАКУЛЬТЕТА**

КРАСНОДАР – 2015

УДК 615.1 (075.8)

ББК 52.82

Ф 64

СОСТАВИТЕЛИ: сотрудники кафедры фармации ГБОУ ВПО КубГМУ
Минздрава России:

Сампиев А.М. - заведующий кафедрой, доктор фармацевтических наук, профессор

Хочава М.Р. - кандидат фармацевтических наук, доцент

Шевченко А.И. - кандидат фармацевтических наук, ассистент

Давитавян Н.А. - кандидат фармацевтических наук, доцент

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Андреева И.Н. - доктор фармацевтических наук, профессор кафедры УЭФ ФПО Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России

Литвинова Т.Н. – доктор педагогических наук, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России:

Учебное пособие для студентов очной и заочной форм обучения фармацевтического факультета.

Краснодар: КубГМУ, 2015 г. – 199с.

Учебное пособие посвящено одному из важнейших разделов курса фармакогнозии и химии природных фармакологически активных веществ - «Химический анализ фармакологических активных веществ лекарственного растительного сырья». Учебное пособие составлено в соответствии с ФГОС - 3 ВПО и рабочих программ по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Химия природных фармакологически активных веществ».

Рекомендовано к публикации на заседании Центрального методического совета» ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России № 6 от «6» февраля 2015 г.

Содержание

Предисловие	4
Введение	5
Раздел 1. Общая характеристика природных фармакологически активных веществ.	4
Раздел 2. Общие методы анализа фармакологически активных веществ в лекарственном растительном сырье	20
2.1. Качественный химический анализ	20
2.2. Хроматографические методы анализа	22
2.3. Методы количественного определения фармакологически активных веществ	28
2.3.1. Гравиметрические методы	28
2.3.2. Титриметрические методы	29
2.3.3. Физико-химические методы	29
Раздел 3. Углеводы	31
Раздел 4. Витамины и органические кислоты	43
Раздел 5. Липиды	55
Раздел 6. Терпены. Анализ эфирных масел	72
Раздел 7. Гликозиды. Анализ растительных источников сердечных гликозидов и сапонинов.	90
Раздел 8. Фенольные соединения. Анализ растительных источников простых фенолов, лигнанов, кумаринов, хромонов, дубильных веществ и флавоноидов	116
Раздел 9. Алкалоиды	152
Вопросы к зачету по дисциплине «Химия природных фармакологических активных веществ» для студентов 3 курса фармацевтического факультета	172
Примеры тестовых заданий ситуационных задач	174
Ситуационные задачи	174
Тестовые задания	176
Приложение 1. Физико-химические характеристики тритерпеновых спиртов	190
Приложение 2. Физические константы и структурные особенности фенольных соединений	193
Приложение 3. Физико-химические константы флавоноидов, выделенных из надземной части зверобоя продырявленного	194
Приложение 4. ТСХ извлечения из травы зверобоя продырявленного	195
Приложение 5. УФ-спектры растворов из травы зверобоя	196
Приложение 6. Общелакалоидные реактивы	197
Литература	198

Предисловие

Учебное пособие «Фитохимический анализ фармакологически активных веществ» разработано на кафедре фармации ГБОУ ПО КубГМУ Минздрава России составлено в соответствии с ФГОС - 3 ВПО, рабочей программой по дисциплине «Фармакогнозия» и рабочей программой «Химия природных фармакологически активных веществ» (2013г.). Учебное пособие предназначено для студентов 3 и 4 курса очной и заочной формы обучения фармацевтического факультета по специальности 060301 - фармация для подготовки к занятиям по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Химия природных соединений». Учебная дисциплина «Фармакогнозия» относится к дисциплинам специальности цикла С-3. Дисциплина «Химия природных фармакологически активных веществ» к дисциплинам по выбору цикла С-3.

Цель пособия – сформировать у студентов знания по вопросам выделения, идентификации основных групп фармакологически активных веществ (ФАВ) лекарственного растительного сырья (ЛРС) и их количественного определения.

Учебное пособие представляет обобщающую информацию по видам классификации ФАВ, физическим и химическим свойствам, методам качественного и количественного анализа растительных объектов, стандартизация которых проводится по фармакопейным статьям (ФС).

Пособие состоит из 9 глав и включает следующие разделы:

- общая характеристика природных фармакологически активных веществ;
- общие методы анализа лекарственного растительного сырья;
- анализ полисахаридов;
- анализ витаминов и органических кислот;
- анализ липидов;
- анализ терпенов;
- анализ гликозидов;
- анализ фенольных соединений
- анализ алкалоидов.

Практические занятия посвящены фитохимическому анализу лекарственного растительного сырья и включают задания по выделению из растительного сырья ФАВ (таких как углеводы, жиры, витамины, терпены (эфирное масло), гликозиды, алкалоиды) и с дальнейшим их качественным и количественным анализом.

Введение

В Государственный Реестр лекарственных средств включено около 300 наименований лекарственного растительного сырья (ЛРС) и около 600 препаратов растительного происхождения. Поэтому оценка качества лекарственного растительного сырья, т.е. установление возможности применения его как лекарственного средства, является одной из задач специалиста-провизора. Лекарственные растения остаются незаменимым источником получения лекарственных препаратов различной направленности действия. Рациональное использование лекарственных растений в медицине без знания свойств их фармакологически активных веществ немыслимо, так как без этого нельзя понять механизма действия растительных препаратов и обосновать их применение.

Основным показателем качества лекарственного растительного сырья служит содержание в нем ФАВ. Определение подлинности и доброкачественности лекарственного растительного сырья проводят в соответствии с теми требованиями, которые предъявляет к лекарственному растительному сырью нормативный документ (НД). Механическое выполнение провизором-аналитиком методик НД может привести к недостоверным результатам. При фитохимическом анализе необходимо понимание таких вопросов как сущность анализа: принцип выбора качественных реакций; метода количественного анализа; обоснование основных этапов проведения регламентируемых методик.

Учитывая актуальность данной проблемы, нами на основе анализа действующей НД, а также опыта проведения практических занятий, подготовлено настоящее учебное пособие. В пособии даны сведения по общей характеристике, химическому строению, классификации и биологической активности и медицинского применения основных ФАВ растений, описаны методы их обнаружения, выделения и анализа.

В основу практических занятий, посвященных химическому анализу ФАВ, положен принцип самостоятельной работы студентов, требующий предварительной теоретической подготовки.

В процессе выполнения практических работ студенты должны **знать** обоснование выбора метода качественного и количественного анализа ФАВ и объяснение основных стадий фитохимического анализа и **уметь** руководствоваться НД, математическими материалами для проведения химического анализа лекарственного растительного сырья, составлять отчетную документацию по оценке качества лекарственного растительного сырья.

Таким образом, основной целью учебного пособия является формирование у студентов знаний, практических навыков и умений по вопросам идентификации и количественного анализа основных групп природных ФАВ лекарственного растительного сырья.

Используемые сокращения

БАВ – биологически активные вещества

БУВ – бутанол-уксусная кислота-вода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – государственный отраслевой стандарт

ОСТ – отраслевой стандарт

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ X – Государственная Фармакопея СССР X издания

ГФ XI – Государственная Фармакопея СССР XI издания

ГФ XII – Государственная Фармакопея XII издания

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛС – лекарственное средство

ПСК – полисахаридный комплекс

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТУ – технические условия

НД – нормативный документ

ФАВ – фармакологически активные вещества

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ХЛФ - хлороформ

ХФ – хлороформная фракция

Х.Ч. – химически чистый

Ч.Д.А. – чистый для анализа

РАЗДЕЛ 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Цель занятия: сформировать у студентов знания по вопросам истории открытия и современного состояния развития химии природных фармакологически активных веществ;

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. История открытия фармакологических активных веществ из растительного сырья.
2. Номенклатура и современная классификация фармакологически активных веществ
3. Современное состояние и перспективы развития химии фармакологически активных веществ из растительного сырья в России.
4. Основные способы выделения фармакологически активных веществ из лекарственного растительного сырья.
5. Методы, применяемые для анализа фармакологически активных веществ из растительного сырья.

Учебный материал по теме

Терапевтическая ценность лекарственных растений и животных определяется входящими в их состав **фармакологически активными веществами (ФАВ)**. К ФАВ относятся все вещества, способные оказывать влияние на биологические процессы, протекающие в организме. За долгую историю поисков и практического использования таких веществ накопились сведения о фармакологической активности большого числа химических соединений с полностью или частично установленной структурой. Только фармакологическая активность описана примерно у 12 тыс. различных соединений. Для части из них известна также и физиологическая система организма или орган — мишень действия. В значительно меньшем объёме известны те биохимические или молекулярно-биологические процессы, на которые действуют эти вещества.

Лекарственные растения и отчасти **лекарственные животные** — это совершенно особый объект изучения, ибо любой из них представляет собой достаточно сложную лабораторию, в которой синтезируются одновременно сотни ФАВ. Этим и объясняется эффект множественного воздействия на различные системы и органы, нередко возникающий в процессе лечения. Дополнительное изучение, казалось бы, вполне изученных и давно используемых лекарственных растений иногда позволяет выявить новый аспект их биологической активности. Лекарственные животные существенно отличаются от растений тем, что у высокоорганизованных их представителей значительно меньше продуктов вторичного метаболизма. Этому существует значительное число предпосылок, которые широко обсуждались в научной литературе. Однако современные методы анализа позволяют открыть многие

аспекты химии первичных метаболитов, которые, как оказывается, существенно влияют на многие биологические процессы человека. В связи с множественным лечебным эффектом лекарственных растений в известной степени условным оказывается понятие так называемых биологически активных веществ или *действующих веществ*. Суть этих понятий, ранее, да и в настоящее время широко используемого в фармакогнозии и фармакологии, достаточно «прозрачна» и, по-видимому, не требует специальных пояснений. Сохранение терминов необходимо главным образом для удобства классификации лекарственного растительного и животного сырья, где последнее нередко группируется по компонентам, проявляющим наиболее выраженную физиологическую активность. Ещё более устаревшими оказываются понятия сопутствующих и балластных веществ. *Сопутствующими веществами* в фармакогнозии ранее называли продукты первичного или вторичного обмена (метаболизма), содержащиеся в лекарственных растениях наряду с действующими веществами. Их фармакологический эффект значительно менее выражен, чем у последних, но присутствие нередко способствует пролонгированию лечебного эффекта, часто усиливает и ускоряет его наступление и т.д. С другой стороны, сопутствующие вещества могут проявлять и отрицательные свойства, что побуждает нередко освобождаться от них в ходе приготовления из растительного и животного сырья лекарственных средств. Достаточно близко понятию сопутствующих веществ понятие балластных веществ, встречающееся в старых руководствах по фармакогнозии. *Балластными веществами* называли соединения, с которыми не связана терапевтическая активность того или иного лекарственного растения или животного. Однако нередко они затрудняют изготовление или поддержание стабильности лекарственных форм.

ПЕРВИЧНЫЙ И ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ, ПРОДУКТЫ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Под **метаболизмом**, или обменом веществ, понимают совокупность химических реакций в организме, обеспечивающих его веществами для построения тела и энергией для поддержания жизнедеятельности. Часть реакций оказывается сходной для всех живых организмов (образование и расщепление нуклеиновых кислот, белков и пептидов, а также большинства углеводов, некоторых карбоновых кислот и т.д.) и получила название первичного метаболизма, или первичного обмена.

Помимо реакций первичного обмена существует значительное число метаболических путей, приводящих к образованию соединений, свойственных лишь определённым, иногда очень немногим, группам организмов. Эти реакции объединяются термином вторичный метаболизм, или вторичный обмен, а продукты называются продуктами вторичного метаболизма, или вторичными соединениями.

Вторичные соединения образуются по преимуществу у вегетативно малоподвижных групп живых организмов — растений и грибов, а также мно-

гих прокариот. У животных продукты вторичного обмена сравнительно редки и часто поступают извне вместе с растительной пищей. Роль продуктов вторичного метаболизма и причины их появления в той или иной группе различны. В самой общей форме им приписывается адаптивная роль и в широком смысле — защитные свойства.

Стремительное развитие химии природных соединений за последние четыре десятилетия, связанное с созданием высокоразрешающих аналитических инструментов, привело к тому, что мир «вторичных соединений» значительно расширился. Например, число известных на сегодня алкалоидов приближается к 5 000 (по некоторым данным - 10 000), фенольных соединений — к 10 000, причём эти цифры растут не только с каждым годом, но и с каждым месяцем.

Любое растительное сырьё всегда содержит сложный набор первичных и вторичных соединений, которые, как сказано выше, и определяют множественный характер действия лекарственных растений. Известно относительно немного растительных объектов, использование которых в медицине определяется, прежде всего, наличием в них первичных соединений. Однако в будущем не исключено повышение их роли в медицине и использование в качестве источников получения новых иммуномодулирующих средств.

Продукты вторичного обмена применяются в современной медицине значительно чаще и шире. Это связано с ощутимым и нередко очень ярким фармакологическим эффектом. Образуюсь на основе первичных соединений, они могут накапливаться либо в чистом виде, либо в ходе реакций обмена подвергаются гликозилированию, т.е. оказываются присоединёнными к молекуле какого-либо моносахарида. В результате гликозилирования возникают молекулы — гетерозиды, которые отличаются от негликозилированных вторичных соединений, как правило, лучшей растворимостью, что облегчает их участие в реакциях обмена и имеет в этом смысле важнейшее биологическое значение. Гликозилированные формы любых вторичных соединений принято называть гликозидами.

Вещества первичного метаболизма

Белки — биополимеры, структурную основу которых составляют длинные полипептидные цепи, построенные из остатков альфа-аминокислот, соединённых между собой пептидными связями. Как правило, белками называют полипептиды, содержащие более 50 аминокислотных фрагментов. Белки делят на простые - протеины, при гидролизе дающие только аминокислоты, и сложные - в них белок связан с веществами небелковой природы: нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеиды), углеводами (гликопротеиды), липидами (липопротеиды), пигментами (хромопротеиды), остатками фосфорной кислоты (фосфопротеиды) и др. Из простых белков в растениях встречаются альбумины (семена гороха), глобулины (семена сои), глютелины и проламины (зерновки злаковых), которые часто используются растениями в качестве запасного питательного материала. Среди сложных белков особое место принадлежит нуклеопротеидам, принимающим участие в явлениях наследственности. В качестве ферментов (энзимов) белки регулируют все

жизненные процессы клетки. Ряд белков являются токсическими веществами. Например, токсические белки представлены в ядах змей. Они характеризуются низкой молекулярной массой. Токсины растений более разнообразны по форме и молекулярной массе (токсальбумин рицин из семян клещевины).

Витамины - особая группа органических веществ, выполняющих важные биологические и биохимические функции в живых организмах. Эти органические соединения различной химической природы синтезируются главным образом растениями, а также микроорганизмами. Человеку и животным, которые их не синтезируют, витамины требуются в очень малых количествах по сравнению с питательными веществами (белками, углеводами, жирами). Известно более 20 витаминов. Они имеют буквенные обозначения, названия химические и названия, характеризующие их физиологическое действие.

Классифицируются витамины на водорастворимые (кислота аскорбиновая, тиамин, рибофлавин, кислота пантотеновая, пиридоксин, кислота фолиевая, цианокобаламин, никотинамид, биотин) и жирорастворимые (ретинол, филлохинон, кальциферолы, токоферолы). К витаминopodobным веществам принадлежат некоторые флавоноиды, липоевая, оротовая, пангамовая кислоты, холин, инозит. Биологическая роль витаминов разнообразна. Установлена тесная связь между витаминами и ферментами. Например, большинство витаминов группы В являются предшественниками коферментов и простетических групп ферментов.

Липиды — жиры и жироподобные вещества, являющиеся производными высших жирных кислот, спиртов или альдегидов. Подразделяются на простые и сложные. К простым относятся липиды, молекулы которых содержат только остатки жирных кислот (или альдегидов) и спиртов. Из простых липидов в растениях и животных встречаются жиры и жирные масла, представляющие собой ацилглицеролы и воски. Ацилглицеролы (ацилглицерины) — наиболее распространённая в природе группа липидов. Эти соединения представляют собой сложные эфиры жирных кислот и трёхатомного спирта глицерола, в котором могут быть этерифицированы одна, две или три гидроксильные группы.

Воски состоят из сложных эфиров высших жирных кислот и одно- или двухатомных высших спиртов. К жирам близки простагландины, образующиеся в организме из полиненасыщенных жирных кислот. По химической природе это производные кислоты простаноевой со скелетом из 20 атомов углерода и содержащие цикlopентановое кольцо.

Сложные липиды делят на две большие группы: фосфолипиды и гликолипиды (т.е. соединения, имеющие в своей структуре остаток кислоты фосфорной или углеводный компонент). В составе живых клеток липиды играют важную роль в процессах жизнеобеспечения, образуя энергетические резервы у растений и животных.

Нуклеиновые кислоты — биополимеры, мономерными цепями которых являются нуклеотиды, которые состоят из остатков кислоты фосфорной, углеводного компонента (рибозы или дезоксирибозы) и азотистого (пурино-

вого или пиримидинового) основания. Различают дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК) кислоты.

Пептиды — органические соединения, состоящие из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидной связью. По числу аминокислотных фрагментов различают ди-, три-, тетра- или полипептиды. Низкомолекулярные пептиды содержатся почти во всех живых клетках. Например, трипептид глутатион, распространённый в животных и растительных тканях, принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях, а также в переносе аминокислот через цитоплазматические мембраны. К пептидам относятся многие природные биологически активные вещества: некоторые гормоны (инсулин, вазопрессин), антибиотики (грамицидин), ингибитор фермента тромбина, содержащийся в слюне пиявок (гирудин); присутствующий в плазме крови брадикинин обеспечивает регуляцию кровотока и проницаемость клеточных мембран. Некоторые полипептиды животных и насекомых обладают сильным физиологическим действием и относятся к ядам. Токсические полипептиды нейротропного действия содержатся в секрете сцифоидных медуз, представителей отряда актиний и ядовитых выделениях скорпиона (инсектотоксины); в составе пчелиного яда находятся токсические полипептиды (меллитин, сепамин, секамин и др.).

Углеводы - огромный класс органических соединений, к которому относят полиоксикарбонильные соединения и их производные. В зависимости от числа мономеров в молекуле, подразделяются на моносахариды, олигосахариды (ди-, три-, тетрасахариды и т.д.) и полисахариды. Углеводы, состоящие исключительно из полиоксикарбонильных соединений, получили название гомозидов, а их производные, в молекуле которых имеются остатки иных соединений, — гетерозидов. К гетерозидам относятся все виды гликозидов. Моносахариды накапливаются в любой живой клетке в процессе фотосинтеза и используются затем для биосинтеза полисахаридов, гликозидов, аминокислот, полифенолов и др. Полисахариды, как правило, накапливаются в значительных количествах как продукты жизнедеятельности протопласта. В растениях синтезируются различные формы полисахаридов, которые отличаются друг от друга как по структуре, так и по выполняемым функциям. Наиболее обычными полисахаридами являются целлюлоза, гемицеллюлозы, крахмал, инулин, слизи, камеди и пектиновые вещества. Целлюлоза (клетчатка) — полимер, составляющий основную массу клеточных стенок растений. Полагают, что молекула клетчатки у разных растений содержит от 1 400 до 10 000 остатков бета-D-глюкозы. Крахмал и инулин относятся к запасным полисахаридам. Крахмал на 96-97,6 % состоит из двух полисахаридов: амилозы (линейный глюкан) и амилопектина (разветвленный глюкан). Он всегда запасается в виде крахмальных зёрен в период активного фотосинтеза. У представителей сем. Asteraceae и Campanulaceae накапливаются фруктозаны (инулин), особенно в больших количествах в подземных органах. Слизь и камеди (гумми) — смеси гомо- и гетеросахаридов и полиуронидов. Камеди состоят из гетерополисахаридов с обязательным участием уроновых кислот, карбоксильные группы которых связаны с ионами Ca^{2+} , K^{+} и Mg^{2+} . По раствори-

мости в воде камеди делятся на 3 группы: арабиновые, хорошо растворимые в воде (абрикосовая и аравийская); бассориновые, плохо растворимые в воде, но сильно в ней набухающие (трагакантовая), и церазиновые, плохо растворимые и плохо набухающие в воде (вишнёвая). Слизь, в отличие от камедей, могут быть нейтральными (не содержат уроновых кислот), а также имеют меньшую молекулярную массу и хорошо растворимы в воде. Пектиновые вещества — высокомолекулярные гетерополисахариды, главным структурным компонентом которых является кислота альфа-D-галактуроновая (полигалактуронан). К основной макромолекуле в виде боковых цепей присоединены D-ксилоза, L-арабиноза, D-галактоза и D-глюкоза, а в главную цепь включена L-рамноза. В растениях пектиновые вещества присутствуют в виде нерастворимого протопектина — линейного полимера метоксилированной полигалактуроновой кислоты с галактаном и арабаном клеточной стенки: цепочки полиуронида соединены между собой ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} .

К полисахаридам относятся также полиурониды морских водорослей. В медицинской практике нашли применение полисахариды водорослей *Ahnfeltia*, *Laminaria*, *Fucus*. Из красной водоросли анфельции добывают агар-агар. В ламинарии содержится кислота альгиновая — аналог кислоты пектиновой. Она состоит из остатков D-маннуриновой и D-гулуриновой кислот, связанных бета-гликозидными связями.

Ферменты — сложные белки, содержащиеся в животных и растительных организмах, выполняющие функции биологических катализаторов и ускоряющие химические процессы в них. Все ферменты делятся на одно- и двухкомпонентные. Первые состоят только из белка. Двухкомпонентные ферменты состоят из белка (апофермента) и небелковой части (кофактор, или кофермент). Играют важную роль в процессах метаболизма.

Вещества вторичного метаболизма

Продукты (вещества) вторичного метаболизма синтезируются на основе первичных соединений и могут накапливаться в растениях нередко в значительных количествах, обуславливая тем самым специфику их обмена. В растениях содержится огромное количество веществ вторичного происхождения, которые могут быть разделены на различные группы.

Гликозиды — широко распространённые природные соединения, распадающиеся под влиянием различных агентов (кислота, щелочь или фермент) на углеводную часть и агликон (генин). Гликозидная связь между сахаром и агликоном может быть образована с участием атомов O, N или S (O-, N- или S-гликозиды), а также за счёт C-C атомов (C-гликозиды). Наибольшее распространение в растительном мире имеют O-гликозиды. Между собой гликозиды могут отличаться как структурой агликона, так и строением сахарной цепи. Углеводные компоненты представлены моносахаридами, дисахаридами и олигосахаридами, и соответственно гликозиды называются монозидами, биозидами и олигозидами.

Своеобразными группами природных соединений являются **цианогенные гликозиды и тиогликозиды** (глюкозинолаты). Цианогенные гликозиды

могут быть представлены как производные альфа-гидроксинитрилов, содержащих в своём составе синильную кислоту. Широкое распространение они имеют среди растений сем. Rosaceae, подсем. Prunoideae, концентрируясь преимущественно в их семенах (например, гликозиды амигдалин и пруназин в семенах *Amygdalus communis* L., *Armeniaca vulgaris* Lam.). Тиогликозиды (глюкозинолаты) в настоящее время рассматриваются в качестве производных гипотетического аниона — глюкозинолата, отсюда и второе название. Глюкозинолаты найдены пока только у двудольных растений и характерны для сем. Brassicaceae, Capparidaceae, Resedaceae и других представителей порядка Capparales. В растениях они содержатся в виде солей со щелочными металлами, чаще всего с калием (например, глюкозинолат синигрин из семян *Brassica juncea* и *B. nigra*).

Изопреноиды - обширный класс природных соединений, рассматриваемых как продукты биогенного превращения изопрена. К ним относятся различные терпены, их производные — терпеноиды и стероиды. Некоторые изопреноиды — структурные фрагменты антибиотиков, некоторых витаминов, алкалоидов и гормонов животных.

Терпены и терпеноиды — ненасыщенные углеводороды и их производные состава $(C_5H_8)_n$, где $n = 2$ или $n > 2$. По числу изопреновых звеньев их делят на несколько классов: моно-, сескви-, ди-, три-, тетра- и политерпены.

Монотерпеноиды ($C_{10}H_{16}$) и сесквитерпеноиды ($C_{15}H_{24}$) являются обычными компонентами эфирных масел. К группе циклопентаноидных монотерпеноидов относятся иридоидные гликозиды (псевдоиндиканы), хорошо растворимые в воде и часто обладающие горьким вкусом. Название «иридоиды» связано со структурным и, возможно, биогенетическим родством агликона с иридодиалем, который был получен из муравьев рода *Iridomyrmex*; «псевдоиндиканы» — с образованием синей окраски в кислой среде. По числу углеродных атомов скелета агликоновой части иридоидные гликозиды подразделяются на 4 типа: C8, C9, C10 и C14. Они присущи лишь покрытосеменным растениям класса двудольных, и к наиболее богатым иридоидами относятся семейства Scrophulariaceae, Rubiaceae, Lamiaceae, Verbenaceae и Bignoniaceae.

Дитерпеноиды ($C_{20}H_{32}$) входят главным образом в состав различных смол. Они представлены кислотами (резиноловые кислоты), спиртами (резинолы) и углеводородами (резены). Различают собственно смолы (канифоль, даммара), масло-смолы (терпентин, канадский бальзам), камеде-смолы (гуммигут), масло-камеде-смолы (ладан, мирра, асафетида). Масло-смолы, представляющие собой раствор смол в эфирном масле и содержащие кислоты бензойную и коричную, называют бальзамами. В медицине применяют перувианский, толутанский, стираксовый бальзамы и др.

Тритерпеноиды ($C_{30}H_{48}$) по преимуществу встречаются в виде сапонинов, агликоны которых представлены пентациклическими (производные урсана, олеанана, лупана, гопана и др.) или тетрациклическими (производные даммарана, циклоартана, зуфана) соединениями.

К **тетратерпеноидам** ($C_{40}H_{64}$) относятся жирорастворимые растительные пигменты жёлтого, оранжевого и красного цвета - каротиноиды, предшественники витамина А (провитамины А). Они делятся на каротины (ненасыщенные углеводороды, не содержащие кислорода) и ксантофиллы (кислородсодержащие каротиноиды, имеющие гидрокси-, метокси-, карбокси-, кето- и эпокси группы). Широко распространены в растениях альфа-, бета- и гамма-каротины, ликопин, зеаксантин, виолаксантин и др.

Последнюю группу изопреноидов состава $(C_5H_8)_n$ представляют **поли-терпеноиды**, к которым относятся природный каучук и гутта.

Кардиотонические гликозиды, или **сердечные гликозиды**, - гетерозиды, агликоны которых являются стероидами, но отличаются от прочих стероидов наличием в молекуле вместо боковой цепи при C_{17} ненасыщенного лактонного кольца: пятичленного бутенолидного (карденолиды) или шести-членного кумалинового кольца (буфадииенолиды). Все агликоны кардиотонических гликозидов имеют у C_3 и C_{14} гидроксильные группы, а у C_{13} - метильную. При C_{10} может быть альфа-ориентированная метильная, альдегидная, карбинольная или карбоксильная группы. Кроме того, они могут иметь дополнительные гидроксильные группы у C_1 , C_2 , C_5 , C_{11} , C_{12} и C_{16} ; последняя иногда бывает ацилирована муравьиной, уксусной или изовалериановой кислотой. Кардиотонические гликозиды применяются в медицине для стимуляции сокращений миокарда. Часть из них - диуретики.

Эфирные масла — летучие жидкие смеси органических веществ, вырабатываемых растениями, обуславливающие их запах. В состав эфирных масел входят углеводороды, спирты, сложные эфиры, кетоны, лактоны, ароматические компоненты. Преобладают терпеноидные соединения из подклассов монотерпеноидов, сесквитерпеноидов, изредка дитерпеноидов; кроме того, довольно обычны «ароматические терпеноиды» и фенилпропаноиды. Растения, содержащие эфирные масла (эфироносы), широко представлены в мировой флоре. Особенно богаты ими растения тропиков и сухих субтропиков. Эфирные масла — летучие жидкие смеси органических веществ, вырабатываемых растениями, обуславливающие их запах. В состав эфирных масел входят углеводороды, спирты, сложные эфиры, кетоны, лактоны, ароматические компоненты. Преобладают терпеноидные соединения из подклассов монотерпеноидов, сесквитерпеноидов, изредка дитерпеноидов; кроме того, довольно обычны «ароматические терпеноиды» и фенилпропаноиды. Растения, содержащие эфирные масла (эфироносы), широко представлены в мировой флоре. Особенно богаты ими растения тропиков и сухих субтропиков.

Сапонины (сапонизиды) — гликозиды, обладающие гемолитической и поверхностной активностью (детергенты), а также токсичностью для холоднокровных животных. В зависимости от строения агликона (сапогенина), их делят на стероидные и тритерпеноидные. Углеводная часть сапонинов может содержать от 1 до 11 моносахаридов. Наиболее часто встречаются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабиноза, D-галактуроновая и D-глюкуроновая кислоты. Они образуют линейные или разветвленные цепи

и могут присоединяться по гидроксильной или карбоксильной группе агликона.

Стероиды — класс соединений, в молекуле которых присутствует циклопентанпергидрофенантроновый скелет. К стероидам относят стерины, витамины группы D, стероидные гормоны, агликоны стероидных сапонинов и кардиотонических гликозидов, экдизоны, витанолиды, стероидные алкалоиды.

Растительные **стерины, или фитостерины**, — спирты, содержащие 28-30 углеродных атомов. К ним принадлежат бета-ситостерин, стигмастерин, эргостерин, кампестерин, спинастерин и др. Некоторые из них, например бета-ситостерин, находят применение в медицине. Другие используются для получения стероидных лекарственных средств — стероидных гормонов, витамина D и др.

Стероидные сапонины содержат 27 атомов углерода, боковая цепь их образует спирокетальную систему спиростанолового или фураностанолового типов. Один из стероидных сапогенинов - диосгенин, выделенный из корневищ диоскореи, — является источником для получения важных для медицины гормональных препаратов (кортизона, прогестерона).

Витанолиды — группа фитостероидов, получивших свое название от индийского растения *Withania somnifera* (сем. Solanaceae), из которого было выделено первое соединение этого класса - витаферин А. В настоящее время известно несколько рядов этого класса соединений. Витанолиды — это полиоксистероиды, у которых в положении 17 находится шестичленное лактонное кольцо, а в кольце А - кетогруппа у C₁. В некоторых соединениях обнаружены 4-бета-гидрокси-, 5-бета-, 6-бета-эпоксигруппировки.

Экдистероиды — полиоксистероидные соединения, обладающие активностью гормонов линьки насекомых и метаморфоза членистоногих. Наиболее известными природными гормонами являются альфа-экдизон и бета-экдизон (экдистерон). В основе строения экдизонов лежит стероидный скелет, где в положении 17 присоединяется алифатическая цепочка из 8 углеродных атомов. Согласно современным представлениям, к истинным экдистероидам относятся все стероидные соединения, имеющие цис-сочленение колец А и В, 6-кетогруппу, двойную связь между C₇ и C₈ и 14-альфа-гидроксильную группу, независимо от их активности в тесте на гормон линьки. Число и положение других заместителей, включая ОН-группы, различны. Фитоэкдистероиды относятся к широко распространённым вторичным метаболитам (установлено более 150 различных структур) и более вариабельны, чем зооэкдистероиды. Общее количество углеродных атомов у соединения данной группы может быть от 19 до 30.

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространённых в растительных организмах и многочисленных классов вторичных соединений с различной биологической активностью. К ним относятся вещества ароматической природы, которые содержат одну или несколько гидроксильных групп, связанных с атомами углерода ароматического ядра. Эти соединения весьма неоднородны по химическому строению, в

растениях встречаются в виде мономеров, димеров, олигомеров и полимеров.

В основу классификации природных фенолов положен биогенетический принцип. Современные представления о биосинтезе позволяют разбить соединения фенольной природы на несколько основных групп, расположив их в порядке усложнения молекулярной структуры. Наиболее простыми являются соединения с одним бензольным кольцом - простые фенолы, бензойные кислоты, фенолоспирты, фенилуксусные кислоты и их производные. По числу ОН-групп различают одноатомные (фенол), двухатомные (пирокатехин, резорцин, гидрохинон) и трёхатомные (пирогаллол, флороглюцин и др.) простые фенолы. Чаще всего они находятся в связанном виде в форме гликозидов или сложных эфиров и являются структурными элементами более сложных соединений, в том числе полимерных (дубильные вещества).

Более разнообразными фенолами являются производные **фенилпропанового ряда (фенилпропаноиды)**, содержащие в структуре один или несколько фрагментов C_6-C_3 . К простым фенилпропаноидам можно отнести гидроксикоричные спирты и кислоты, их сложные эфиры и гликозилированные формы, а также фенилпропаны и циннамоиламиды. К соединениям, биогенетически родственными фенилпропаноидам, относятся кумарины, флавоноиды, хромоны, димерные соединения — **лигнаны** и полимерные соединения — **лигнины**.

Лигнаны - природные фенольные вещества, производные димеров фенилпропановых единиц (C_6-C_3), соединенных между собой бета-углеродными атомами боковых цепей. Разнообразие лигнанов обусловлено наличием различных заместителей в бензольных кольцах и характером связи между ними, степенью насыщенности боковых цепей и др. По структуре они делятся на несколько групп: диарилбутановый (кислота гваяретовая), 1-фенилтетрагидронафталиновый (подофиллотоксин, пельтатины), бензилфенилтетрагидрофурановый (ларицирезинол и его глюкозид), дифенилтетрагидрофурановый (сезамин, сингарезинол), дибензоциклооктановый (схизандрин, схизандрол) типы и др.

Лигнины представляют собой нерегулярные трёхмерные полимеры, предшественниками которых служат гидроксикоричные спирты (паракумаровый, конифериловый и синаповый), и являются строительным материалом клеточных стенок древесины. Лигнин содержится в одревесневших растительных тканях наряду с целлюлозой и гемицеллюлозами и участвует в создании опорных элементов механической ткани.

Меланины — полимерные фенольные соединения, которые в растениях встречаются спорадически и представляют собой наименее изученную группу природных соединений. Окрашены они в чёрный или чёрно-коричневый цвет и называются алломеланинами. В отличие от пигментов животного происхождения, они не содержат азота (или его очень мало). При щелочном расщеплении образуют пирокатехин, протокатеховую и салициловую кислоты.

Ксантоны — класс фенольных соединений, имеющих структуру дибензо-гамма-пирона. В качестве заместителей содержат в молекуле гидрокси-

, метокси-, ацетокси-, метилендиокси- и другие радикалы. Известны соединения, содержащие пирановое кольцо. Особенностью ксантонов является распространение хлорсодержащих производных. Ксантоны находят в свободном виде и в составе О- и С-гликозидов. Из ксантоновых С-гликозидов наиболее известен мангиферин, который одним из первых введен в медицинскую практику.

Кумарины - природные соединения, в основе строения которых лежит 9,10-бензо-альфа-пирон. Их можно также рассматривать как производные кислоты орто-гидроксикоричной (орто-кумаровой). Они классифицируются на окси- и метоксипроизводные, фуру- и пиранокумарины, 3,4-бензокумарины и куместаны (куместролы).

Нафтохиноны - хиноидные пигменты растений, которые найдены в различных органах (в корнях, древесине, коре, листьях, плодах и реже в цветках). В качестве заместителей производные 1,4-нафтохинона содержат гидроксильные, метильные, пренильные и другие группы. Наиболее известным является красный пигмент шиконин, обнаруженный в некоторых представителях сем. Boraginaceae (виды родов *Arnebia*, *Echium*, *Lithospermum* и *Onosma*).

Немногочисленные группы фенилпропаноидных соединений составляют оригинальные комплексы, сочетающие в себе производные флавоноидов, кумаринов, ксантонов и алкалоидов с лигнанами (**флаволигнаны, кумаринолигнаны, ксантолигнаны и алкалоидолигнаны**). Уникальной группой биологически активных веществ являются флаволигнаны *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (силибин, силидианин, силикристин), которые проявляют гепато-защитные свойства.

Флавоноиды относят к группе соединений со структурой $C_6-C_3-C_6$, и большинство из них представляют собой производные 2-фенилбензопирана (флавана) или 2-фенилбензо-гамма-пирона (флавона). Классификация их основана на степени окисленности трёхуглеродного фрагмента, положении бокового фенильного радикала, величине гетероцикла и других признаках. К производным флавана принадлежат катехины, лейкоантоцианидины и антоцианидины; к производным флавона — флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванолы. К флавоноидам относятся также ауруны (производные 2-бензофуранона или 2-бензилиден кумаранона), халконы и дигидрохалконы (соединения с раскрытым пирановым кольцом). Менее распространены в природе изофлавоноиды (с фенильным радикалом у C_3), неофлавоноиды (производные 4-фенилхромона), бифлавоноиды (димерные соединения, состоящие из связанных С-С-связью флавонов, флаванонов и флавонофлаванонов). К необычным производным изофлавоноидов относятся птерокарпаны и ротеноиды, которые содержат дополнительный гетероцикл. Птерокарпаны привлекли к себе внимание после того, как было выяснено, что многие из них играют роль фитоалексинов, выполняющих защитные функции против фитопатогенов. Ротенон и близкие к нему соединения токсичны для насекомых, поэтому являются эффективными инсектицидами.

Хромоны — соединения, получающиеся в результате конденсации

гамма-пиронового и бензольного колец (производные бензо-гамма-пирона). Обычно все соединения этого класса имеют в положении 2 метильную или оксиметильную (ацилоксиметильную) группу. Классифицируются они по тому же принципу, что и кумарины: по числу и типу циклов, сконденсированных с хромоновым ядром (бензохромоны, фурухромоны, пираноххромоны и др.).

Антраценпроизводные — группа природных соединений жёлтой, оранжевой или красной окраски, в основе которых лежит структура антрацена. Они могут иметь различную степень окисленности среднего кольца (производные антрона, антранола и антрахинона) и структуру углеродного скелета (мономерные, димерные и конденсированные соединения). Большинство из них являются производными хризацина (1,8-дигидроксиантрахинона). Реже встречаются производные ализарина (1,2-дигидроксиантрахинона). В растениях производные антрацена могут находиться в свободном виде (агликоны) или в виде гликозидов (антрагликозиды).

Стильбены можно рассматривать как фенольные соединения с двумя бензольными кольцами, имеющие структуру $C_6-C_2-C_6$. Это сравнительно небольшая группа веществ, которые встречаются в основном в древесине различных видов сосны, ели, эвкалипта, являются структурными элементами танинов.

Таннины (дубильные вещества) - высокомолекулярные соединения со средней молекулярной массой порядка 500-5000, иногда до 20000, способные осаждать белки, алкалоиды и обладающие вяжущим вкусом. Таннины подразделяют на гидролизуемые, распадающиеся в условиях кислотного или энзиматического гидролиза на простейшие части (к ним относятся галлотаннины, эллаготаннины и несахаридные эфиры карбоновых кислот), и конденсированные, не распадающиеся под действием кислот, а образующие продукты конденсации – флобафены. Структурно они могут рассматриваться как производные флаван-3-олов (катехинов), флаван-3,4-диолов (лейкоантоцианидинов) и гидроксистильбенов.

Алкалоиды - азотсодержащие органические соединения основного характера, преимущественно растительного происхождения. Строение молекул алкалоидов весьма разнообразно и нередко довольно сложно. Азот, как правило, располагается в гетероциклах, но иногда находится в боковой цепи. Чаще всего алкалоиды классифицируют на основе строения этих гетероциклов либо в соответствии с их биогенетическими предшественниками - аминокислотами. Выделяют следующие основные группы алкалоидов: пирролидиновые, пиридиновые, пиперидиновые, пирролизидиновые, хинолизидиновые, хиназолиновые, хинолиновые, изохинолиновые, индольные, дигидроиндольные (беталаины), имидазоловые, пуриновые, дитерпеновые, стероидные (гликоалкалоиды) и алкалоиды без гетероциклов (протоалкалоиды). Многие из алкалоидов обладают специфическим, часто уникальным физиологическим действием и широко используются в медицине. Некоторые алкалоиды — сильные яды (например, алкалоиды кураре).

Фитонциды - это необычные соединения вторичного биосинтеза, продуцируемые высшими растениями и оказывающие влияние на другие организмы, главным образом микроорганизмы. Наиболее активные антибактериальные вещества содержатся в луке репчатом (*Allium cepa*) и чесноке (*Allium sativum*), из последнего выделено антибиотическое соединение аллицин (производное аминокислоты аллиина).

Подавляющее большинство продуктов вторичного метаболизма может быть синтезировано чисто химическим путём в лаборатории, и в отдельных случаях такой синтез оказывается экономически выгодным. Однако не следует забывать, что в фитотерапии значение имеет вся сумма биологических веществ, накапливающихся в растении. Поэтому сама по себе возможность синтеза не является в этом смысле решающей.

Минеральные вещества растений. В растениях, в том числе лекарственных, наряду с органическими, содержатся минеральные вещества, элементы которых обнаруживаются в золе при их сжигании. Минеральные вещества воздействуют на коллоидные вещества плазмы, отчасти являются регуляторами жизненных процессов, протекающих в растениях, и, очевидно, в ряде случаев оказывают лечебный эффект. Содержание минеральных веществ в растениях может меняться в зависимости от состава почвы, влажности, биологии растения и др. Минеральные элементы по содержанию их в растении делят на макроэлементы (K, Ca, Mg, Fe), микроэлементы (Mn, Cu, Zn, Co, Mo, Cr, Al, Ba, V, Se, Ni, Sr, Cd, Pb, Li, B, I, Au, Ag, Br) и ультрамикроэлементы. Высокая биологическая активность минеральных элементов проявляется, вероятно, и при использовании некоторых лекарственных растений. Можно в этой связи указать на использование ламинарии, богатой йодом, для лечения тиреотоксикоза; ранозаживляющие свойства сфагнума могут быть до известной степени связаны с его минеральным составом; кровоостанавливающие свойства лагохилуса опьяняющего — с высоким содержанием кальция; применение в ряде стран спорыша для лечения легочных заболеваний, возможно, определяется высоким содержанием кремния и т.д. Микроэлементы не только сами обладают определённым физиологическим действием, но могут также проявлять синергизм по отношению к целому ряду веществ, а поэтому из растений можно получать препараты комбинированного действия. Установлено, что Mn и Mo потенцируют действие сердечных гликозидов, Mn усиливает действие аскорбиновой кислоты и каротиноидов, содержащихся в лекарственных растениях, и др. Кроме того, микроэлементы растительного происхождения лучше усваиваются человеческим организмом, так как они находятся в растении в «биологических» концентрациях.

РАЗДЕЛ 2. ОБЩИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Цель занятия: сформировать у студентов знания по вопросам качественно-количественного определения ФАВ, основанных на физических, химических и биологических свойствах природных веществ в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте определение термина "Хроматография". На чем основано разделение веществ при хроматографических методах анализа?
2. Назовите виды хроматографии. Какие существуют способы хроматографического разделения?
3. Что такое коэффициент распределения веществ (R_f) и как его рассчитать?
4. Какие способы обнаружения и идентификации веществ на хроматограмме используют при ТСХ и БХ?
5. Для решения каких задач используют хроматографические методы при анализе ЛРС? Для идентификации каких видов ЛРС ГФ XI регламентирует применение ТСХ? Для какого вида ЛРС ГФ XI регламентирует применение ТСХ в методике количественного определения?
6. Какие виды сорбентов и систем растворителей используют при ТСХ? Назовите преимущества и недостатки метода ТСХ.
7. Для какого вида сырья и с какой целью применяется в ГФ XI метод ГЖХ?
8. Назовите возможные варианты хроматографии на бумаге. Для каких видов ЛРС и с какой целью ГФ XI регламентирует применение метода ВБХ? В чем преимущества и недостатки метода ВБХ?
9. Назовите титриметрические методы анализа, используемые для количественного определения веществ в ЛРС. Какие существуют варианты титриметрии?
10. Назовите преимущества спектофотометрических методов по сравнению с другими оптическими методами при исследовании лекарственного растительного сырья.
19. Как устанавливают подлинность ЛРС при использовании УФ и ИК-спектрофотометрии?
20. Какие виды ЛРС можно идентифицировать с помощью оптических методов? Приведите примеры.

2.1. Качественный химический анализ

Для установления подлинности лекарственного растительного сырья используют простейшие качественные реакции и хроматографические пробы на действующие и сопутствующие вещества, основанные на их свойствах. Методика изложена в соответствующей нормативной документации на исследуемый вид сырья в разделе "Качественные реакции".

По технике выполнения и характеру получаемых результатов химические реакции делят на несколько групп:

- 1) качественные реакции;
- 2) микрохимические реакции;
- 3) гистохимические реакции;
- 4) микросублимация.

Качественные реакции

- I. Качественные реакции выполняют на сухом сырье с такими видами сырья: коры дуба, калины, крушины; корневища бадана, корневища и корни девясила, корни одуванчика, алтея, женьшеня, барбариса; цветки липы, семена льна, склероции спорыньи (всего по существующей НД - для 12 видов сырья).
- II. В основном, качественные реакции проводят с извлечением из лекарственного растительного сырья.

Исходя из свойств ФАВ, их извлекают из ЛРС водой, спиртом различной концентрации или органическим растворителем, реже с добавлением щелочи или кислоты.

Водное извлечение готовят из сырья, содержащего гликозиды: полисахариды, сапонины, фенологликозиды, антрагликозиды, дубильные вещества. Подкисленной водой извлекают из сырья алкалоиды в виде солей.

Большинство ФАВ извлекают из сырья ЛРС этиловым и метиловым спиртом различной концентрации (сердечные гликозиды, кумарины, лигнаны, флавоноиды).

Если реакция достаточно специфична и чувствительна, то ее проводят с неочищенным извлечением из сырья. Например:

- 1) общеалкалоидные осадочные реакции;
- 2) реакции с раствором хлорида алюминия на флавоноиды (трава зверобоя, горца птичьего, горца перечного и др.);
- 3) проба Синода на флавоноиды в цветках бессмертника;
- 4) реакция с раствором щелочи на антраценпроизводные (кора крушины, корни ревеня и др.);
- 5) реакция с раствором железоаммонийных квасцов на дубильные вещества (кора дуба, корневища змеевика, бадана и др.).

Часто проведению реакции мешают сопутствующие вещества (белки, амины, стерин, хлорофилл), в этом случае используют очищенное извлечение (например, из сырья, содержащего сердечные гликозиды, кумарины, алкалоиды, фенологликозиды, лигнаны).

Очищают извлечение осаждением сопутствующих веществ раствором ацетата свинца и сульфата натрия, используют прием смены растворителей и метод распределительной хроматографии.

Микрохимические реакции

Микрохимические реакции проводят обычно одновременно с микроскопическим анализом, наблюдая результаты под микроскопом:

- 1) на эфирное и жирное масло с раствором Судан III;
- 2) на одревесневшие лигнифицированные элементы с раствором флоро-

глюцина и 25% раствором серной кислоты или конц. хлороводородной кислоты.

На кору дуба (порошок) проводят реакцию с железоаммонийными квасцами, результат реакции изучают под микроскопом.

Гистохимические реакции

Гистохимические реакции - это такие реакции, с помощью которых можно выявить те или иные соединения непосредственно в клетках или структурах, где они локализуются.

По ГФХІ гистохимические реакции проводят на слизь с раствором туши в корнях алтея и семенах льна.

Микросублимация

Микросублимация - непосредственное выделение из сухого растительного материала веществ, которые легко возгоняются при нагревании. Полученный сублимат исследуют под микроскопом, затем проводят микрохимическую реакцию с соответствующим реактивом (ГФХІ - кора крушины).

2.2. Хроматографические методы анализа

Хроматография - процесс разделения смесей веществ, основанный на различиях в поведении разделяемых компонентов при их непрерывном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых (твердая или жидкая) неподвижна, а другая (жидкая или газ) имеет постоянное направление движения.

Каждое соединение в составе смеси веществ, обладая индивидуальными физическими и химическими свойствами, обусловленными особенностями строения, имеет свой коэффициент распределения между подвижной и неподвижной фазой. Хроматографические методы анализа позволяют разделить смесь веществ, различающихся коэффициентами распределения, на индивидуальные компоненты, после чего можно идентифицировать их или провести количественное определение.

Хроматографические методы анализа широко применяются в фармации в анализе лекарственных средств. В Государственной Фармакопее ХІ издания, вып.1, в разделе «Физико-химические методы анализа» есть специальная статья «Хроматография». В ней даны подробные сведения о видах хроматографии, способах и механизмах хроматографического разделения.

2.2.1. Виды хроматографии.

1. *Адсорбционная* - в основе лежит непрерывный обмен хроматографируемым веществом между неподвижной (твердой или жидкой) и подвижной фазами, обусловленный существованием на поверхности раздела фаз динамического равновесия между процессами адсорбции и десорбции хроматографируемого вещества, растворенного в подвижной фазе.
2. *Распределительная* - в основе лежит процесс непрерывного перераспределения хроматографируемого вещества между двумя фазами (подвижной и неподвижной), причем это вещество растворимо в каждой из фаз. Отношение

равновесных концентраций растворенного вещества в каждой из находящихся в контакте фаз в статических условиях при данной температуре является постоянной величиной и называется коэффициентом распределения (R_f).

3. *Ионообменная* - в основе лежит обратимая хемосорбция ионов анализируемого раствора ионогенными группами сорбента. Обратимый обмен ионами в системе сорбент-растворитель протекает в этом случае с соблюдением стехиометрических отношений.
4. *Газовая* - хроматография, когда подвижная фаза находится в состоянии газа или пара. В фармацевтическом анализе находит применение как газожидкостная, так и газоадсорбционная хроматография. Метод газовой хроматографии применяется для анализа летучих веществ либо веществ, которые могут быть переведены с помощью специальных приемов и устройств в парообразное состояние.
5. *Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)* — является вариантом колоночной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза - элюент - проходит через заполняющий колонку сорбент с большей скоростью за счет значительного давления на входе в хроматографическую колонку. ВЭЖХ является удобным способом разделения, препаративного выделения и проведения качественного и количественного анализа нелетучих термолабильных соединений как с малой, так и с большой молекулярной массой.

2.2.2. Способы хроматографического разделения

- *Хроматография на колонках* - процесс хроматографирования, протекающий с использованием сорбента (или твердого носителя), помещенного в цилиндрическую колонку. Данный способ чаще всего используется при ионообменной хроматографии.
- *Хроматография на бумаге* - хроматографический процесс, протекающий на листе фильтровальной бумаги при перемещении по ее капиллярам и поверхности подвижной жидкой фазы. Неподвижной фазой является бумага. Механизм хроматографии на бумаге бывает распределительным или адсорбционным. Перемещение подвижной фазы осуществляется либо под действием капиллярных сил (*восходящая хроматография*), либо под действием капиллярных сил и силы тяжести (*нисходящая хроматография*). Эти варианты указаны в ГФ XI. Кроме того, существует еще один вариант - *круговая (радиальная) хроматография*, когда растворитель и вещества передвигаются от центра бумаги, вырезанной в виде круга, по радиусам к периферии.

При хроматографии на бумаге анализируемые вещества образуют пятна (зоны). Совокупность пятен, полученных при хроматографировании данного анализируемого образца, называют *хроматограммой*.

Пятна веществ на хроматограммах можно обнаружить:

- по собственной окраске вещества в видимом свете;
- по собственной флюоресценции в УФ-свете;
- по окраске в видимом или УФ-свете после обработки групповым или специфическим реактивом.

Для идентификации обнаруженных пятен используют:

- значения коэффициента распределения (R_f);

- сравнение со «свидетелем» - государственным стандартным образцом (ГСО).

Коэффициент распределения (R_f) представляет собой отношение пути, пройденного веществом (расстояние от линии старта до центра пятна), к пути, пройденному растворителем (расстояние от линии старта до фронта растворителя). Каждое вещество за счет различных физических и химических свойств имеет свой коэффициент распределения между подвижной и неподвижной фазой. На экспериментально определяемые значения R_f заметно влияют условия хроматографирования. Хроматографирование с использованием ГСО является более точным.

Хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ) - хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента (носителя), нанесенного на инертную поверхность. Неподвижная фаза - тонкий сорбент (силикагель, алюминия оксид и т.д.). Механизм хроматографического разделения может быть различным, но чаще всего он адсорбционный. Перемещение подвижной фазы в слое адсорбента осуществляется восходящим методом, т.е. под действием капиллярных сил. Для хроматографирования удобно использовать готовые пластинки с закрепленным слоем сорбента, выпускаемые промышленностью как зарубежной («Силуфол»), так и отечественной («Сорбфил» и др.).

2.2.3. Применение методов хроматографии в анализе лекарственного растительного сырья

В анализе лекарственных средств растительного происхождения хроматографические методы занимают особое место. В анализе лекарственного растительного сырья (ЛРС) они могут быть использованы для решения следующих задач:

- для качественного анализа (идентификации) ЛРС по комплексу ФАВ или индивидуальным компонентам;
- для количественного определения ФАВ в ЛРС (стадия очистки и выделения ФАВ).

Хроматография на колонках (колоночная хроматография)

Впервые разделение веществ с помощью колоночной хроматографии (КХ) предложил основоположник хроматографического метода анализа - российский ученый М.С.Цвет в 1901 г. В настоящее время для идентификации веществ КХ практически не применяют. Однако, она имеет большое значение для очистки, разделения и выделения индивидуальных веществ из растительных экстрактов, особенно в научных исследованиях.

В качестве сорбентов применяют полиамид, силикагель, алюминия оксид, целлюлозу и др. Для каждого из сорбентов подбирают растворители, учитывая полярные свойства компонентов, подлежащих разделению.

В частных статьях ГФ XI в методиках количественного определения используют способ хроматографического разделения на колонках с полиамидным сорбентом с целью очистки извлечений из ЛРС и выделения суммы

флавоноидов из плодов боярышника (ст.32) и травы сушеницы топяной (ст.51), а также суммы ксантонов из травы золототысячника (ст. 48).

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Преимущество этих современных инструментальных методов анализа в том, что они позволяют решить все задачи фитохимического анализа: доказать подлинность ЛРС по наличию тех или иных специфических компонентов, выявить отсутствие или допустимое содержание примесей, провести количественное определение ФАВ.

В ГФ XI метод ГЖХ используется для количественного определения ледола в эфирном масле побегов багульника болотного (ст.1). В данном случае применяют метод внутреннего стандарта. Для этого в анализируемую пробу перед хроматографированием вводят точный объем раствора вещества, заведомо отсутствующего в пробе (внутреннего стандарта) - метилового эфира миристиновой кислоты. На хроматограмме высота (площадь) пика определяемого вещества (ледола) меняется, а высота (площадь) пика внутреннего стандарта остается неизменной. На калибровочном графике откладывают отношение высоты (площади) пика ледола к высоте (площади) пика метилового эфира миристиновой кислоты. Высокая точность определения достигается за счет того, что все ошибки дозирования будут в равной степени сказываться на пиках обоих веществ, а их отношение существенных изменений не претерпевает.

Для анализа ЛРС, включенного в ГФ XI, ВЭЖХ не нашла применения. В настоящее время разработаны и включены в нормативные документы (НД) методики качественного и количественного анализа сырья элеутерококка, родиолы розовой, расторопши пятнистой, почек тополя и др. с использованием ВЭЖХ.

ГЖХ и ВЭЖХ перспективны для целей стандартизации многих видов ЛРС. Современные хроматографы имеют соответствующее программное обеспечение, позволяющее осуществлять контроль за хроматографическим разделением веществ на мониторе с последующей распечаткой на принтере результатов качественного и количественного анализа.

Хроматография в тонком слое сорбента или тонкослойная хроматография (ТСХ)

Этот метод хроматографии широко используют как для идентификации ЛРС, так и для разделения, очистки и выделения ФАВ (флавоноидов, кумаринов, алкалоидов и др.) при их количественном определении в ЛРС.

Идентификация ЛРС.

ГФ XI регламентирует применение ТСХ для доказательства:

- иридоидов и катехинов в коре калины (ст.4),
- флавонола гиперозида в цветках (ст.8) и плодах (ст.32) боярышника,
- флавоон-5-гликозидов в траве хвоща полевого (ст.50),
- фенологликозида салидрозида (родиолозида) и фенилпропаноида розавина в корневищах и корнях родиолы розовой (ст. 75),
- сапонинов - аралозидов в корнях аралии маньчжурской (ст. 65),

- сапонинов - панаксозидов в корнях женьшеня (ст.66),
- витамина К в листьях крапивы (ст. 25).

В качестве сорбента используют силикагель (специально обработанный оксид кремния). При анализе корней аралии маньчжурской силикагель наносят на стеклянную пластинку, во всех остальных случаях используют пластинки (подложка - алюминиевая фольга, связующий компонент - крахмал). Механизм разделения - адсорбционный. Во всех случаях, кроме анализа листьев крапивы, необходимо разделить высокополярные соединения (гликозиды флавоноидов, сапонинов и др.). Для этого в качестве подвижной фазы применяют системы растворителей: хлороформ - метанол или хлороформ - метанол - вода с преобладанием неполярного компонента (хлороформа),

Для анализа липофильного, т.е. сравнительно неполярного витамина К₁ (филлохинона) в листьях крапивы для лучшего его перемещения по пластинке используют смесь неполярных растворителей (бензол - петролейный эфир).

После разделения веществ для обнаружения (детекции) ФАВ, обладающих собственной флюоресценцией, пластинки просматривают в УФ-свете определенной длины волны (254 или 360 нм). Так доказывают флавоны - гликозиды в траве хвоща полевого, розавины в корневищах и корнях родиолы розовой, витамин К в листьях крапивы. Достоинствами обнаружения веществ с помощью УФ-света является высокая чувствительность и специфичность флюоресценции различных групп соединений. Кроме того, при этом не нарушается структура веществ, что позволяет в дальнейшем использовать эти же хромато-граммы для выделения и идентификации соединений. Для обнаружения веществ на хроматограммах применяют также специфические реактивы. Так, например, для обнаружения флавоноидов в цветках и плодах боярышника, траве хвоща полевого используют спиртовой раствор алюминия хлорида, усиливающий их флюоресценцию.

Доказательство подлинности проводят:

- С применением государственных стандартных образцов (ГСО) - например, гиперозида для цветков и плодов боярышника; а также рабочих стандартных образцов (РСО) индивидуальных веществ; иногда используют образцы новогаленовых препаратов (например, сапарала при анализе корней аралии). На уровне пятна стандартного вещества должно быть пятно компонента, имеющего одинаковую флюоресценцию или окраску.
- по расчету значений R_f . Оптимальными значениями считаются такие, когда величина R_f для определяемого вещества лежит в пределах 0,2 - 0,7. По значениям R_f пятен ФАВ проводится идентификация травы хвоща полевого, корней женьшеня, корневищ и корней родиолы розовой. Этот способ доказательства менее надежен, т.к. величина R_f зависит от условий эксперимента. Применяется в тех случаях, когда отсутствуют стандартные образцы.

Использование ТСХ для количественного определения ФАВ.

Согласно ГФ XI, метод ТСХ используют для очистки извлечения из цветков боярышника и выделения гиперозида, по количественному содержанию которого проводится оценка качества этого ЛРС. При количественном

определении для обнаружения и идентификации веществ на пластинках нельзя использовать реактивы, которые разрушают структуру анализируемого соединения. При анализе цветков боярышника на пластинку наносят ГСО гипeroxида, а затем проводят параллельные операции по обнаружению гипeroxида в УФ-свете, удалению с пластинки и количественному определению анализируемого извлечения и раствора ГСО. Это позволяет свести к минимуму как систематические ошибки, присущие данному методу, так и случайные.

Метод ТСХ имеет как преимущества, так и недостатки. Преимущества - в скорости анализа и возможности детектирования веществ агрессивными проявителями при повышенных температурах (так, например, для проявления ара-лозидов пластинку обрабатывают 20 % - ным раствором серной кислоты и выдерживают в сушильном шкафу). К недостаткам приведенных фармакопейных методик следует отнести использование систем, включающих токсичные растворители (метанол, хлороформ и др.), дефицитных (импортных) пластинок "Silufol" и труднодоступных ГСО, необходимость насыщения камеры (от 40 мин. до 2 час, а в некоторых случаях - до 24 час). Производство отечественных пластинок для ТСХ ("Сорбфил" и др.), а также исследования по выделению индивидуальных соединений с целью расширения ассортимента ГСО в последние годы способствует более широкому использованию метода ТСХ для качественного и количественного анализа при разработке новых НД на ЛРС и фитопрепараты.

Хроматография на бумаге (БХ)

ГФ XI регламентирует использование метода *восходящей хроматографии на бумаге (ВБХ)* для идентификации листьев вахты трехлистной (ст. 19) и травы череды (ст. 45).

При анализе листьев вахты используют систему растворителей уксусная кислота - вода 15:85, доказывают наличие флавонолов с использованием ГСО рутин по окраске после проявления раствором алюминия хлорида.

Для идентификации травы череды используют систему растворителей н-бутанол- уксусная кислота- вода (БУВ) 4:1:2, пятна флавоноидов обнаруживают в УФ - свете, доказательство их проводят по значениям R_f , указанным в статье.

Методы хроматографии на бумаге обладают большой чувствительностью при идентификации флавоноидов и др. фенольных соединений. Однако, для проведения ВБХ необходимы специальные громоздкие камеры, большие количества растворителей и хроматографической бумаги, а также значительные затраты времени (так, при анализе травы череды необходимо в течение 24 час. проводить насыщение камеры, после чего проводить разделение веществ в течение 16 час). Эти недостатки ограничивают применение ВБХ для качественного и количественного анализа ЛРС

Метод круговой (радиальной) хроматографии на бумаге (КБХ) отличается от ВБХ быстротой (затраты времени на проведение анализа обычно не превышают 1 часа), а также экономичностью с точки зрения использования раствори-

телей, бумаги и оборудования (в качестве камеры используются обычные чашки Петри).

2.3. Методы количественного определения фармакологически активных веществ

Методики определения количественного содержания ФАВ в ЛРС описаны в соответствующей нормативной документации.

Выбор метода зависит от физических и химических свойств ФАВ.

Используют гравиметрические (весовые), титриметрические (объемные) и физико-химические (инструментальные) методы анализа.

1.3.1. Гравиметрические методы

Гравиметрические (весовые) методы основаны на избирательной различной растворимости ФАВ в воде и неполярных органических растворителях. Происходит выделение суммы веществ путем их осаждения или получения нерастворимых комплексных соединений с последующим установлением их постоянной массы. Применяют для сырья, содержащего гликозиды: полисахариды (хорошо растворимы в воде и нерастворимы в крепких спиртах - осаждаются 95% этанолом); сапонины (растворимы в метиловом спирте и нерастворимы в диэтиловом эфире и ацетоне); дубильные вещества (осаждение желатином, солями тяжелых металлов или адсорбция кожным порошком); алкалоиды, выделяемые в виде солей или в виде оснований.

Методы просты в исполнении, но длительны, т.к. выделившийся осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием, высушивают и доводят до постоянной массы. Кроме того, метод дает завышенные результаты, потому что вместе с ФАВ осаждаются и сопутствующие вещества. Но для некоторых видов сырья, например, содержащего полисахариды, этот метод наиболее специфичен, поэтому включен в статьи ГФХІ, вып.2 на листья подорожника большого, траву череды, слоевища ламинарии. Используется для сырья, содержащего алкалоиды: сырье безвременника, дурмана индийского, плауна-баранца.

Для многих видов ЛРС проводят количественное определение экстрактивных веществ. Методика их определения (ГФХІ, вып.1) также основана на использовании гравиметрического метода.

Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье

Около 1 г измельченного сырья (точная навеска), просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200—250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью $\pm 0,01$ г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют обратным холодильником, нагревают, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150—200 мл. 25 мл фильтрата пипеткой пе-

реносят в предварительно высушенную при температуре 100—105°С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7—9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушат при температуре 100—105° С до постоянной массы, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится безводный хлорид кальция, и немедленно взвешивают. Содержание экстрактивных веществ в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{t \cdot 100}{m - (100 - W)},$$

где **t** - масса сухого остатка в граммах;

m - масса сырья граммах;

W— потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.3.2. Титриметрические методы

Титриметрические (объемные) методы основаны на химических свойствах ФАВ:

1. На их способности легко окисляться:
 - перманганатом калия (дубильные вещества);
 - раствором йода (простые фенольные соединения - арбутин);
 - 2,6-дихлорфенолиндофеолятом натрия (аскорбиновая кислота).
2. На основных свойствах основаны титриметрические методы определения алкалоидов. Алкалоиды ведут себя как основания и могут быть определены путем:
 - прямого титрования (сырье анабазиса, софоры толстоплодной, чилибухи);
 - обратного титрования (листья белены, дурмана, красавки; трава термопсиса, корневища с корнями чемерицы) растворами кислот.

Слабые основания определяют методом кислотно-основного титрования в неводных средах, где титрантом служит хлорная кислота.

Точку эквивалентности устанавливают по индикатору или потенциометрически (ГФ XI - трава чистотела - метод неводного потенциометрического титрования).

Титриметрические методы экономичны, быстры в исполнении, но недостаточно точны и дают завышенные результаты. С их помощью можно определить только сумму биологически активных веществ.

2.3.3. Физико-химические методы

Наиболее точны и высокочувствительны фотометрические методы (фотокolorиметрия и спектрофотометрия), основанные на измерении количества света, поглощенного веществом, суммой веществ или комплексом вещества в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной области спектра. Используют фотометрические методы для определения почти всех групп ФАВ (сердечные гликозиды, экдистероны, сапонины, кумарины, хро-моны, лигнаны, флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества, алкалоиды, каротиноиды).

Фотоэлектроколориметрические методы основаны на измерении степени поглощения немонахроматического (полихроматического) света на довольно широком участке спектра окрашенных растворов с помощью фотоэлектроколориметра. Для получения окрашенных соединений используют реактивы, дающие яркие, устойчивые окраски: на флавоноиды, кумарины, фенологликозиды проводят реакцию образования азокрасителя с диазотированными сульфаниламидами (ГФХІ - листья вахты, корневища и корни родиолы розовой).

Для анализа алкалоидов используют частные цветные реакции, основанные на окислении, конденсации и дегидратации алкалоидов концентрированными кислотами (коробочки мака, трава мачка желтого).

Антраценпроизводные дают вишнево-красное окрашивание со щелочами (кора крушины, корни ревеня, корневища и корни марены красильной).

Спектрофотометрические методы основаны на способности веществ или их окрашенных продуктов реакции избирательно поглощать монахроматический свет в определенной области спектра. Такими свойствами обладают флавоноиды, кумарины, антраценпроизводные, сапонины, индивидуальные алкалоиды, экдистероны. Измерение проводят с помощью спектрофотометра. Для большинства видов сырья, содержащих флавоноиды, измеряют:

- собственное поглощение суммы флавоноидов (ГФ ХІ - цветки бессмертника, цветки пижмы);

- поглощение окрашенного комплекса с алюминия хлоридом (трава горца перечного, горца птичьего, зверобоя, листья сумаха, скуппии).

Для сырья, содержащего антраценпроизводные, используют реакцию со щелочью (листья сенны).

Для сырья, содержащего фенологликозиды, используют реакцию диазотирования (корневища и корни родиолы розовой).

Наиболее точными являются хроматоспектрофотометрические методы, основанные на разделении веществ с помощью хроматографии с последующим их определением спектрофотометрически. Можно определять количественное содержание как суммы веществ, так и индивидуальных веществ.

Реже для анализа лекарственного растительного сырья применяется флюорометрия, полярография, денситометрия, амперометрия, кондуктометрия.

РАЗДЕЛ 3: УГЛЕВОДЫ

Цель занятия: освоить методы фитохимического анализа лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды.

Этапы достижения цели:

1. Овладеть методикой проведения качественного определения основных классов полисахаридов в лекарственном растительном сырье;
2. Овладеть методикой определения количественного содержания полисахаридов в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте определение понятия «полисахариды», как группы фармакологически активных веществ.
2. Приведите классификацию полисахаридов. Дайте определение основным группам полисахаридов.
3. Охарактеризуйте строение полисахаридов – крахмала, инулина, слизей, камедей и пектинов. Напишите формулы: глюкозы, галактозы, фруктозы, галактуроновой и глюкуроновой кислот, альгиновой кислоты, амилопектина, амилозы, инулина, пектина.
4. Назовите физико-химические свойства полисахаридов
5. Перечислите и охарактеризуйте методы качественного и количественного определения полисахаридов в растительном сырье.

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Полисахариды (гомogliкозиды. полиозы) - это высокомолекулярные продукты конденсации более пяти моносахаридов и их производных, связанных друг с другом О-гликозидными связями, образующие линейные или разветвленные цепи. Молекулярная масса полисахаридов колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов. В состав полисахаридов входят около 20 моносахаридов: *гексозы* - глюкоза, галактоза, фруктоза; *пентозы* - ксилоза, арабиноза; *уроновые кислоты* - глюкуроновая, галактуроновая, маннуроновая. Моносахариды входят в состав полисахаридов в пиранозной или фуранозной форме. Гликозидная связь образуется за счет полуацетального гидроксильного одного моносахарида и водорода одной из спиртовых групп другого моносахарида. Присоединение их идет по связям 1→4, 1→6, 1→3 в зависимости от положения спиртового гидроксильного, который участвует в образовании связи. Полисахариды могут образовывать линейные или разветвленные цепи. Гидроксильные группы могут быть метилированы, этерифицированы уксусной, азотной, серной (агар-агар) кислотами, могут замещаться металлами – Mg^{2+} , Ca^{2+} . Отдельные группы полисахаридов имеют тривиальные названия - крахмал, целлюлоза, слизи и т.д.

Закономерности образования и накопления полисахаридов в растениях.

В растениях моносахариды и их производные, образующиеся в процессе фотосинтеза, используются в качестве предшественников при синтезе олиго- и полисахаридов. Синтезируются структурные полисахариды (целлю-

лоза, пектиновые вещества) и запасные полисахариды (крахмал, инулин). Структурные полисахариды образуются в растущих тканях. Запасной полисахарид крахмал временно откладывается в виде крахмальных зерен в хлоропластах, а затем мобилизуется и переносится в виде сахарозы из листьев в другие органы растений. Крахмал вновь образуется в лейкопластах (амилопластах) и откладывается в запас в семенах и в подземных органах, при помощи которых растения возобновляются и размножаются вегетативно (корнях, корневищах, клубнях, клубнелуковицах и луковицах). В подземных органах семейства *Asteraceae* вместо крахмала запасаются фруктозаны, в частности инулин.

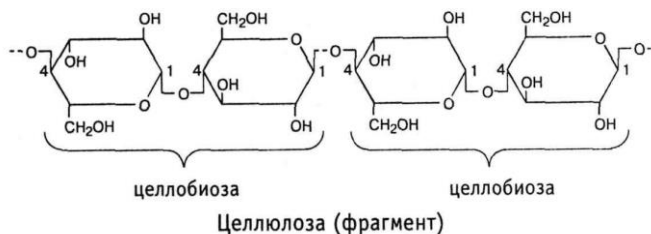
Классификация полисахаридов

Полисахариды делятся на два типа: *гомополисахариды* (гомополимеры) и *гетерополисахариды* (гетерополимеры).

Гомополисахариды построены из моносахаридных единиц (мономеров) одного типа, гетерополисахариды – из остатков различных моносахаридов и их производных. В медицинской практике из числа гомополисахаридов используют крахмал и клетчатку (целлюлозу); из числа гетерополисахаридов – инулин, пектиновые вещества, камеди и слизи.

Клетчатка (целлюлоза)

Целлюлоза является наиболее распространенным в природе полисахаридом, она составляет основную массу клеточных стенок растений. Молекула целлюлозы у разных растений содержит от 1400 до 10 000 остатков глюкозы, которые соединены между собой *бета*-1,4-гликозидными связями в линейные цепи. Целлюлоза подвергается кислотному гидролизу и при кипячении с концентрированной кислотой серной превращается в глюкозу.

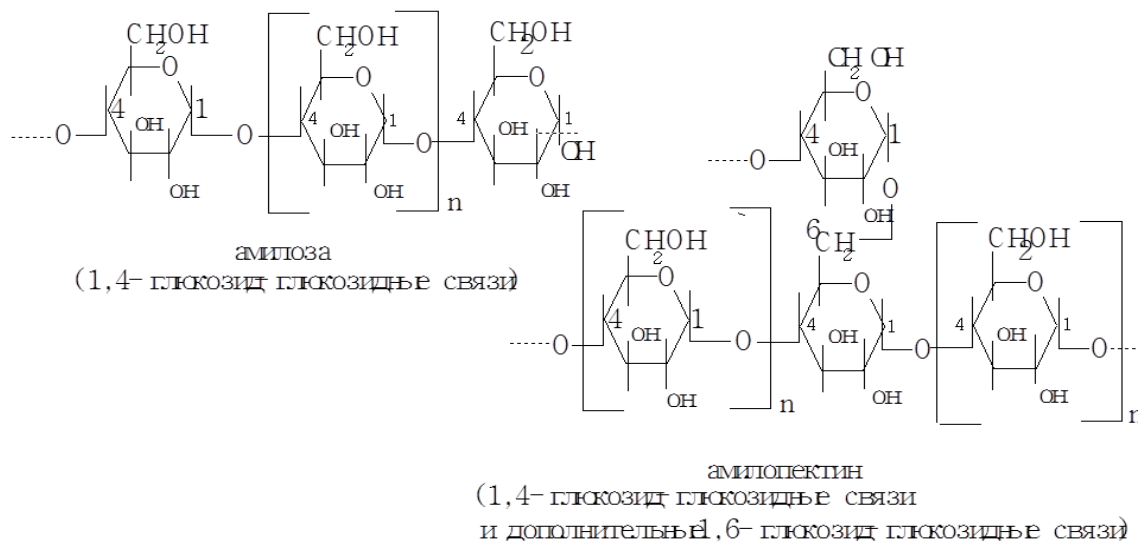


В медицине используется вата – *Gossypium* (волоски семян видов рода хлопчатник – *Gossypium* L. из сем. мальвовых – *Malvaceae*), более чем на 95 % состоящая из клетчатки. Вата является исходным материалом для получения коллодия и различных производных целлюлозы (метилцеллюлоза и др.), находящихся широкое применение в качестве вспомогательных веществ при изготовлении разных лекарственных форм. Из целлюлозы производят бумагу, целлофан, сорбенты, взрывчатые вещества и др.

Крахмал – *Amylum*

Крахмал не является химически индивидуальным веществом. Полисахариды крахмала представлены двумя веществами – амилозой и амилопектином. Оба полисахарида являются глюканами и образованы из *альфа*-глюкопиранозных остатков.

Амилоза представляет собой линейный глюкан, в котором 60-300 (до 1500) остатков глюкозы связаны *альфа*-гликозидными связями между первым и четвертым углеродными атомами. Амилоза имеет молекулярную массу 32 000-160 000, легко растворима в воде и дает растворы со сравнительно невысокой вязкостью. *Амилопектин* - разветвленный глюкан, в котором 3000-6000 (до 20 000) остатков глюкозы соединены *альфа*-гликозидными связями не только между первым и четвертым углеродными атомами, но также между первым и шестым. Амилопектин растворяется в воде при нагревании и дает стойкие вязкие растворы. Его молекулярная масса достигает сотен миллионов.



Крахмал образуется и запасается в пластидах в виде зерен. Форма и размер крахмальных зерен специфичны для данного вида растения. Крахмальные зерна на 96-98 % состоят из полисахаридов, которые сопровождаются минеральными веществами (кислота фосфорная) и твердыми жирными кислотами.

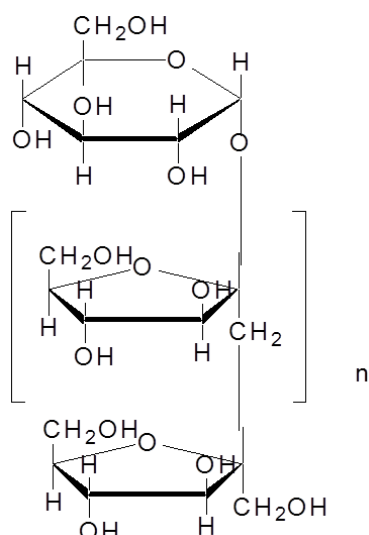
В медицинской практике используют:

- крахмал картофельный - *Amylum Solani* (*Solanum tuberosum*);
- крахмал пшеничный - *Amylum Tritici* (*Triticum vulgare*);
- крахмал кукурузный (маисовый) - *Amylum Maydis* (*Zea mays*);
- крахмал рисовый - *Amylum Oryzae* (*Oryza sativa*).

Применяют крахмал как наполнитель, а в хирургии – для приготовления неподвижных повязок. Он широко используется в присыпках, мазях, пастах вместе с цинка оксидом, тальком. Внутрь крахмал применяют как обволакивающее средство при желудочно-кишечных заболеваниях. Применяются также продукты частичного гидролиза крахмала - декстрины (*Dextrinum*). Картофельный и кукурузный крахмал - основные источники промышленного получения глюкозы.

Инулин

Молекула инулина построена из остатков *бета*-фруктофуранозы, связанных гликозидными связями между первым и вторым углеродными атомами. Молекулы инулина линейны и оканчиваются остатком *альфа*-глюкопиранозы.

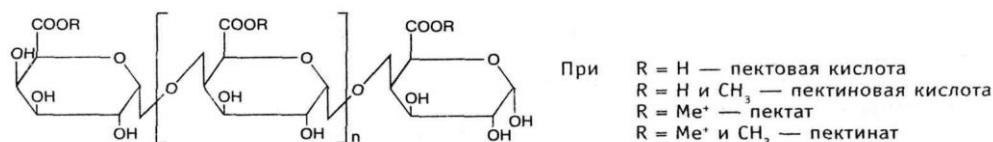


Инулин в больших количествах содержится в подземных органах растений семейств сложноцветных (Asteraceae) и колокольчиковых (Campanulaceae), у которых он заменяет крахмал. В медицинской практике используют инулинсодержащее сырье: корни одуванчика - *Radices Taraxaci* (*Taraxacum officinale*); корневища и корни девясила - *Rhizomata et radices Inulae* (*Inula helenium*); листья мать-и-мачехи - *Folia Farfarae* (*Tussilago farfara*); корни лопуха - *Radices Arctii* (*Arctium lappa*, *A. tomentosum*, *A. minus*).

Растения, содержащие инулин, используются для получения фруктозы. В настоящее время сырье, богатое инулином (корни цикория, клубни топинамбура (земляной груши), широко используются в составе различных пищевых добавок, применяемых при заболевании сахарным диабетом.

Пектиновые вещества

Открыты в 1825 г.; название происходит от «*pectos*» - (греч.) - застывший, свернувшийся. Основным мономером пектиновых веществ является *альфа*-галактуроновая кислота. Полигалактуроновая кислота сопровождается галактаном и арабаном, которые связаны ковалентными связями с кислотными фрагментами пектинов. Карбоксильная группа каждого остатка галактуроновой кислоты может быть метоксилирована или образовывать соли с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} .



Пектиновые вещества классифицируют в зависимости от строения мономеров и степени полимеризации.

Различают:

1. *пектовые кислоты* (простейшие представители пектиновых веществ, со-

держат до 100 мономеров, карбоксильные группы не модифицированы, R = H);

1. *пектаты* (соли пектовых кислот, R = Me⁺ и H);
3. *пектиновые кислоты (пектины)* (более высокомолекулярные соединения, содержащие 100-200 мономеров, карбоксильные группы частично метоксилированы, R=H и CH₃);
4. *пектинаты* (соли пектиновых кислот, R = Me⁺ и CH₃);
5. *протопектины* (нерастворимые в воде высокомолекулярные полимеры, в которых метоксилированная полигалактуроновая кислота связана с полисахаридами клеточной стенки).

Пектиновые вещества содержатся в больших количествах в плодах, клубнях и стеблях растений в виде нерастворимого протопектина. При созревании плодов и их хранении протопектин переходит в растворимые формы, при этом улучшаются вкусовые качества плодов. Растворимые пектины присутствуют в соках растений. Наличие пектиновых веществ необходимо учитывать при переработке лекарственного растительного сырья. Пектиновые вещества составляют межклеточное вещество и первичные стенки молодых растительных клеток. В бурых водорослях эту роль выполняют *альгиновые кислоты*. Мономерами альгиновых кислот являются *бета-маннуронозная* и *альфа-гулууронозная* кислоты, связанные 1→4 гликозидными связями. Карбоксильные группы маннуронозной и гулууронозной кислот часто образуют соли с ионами Na⁺, Ca²⁺ и Mg²⁺.



В медицинской практике используют сырье:

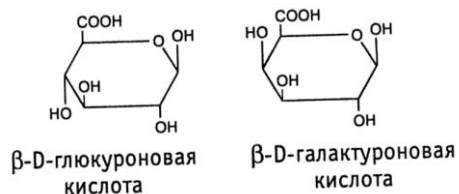
- листья подорожника большого - Folia Plantaginis majoris (Plantago major);
- листья подорожника большого свежие - Folia Plantaginis majoris recentia
- трава подорожника блошного свежая - Herba Plantaginis psyllii recens
- слоевища ламинарии - Thalli Laminariae.

Использование пектиновых веществ в медицине связано с их способностью снижать гастротоксичность салицилатов; пектиновые кислоты могут использоваться в качестве носителя лекарственных веществ. Пектины оказывают противоязвенное действие и являются легким слабительным, а с различными металлами образуют комплексные соединения – хелаты, которые легко выводятся из организма. По этой причине продукты, содержащие пектины, особенно показаны людям, проживающим на радиоактивно зараженной территории. Промышленным сырьем для получения пектинов являются свекловичный жом, яблочные выжимки, кожура плодов цитрусовых, вымоченные корзинки подсолнечника и др. Пектиновые вещества широко ис-

пользуются в текстильной и пищевой промышленности, в косметике. Альгиновая кислота является природным «ионообменником» и обладает способностью селективно адсорбировать катионы тяжелых металлов и радиоизотопов. Применение альгиновой кислоты предотвращает отложение радиоактивного стронция в организме человека и животных. На основе солей альгиновой кислоты – альгинатов – разработаны препараты для лечения ран и ожогов, гемостатические препараты для гастроэнтерологии, которые создают на пораженном участке защитное и лечебное покрытие. Альгинаты также используются для получения перевязочных материалов с пролонгированным лечебным действием.

Камеди и слизи

Камеди (гумми) и слизи - смеси гомо- и гетерополисахаридов и полиуронидов. По химическому строению они близки между собой. *Камеди* обычно образуются у растений засушливого климата в результате перерождения клеточных стенок, содержимого клеток сердцевины, сердцевинных лучей. Они выделяются в виде вязких натеков из надрезов и трещин растений при их повреждении или заболевании. Эти мягкие натеки на воздухе затвердевают. В состав камедей входят гексозы (галактоза и манноза), пентозы (арабиноза и ксилоза), метилпентозы (рамноза и фукоза), уроновые кислоты (глюкуроновая и галактуроновая). Уроновые кислоты образуют соли с ионами K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .



В медицинской практике используют камедь трагакантовую, абрикосовую, сливовую, вишневую и др. Они используются при приготовлении эмульсий, таблеток и пилюль. Камеди также находят применение в пищевой, текстильной, кожевенной, лакокрасочной промышленности.

*Слиз*и присутствуют в неповрежденных растениях и образуются в результате нормального слизистого перерождения клеточных стенок и клеточного содержимого. Накапливаются слизи в межклетниках, в клетках и специальныхместилищах. Различают слизи нейтральные (слизь салепа) и кислые (слизь алтея, льна, подорожника блошного). Кислая реакция обусловлена наличием в составе слизей уроновых кислот.

Слиз

и отличаются значительным преобладанием пентоз. В отличие от камедей они могут быть нейтральными, т.е. не содержать уроновых кислот. Слизесодержащее сырье, используемое в медицинской практике:

- корни алтея - Radices Althaeae (Althaea officinalis, A. armeniaca);
- трава алтея лекарственного - Herba Althaeae officinalis
- листья мать-и-мачехи - Folia Farfarae (Tussilago farfara);
- листья подорожника большого - Folia Plantaginis majoris (Plantago major);

- листья подорожника большого свежие - *Folia Plantaginis majoris recentia* (P. major);
- трава подорожника блошного свежая - *Herba Plantaginis psyllii recens* (Plantago psyllium);
- семена подорожника блошного - *Semina Plantaginis psyllii* (P. psyllium);
- семена льна - *Semina Lini* (Linum usitatissimum);
- цветки липы - *Flores Tiliae* (Tilia cordata, T. platyphyllos).

В медицине слизи используют как противовоспалительные и обволакивающие средства. Кроме того, слизи обладают радиопротекторными и иммунозащитными свойствами.

Физические и химические свойства полисахаридов

Обычно это аморфные вещества. Нерастворимы в спирте и неполярных растворителях. Растворимость в воде варьирует: целлюлоза, протопектины, вишневая камедь - нерастворимы в воде; другие группы пектинов - образуют гели; трагакантовая камедь, крахмал - набухают в воде. В теплой воде крахмал образует вязкий коллоидный раствор (клейстер); инулин, слизи, абрикосовая камедь - растворимы в воде. Обычно полисахариды бесцветны, без вкуса и запаха. Полисахариды подвергаются кислотному или ферментативному гидролизу с образованием моно- или олигосахаридов. Образующиеся мономеры дают характерные для них реакции.

Оценка качества сырья, содержащего полисахариды. Методы анализа

Подлинность лекарственного растительного сырья подтверждают качественными реакциями. Фармакопейными (ГФ XI, вып. 2) являются следующие:

- на крахмал*: при добавлении раствора Люголя (раствора йода в водном растворе калия йодистого) появляется синее окрашивание (реакция Сакса);
- на инулин*: 1 этап - при нанесении раствора йода не должно быть синего окрашивания (отсутствие крахмала); 2 этап – при нанесении 20 % спиртового раствора *альфа*-нафтола и кислоты серной концентрированной появляется розово-фиолетовое окрашивание (реакция Молиша);
- на слизь*: 1) при нанесении раствора аммиака или натрия гидроксида появляется желтое окрашивание; 2) спиртовой раствор метиленовой сини окрашивает слизь в синий цвет; 3) микропрепарат помещают в раствор (1:10) канцелярской туши: на темно-сером (почти черном) фоне выделяются белыми пятнами клетки со слизью;
- на пектиновые вещества*: образующаяся после кислотного гидролиза галактуроновая кислота дает реакцию с карбазолом, при этом появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Количественное определение полисахаридов проводят гравиметрическим (весовым) методом, основанным на осаждении полисахаридов из водного извлечения 95 % спиртом. ГФ XI, вып. 2 предлагает этот метод для листьев подорожника большого, тавы череды и слоевищ ламинарии.

Стадии анализа:

- 1) экстракция полисахаридов водой;
- 2) осаждение полисахаридов из водного извлечения 95 % спиртом;

3) высушивание осадка и доведение его до постоянной массы.

Медицинское применение сырья, содержащего полисахариды

Фармакологическое действие основано на способности полисахаридов набухать и образовывать коллоидные растворы. Они покрывают тонким слоем воспаленные слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта (обволакивающее действие), предохраняют чувствительные нервные окончания от раздражения пищей, лекарствами, компонентами желудочного сока, желчи, кислыми пептидами (гастропротекторное действие). Благодаря такому действию полисахаридов уменьшается выраженность болевого синдрома и снижается воспалительный процесс на его начальном этапе. При этом они уменьшают всасывание токсинов, пролонгируют действие лекарств. Механизм смягчающего и отхаркивающего действия полисахаридов при заболеваниях верхних дыхательных путей иной. Полисахариды не возгоняются с водяным паром и неэффективны при ингаляциях. При приеме внутрь полисахариды не всасываются в желудочно-кишечном тракте и не могут в натуральном виде попасть на слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Однако эмпирические данные и клинические исследования подтверждают полезность назначения полисахаридов внутрь при бронхите, пневмонии, трахеите. Очевидно, образующиеся при частичном гидролизе полисахаридов в желудочно-кишечном тракте короткие олигосахариды и моносахариды стимулируют секрецию слизи и способствуют нормальному функционированию слизистых оболочек.

Таким образом, лекарственные средства, содержащие полисахариды, используют в основном:

- как обволакивающие, противовоспалительные, смягчающие, отхаркивающие средства при острых и хронических заболеваниях дыхательных путей (настои из сырья липы, мать-и-мачехи, подорожника большого, алтея, грудные и потогонные сборы, сухой экстракт и сироп алтея, «Мукалтин»);
- как обволакивающие и противовоспалительные средства для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта (настои корней алтея, семян подорожника блошного, отвар крахмала, слизь семян льна).

«Плантаглюцид» применяется для лечения хронического гиперацидного гастрита и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки с нормальной и пониженной кислотностью. Сок подорожника применяется при анацидных гастритах и хронических колитах. Настойка подорожника - антацидное, отхаркивающее, противовоспалительное, стимулирующее регенерацию средство. Семена подорожника блошного, семена льна, порошок слоевищ ламинарии, таблетки ламинарии, экстракт ламинарии сухой и густой, «Ламинарид» применяются как мягкие слабительные средства при хронических атонических запорах и колитах. Действие основано на способности полисахаридов набухать в желудочно-кишечном тракте, что способствует разрыхлению каловых масс, увеличению их объема. Это вызывает раздражение рецепторов слизистой оболочки кишечника, способствует его опорожнению. Порошок слоевищ ламинарии, таблетки ламинарии, экстракт ламинарии

сухой и густой применяют также для профилактики атеросклероза, заболеваний щитовидной железы (эндемического зоба), используют для профилактики заболеваний, связанных с недостатком йода в организме. «Альгипор», «Альгимаф» применяются для лечения ран и ожогов.

«Альгинатол» - гемостатическое средство для местного применения.

«Альгисорб» - комплексобразующее средство (антидот).

«Адаптовит» - общетонизирующее средство.

Лекарственное растительное сырье, содержащее инулин, применяют при лечении сахарного диабета (инулин способствует отложению гликогена в печени, улучшается инсулинообразующая функция поджелудочной железы). Пектиновые вещества способствуют уменьшению содержания холестерина в крови, т.е. оказывают антисклеротическое действие. Пектиновые вещества и альгиновые кислоты обладают способностью адсорбировать катионы тяжелых металлов и радиоизотопы, способствуют выведению радионуклидов и тяжелых металлов из организма.

Кроме того, полисахариды в растительном сырье выполняют биофармацевтическую функцию. Они образуют комплексы с малорастворимыми или нерастворимыми в воде терпенами и фенолами. Благодаря полисахаридам в настои и отвары переходят эфирные масла и другие группы биологически активных веществ. Полисахариды пролонгируют действие других ФАВ и лекарственных средств.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

Практическая работа 1. Проведите качественный анализ полисахаридов в лекарственном растительном сырье

Задание 1. Проведите гистохимические реакции на основные классы полисахаридов:

1. Реакция на крахмал с раствором йода.

При нанесении на порошок крахмала 2–3 капли раствора йода наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

2. Реакция на целлюлозу с раствором йода.

На порошок целлюлозы наносят пипеткой каплю раствора йода. Целлюлоза окрашивается раствором йода в желтый или коричневый цвет.

3. Реакция на слизи со щелочью.

При смачивании порошка или среза корня (алтея) раствором едкого натра появляется желтое окрашивание.

4. Реакция на слизи с тушью (с порошком семян льна). Семена льна измельчают и помещают на предметное стекло в каплю туши (разведенную водой 1:10), тщательно перемешивают и накрывают покровным стеклом. На темно-сером (почти черном) фоне выделяются белыми пятнами клетки со слизью.

5. Реакция двойного окрашивания. Срез корня алтея помещают на 20 минут в раствор хлорида окисного железа, затем на 2-3 минуты в раствор метиленового синего, промывают водой и заключают в глицерин. Клетки

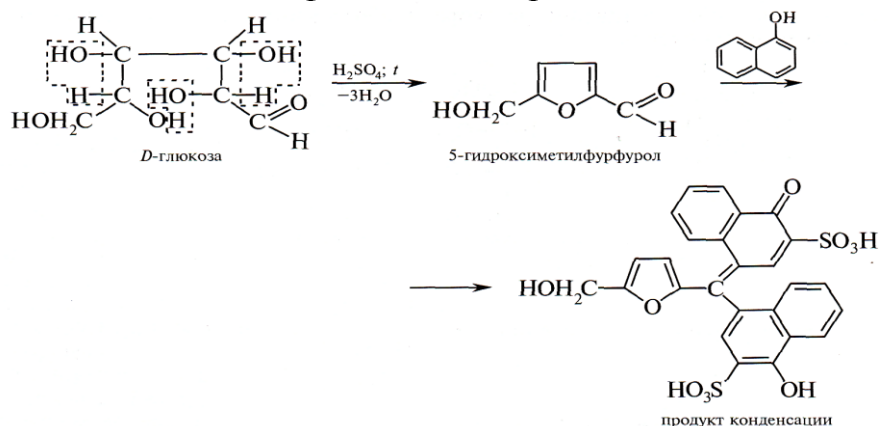
со слизью окрашиваются в желтый цвет, механические волокна в голубой, сосуды древесины в зеленый.

6. Реакция с метиленовым синим. Срез корня алтея помещают на несколько минут в раствор метиленового синего в спирте (1:5000), затем переносят в глицерин. Слизь окрашивается в голубой цвет.

7. Реакция на инулин

а) проводят реакцию с раствором йода для доказательства отсутствия крахмала;

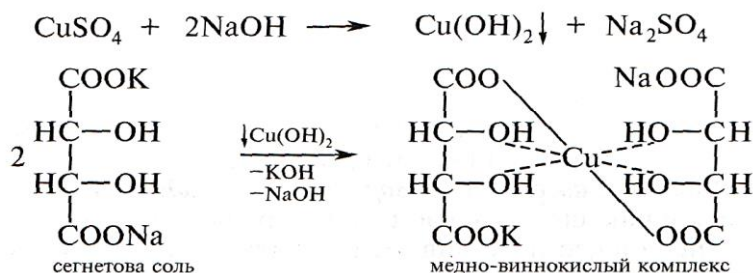
б) **Реакция Молиша.** На поперечный срез корня или корневища (одуванчика, девясила, цикория) наносят пипеткой 2–3 капли 20 % спиртового раствора α -нафтола и каплю концентрированной серной кислоты. С течением времени появляется фиолетовая окраска.



Задание 2. Проведите качественные реакции на основные классы подисхаридов

1. Осаждение слизи этанолом из водного извлечения. 10 г измельченного сырья (листья подорожника) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды и нагревают с обратным холодильником на электрической плитке в течение 30 минут, поддерживая слабое кипение. Извлечение фильтруют через 5 слоев марли. К 10 мл фильтрата прибавляют 10–30 мл 95 % этанола и перемешивают. Появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

2. Реакция с реактивом Фелинга (травя череды, слоевище ламинарии). Раствор с осадком (см. реакцию 1) фильтруют через стеклянный фильтр через ПОР-16, осадок переносят в пробирку, прибавляют 2 мл разведенной хлористоводородной кислоты, нагревают, затем прибавляют реактив Фелинга и снова нагревают; появляется оранжево-красное окрашивание (восстанавливающие сахара).



3. Реакция с карбазолом (листья подорожника большого). Раствор с осадком (см. реакцию 1) фильтруют через стеклянный фильтр через ПОР-16, осадок переносят в колбу вместимостью 50 мл раствором едкого натра (0,1 моль/л). К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл 0,5% раствора карбазола и 5 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают и нагревают в течение 10 минут, появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроно-вая кислота);

4. Реакция с ацетатом свинца. К 2 мл извлечения из подорожника прибавляют 2 мл раствора ацетат свинца. Выпадает объемный осадок слизи.

5. Реакция с раствором щелочи (аммиака). К 1-2 мл 10 % настоя корня алтея, приготовленного на холодной воде, прибавляют несколько капель раствора гидроксида натрия (или аммиака). Смесь приобретает лимонно-желтую окраску.

6. Реакция с хлористоводородной кислотой. В пробирку наливают 1 мл 10 % настоя корня алтея и прибавляют несколько капель концентрированной хлористоводородной кислоты. Образуется желтовато-зеленое окрашивание. К смеси приливают 2 мл 95 % этанола. Слизь коагулирует в пористый сгусток.

Проведите предложенные качественные реакции, результаты экспериментов запишите в тетрадь для практических работ в виде предложенной таблицы:

№	Название сырья/основной полисахарид	Реактив	Результат реакции

Практическая работа 2. Определите количественное содержание суммы полисахаридов в листьях подорожника большого по методике, предложенной в ГФ XI изд.

Методика количественного определения суммы полисахаридов в лекарственном растительном сырье. Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья или 2 г (точная навеска препарата) помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл воды. Содержимое колбы кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, после чего фильтруют. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй раз 100 мл воды. Фильтраты объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытой водой. Фильтр промывают водой и доводят раствор водой до метки (раствор А).

5 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95% спирта этилового, перемешивают, подогревают на водяной бане до 30⁰С в течение 5 мин. Через час содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют

под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100-105⁰С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносят на фильтр и последовательно промывают 15 мл раствора 95% этилового спирта в воде (3:1), 10 мл ацетона, 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100-105⁰С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье или препарат в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где m_1 – масса фильтра, г;

m_2 – масса фильтра с осадком, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Сделайте заключение о количественном содержании суммы полисахаридов в листьях подорожника большого в соответствии с требованиями ГФ XI изд.

РАЗДЕЛ 4: ВИТАМИНЫ И ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Цель занятия: освоить методы фитохимического анализа лекарственного растительного сырья, содержащего витамины и органические кислоты.

Цель занятия:

Этапы достижения цели:

1. Овладеть методикой проведения качественного определения витаминов и органических кислот в лекарственном растительном сырье;
2. Овладеть методикой определения количественного содержания аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте определение понятия «витамины» как группы фармакологически активных веществ.
2. Охарактеризуйте химическое строение витаминов С, К, Р, Е, каротиноидов. Напишите формулы аскорбиновой кислоты, β -каротина, филлохинона, рутина.
3. Опишите виды классификаций ЛРС, содержащего витамины, назовите физико-химические свойства витаминов;
4. Охарактеризуйте физико-химические свойства водорастворимых витаминов.
5. Охарактеризуйте физико-химические свойства жирорастворимых витаминов (на примере каротиноидов).
6. Назовите методы качественного анализа сырья, содержащего каротиноиды.
7. Назовите методы оценки сырья, содержащего аскорбиновую кислоту и каротиноиды;
8. Дайте определение понятия «Органические кислоты». Напишите формулы: лимонной, щавелевой, бензойной, салициловой, галловой, пирокатехиновой, хинной, п-гидроксibenзойной кислот.
9. Назовите физико-химические свойства органических кислот растений.

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ

Органические кислоты, наряду с углеводами и белками, являются самыми распространенными веществами в растениях. Они принимают участие в дыхании растений, биосинтезе белков, жиров и других веществ. Органические кислоты относятся к веществам как первичного синтеза (яблочная, уксусная, щавелевая, аскорбиновая), так и вторичного синтеза (урсоловая, олеаноловая).

Органические кислоты являются фармакологически активными веществами и участвуют в суммарном эффекте препаратов и лекарственных форм из растений:

- салициловая и урсоловая кислоты обладают противовоспалительным действием;

- яблочная и янтарная кислоты - доноры энергетических групп, способствуют повышению физической и умственной работоспособности;

- аскорбиновая кислота - витамин С.

Витамины – органические вещества различной химической природы, не образующиеся в достаточном количестве клетками человеческого организма, но необходимые для его нормальной жизнедеятельности. Витамины проявляют биологическую активность в очень малых концентрациях. Они выполняют функции регуляторов обмена веществ. Большинство витаминов входит в состав ферментов, являясь их коферментами.

Приоритет открытия витаминов принадлежит русскому врачу Николаю Ивановичу Лунину. В 1880 г. Н.И. Лунин писал, что в пище, кроме «казеина, жира, молочного сахара и солей, содержатся еще другие вещества, незаменимые для питания».

Термин «витамины» был предложен польским ученым Казимиром Функом в 1912 году от лат. «*vita*» - «жизнь», т.е. дословно термин означает «амины жизни». Поскольку первое выделенное в кристаллическом виде вещество, а это был тиамин (В₁) из отрубей риса, содержало азот, то К. Функ предполагал, что наличие азота характерно для всех витаминов. Термин «витамины» не точен, но сохранился до настоящего времени.

Классификация витаминов и витаминосодержащего лекарственного растительного сырья

Существует несколько классификаций витаминов.

1. Буквенная классификация - первая в историческом плане. При обнаружении новых факторов витаминной природы им присваивали условные названия в виде буквы латинского алфавита. Например: витамины А, В, С, D и др.

2. Фармакологическая классификация. Эта классификация вводилась параллельно с буквенной и указывала на заболевание, от которого предохраняет витамин:

витамин С - противцинготный;

витамин К - антигеморрагический;

витамин D - антирахитический и др.

3. Химическая классификация. В зависимости от химической структуры выделены группы:

витамины алифатического ряда - С, F и др.;

витамины алициклического ряда - А, D и др.;

витамины ароматического ряда - К и др.;

витамины гетероциклического ряда - E, P и др.

4. Классификация по растворимости витаминов:

водорастворимые витамины – группы В, С, Р, Н, РР;

жирорастворимые витамины — А, D, E, К, F, U.

Витамины содержатся во всех растениях, но **витаминосодержащими** называют только те растения, которые избирательно накапливают вита-

мины в дозах, способных оказать выраженный фармакологический эффект. Это в 500-1000 раз больше, чем в других растениях.

В настоящее время практически все витамины получают синтетическим путем. Однако витаминсодержащие лекарственные растения не утратили своего значения. Они широко используются, особенно в педиатрии, в гериатрии и для лечения лиц, склонных к аллергическим заболеваниям, поскольку:

- во-первых, витамины в лекарственном растительном сырье находятся в комплексе с полисахаридами, сапонинами, флавоноидами, поэтому такие витамины легче усваиваются;
- во-вторых, растительные витамины реже дают аллергические реакции, чем их синтетические аналоги;
- в-третьих, в организме человека есть специальные системы защиты от передозировки витаминов (например, каротин в организме человека превращается в витамин А по мере необходимости).

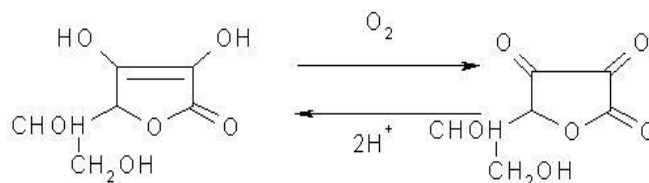
Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины

1. Концентраторы *витамина С*: плоды черной смородины, плоды шиповника, плоды рябины, плоды малины, листья крапивы, плоды и листья земляники.
2. Концентраторы и источники *витамина Р*: бутоны и плоды софоры японской, плоды аронии (рябины) черноплодной, плоды черной смородины, кожура плодов цитрусовых, листья чая.
3. Концентраторы *каротиноидов* (провитаминов А): плоды шиповника, плоды облепихи, плоды рябины, цветки календулы, трава череды, трава сушеницы топяной.
4. Концентраторы *витамина К*: листья крапивы, трава пастушьей сумки, трава тысячелистника, цветки и листья зайцегуба, кора калины, кукурузные рыльца.
5. Концентраторы *витамина Е*: плоды облепихи, облепиховое масло, масло шиповника, кукурузное масло, льняное масло, семена тыквы.
6. Концентраторы *витамина F*: масло кукурузное, масло подсолнечное и другие растительные жирные масла.

В лекарственном растительном сырье довольно часто встречаются витамины группы В: В₂ - рибофлавин, В₅ - пантотеновая кислота, В₉ - фолиевая кислота, провитамин витаминов группы D - эргостерол и другие фитостеролы. В высоких концентрациях способны накапливаться только кислота аскорбиновая (витамин С), каротиноиды (провитамин А), витамин К₁ (филлохинон) и некоторые флавоноиды (рутин, кверцетин и др.), относимые к витамину Р.

Химическая структура витаминов. Физические, химические и биологические свойства

Витамин С – аскорбиновая кислота.



гамма-лактон 2,3-дегидро-альфа-гулоновой кислоты (гексуоновая кислота)

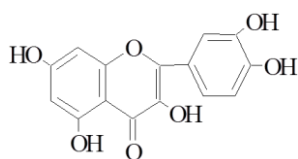
Существует в двух формах - аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. Обе формы легко переходят друг в друга при соответствующих условиях, обе формы одинаково фармакологически активны. Аскорбиновая кислота – белый кристаллический порошок, кислого вкуса. Легко растворяется в воде и спирте, не растворяется в органических растворителях: эфире, хлорформе, бензоле. Аскорбиновая кислота – нестойкое вещество. В водных растворах она легко разрушается под действием кислорода воздуха, света; следы железа и меди ускоряют процесс разрушения (окисления).

Аскорбиновая кислота участвует в окислительно-восстановительных реакциях, в том числе в липидном и пигментном обмене, активирует протромбин, обладает десенсибилизирующим действием, поднимает жизненный тонус организма и повышает сопротивляемость к экстремальным воздействиям. Недостаток витамина С вызывает цингу, или скорбут (рыхлость десен, выпадение зубов, кровоизлияния).

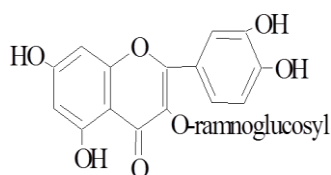
Витамин Р – полифенольные гетероциклические соединения группы флавоноидов. В этой группе около **120** веществ. Основными представителями этой группы являются **рутин, гесперидин, кверцетин**.

Этот витамин был открыт при изучении проницаемости сосудов в условиях недостатка витамина С. Ученые обнаружили, что употребление одного витамина С не приводит к желаемому результату. Когда стали использовать сок лимона, кровоточивость снизилась. После этого из кожуры лимона выделили вещество, повышающее прочность стенки сосудов и назвали витамином Р (*"permeabilitas"- проницаемость*).

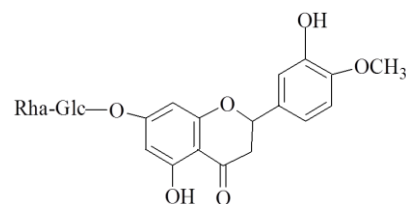
Дальнейшие исследования привели к получению веществ, обладающих «Р-витаминным» действием. В больших количествах они были обнаружены в листьях чая, плодах шиповника, лимонах, апельсинах, плодах рябины черноплодной и в других растениях. В листьях чая из Р-витаминной группы находятся катехины, в листьях и цветках гречихи – рутин и кверцетин. В условиях хранения все Р-активные соединения крайне не устойчивы и при доступе воздуха, воздействии солнечного света легко разрушаются



кверцетин



рутин



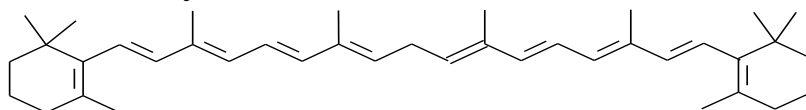
гесперидин

Физические и химические свойства описаны в разделе «Флавоноиды». Укрепляют стенки кровеносных сосудов и капилляров.

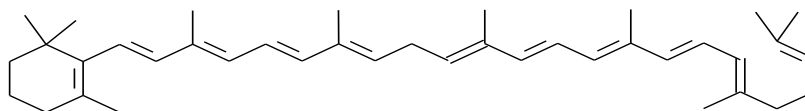
Каротиноиды – предшественники (провитамины) витамина А – жирорастворимые растительные пигменты желтого, оранжевого или красного цвета. По своей химической природе являются тетратерпеноидами с общей формулой $[(C_5H_8)_2]_4$, или $C_{40}H_{64}$ (см. раздел «Терпеноиды»).

В растениях каротиноиды находятся в виде ненасыщенных углеводов – *каротинов* - и кислородсодержащих производных – *ксантофиллов*. Представлены приблизительно 70 соединениями, но провитаминами А являются 9 веществ. Каротиноиды играют важную роль в процессах фотосинтеза, дыхания, участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, оплодотворении. Каротиноиды синтезируются высшими растениями, грибами и бактериями. Животные не способны их синтезировать.

Широко распространены в растениях *альфа*-, *бета*- и *гамма*-каротины, ликопин, зеаксантин, виолаксантин и др. Наибольшую биологическую активность проявляет *бета*-каротин, в результате окислительно-гидролитического расщепления которого в тканях животных и человека образуется две молекулы витамина А, из остальных – одна молекула.



β - каротин



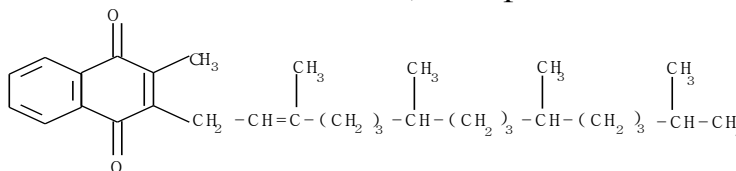
γ - каротин

Каротиноиды нерастворимы в воде, растворимы в жирных маслах, хлороформе, эфире, ацетоне, бензине и трудно растворимы в спирте. Легко окисляются кислородом воздуха, разрушаются на свету.

Витамин А (ретинол) способствует нормализации обмена веществ, росту и развитию организма, регенерации тканей, обеспечивает нормальную деятельность органов зрения. Недостаток вызывает ухудшение сумеречного зрения («куриную слепоту»), сухость роговицы, поражение слизистых.

Источниками промышленного получения *бета*-каротина служат свежие корнеплоды моркови посевной и свежая мякоть плодов различных сортов тыквы.

Витамины группы К - производные 2-метил-1,4-нафтохинона. В природе данные витамины представлены несколькими соединениями, в высших растениях находится только витамин K_1 , или филлохинон.



Витамин К₁ (филлохинон)

Длинная боковая изопреноидная цепь витамина К₁ является остатком дитерпенового алифатического спирта фитола (см. раздел «Терпеноиды»). Витамин К₁ - филлохинон - вязкое маслообразное вещество желтого цвета. Нерастворим в воде, растворим в жирных маслах и органических растворителях. Стоек при длительном кипячении с водой, но быстро разрушается при нагревании в растворах щелочей. Флуоресцирует в УФ-свете красным светом, затем флуоресценция становится зеленой, а под действием спиртового раствора калия гидроксида - оранжевой. Витамин К₁ легко окисляется, быстро разрушается под действием УФ-лучей.

Витамины группы К участвуют в свертывании крови, индуцируя образование протромбина (антигеморрагический фактор). Недостаток вызывает замедление свертывания крови и кровоизлияния.

Витамины группы Е - производные хромана. Витамины Е - смесь высокомолекулярных спиртов – токоферолов. Наиболее активен *бета*-токоферол. Токоферолы не растворяются в воде, растворимы в жирных маслах и органических растворителях. Соединения нестойкие, легко разрушаются под действием света и кислорода воздуха. Витамины группы Е являются природными антиоксидантами, участвуют в биосинтезе белков, тканевом дыхании, процессах размножения, влияют на состояние сердечно-сосудистой и нервной систем.

Витамины группы F - высоконепредельные жирные кислоты с 18-20 углеродными атомами: линолевая – $C_{17}H_{31}COOH$, линоленовая – $C_{17}H_{29}COOH$, арахидоновая – $C_{19}H_{31}COOH$ – кислоты.

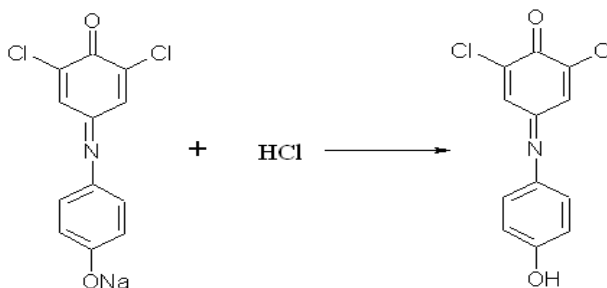
Физические и химические свойства описаны в разделе «Жирные масла». Участвуют в липидном обмене, препятствуют отложению холестерина на стенках кровеносных сосудов. Из витаминов F в тканях образуются простагландины.

Витамины, в целом, участвуют в окислительно-восстановительных процессах в организме. Многие из них (витамины С, Р, К, Е, каротиноиды) являются природными антиоксидантами. Они защищают клеточные и субклеточные мембраны от повреждения активными свободными радикалами, нейтрализуя активные свободные радикалы путем связывания их непарных электронов.

Оценка качества сырья, содержащего витамины. Методы анализа

Согласно существующей нормативной документации подтверждают присутствие **витамина К₁** только в листьях крапивы. Метод определения хроматографический. Определение основано на способности витамина К₁ флуоресцировать в УФ-свете. Экстрагируют из растительного сырья витамин К₁ гексаном. Хроматографическое разделение проводят восходящим способом на пластинке «Силуфол» при температуре 40-70 °С. Система растворителей: бензол - петролейный эфир (1:1). Готовую хроматограмму высушивают на воздухе 2-3 мин и выдерживают в УФ-свете при длине волны 360 нм в течение 2 мин, должно появиться пятно с желто-зеленой флуоресценцией. Количественное определение витамина К₁ в сырье не проводится.

Качественное и количественное определение содержания **витамина С** в лекарственном растительном сырье связано с использованием натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята. Для количественного определения кислоты аскорбиновой в плодах шиповника навеску сырья экстрагируют горячей водой и аликвоту экстракта титруют раствором реактива, который имеет синий цвет. Кислота аскорбиновая способна окисляться до дегидроформы раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята и восстанавливать последний до лейкоформы (стадия 1). Точка эквивалентности устанавливается появлением розового окрашивания, не исчезающего в течение 30-60 сек, которое свидетельствует об отсутствии восстановителя, т.е. кислоты аскорбиновой (2,6-дихлорфенолиндофенол имеет в щелочной среде синее окрашивание, в кислой – красное, а при восстановлении обесцвечивается) (стадия 2).



Для качественного определения часть водного экстракта хроматографируют на пластинках «Силуфол» или «Сорбфил», высушивают и обрабатывают указанным реактивом (нанеся одновременно раствор свидетеля – чистой кислоты аскорбиновой) – пятна кислоты аскорбиновой выглядят бесцветными на синем фоне.

Для качественного обнаружения **каротиноидов** можно использовать химические реакции и хроматографию на силикагеле. Каротиноиды извлекают из сырья хлороформом и к хлороформному извлечению прибавляют кислоту серную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в слой кислоты серной) или кислоту азотную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в зеленое и грязно-желтое). Хроматограммы проявляют 10 % этанольным раствором кислоты фосфорномолибденовой, нагревают в сушильном шкафу при температуре 60-80°C несколько минут. На желто-зеленом фоне появляются синие пятна каротиноидов.

Для количественного определения каротиноидов в лекарственном сырье используют фотоколориметрический или спектрофотометрический методы. В качестве стандарта применяют раствор калия бихромата. Из сырья каротиноиды извлекают абсолютным спиртом, петролейным эфиром. Извлечения высушивают над безводным натрием сульфатом перед определением оптической плотности

Медицинское применение сырья и препаратов, содержащих витамины

Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, и лекарственные средства на его основе обладают широким спектром фармакологического действия. Действие обусловлено витаминами и другими биологиче-

ски активными веществами, содержащимися в сырье: флавоноидами, дубильными веществами и др.

Действие витаминов заместительное (восполняющее витаминную недостаточность), либо фармакологическое (влияющее на течение ферментативных процессов, повышающее иммунные, защитные силы). Например: введение в организм витамина С повышает фагоцитарную активность лейкоцитов. Витамин С усиливает фармакологическое действие лекарственных веществ и снижает их побочное токсическое действие. Каротиноиды оказывают противовоспалительное и ранозаживляющее действие.

Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, используют как:

поливитаминные средства - плоды черной смородины, плоды рябины обыкновенной, плоды шиповника, листья крапивы;

кровоостанавливающие средства – цветки и листья зайцегуба, листья крапивы, кора калины, трава пастушьей сумки, трава тысячелистника;

ранозаживляющие и противоязвенные средства - масло облепихи и масло шиповника, трава череды, трава сушеницы топяной;

противовоспалительное и антисептическое средство - цветки календулы;

противовоспалительное и противоаллергическое средство - трава череды;

желчегонные средства - кукурузные столбики с рыльцами, плоды шиповника;

мочегонные средства - плоды и листья земляники, трава череды.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

Практическая работа №1. Проведите качественное определение витаминов в растительном сырье

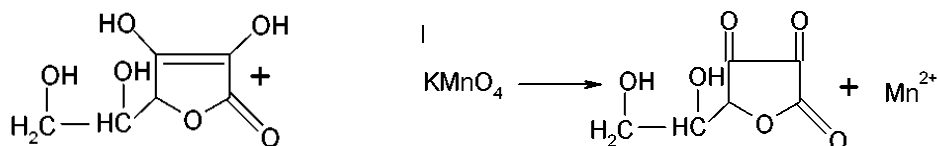
Задание 1. Экстракция аскорбиновой кислоты и лекарственного растительного сырья

Методика. Отвешивают 5 г растительного сырья (плоды шиповника), измельчают в фарфоровой ступке и добавляют 50 мл дистиллированной воды. Полученную смесь настаивают 10 минут, затем фильтруют или центрифугируют.

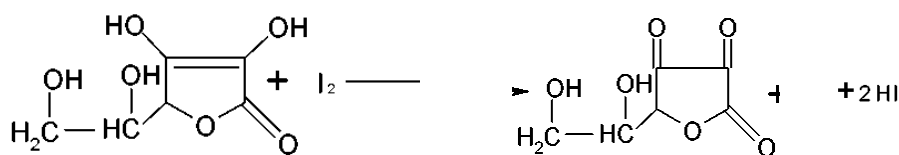
Задание 2. Качественное определение аскорбиновой кислоты в извлечении из растительного сырья

Проведите качественные реакции на присутствие аскорбиновой кислоты в полученном извлечении из лекарственного растительного сырья. Качественное определение аскорбиновой кислоты основано на ее высокой восстановительной способности.

1. Реакция с калия перманганатом. К 1 мл реактива раствора перманганата калия по каплям добавляют извлечение из сырья, содержащее аскорбиновую кислоту. Наблюдают обесцвечивание раствора перманганата калия вследствие восстановления марганца до Mn^{2+} .



2. Реакция с раствором йода. К 1 мл реактива раствора йода по каплям добавляют извлечение из сырья, содержащее аскорбиновую кислоту. Наблюдают обесцвечивание раствора.



3. Реакция с солью железа (II). К 1 мл извлечения добавляют 1 мл раствора гидрокарбоната натрия и 1 мл сульфата железа (II). Наблюдают образование аскорбината железа фиолетового цвета.

4. Реакция с раствором нитрата серебра. К извлечению прибавляют 1 мл раствора нитрата серебра, при этом выпадает осадок металлического серебра. При этом происходит восстановление серебра, а аскорбиновая кислота окисляется в кетоформу.

Сделайте выводы исходя из полученных результатов.

Задание 3. Проведите хроматографическое исследование аскорбиновой кислоты в плодах шиповника

Методика

1. В ступке измельчают 0,5 г плодов шиповника, заливают 5 мл воды, перемешивают, оставляют на 15 мин и фильтруют.
2. Полученное извлечение наносят капилляром на пластинку (один капилляр), рядом как свидетель наносят чистую аскорбиновую кислоту.
3. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей *этилацетата - ледяная уксусная кислота* (80:20).
4. Хроматографирование ведут 20 мин (пробег растворителя 13 см), после чего хроматограмму высушивают на воздухе и обрабатывают парами йода.
5. Рассчитывают значение R_f исследуемого вещества и свидетеля и делают вывод о содержании аскорбиновой кислоты в исследуемом извлечении.

Задание 4. Проведите хроматографическое исследование каротиноидов в цветках календулы

Навеску 2,0 г сырья помещают в колбу с притертой пробкой и заливают до зеркала гексаном, для получения экстракта выдерживают 2-3 сут. Полученное извлечение отфильтровать и экстракт хроматографировать на наличие каротиноидов в системах растворителей:

Бензол-петролейный эфир-ацетон (20:5:4)

Бензол-петролейный эфир-ацетон-этанол (40:40:4:1)

Циклогексан – эфир (80:20).

Проявить хроматограмму в УФ-свете. Каротиноиды дают темно-коричневую флуоресценцию. При дневном свете каротиноиды видны в виде желтоватых пятен.

Практическая работа №2. Проведите качественное определение свободных органических кислот

Для качественного определения свободных органических кислот водное извлечение из растительного сырья хроматографируют на пластинках «Сорбфил» в системе растворителей этиловый спирт-аммиак-вода (13 : 4 : 3) с последующим проявлением 0,1% раствором бромтимолового синего. Идентифицируют с достоверными образцами органических кислот и их значениями R_f .

Значения R_f Органических кислот

Название кислоты	Значения R_f
Винная	0,37
Яблочная	0,42
Щавелевая	0,50
Янтарная	0,52
Аскорбиновая	0,57
Муравьиная	0,79
Сорбиновая	0,84

Примечание: 1. Подготовка пластинок. Пластины «Силуфол УФ 254» 15 x 15 см, «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 ч. Пятна исследуемых растворов наносят на линию старта, проведенную вдоль линий накатки.

Практическая работа №3. Определите количественное содержание кислоты аскорбиновой в плодах шиповника

Методика (ГФ XI изд, вып.2, (ст. 38) : Из грубо измельченной аналитической пробы плодов берут навеску массой 20 г, помещают в фарфоровую ступку, где тщательно растирают со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивают 10 минут. Затем смесь размешивают и извлечение фильтруют. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2% хлористоводородной кислоты, 13 мл воды, помещивают и титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30-60 секунд. Титрование продолжают не более 2 минут. В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты (расход раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) более 2 мл обнаруженного пробным титрованием, исходное извлечение разбавляют водой в 2 раза или более.

Содержание аскорбиновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times 300 \times 100 \times 100}{m \times 1 \times (100 - W)},$$

где 0,000088 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6 - дихлорфенолиндофенолята- натрия (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

m - масса сырья в граммах;

W - потеря в массе сырья при высушивании в процентах.

Примечания

Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л): 0,22 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия растворяют в 500 мл свежeproкипяченной и охлажденной воды при энергичном взбалтывании (для растворения навески раствор оставляют на ночь). Раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки. Срок годности раствора не более 7 суток при условии хранения в холодном, темном месте.

Установка титра. Несколько кристаллов (3-5) аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл 2 % раствора серной кислоты; 5 мл полученного раствора титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 1-2 нед.

Другие 5 мл этого же раствора аскорбиновой кислоты титруют раствором калия йодата (0,001 моль/л) в присутствии нескольких кристаллов (около 2 мг) калия йодида и 2-3 капель раствора крахмала до появления голубого окрашивания.

Поправочный коэффициент (K) вычисляют по формуле:

$$K = \frac{V}{V_1}$$

V - объем раствора калий йодата (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах

V₁ - объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, в миллилитрах.

Практическая работа №3. Определите количественное содержание свободных органических кислот в плодах шиповника

Методика (ГФ XI изд). Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. 25 г измельченных плодов шиповника помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 200 мл воды и выдерживают в течение 2 ч на кипящей водяной бане, затем охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают. Отбирают 10 мл извлечения, помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200—300 мл свежeproкипяченной воды, 1 мл 1 % спиртового раствора фенолфталеина, 2 мл 0,1 % раствора метиленового синего и титруют

раствором натра едкого (0,1 моль/л) до появления в пене лилово-красной окраски.

Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,0067 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 10 \times (100 - W)}$$

где 0,0067 — количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл раствора натра едкого (0,1 моль/л), в граммах; V — объем раствора натра едкого (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах; m — масса сырья в граммах; W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

После выполнения экспериментов сделайте заключение и заполните следующую таблицу.

1. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту				
Название реакции		Реактивы		результат
1.				
2.				
2. Хроматографическое исследование извлечений				
Вид извлечения	Хроматографическая система	Расстояние от линии старта до середины пятна	Расстояние от линии старта до фронта растворителя	R _f
3. Количественное определение аскорбиновой кислоты				
Метод	Данные нормативной документации		Полученный результат	
4. Количественное определение органических кислот				
Метод	Данные нормативной документации		Полученный результат	

РАЗДЕЛ 5: ЛИПИДЫ

Цель занятия: освоить методы анализа на доброкачественность жирного масла и анализа лекарственного растительного сырья, содержащего липиды.

Этапы достижения цели:

1. Овладеть методикой проведения анализа качества жирного масла в лекарственном растительном сырье;
2. Овладеть методикой определения количественного содержания липидов в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте определение понятия жиры.
2. Приведите классификацию жиров.
3. Приведите классификацию жирных масел.
4. Приведите общую формулу жира.
5. Напишите формулы триглицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, рицинолевой кислот.
6. Дайте характеристику жирных кислот, входящих в состав жиров.
7. Напишите формулы пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линоленовой, линолевой, рицинолевой.
8. Охарактеризуйте физико-химические свойства жиров и жирных масел.
9. Охарактеризуйте метод количественного определения липидов в растительных объектах.
10. Назовите и охарактеризуйте физические и химические показатели жирных масел, методы их определения и аналитическое значение.

Учебный материал по теме

Понятие о жирах, их строение

Жиры - это сложные смеси органических веществ растительного и животного происхождения, представляющие собой преимущественно смеси различных глицеридов, т.е. сложных эфиров глицерина и высокомолекулярных жирных кислот

Жиры относятся к многокомпонентным липидам. Глицериды (ацилглицерины) бывают *однокислотные*: $R_1=R_2=R_3$ и *разнокислотные* (смешанные): $R_1 \neq R_2 \neq R_3$. Однокислотные триглицериды в природе встречаются редко. Примером являются оливковое масло (глицерин этерифицирован олеиновой кислотой) и касторовое масло (глицерин этерифицирован рицинолевой кислотой). Подавляющее большинство жиров - смеси различных глицеридов. В настоящее время известно свыше 1300 различных жиров, различающихся по составу жирных кислот. Жирных кислот в природных жирах обнаружено более 200. Жирные кислоты, как правило, имеют одну карбоксильную группу и неразветвленную углеводородную цепь с четным числом углеродных атомов: от 8 до 24. Наиболее распространенные:

1. *Предельные, или насыщенные кислоты* ($C_nH_{2n+1}COOH$):

$C_{15}H_{31}COOH$ - пальмитиновая кислота;

$C_{17}H_{35}COOH$ - стеариновая кислота.

2. Непредельные, или ненасыщенные кислоты.

В большинстве растительных масел двойная связь находится между 9C и ^{10}C атомами углеродной цепи. Если двойных связей больше одной (число двойных связей может быть от 1 до 9), то они располагаются обычно через три углеродных атома. Фрагмент углеродной цепи, примыкающий к карбоксильной группе ($=^9CH - (CH_2)_7 - COOH$) свободен от двойных связей.

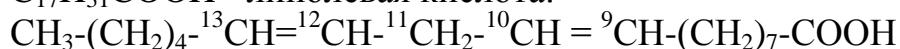
2.1. Кислоты с одной двойной связью:

$C_{17}H_{33}COOH$ - олеиновая кислота, в природе встречается в *цис*-форме:

$C_{17}H_{32}ONCOOH$ - рицинолевая (оксиолеиновая) кислота:

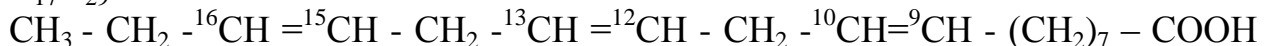
2.2. Кислоты с двумя двойными связями:

$C_{17}H_{31}COOH$ - линолевая кислота:



2.3 Кислоты с тремя двойными связями:

$C_{17}H_{29}COOH$ - линоленовая кислота:



Встречаются жирные кислоты, имеющие больше трех двойных связей. Так, в рыбьем жире присутствует арахидоновая кислота - с 4-мя двойными связями; в жире морских животных - клупадоновая кислота - с 5-ю двойными связями.

Обычно в составе глицеридов находятся 4-7 кислоты главных и несколько сопутствующих. 75 % жиров составляют глицериды всего трех кислот - пальмитиновой, олеиновой и линолевой.

Кроме триглицеридов в состав жиров входят стерины (фитостерины и зоостерины соответственно), пигменты (хлорофилл, каротиноиды), жирорастворимые витамины (группы А, Е, D, К, F), свободные жирные кислоты, белки, слизи и другие вещества.

Отдельные компоненты жиров проявляют фармакологическое действие (каротиноиды, хлорофилл), другие - токсичны. Например: токсальбумин рицин в семенах клещевины при приеме внутрь вызывает сильнейшее воспаление слизистой кишечника (6 семян смертельны для детей, 20 - для взрослых).

Классификация жиров

Существует несколько классификаций жиров:

1. По химическому составу (однокислотные и смешанные).
2. По происхождению.
3. По консистенции.

4. По физико-химическим свойствам (по свойству высыхаемости).



Высыхание - сложный физико-химический процесс. При достаточно длительном контакте с воздухом происходит окисление масла, конденсация, полимеризация, коллоидные превращения. На поверхности масла формируется прозрачная, напоминающая смолу, эластичная или твердая пленка. Масла, не образующие пленку, называют *невысыхающими*. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды олеиновой кислоты (с 1-й двойной связью). Масла, образующие мягкие пленки, называют *полувсыхающими*. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды линолевой кислоты (с 2-я двойными связями). Масла, образующие плотную пленку, называют *высыхающими*. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды линоленовой кислоты (с 3-я двойными связями).

Физические и химические свойства жиров

Физические свойства. Жиры при обычной температуре имеют плотную или мягкую консистенцию. Жирные масла являются густыми, прозрачными жидкостями. На бумаге жиры оставляют жирное пятно, которое при нагревании еще сильнее расплывается (отличие от эфирных масел). Окраска, запах и вкус жиров зависят от сопутствующих веществ. Окраска чаще белая или желтоватая. Запах отсутствует или слабый, специфический. Вкус нежный и маслянистый, реже неприятный, как у касторового масла. Жиры легче воды, плотность от 0,910 до 0,970. Большинство жиров оптически неактивны. Исключение составляет касторовое масло. Показатель преломления (коэффициент рефракции) характерен и постоянен для каждого масла. Так, у оливкового масла он составляет 1,46-1,71. Чем выше молеку-

лярная масса глицеридов и чем больше двойных связей, тем выше показатель преломления. Все жиры нерастворимы в воде, мало растворимы в этаноле, легко растворимы в эфире, хлороформе, петролейном эфире. Исключение: касторовое масло легко растворимо в 96 % этаноле, трудно - в петролейном эфире. Сами жиры являются хорошими растворителями для многих лекарственных веществ (камфора, гормоны, эфирные масла и др.). Жиры хорошо смешиваются между собой.

Химические свойства жиров обусловлены наличием:

- 1) сложных эфирных связей;
 - 2) двойных связей в углеводородных радикалах жирных кислот;
 - 3) наличием глицерина в составе жира.
- 1.1. Жиры легко подвергаются *гидролитическому расщеплению при участии ферментов* с образованием глицерина и жирных кислот. Ферментативный гидролиз происходит ступенчато. Фермент липаза содержится во всех семенах масличных растений. Гидролизу способствуют влага и повышенная температура. Происходит гидролитическое прогоркание жира. Указанное свойство учитывается при хранении жиров.
- 1.2. Жиры *расщепляются под действием щелочей* с образованием глицерина и солей жирных кислот. Соли называют мылами: калиевые мыла - жидкие, натриевые - твердые. Процесс называют омылением. Свойство используется при анализе жиров. На нем основано производство мыл и шампуней.
2. По двойным связям жирных кислот могут присоединяться водород, галогены, кислород.
- 2.1. *Присоединение водорода* - гидрирование жиров (гидрогенизация жиров) идет при повышенной температуре в присутствии катализатора (никель). Непредельные жирные кислоты переходят в предельные, жидкие масла превращаются в твердые. Получают саломассы, их используют в медицинской практике как мазевые и суппозиторные основы (бутирол) и в пищевой промышленности (производство маргарина).
- 2.2. *Присоединение галогенов* используют в анализе жиров при определении химической константы - йодного числа.
- 2.3. *Присоединение кислорода воздуха* приводит к окислению и прогорканию жиров. Различают химическое окисление (альдегидное) и биохимическое при участии микроорганизмов (кетонное).

Жиры приобретают специфический вкус и запах и становятся непригодными к употреблению. Изменяется цвет жира (чаще жиры обесцвечиваются); изменяются физические и химические свойства: увеличиваются плотность и кислотное число, уменьшаются йодное число и вязкость. Различают 3 вида *окислительного прогоркания*:

а) *неферментативное* - кислород присоединяется по месту двойных связей, образуя пероксиды; при разложении пероксидов жирных кислот получают альдегиды.

б) *ферментативное* с участием липоксидаз и липоксигеназ, образуются гидропероксиды.

Гидропероксиды способны окислять биологически активные вещества, содержащиеся в масле, например каротиноиды. Гидропероксиды подвергаются разложению с образованием альдегидов и кетонов. Свойство учитывают при хранении жиров и при их анализе.

в) *ферментативное (кетонное)* - происходит при участии микроорганизмов.

3. *Глицерин*, входящий в состав жира, подвергается *окислению* и *дегидратации* при нагревании жира с концентрированной кислотой серной. При этом образуется альдегид акролеин, имеющий неприятный запах. Акролеиновая проба позволяет отличить жиры от жироподобных веществ.

Биосинтез жиров в растениях

Исходными продуктами в биосинтезе жирных масел являются углеводы. Из них образуются жирные кислоты и глицерин. В процессе созревания семян вначале накапливаются жирные кислоты, причем сначала насыщенные, а затем из них образуются ненасыщенные кислоты. Далее при участии фермента липазы идет реакция соединения кислот и глицерина, образуется жир. Жирное масло из незрелых семян имеет повышенную кислотность. В прорастающих семенах происходит обратный процесс: жир распадается до углеводов, промежуточными продуктами распада являются жирные кислоты.

Методы выделения жиров из сырья, их очистка

Извлекают жиры из масличных растений прессованием или экстракцией. *Прессование* может быть холодным и горячим. Для медицинских целей масла получают *холодным прессованием*, т.е. без поджаривания семян и в холодных прессах. При этом выход масла меньше, а качество лучше. Этим методом получают масла, используемые для парентерального применения (миндальное, персиковое, т.е. невысыхающие масла). Масла, полученные *горячим прессованием*, загрязнены посторонними веществами (смолами, фитостеринами, белками) и имеют слабокислую реакцию из-за частичного расщепления триглицеридов. Их используют после очистки для наружного и внутреннего применения, но не парентерально.

Экстракцию жиров проводят бензином, гексаном, дихлорэтаном и другими экстрагентами. Полученные масла имеют неприятный вкус и запах. Их используют в технике, в медицине не применяют. Получение животных жиров проводят способом *вытапливания*. Различают мокрый и сухой способ. По первому способу сырье обрабатывают острым паром под давлением в 3-4 атм или в автоклавах. По второму способу жир вытапливают на открытом огне. Расплавленный жир сливают в отстойники для отделения воды и белков. Для улучшения качества жира его в дальнейшем вновь расплавляют, отстаивают, рафинируют.

Очистку (*рафинирование*) жира проводят для удаления примесей, попавших в жир в процессе его получения. Метод очистки зависит от характера и природы примесей. Методы рафинирования:

1. *Метод механический* - отстаивание, центрифугирование, фильтрование, т.е. отделение механических примесей (обрывков паренхимы, сосудов).

2. *Метод коагулирования* - для удаления белковых и слизистых веществ. Осуществляется путем пропускания горячего пара при температуре около 60 °С. После коагулирования жир отстаивают и фильтруют.
3. *Метод нейтрализации* (щелочная очистка) - для удаления свободных жирных кислот. Одновременно жиры осветляются. Мыла отмывают водой.
4. *Метод вымораживания* - для удаления глицеридов предельных кислот из невысыхающих медицинских масел, применяемых для парентерального применения.

Для освобождения от дурно пахнущих веществ (летучих жирных кислот) применяют *метод дезодорации*. Масло обрабатывают перегретым паром под вакуумом. Дезодорацию окислителями для медицинских масел не проводят.

Оценка качества сырья, содержащего жиры. Методы анализа

Нормативная документация предусматривает *качественные реакции* на жиры при проведении микроскопического анализа плодов и семян (ГФ XI, вып. 1, с. 279). Поперечный срез помещают в раствор судана III и подогревают; капли жирного масла окрашиваются в оранжево-розовый цвет. Этой реакцией, в частности, подтверждают наличие капель жирного масла в эндосперме семян льна.

Метод количественного определения жиров в лекарственном растительном сырье гравиметрический. Метод основан на растворимости жиров в органических растворителях. Наиболее широко распространены методы, основанные на экстракции масла из определенных навесок и последующим взвешиванием полученного масла или высушенного обезжиренного остатка после удаления растворителя. Экстракцию масла проводят в аппарате Сокслета. Аппарат состоит из трех частей: плоскодонной колбы, экстрактора, обратного холодильника. В экстрактор помещается пакет фильтровальной бумаги, содержащий навеску: пакет подвергается многократному воздействию низки кипящих растворителей. В качестве растворителей жирного масла применяют хлороформ, четыреххлористый углерод, гексан и др.

Наиболее часто используют метод Сокслета и метод Рушковского. По методу Сокслета определяют массу жирного масла после отгона органического растворителя. По методу Рушковского о массе жирного масла судят по убыли массы навески сырья после обработки органическим растворителем. Определение длительное (от 16 до 72 часов) и недостаточно точное, т.к. извлекаются не только жиры, но и пигменты, каротиноиды, смолистые вещества.

Анализ жирных масел

В медицинской практике используют жиры, которые должны быть стандартизованы, т.е. отвечать требованиям НД. Индивидуальные фармакопеевые статьи на конкретные жирные масла включены в ГФ X и ГФ IX.

Общая статья «*Olea pingua* - Масла жирные» включена в ГФ X, с. 472. Статья методического плана: регламентирует приемы и порядок выполнения анализа. Цель анализа: установление *подлинности* (соответствие природе

масла) и *доброкачественности* (соответствие требованиям НД) жирного масла.

Подлинность характеризуют количественное соотношение триглицеридов, качественный состав радикалов жирных кислот и присутствие типичных для данного масла сопутствующих веществ.

Для установления подлинности определяют органолептические и числовые показатели, проводят специфические реакции.

1. *Органолептические показатели*: цвет, вкус, запах.

Цвет и прозрачность жидких жиров определяют, поместив испытуемое масло в цилиндр прозрачного стекла и наблюдая в дневном проходящем свете. Вкус и запах определяют, нанеся масло на фильтровальную бумагу.

2. *Числовые показатели* - это физические и химические константы. *Физические константы*: растворимость в этиловом спирте, температура плавления для твердых жиров, плотность и показатель преломления. Они характерны и постоянны для каждого масла.

Растворимость зависит от состава и структуры триглицеридов. Триглицериды низкомолекулярных предельных жирных кислот довольно хорошо растворяются в этиловом спирте. Глицериды высокомолекулярных предельных кислот растворяются в спирте лишь при нагревании до 60 °С. Глицериды рицинолевой кислоты хорошо растворяются в спирте. Триглицериды ненасыщенных кислот практически не растворяются в спирте. Температура плавления (затвердевания) зависит от структуры триглицеридов. Так, масло какао (олеиново-стеариново-пальмитиновое) плавится при температуре 30-34 °С. Масло касторовое при охлаждении до -16°С застывает в белую мазеобразную массу.

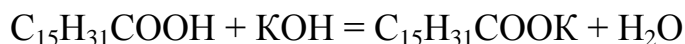
Плотность - по этой константе можно судить не только о подлинности данного масла, но и о том, к какой группе оно относится:

- у масел невысыхающих плотность 0,913-0,925;
- у масел высыхающих плотность 0,920-0,940.

Показатель преломления - по величине показателя преломления в сочетании с другими показателями можно отличить один жир от другого. Например, показатель преломления оливкового масла 1,46-1,71, льняного - 1,48-1,87. Чем больше двойных связей и чем выше молекулярный вес глицеридов, тем выше показатель преломления.

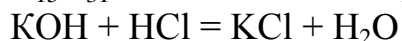
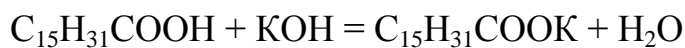
Химические константы: кислотное число, число омыления, йодное число и перекисное число.

Кислотное число (к.ч.) - это количество мг калия гидроксида, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в одном грамме исследуемого жира. Определяют методом прямого алкалометрического титрования после растворения масла в смеси этанола и эфира. Индикатор - фенолфталеин.



Число омыления (ч.о.) - это количество мг калия гидроксида, необходимое для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого масла. Определяют методом обратного

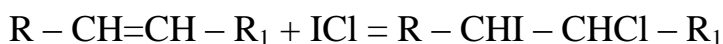
титрования. Избыток КОН титруют раствором НСl. Индикатор - фенолфта-
леин.



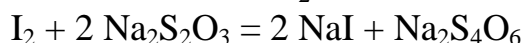
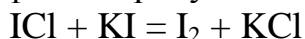
Число омыления характеризует среднюю величину молекулярного веса глицеридов и находится от нее в обратной зависимости. Значительная часть медицинских жиров представлена смесью глицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, которые имеют близкий молекулярный вес, поэтому и числа омыления медицинских жиров близки и лежат в пределах 170-200.

Йодное число (й.ч.) - это количество граммов йода, связываемое 100 г исследуемого вещества. Этот показатель характеризует среднюю степень ненасыщенности радикалов жирных кислот глицеридов, раскрывает соотношение в масле предельных и непредельных кислот. По величине йодного числа можно судить, к какой группе по высыхаемости относится испытуемое масло: й.ч. твердых жиров составляет от 20 до 60 (й.ч. масла какао 32-38); й.ч. невысыхающих масел - 80-100; й.ч. полувсыхающих масел - 110-160; й.ч. высыхающих масел - 170-200.

ГФ XI предлагает йодхлорометрический метод определения йодного числа. ГФ X предлагает 2 метода определения йодного числа: йодбромометрический и йодхлорометрический. Методы титриметрические (обратное титрование), основаны на свойстве радикалов жирных кислот, входящих в состав масла, по двойным связям присоединять галогены. Масло растворяют в органическом растворителе и добавляют избыток йода монохлорида (йода монобромид). Присоединение галогенов по месту двойных связей идет постепенно, начиная от двойных связей, наиболее удаленных от эфирной группировки.

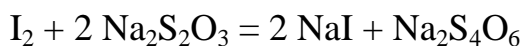


Через 1 час добавляют раствор калия йодида и воду. Не израсходованный в процессе реакции йода монохлорид (йода монобромид) вступает во взаимодействие с калия йодидом, выделяется свободный йод, который далее титруют раствором натрия тиосульфата в присутствии раствора крахмала.



Кислотное число, число омыления и йодное число являются показателями как подлинности, так и доброкачественности.

Перекисное число (п.ч.) - это показатель только доброкачественности жирного масла. Регламентирует его ГОСТ 26593-85. Метод основан на способности пероксидов и гидропероксидов, содержащихся в образце масла, окислять калия йодид. Выделившийся йод титруют раствором натрия тиосульфата в присутствии раствора крахмала.



3. *Специфические качественные реакции* подлинности предусмотрены частными статьями на соответствующие жирные масла. Эти реакции проводят на

радикалы жирных кислот и на сопутствующие вещества (естественные примеси, которые попадают в жир в ходе выделения из растительных и животных объектов):

на радикалы жирных кислот в миндальном, персиковом и оливковом масле проводят элаидиновую пробу (проба на олеиновую кислоту): под действием азотистой кислоты *цис*-форма олеиновой кислоты (жидкое масло) переходит в *транс*-форму (масло кристаллизуется через 2-8 часов).

на естественные примеси: Липохромы определяют: в миндальном и персиковом маслах: реакция с концентрированной кислотой серной и дымящей кислотой азотной - миндальное масло дает желтую окраску, персиковое, абрикосовое, сливовое – красную;

в рыбьем жире: реакция с концентрированной кислотой серной в хлороформе – наблюдают скоро проходящие окраски: желтая - сине-фиолетовая – бурая;

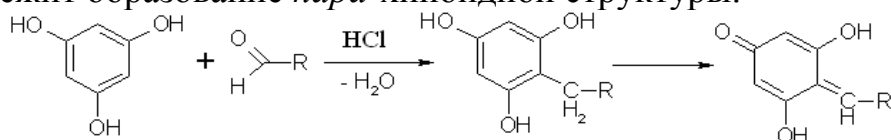
в масле подсолнечном (к медицинскому применению допускается нерафинированное масло высшего и первого сорта) и льняном масле: реакция с концентрированной кислотой азотной и резорцином в бензоле - наблюдают скоро проходящее сине-фиолетовое окрашивание.

Витамин А определяют в рыбьем жире: реакция с сурьмы хлоридом - нестойкое голубое окрашивание.

Доброкачественность жиров характеризуется сохранностью их составных компонентов и отсутствием примесей и подмесей.

Присутствие *продуктов гидролиза* (избытка кислот) и *окисления* (продуктов разложения жира) можно установить по изменению органолептических и числовых показателей. При окислении жиров меняется цвет (идет обесцвечивание липохромов), появляется резкий запах и раздражающий вкус, благодаря присутствию перекисей, альдегидов, кетонов. Примеси продуктов окисления меняют интервал температуры плавления и застывания, увеличивают растворимость в спирте, повышают плотность и показатель преломления (физические константы); увеличивают кислотное число, число омыления, перекисное число (возрастает количество низкомолекулярных продуктов окисления) и уменьшают йодное число.

Проводят специальную пробу Крейса на присутствие перекисей, альдегидов, кетонов (проба на прогоркание масла). Масло взбалтывают с равными объемами концентрированной кислоты хлористоводородной и эфирного раствора флороглюцина - не должно быть розового окрашивания. В основе определения лежит образование *пара*-хиноидной структуры.



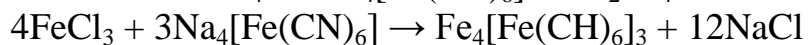
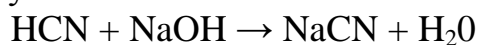
Проводят пробу на способ получения жира - определяют наличие *сопутствующих жирам веществ*, растворимых в органических растворителях - экстрагентах и жирах. Эти вещества попадают в жирные масла при горячем прессовании и экстракции.

Проба с концентрированной кислотой серной и хлороформом: масло, полученное холодным прессованием, окрасится в красно-бурый цвет за счет окисления, дегидратации, полимеризации; если масло получено горячим прессованием или экстракцией, то - в черно-бурый цвет.

Для невысыхающих жирных масел для парентерального применения (масло персиковое, миндальное) частными статьями предусмотрено определение *белков, воды, цианидов, синильной кислоты и мыла*, которые попадают в ходе получения и некачественной очистки масла.

Отсутствие примесей белков и воды в персиковом и миндальном маслах определяют растворением в бензине. Определение основано на разной растворимости жирного масла и примесей.

Отсутствие цианидов и синильной кислоты определяют реакциями образования берлинской лазури - не должно быть синего окрашивания жидкости или бумаги.



берлинская лазурь

Определение мыла в жирных маслах основано на установлении щелочной реакции солей жирных кислот. Определяют индикатором фенолфталеином - не должно быть розового окрашивания. Если жирное масло предназначено для приготовления инъекционных растворов (миндальное, персиковое масло), то определение мыла проводят после сжигания навески масла. Остаток после сжигания растворяют в воде и прибавляют индикатор - мыла в масле не должно быть более 0,001 %. Если жирное масло не предназначено для приготовления инъекционных растворов, то определение мыла проводят после кипячения навески масла с водой в присутствии индикатора - мыла в масле не должно быть более 0,01 %.

Посторонние примеси (подмеси-фальсификаторы) определяют косвенно по изменению числовых или органолептических показателей или прямым определением.

Наличие подмесей меняет физические константы: повышаются плотность и показатель преломления, характерные для данного масла. Воск, вазелин, парафин, смолы снижают показатели числа омыления, йодного, кислотного и перекисного чисел. Прямое определение вазелинового масла, парафина, восков и смол в составе жирного масла проводят омылением раствором щелочи. В результате реакции омыления образуются соли и глицерин, которые легко растворимы в воде; подмеси - высокомолекулярные углеводороды, воски и смолы - в этих условиях не омыляются и при разведении водой вызывают помутнение раствора.

Пути использования сырья и медицинское применение

Все виды сырья (плоды и семена растений, печень трески и др.), содержащие жирные масла, используют для выделения жирного масла в чистом виде. Переработку сырья ведут на заводах пищевой промышленности. Для медицинских целей жиры закупают.

Для приготовления *экстемпоральных* лекарственных форм, фармакологическое действие которых связано с другими группами биологически активных веществ, используют семена льна и семена горького миндаля. Из семян льна получают слизистый раствор.

Жиры используют:

1. как лекарственные средства;
2. как суппозиторные и мазевые основы;
3. как растворители лекарственных средств и экстрагенты.

Как *лекарственные средства* жиры используют для внутреннего и наружного применения.

При *приеме внутрь* жирные масла оказывают слабительное, антисклеротическое, антирахитическое и гепатопротекторное действие.

Слабительное действие наиболее выражено у касторового масла - масла семян клещевины (*Ricinus communis*) из сем. Euphorbiaceae. В организме человека касторовое масло гидролизруется. Свободная рицинолевая кислота раздражает стенки кишечника, усиливает перистальтику и облегчает эвакуацию содержимого кишечника. Действие проявляется через 2-5 часов. Касторовое масло нарушает пищеварение в тонком кишечнике, поэтому используется ограниченно. Легкий послабляющий эффект при хронических запорах оказывают принятые на ночь миндальное, оливковое, кунжутное и др. масла. Жирные масла размягчают каловые массы, способствуют их эвакуации. Жирные масла обладают *антисклеротическим* (гипохолестеринемическим, гиполипидемическим) действием. Наиболее выражено действие у льняного, подсолнечного, кукурузного, арахисового, хлопкового масел. Биохимическая связь ненасыщенных жирных кислот с уровнем липопротеидов и холестерина в крови в деталях не выяснена, но сам факт не вызывает сомнения. Комплекс ненасыщенных жирных кислот, особенно линоленовая кислота, которая в организме легко превращается в арахидоновую кислоту, изначально не синтезируется в организме человека и должен поступать с пищей. Эти кислоты называют витамином F. Они выполняют в организме роль тканевых регуляторов, участвуют в построении клеточных мембран и в синтезе простагландинов. Производные эйкозанпентаеновой кислоты, имеющей 5 двойных связей, проявляют сосудорасширяющее действие и понижают свертываемость крови. На основе льняного масла получены препараты противосклеротического действия «Линетол» - смесь этиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот и «Липостабил», гиполипидемический эффект обусловлен действием ненасыщенных жирных кислот. Препарат «Эйконол» получен на основе рыбьего жира тканевого (полиненасыщенные жирные кислоты). *Антирахитическим* действием обладает рыбий жир очищенный для внутреннего применения и рыбий жир тресковый витаминизированный. Действие обусловлено высоким содержанием витаминов А и D, рыбий жир используют для профилактики и лечения гипо- и авитаминозов.

Гепатопротекторным действием обладают препараты: «Эссенциале», содержащий фосфолипиды соевого масла, «Холенол» и «Тыквеол», содержащие масло семян тыквы.

Жиры используют для парентерального питания в послеоперационном периоде, при обширных ожогах, тяжелых инфекционных заболеваниях, раке желудка и пищевода. Выпускают препараты «Интралипид» и «Липофундин» - это жировая эмульсия из очищенного соевого масла.

При *наружном применении* растительные масла и рыбий жир способствуют регенерации тканей и заживлению раневой поверхности, в том числе язв. Действие связано с наличием высокого содержания каротиноидов, витаминов А и Е в составе жиров. Жиры и эфиры жирных кислот входят в состав линиментов (бальзамический по А.В. Вишневскому, синтомициновый, стрептоцида, борно-цинковый, «Алором», дерматолого-дегтярный), мазей (от обморожения, Конькова, «Вулнузан», «Эссавен-гель»), аэрозолей («Винизоль», «Камфомен», «Левовинизоль», «Ливиан», «Лифузол»), свечей (антисептические биологические). Как *суппозиторные основы* используют масло какао и жировую основу. Выпускают ректальные суппозитории «Простопин», суппозитории ректальные с полиоксидонием, лютенурина шарики. Как *мазевую основу* используют жир свиной. На свином жире готовят мазь от обморожения, мазь «Биопин», готовят свинцовые пластыри (простой и сложный). Как *растворители* лекарственных средств наибольшую ценность представляют невысыхающие жирные масла: оливковое, миндальное, персиковое. Эти масла используют при изготовлении инъекционных растворов камфоры, половых гормонов («Синэстрол», «Прогестерон», «Тетрастерон», «Пролотестон»), анаболических стероидных средств («Силаболин») и препаратов для внутреннего применения («Пинабин», «Цистенал», «Олиметин»). Невысыхающие масла используют для *приготовления суспензий* для внутримышечного введения («Бисмоверол», «Бийохинол»).

В препаратах для наружного применения может быть использовано полувысыхающее масло, например, подсолнечное. Препарат «Аэкол» - масляный раствор (подсолнечное масло) каротина с добавлением токоферола.

Как *экстрагенты* используют невысыхающие масла, реже полувысыхающие. Например, «Каротелин» - масляный экстракт мякоти плодов шиповника, содержит токоферолы, каротиноиды, ненасыщенные жирные кислоты. К группе экстракционных препаратов можно отнести «Масло облепиховое», «Масло облепиховое из плодов и листьев» и «Масло шиповника». «Масло облепиховое из плодов и листьев» содержит собственно жирное масло околоплодника и семян облепихи и жирорастворимые вещества, извлекаемые масляным экстрагентом. «Масло шиповника» получают из плодиков - орешков шиповника, препарат содержит собственное жирное масло и жирорастворимые вещества. «Масло облепиховое» входит в состав препаратов «Олазол», «Гипозоль», «Облекол».

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Практическая работа №1. Определите подлинность, доброкачественность и чистоту жирных масел по общей фармакопейной статье «Масла жирные – Olea pinguiа».

Задание 1. Запишите в лабораторный журнал схему проведения анализа при исследовании жирных масел.

Задание 2. Органолептический контроль жирных масел

Проведите органолептический анализ образца жирного масла (по заданию преподавателя), испытания на подлинность и на чистоту. Запишите в лабораторном журнале ваши наблюдения и сделайте вывод по результатам анализа.

1. Определение цвета и прозрачности

Цвет и прозрачность определяют, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного стекла диаметром 2-3 см, и наблюдают образец жирного масла в проходящем свете.

2. Определение запаха

Запах определяют, нанося 2 капли масла на полоску фильтровальной бумаги так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и сравнивают запах испытуемого образца с запахом контрольного образца.

3. Определение вкуса

Вкус определяют, прикладывая, к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей масла.

Задание 3. Определение растворимости жирного масла

Проверьте растворимость жирного масла. Результаты занесите в таблицу.

Жирные масла практически нерастворимы в воде, мало растворимы в спирте, легко – в эфире, хлороформе, петролейном эфире. Исключение составляет касторовое масло, легко растворимое в спирте, трудно — в петролейном эфире. Эта особенность используется как показатель подлинности и доброкачественности касторового масла.

Методика. Навеску 1,0 г жирного масла вносят в отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при 20 ± 2 °С. Для медленно растворимых препаратов, требующих для своего растворения более 10 мин, допускается также нагревание на водяной бане до 30 °С. Наблюдения производят после охлаждения раствора до 20 ± 2 °С и энергичного встряхивания в течение 1—2 мин.

Препарат считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются капли масла.

Задание 4. Определение чистоты образца жирного масла

1. Определение примеси парафина, воска, смолы

1 мл масла нагревают с 10 мл 0,5 м спиртового раствора калия гидроксида при непрерывном взбалтывании. При этом омыление наступает очень быстро. Полученный прозрачный раствор не должен мутнеть от добавления 25 мл воды.

2. Определение примеси перекиси, альдегидов (проба Крейса)

1 мл масла взбалтывают в течение 1 мин с 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, прибавляют 1 мл эфирного раствора флороглюцина (1:1000) и перемешивают. Появление розового или красного окрашивания указывает на наличие разложившегося масла, присутствие которого не допускается.

3. Определение примеси мыла

Для жирных масел, не применяемых для приготовления инъекционных растворов, реакцию на присутствие мыла проводят следующим образом: 50 мл воды, смешанной с 10 каплями раствора фенолфталеина, кипятят в конической колбе вместимостью 250 мл в течение 1 мин, при этом раствор должен оставаться бесцветным. Затем к горячей воде приливают 5 г масла и кипятят еще 5 мин, после чего жидкость охлаждают до комнатной температуры, ставят на лист белой бумаги и прибавляют еще 10 капель раствора фенолфталеина. Полученный раствор должен быть бесцветным, что указывает на отсутствие мыла или содержание его не более 0,01 %.

4. Определение примесей цианидов, синильной кислоты.

В небольшую колбу вносят 5 мл масла и 5 мл разведенной серной кислоты. Колбу неплотно закрывают корковой пробкой со щелью в нижней части пробки по диаметру. В щель вставляют полоску фильтровальной бумаги шириной 1 см и такой же длины, чтобы нижний край полоски находился на 1–1,5 см над уровнем жидкости. Нижний конец полоски смачивают 1 каплей едкого натра. Колбу закрывают пробкой со вставленной полоской и ставят на горячую водяную баню на 15 минут. Затем колбу снимают, кончик полоски, смоченной раствором едкого натра, отрезают и помещают в фарфоровую чашку. На бумагу в чашке наносят 1 каплю насыщенного раствора сульфата железа закисного и нагревают на водяной бане 1 минуту. На бумагу в чашке наносят 1 каплю 5 % раствора железа окисного и 1 каплю концентрированной соляной кислоты. Не должно наблюдаться синего или голубого окрашивания жидкости или бумаги.

Задание 5. Проведите качественные реакции на семенные и косточковые масла и реакции подлинности рыбьего жира.

Запишите наблюдения и вывод в тетрадь.

1. Реакция на семенные масла (реакция Беллиера).

В пробирку наливают 2 мл исследуемого масла, осторожно настилают по 1 мл кислоты азотной (плотность 1,4) и 0,15 % раствора резорцина в бензоле. Содержимое энергично перемешивают. Жирные масла, полученные из семян, в течение 5 с. дают красное или сине-фиолетовое окрашивание, которое быстро исчезает. При разделении слоев окраска переходит в бензольный слой.

2. Реакция на косточковые масла (реакция Биберга).

В пробирку помещают 2,5 мл масла, осторожно добавляют 1 мл охлажденной смеси равных объемов воды и кислот серной и азотной концентрированных.

Слабо-желтая окраска образовавшегося раствора указывает на миндальное масло, красноватый цвет — на персиковое или абрикосовое масло.

3. Реакции на рыбий жир

- 0,1 г жира растворяют в 1 мл хлороформа и прибавляют 5 мл раствора сурьмы (III) хлорида; появляется нестойкое голубое окрашивание (витамин А).
- раствор 1 капли жира в 1 мл хлороформа при взбалтывании с 1 каплей

кислоты серной концентрированной окрашивается в сине-фиолетовый цвет, скоро переходящий в бурый (липохром).

Задание 6. Проведите определение плотности образца жирного масла, запишите ее значение в таблицу, сравните с данными фармакопейной статьи и сделайте заключение о доброкачественности жирного масла.

Методика. Чистый сухой пикнометр взвешивают до 0,0002 г, заполняют с помощью маленькой воронки дистиллированной водой немного выше метки, закрывают пробкой и выдерживают в течение 20 мин в термостате, в котором поддерживают постоянную температуру воды 20 °С с точностью до 0,1 °С. При этой температуре уровень воды в пикнометре доводят до метки, быстро отбирая излишек воды при помощи пипетки или свернутой в трубку полоски фильтровальной бумаги. Пикнометр закрывают пробкой и выдерживают в термостате еще 10 мин, проверяя положение мениска по отношению к метке, затем пикнометр вынимают из термостата, фильтровальной бумагой вытирают внутреннюю поверхность горлышка, а также весь пикнометр снаружи, оставляют под стеклом аналитических весов в течение 10 мин и взвешивают с той же точностью.

Пикнометр освобождают от воды, высушивают, споласкивая последовательно спиртом и эфиром, удаляя остатки эфира продуванием воздуха (сушить пикнометр путем нагревания не допускается). Заполняют пикнометр образцом исследуемого жирного масла и затем производят те же операции, что и с дистиллированной водой.

Плотность ρ_{20} , г/см³, вычисляют по формуле:

$$\rho_{20} = \frac{(m_2 - m) \times 0,99703}{m_1 - m} + 0,0012,$$

m — масса пустого пикнометра, г;

m_1 — масса пикнометра с дистиллированной водой, г;

m_2 — масса пикнометра с испытуемым образцом жирного масла, г;

0,99703 — значение плотности воды при 20°С (в г/см³ с учетом плотности воздуха);

0,0012 — плотность воздуха при 20°С и барометрическом давлении 1011 гПа (760 мм.рт. ст.).

Задание 7. Определите показатель преломления образца жирного масла, запишите его значение в лабораторный журнал, сравните с данными фармакопейной статьи и сделайте заключение о доброкачественности жирного масла.

Показатель преломления n среды относительно воздуха равен отношению синуса угла падения луча света в воздухе к синусу угла преломления луча света в данной среде. Показатель преломления (индекс рефракции) определяют при помощи рефрактометра. Показателем преломления называют отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Он зависит от природы вещества, температуры и длины волны света.

Методика. Рефрактометр имеет две призмы, одна из которых (верхняя) приподнимается. Перед проведением измерения на нижнюю призму наносят 1–2 капли жидкости, после чего опускают верхнюю призму и плотно ее прижимают. Пучок света с помощью зеркала направляют в верхнее окошко призмы. Наблюдая в окуляр, совмещают границу светотени со штрихом сетки. Для ахроматизации границы светотени служит компенсатор дисперсии. Отсчет показателя преломления производится с точностью до четвертого знака. Перед каждым опытом рефрактометр необходимо проверять с помощью дистиллированной воды, имеющей показатель преломления 1,3330.

Задание 8. Определите количественное содержание жирного масла в семенах клещевины

Извлечение липидов проводят в аппарате Сокслета (рис. 1), который состоит из трех частей: приемной колбы (4), собственно экстрактора (1) и холодильника (2). На экстракторе имеются две трубки: одна служит для отвода паров растворителя из приемника; вторая — является сифоном, по которому экстракт, содержащий липиды, переливается в приемную колбу.

Методика. 0,5 г растительного сырья (точно не взвешивают) раститруют в ступке для пропитывания маслом стенки ступки. Растертую массу выбрасывают, ступку очищают. Затем в ступке раститруют 5–7 г сырья. 1,5 – 2 г сырья (точная навеска) растертой массы помещают в бумажный пакетик, предварительно высушенный до постоянной массы. Взвешивают пакетик вместе с навеской. В один экстрактор аппарата Сокслета можно загрузить несколько таких пакетиков. Перед тем как собрать прибор, необходимо также взвесить на аналитических весах приемную колбу, высушенную до постоянной массы.

После соединения всех частей аппарата через холодильник наливают растворитель до тех пор, пока жидкость не перельется через сифон в приемник, а затем в экстрактор еще доливают растворитель примерно на 1/3 объема.

Приемник с растворителем нагревают на кипящей водяной бане. Пары растворителя поднимаются по трубке в холодильник, конденсируются и стекают в экстрактор на пакет с сырьем. Когда экстрактор наполняется жидкостью до высоты сифона, жидкость сливается в приемник. Весь этот процесс продолжается до полноты извлечения жирного масла.

ВВ! Извлечение необходимо проводить осторожно, не нагревая растворитель выше 60 °С. Он должен кипеть равномерно, так как при сильном нагревании часть паров растворителя не успевает конденсироваться в холодильнике и улетучивается. Полноту извлечения жиров определяют по отсутствию жирного

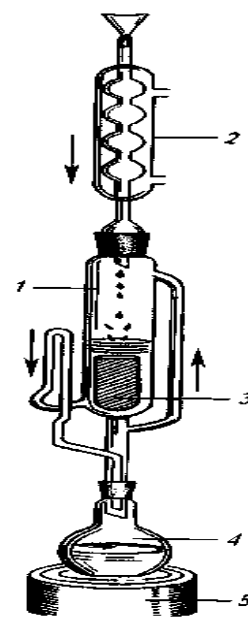


Рисунок 1

Аппарат Сокслета.

1 – экстрактор, 2 – холодильник, 3 – патрон с сырьем, 4 – приемная колба, 5 – водяная баня

пятна на фильтровальной бумаге от нескольких капель извлечения.

По достижении полноты извлечения растворитель отгоняют. Приемную колбу с содержимым высушивают в сушильном шкафу при 90-95°C до постоянной массы и взвешивают. Зная массу пустого приемника и приемника с жиром, вычисляют содержание липидов x %, в сырье по формуле

$$X = \frac{(A - B) \times 100}{B}$$

Где A — масса приемника с жиром, г; B — масса пустого приемника, г; B — навеска сырья, г.

Сделайте заключение о количественном содержании липидов в анализируемом образце сырья.

РАЗДЕЛ 6: ТЕРПЕНОИДЫ. АНАЛИЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Цель занятия: научиться умению проводить количественное определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и проводить анализ на доброкачественность самого масла.

Этапы достижения цели:

1. Овладеть методикой проведения качественного определения основных классов полисахаридов в лекарственном растительном сырье;
2. Овладеть методикой определения количественного содержания полисахаридов в лекарственном растительном сырье.

Этапы достижения цели.

1. проведения анализа качества эфирных масел.
2. Овладеть методикой количественного определения эфирных масел в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

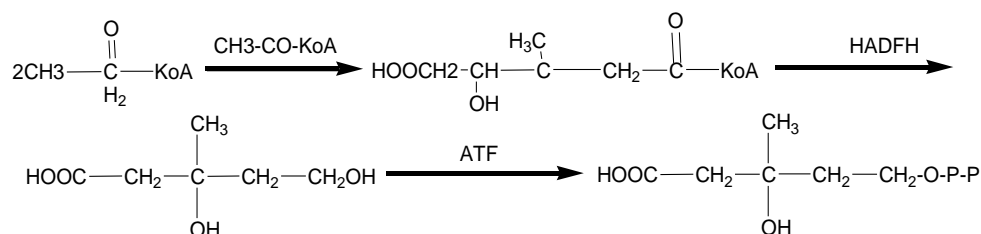
1. Дайте понятие о терпеноидах и об эфирных маслах. Опишите основные стадии биогенеза терпеноидов в растениях.
2. Приведите классификацию терпеноидов и эфирных масел и эфирно-масличного сырья.
3. Опишите способы получения эфирных масел из растительного сырья.
4. Значение эфирных масел для растения. Динамика накопления эфирных масел в растениях.
5. Как проводят анализ медицинских эфирных масел. Определение физических и химических констант.
6. Охарактеризуйте метод ГЖХ для исследования эфирного масла
7. Опишите спектроскопические методы анализа эфирного масла.

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Терпеноиды – обширный класс природных органических соединений с общей формулой $(C_5H_8)_n$, где $n \geq 2$.

Группа терпеноидов однородна биогенетически и представляет собой общую семью близкородственных соединений. Углеродный скелет всех терпеноидов построен из разветвленных изопреновых единиц: $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$, содержит (в зависимости от сложности структуры отдельных производных) кратное число таких пятиуглеродных фрагментов и образуется из общего предшественника – изопентенилдифосфата. Последний представляет собой фосфорилированный аналог изопрена и известен под названием «активированного изопрена».

Путь биосинтеза терпеноидных структур называется **меволонатным путем**. ИПФФ и ПФФ синтезируются из ацетил-КоА по схеме (ч/з мевалоновую кислоту):



Все реакции дальнейшего биосинтеза заключаются в постоянном наращивании их углеродной цепи путем конденсации нескольких молекул ИПФФ.

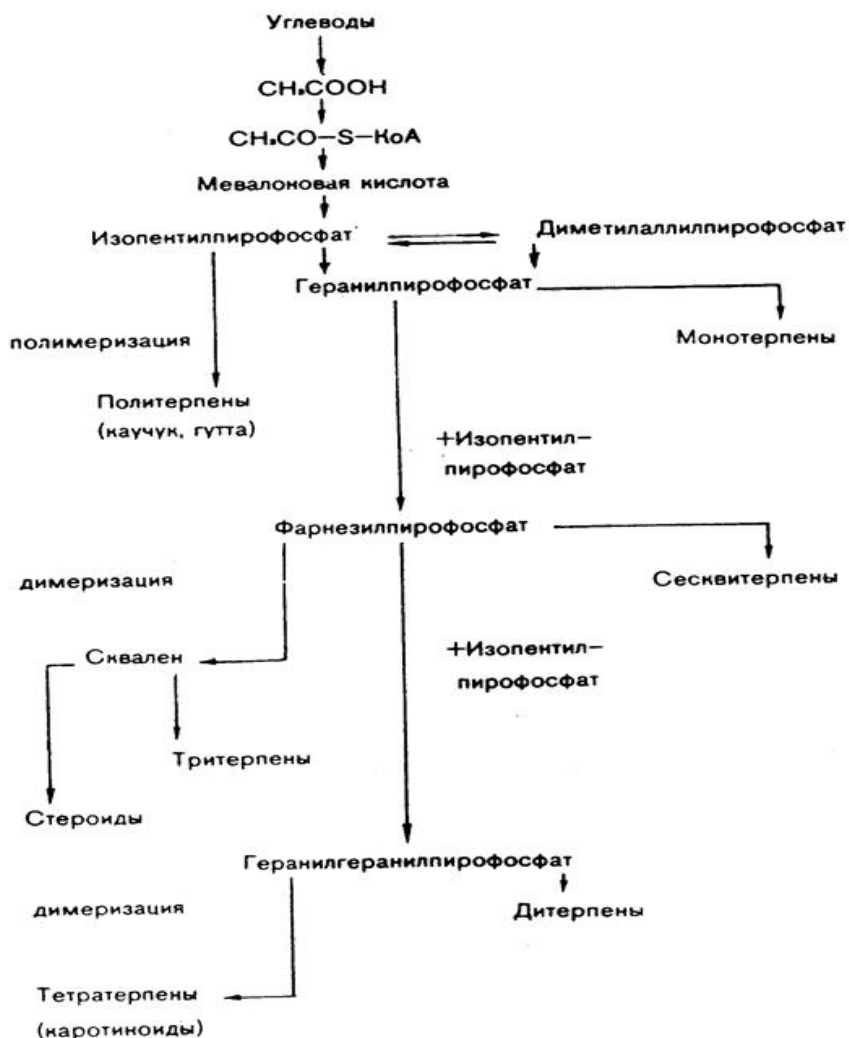
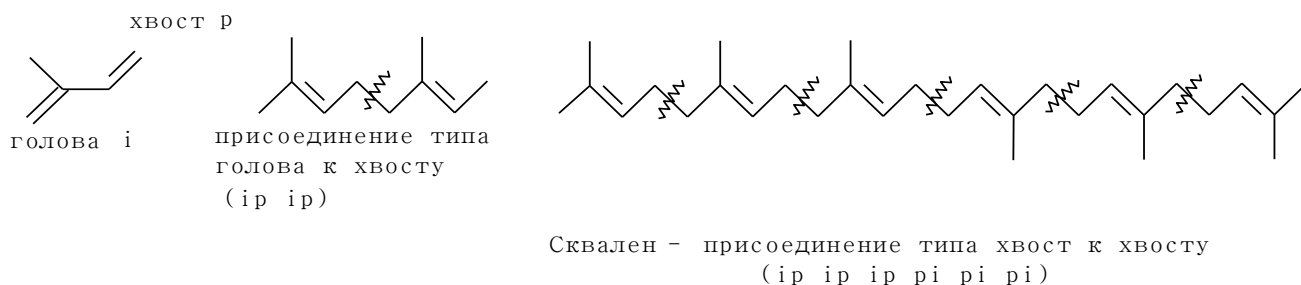


Рис. Общая схема биогенеза терпенов в растениях

Среди терпенов различают

1. монотерпены $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ летучие вещества, входят в состав
2. сесквитерпены $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$; эфирных масел;
3. дитерпены $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$)₂ не летучи, входят в состав бальзамов и смол;
4. тритерпены $\text{C}_{30}\text{H}_{48}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$)₃ растительные стерины и гликозиды с тритерпеновыми агликонами (сапонины и др.);
5. тетратерпены $\text{C}_{40}\text{H}_{64}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$)₄ входят в состав каротиноидов;
6. политерпены ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$)_n - каучук и гутта.

Изопреноидные остатки в более простых соединениях обычно присоединяются голова к хвосту, в более сложных молекулах (каротиноидах, стероидах) встречается другой тип присоединения – хвост к хвосту.



Терпеноиды широко распространены в лекарственных растениях. Классификация лекарственного сырья, содержащего терпеноиды, базируется на основных компонентах, обуславливающих терапевтическое действие.

Классификация изопреноидных соединений

Подкласс	Эмпирическая формула	Распространение в природе; представители	Окисленные формы
Изопрен	C_5H_8	Широко распространён в природе	Изопентенилдифосфат
Монотерпеноиды	$C_{10}H_{16}$	В составе эфирных масел; горечей; мирцен	Терпеноидные спирты, альдегиды, кетоны
Сесквитерпеноиды	$C_{15}H_{24}$	В составе эфирных масел; смолы; горечей; фарнезен	Спирты, кетоны, лактоны
Дитерпеноиды	$C_{20}H_{32}$	В составе эфирных масел; смолы; C_{20} -терпены	C_{20} -терпенол, фитол, витамин А, смоляные кислоты
Тритерпеноиды	$C_{30}H_{48}$	Повсеместно в растениях; в печени акул; сквален	Стерины (менее 30 атомов С), сапонины, лупеол
Тетратерпеноиды	$C_{40}H_{64}$	Каротины; фитонин	Ксантофиллы
Политерпеноиды	$(C_5H_8)_n$	Каучук, гуттаперча	Отсутствуют



ЭФИРНЫЕ МАСЛА

Эфирные масла (Olea aetherea) представляют собой вырабатываемые растениями смеси душистых веществ, относящихся к различным классам органических соединений, преимущественно к терпеноидам, реже ароматическим или алифатическим соединениям.

Название обусловлено физическими свойствами: это маслянистые жидкости, которые при нанесении на бумагу оставляют жирное пятно, они летучи (пятно с бумаги со временем исчезает без остатка).

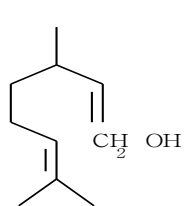
Термин «эфирные масла» появился в середине XVIII века. Он явно неточен, но сохранился до настоящего времени во многих странах. Эфирные масла - это всегда смеси веществ. Выделено свыше 1000 компонентов эфирных масел. Это различные типы углеводородов, спирты, кетоны, кислоты, сложные эфиры, лактоны.

Классификация эфирных масел и эфирномасличного сырья

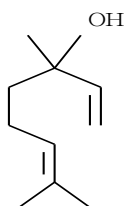
Эфирные масла классифицируют по преобладающим или наиболее ценным, главным компонентам. Эти компоненты определяют фармакологический эффект и часто являются носителями запаха масла.

В состав эфирных масел входят моно- и сесквитерпены. Среди монотерпенов выделяют ациклические, моноциклические, бициклические, трициклические (в состав эфирных масел не входят) и ароматические. Среди сесквитерпенов также различают ациклические, моно-, би-, трициклические и ароматические (в состав эфирных масел не входят). Промежуточной формой между би- и трициклическими сесквитерпенами можно считать трициклические лактоны.

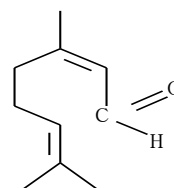
К **алифатическим монотерпенам** относятся углеводороды, спирты, альдегиды, например:



гераниол

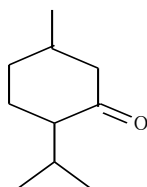


линалоол



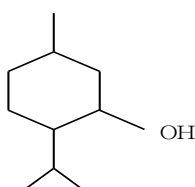
цитраль

Моноциклические монотерпены

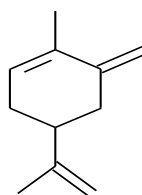


ментон

(мята)

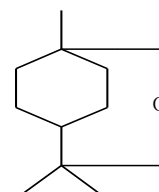


ментол



карвон

(тмин)

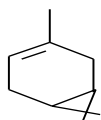


цинеол

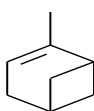
(шалфей,
эвкалипты)

Бициклические монотерпены

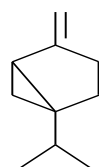
а) группа карена б) группа пинена в) группа сабинена



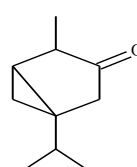
Карен



α-пинен

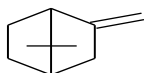


Сабинен

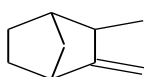


Туйон
пихма

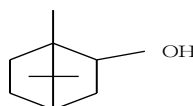
г) группа камфена-фенхена



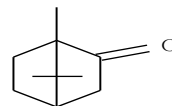
камфен



фенхен

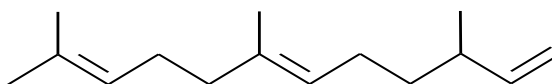


борнеол
(пихта,
валериана)



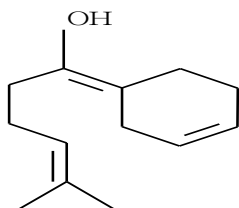
камфора

Алифатические сесквитерпены

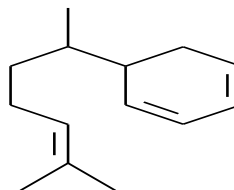


фарнезен
(ромашка, хмель)

Моноциклические сесквитерпены

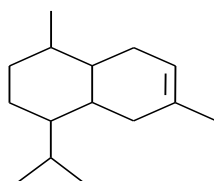


бисаболол
(ромашка)

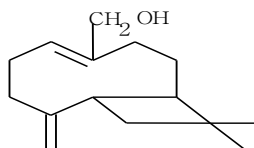


цингиберен
(имбирь)

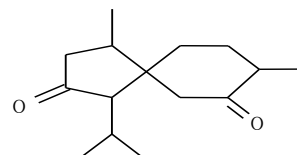
бициклические сесквитерпены



кадинен
(польнь)

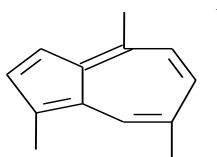


бетулинол
(береза)

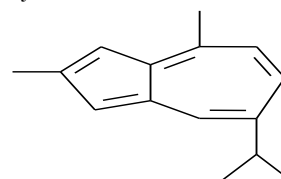


акорон

Производные azulена

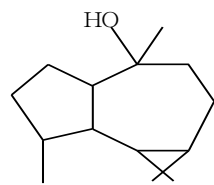


хамазулен

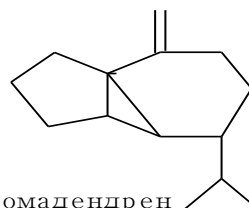


гвайазулен

трициклические сесквитерпены

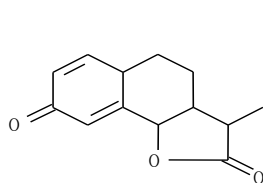


ледол
(багульник)

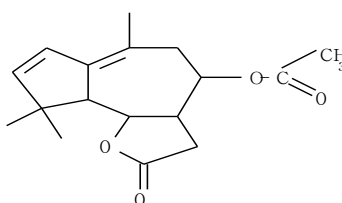


аромадендрен
(эвкалипты)

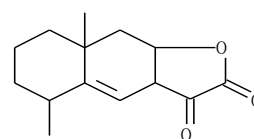
Лактоны



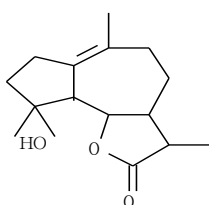
Сантонин
(полынь цитварная)



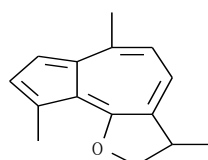
матрицин
(ромашка)



алантолактон

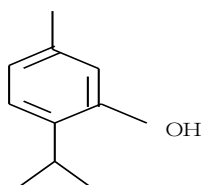


артабсин

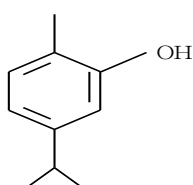


артемазулен

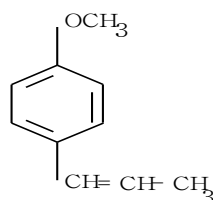
Ароматические терпены



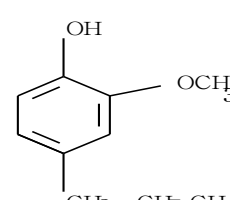
Тимол
(тимьян)



карвакрол
душица



анетол
(анис, фенхель,
бадьян)



эвгенол
(гвоздика)

Физические и химические свойства

Физические свойства. Эфирные масла - это бесцветные или окрашенные жидкости. Например, эфирное масло аира болотного - желтоватое, ромашки и тысячелистника - синее, тимьяна - красноватое, корицы - коричневое. Запах и вкус эфирных масел специфичны.

Большинство эфирных масел легче воды и лишь некоторые из них имеют плотность больше единицы (масло гвоздики и корицы). Эфирные масла мало или практически нерастворимы в воде. При взбалтывании с водой образуют эмульсии, придают воде запах и вкус. Эфирные масла растворимы в жирных (подсолнечное и др.) и минеральных (вазелиновое) маслах, спирте, эфире и других органических растворителях.

Температура кипения эфирных масел обычно колеблется от 40°C до 260°C, причем фракция монотерпеноидов кипит при 150-190 °C, фракция сесквитерпеноидов - при 230-300 °C. Эфирные масла оптически активны. Реакция масел нейтральная или кислая. Эфирные масла перегоняются с водяным паром, причем монотерпеноиды перегоняются хорошо, сесквитерпеноиды - труднее. При охлаждении эфирных масел некоторые компоненты выкристаллизовываются (анетол, ментол, тимол, камфора). Твердую часть эфирного масла называют стеароптен, жидкую часть - олеоптен.

Химические свойства. Компоненты эфирных масел легко вступают в реакции окисления, изомеризации, полимеризации; по двойным связям легко гидрогенизируются, гидратируются, присоединяют галогены, кислород, серу; дают реакции, характерные для их функциональных групп. «Изменчивыми хамелеонами органической химии» назвал класс терпеноидов академик А.Е. Арбузов за способность подвергаться всевозможным химическим превращениям, порой с полной перестройкой скелета молекулы. На свету в присутствии кислорода воздуха эфирные масла окисляются, меняют цвет (темнеют) и запах. Некоторые эфирные масла загустевают после отгонки или при хранении.

Методы выделения (получения) эфирных масел из растительного сырья

Эфирные масла могут быть использованы как самостоятельные лекарственные средства. Для этого их выделяют из растительного сырья. Эту операцию обычно называют «получением» эфирных масел, т.е. получают как самостоятельный продукт.

Метод получения эфирного масла зависит от количества, состава, свойств эфирного масла и от морфолого-анатомических особенностей сырья.

1. Если в сырье содержится сравнительно много эфирного масла и масло термостабильное, то используют *метод гидродистилляции*. Различают:

- а) метод перегонки с водой;
- б) метод перегонки с водяным паром;
- в) метод перегонки с водяным паром при повышенном давлении;
- г) метод перегонки с водяным паром при пониженном давлении.

Используется аппаратура периодического или непрерывного действия.

2. Если компоненты эфирного масла термолабильны и подвергаются деградации при гидродистилляции, то используют *метод экстрагирования*. Различают:

- а) экстракция низкикипящими растворителями (этиловый эфир, хлористый метил, петролейный эфир, ацетон и др.);
- б) экстракция сжиженным газом (пропан, бутан, углекислота);
- в) экстракция жирами:
 - мацерация цветочного сырья жирным маслом с нагреванием и без него;
 - анфлераж - выделяющееся эфирное масло из свежесобранного сырья (преимущественно из цветков) поглощается сорбентами (твердые высококачественные жиры либо активированный уголь).

Из 1 тонны лепестков розы получают методом анфлеража 700 г эфирного масла.

3. Если эфирное масло находится в больших количествах в крупных емкостях (например, в околоплоднике цитрусовых), то используют метод прессования или выжимания, т.е. *механический способ*.

Оценка качества эфирномасличного сырья. Методы анализа

Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего эфирные масла, кроме определения подлинности сырья, отсутствия примесей и дефектов, включает обязательное определение **количественного содержания эфирного масла**.

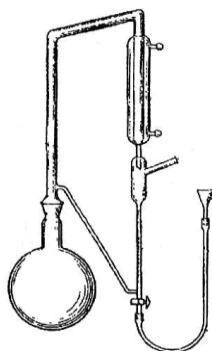
Количество эфирного масла в сырье определяют при приемке сырья и в процессе его хранения. Согласно ГФ XI, вып. 1, с. 290-294, определение содержания эфирного масла проводят путем его перегонки (гидродистилляции) с водяным паром из растительного сырья. Содержание масла выражают в объемно-весовых процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье. Нормативная документация на конкретные виды сырья регламентирует массу навески сырья, время перегонки и нижний показатель содержания эфирного масла в сырье.

Метод количественного определения содержания эфирного масла в растительном сырье основан:

- 1) на физических свойствах эфирного масла - летучести и практической нерастворимости в воде;
- 2) на отсутствии химического взаимодействия эфирного масла и воды;
- 3) на законе Дальтона о парциальных давлениях. Согласно закону, смесь жидкостей закипает тогда, когда сумма их парциальных давлений достигает атмосферного давления. Следовательно, давление паров смеси жидкостей (вода + эфирное масло) достигнет атмосферного давления еще до кипения воды. Перегонка с парами воды при нормальном давлении (760 мм рт.ст.) протекает всегда при температуре ниже 100°C, что позволяет избежать деградации компонентов эфирного масла.

Например, смесь скипидара и воды будет перегоняться при атмосферном давлении при температуре 95°C (вместо 160 °C для пинена - основного компонента скипидара и 100 °C для воды).

Прибор для количественного определения эфирного масла (прибор Клевенджера) состоит из экстракционной колбы, соединенной с обратным холодильником и приемника, в основе которого V-образная трубка. Приемник работает по принципу сообщающихся сосудов: эфирное масло собирается на поверхности воды, избыток воды по узкому и более низкому колену возвращается обратно в колбу.



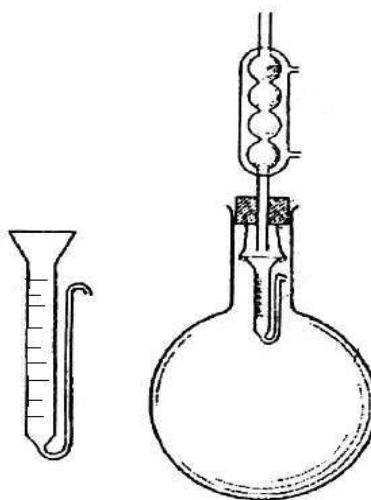
прибор Клевенджера

Согласно ГФ XI, вып. 1, с. 290 (раздел «Общие методы анализа»), определение проводят одним из 4 методов в зависимости от количества в сырье эфирного масла, его состава, плотности и термолабильности.

Метод 1 и 2 применяют, если эфирное масло имеет плотность меньше 1 и не растворяется в воде.

Метод 3 и 4 применяют для сырья, содержащего эфирное масло, которое при перегонке претерпевает изменения, образует эмульсию, легко загустевает или имеет плотность, близкую к единице.

Метод 1 (метод Гинзберга) применяют для сырья, где много эфирного масла, масло термостабильное, в его составе преобладают моно- и бициклические монотерпеноиды. Приемник для сбора эфирного масла помещается в экстракционной колбе. Этим методом определяют содержание эфирного масла в сырье можжевельника, мяты, шалфея, эвкалипта, тмина.



прибор Гинзберга

Метод 2 (метод Клевенджера) используют, когда сырье содержит эфирного масла менее 0,2-0,3 %. Этот метод дает меньшую ошибку опыта. Приемник вынесен за пределы экстракционной колбы, что позволяет определить в сырье содержание термолабильного эфирного масла. Этим методом

определяют содержание эфирного масла в сырье ромашки, тмина, мяты, шалфея, эвкалипта.

Метод 3 (метод Клевенджера). Используется прибор Клевенджера. В приемник добавляют органический растворитель для разрушения эмульсии или растворения загустевшего или тяжелого масла. Этим методом определяют эфирное масло в сырье аниса, аира и тысячелистника.

Метод 4 впервые включен в ГФ XI и отличается от метода 3 возможностью контролировать температуру конденсации. Во время гидродистилляции температура в отстойнике не должна превышать 25 °С.

Этапы количественного определения:

- *подготовительный*: измельчают сырье в третьей аналитической пробе до размера частиц, указанного в нормативной документации, берут две точные навески сырья, отмеряют воду очищенную, собирают прибор;
- *гидродистилляция*: эфирномасличное сырье с водой нагревают в колбе на колбонагревателе, конденсат эфирного масла собирают в приемнике;
- *расчет результатов*: замеряют объем эфирного масла, рассчитывают процентное содержание масла в сырье, сравнивают полученный показатель с нормативным документом.

Для побегов багульника болотного (ГФ XI, вып. 2, с. 227) даны два показателя содержания эфирного масла в сырье: если сырье предназначено для получения экстемпоральных лекарственных форм, то эфирного масла должно быть не менее 0,1 %; если сырье предназначено для получения препарата ледина, то эфирного масла должно быть не менее 0,7 %. В таком эфирном масле дополнительно определяют содержание ледола методом газожидкостной хроматографии. Ледола должно быть не менее 17 %.

Анализ эфирных масел

Эфирные масла, которые используют в медицинской практике, должны быть стандартизованы, т.е. должны отвечать требованиям НД. Общая статья методического плана - «Olea aetherea» (ГФ XI, вып. 1, с. 287) регламентирует приемы и порядок выполнения анализа. Частные статьи на конкретные эфирные масла включены в ГФ XI, X и IX издания. Для эфирных масел устанавливают подлинность и доброкачественность.

Подлинность эфирного масла подтверждают органолептические показатели и числовые показатели.

Органолептические показатели - это цвет, вкус и запах. **Цвет** (и *прозрачность*) эфирного масла определяют, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного бесцветного стекла диаметром 2-3 см, наблюдая в проходящем свете.

Запах определяют, нанеся около 0,1 мл (2 капли) масла на полоску фильтровальной бумаги размером 12×5 см. Масло не должно смачивать края бумаги. Сравнивают запах испытуемого образца с запахом образца контрольного в течение 1 часа. Сначала ощущается запах всего «букета» веществ, а затем постепенно часть легко летучих веществ испаряется, и при последующих определениях через каждые 15 минут запах будет меняться.

Сравнение с эталоном позволяет установить идентичность испытуемого масла. Может быть обнаружена примесь других масел или душистых веществ. *Вкус* определяют, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей масла, или смешивают 1 каплю эфирного масла с 1 г сахарной пудры и пробуют на язык.

Числовые показатели - это физические и химические константы.

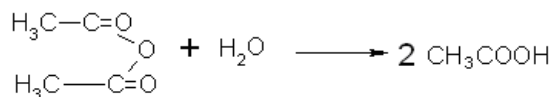
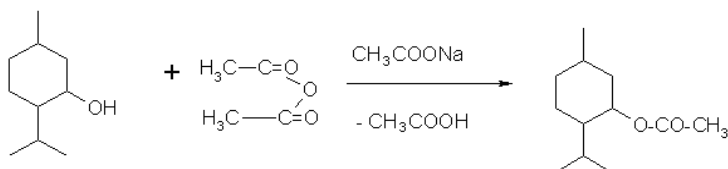
Физические константы - это растворимость, температура затвердевания, плотность, показатель преломления, угол вращения плоскости поляризации. *Растворимость* определяют в мерном цилиндре, в который наливают 1 мл масла и постепенно по 0,1 мл из бюретки приливают растворитель, указанный в частной нормативной документации. Тщательно взбалтывают. Отмечают полное растворение эфирного масла. Определение ведут при 20°C. *Температуру затвердевания* (кристаллизации) определяют в приборе Жукова. *Плотность* определяют с помощью пикнометра. *Показатель преломления* определяют с помощью рефрактометра. *Угол вращения плоскости поляризации* определяют в поляриметре. Определение ведут по общепринятым в аналитической химии методикам (ГФ XI, вып. 1).

Химические константы - это кислотное число, эфирное число, эфирное число после ацетилирования. Химические константы - показатели и подлинности, и доброкачественности.

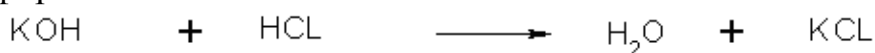
Кислотное число (к.ч.) - это количество мг калия гидроксида, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г эфирного масла. Определяют методом алкалиметрического прямого титрования.

Эфирное число (э.ч.) - это количество мг калия гидроксида, пошедшее на омыление сложных эфиров, содержащихся в 1 г эфирного масла. Определяют методом обратного алкалиметрического титрования.

Эфирное число после ацетилирования (э.ч.п.а.) - это количество мг калия гидроксида, необходимое для омыления суммы сложных эфиров, содержащихся первоначально в 1 г масла и образовавшихся при ацетилировании. Определяют методом обратного титрования после ацетилирования компонентов эфирного масла уксусным ангидридом. Например, в мятном масле более 4 % сложных эфиров ментола с уксусной и валериановой кислотами и свыше 46 % свободного ментола.



Уксусную кислоту отмывают водой. Далее в ацелированном масле определяют эфирное число.



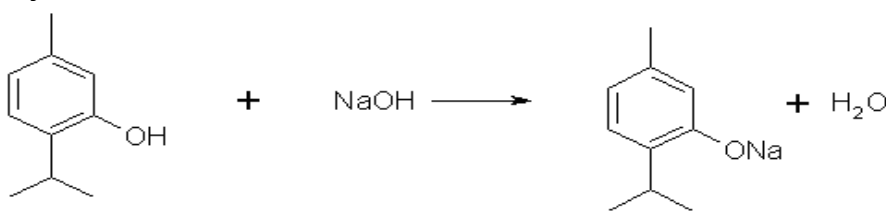
По разности э.ч. и э.ч.п.а. определяют количество свободных спиртов.

Доброкачественность эфирного масла: определяют наличие основных компонентов масла и отсутствие примесей.

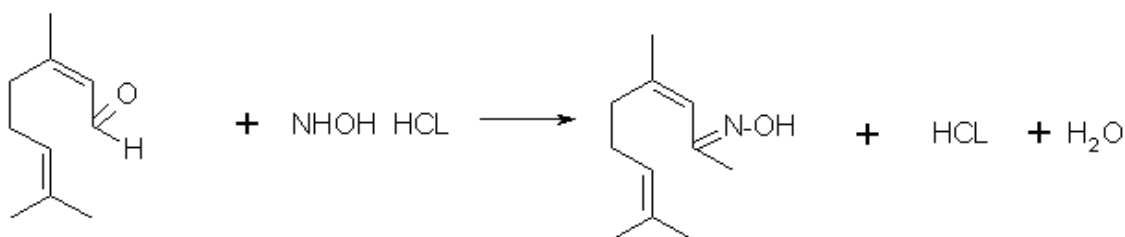
Основные компоненты эфирного масла - это кислоты, сложные эфиры, спирты, фенолы и отдельные компоненты (цитраль, цинеол и др.). Их количество находится в определенных пределах для каждого масла.

О содержании *кислот, эфиров и спиртов* судят по химическим константам. Химические константы - показатели как подлинности, так и доброкачественности.

Содержание *фенолов* (ГФ XI, общая статья) определяют в объемных процентах по убыли объема эфирного масла, взятого для исследования, после удаления из него фенолов (в форме растворимых в воде фенолятов при встряхивании эфирного масла с 5 % раствором натрия гидроксида). Определение ведут в кассиевой колбе.



Отдельные компоненты эфирных масел определяют по методикам частной нормативной документации на каждое конкретное эфирное масло. Например, содержание *альдегидов* в лимонном масле (ГФ XI, вып. 1, с. 342) определяют методом обратного титрования. Метод основан на способности цитраля реагировать с гидроксиламина гидрохлоридом с образованием оксима, при этом отщепляется хлористый водород в количествах, эквивалентных цитралю:



Выделившийся хлористый водород титруют 0,5 н спиртовым раствором калия гидроксида.



Примеси в эфирном масле различают *посторонние (подмеси)* и *собственные* - продукты окисления эфирного масла.

Примесь спирта, жирного масла и воды определяют специальными пробами. Примесь терпентинного масла, воска, продуктов окисления и др.

можно определить только по изменению органолептических и числовых показателей. Специальные пробы:

Спирт (этанол):

1) 2-3 капли эфирного масла наносят на воду на часовом стекле. Наблюдают на черном фоне. Не должно быть заметного помутнения вокруг капель масла. 2) 1мл масла в пробирке нагревают до кипения. Пробирка должна быть закрыта ватой с кристаллом фуксина. Пары спирта растворяют фуксин. Не должно быть фиолетово-розового окрашивания ваты.

Жирные и минеральные масла: 1 мл эфирного масла взбалтывают в пробирке с 10 мл спирта; не должно быть помутнения и капель жирного масла.

Вода: определяют методом дистилляции.

Примесь восков, вазелина, жирных масел, высокомолекулярных терпенов, спирта снижает показатель преломления, угол вращения плоскости поляризации, плотность эфирного масла. При растворении в спирте (этаноле) углеводороды всплывут наверх, а жирное масло каплями опустится на дно.

Продукты окисления компонентов эфирного масла изменяют органолептические показатели, улучшают растворимость в спирте 70-96 %, увеличивают показатель плотности, показатель преломления, увеличивают кислотное число и уменьшают эфирное число и эфирное число после ацетилирования.

Окисление анетол в эфирном масле аниса и фенхеля до анисового альдегида и анисовой кислоты приводит к резкому снижению температуры затвердевания (доброкачественное анисовое масло кристаллизуется при температуре не менее 15°C, фенхелевое масло - не менее 3 °C по ГФ X).

Если анализ эфирного масла проводят *в научных целях*, то сумму компонентов эфирного масла исследуют подробно. Для этого фракции эфирных масел исследуют с помощью различных хроматографических и спектрометрических методов, в том числе используются электронная спектроскопия, ИК-спектроскопия и ЯМР-спектроскопия.

Медицинское применение сырья и препаратов, содержащих эфирные масла

Наиболее часто лекарственные средства на основе эфирномасличного сырья используют для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, печени, верхних дыхательных путей и сердечно-сосудистой системы.

Фармакологическое действие зависит:

- от состава эфирного масла;
- от сопутствующих ему биологически активных веществ (флавоноидов, тритерпеновых кислот, дубильных веществ, полисахаридов и др.);
- от места введения эфирного масла (кожа, слизистые оболочки, соответствующий орган);
- от места выведения эфирного масла (кишечник, почки, печень, верхние дыхательные пути).

Например, наличие фенольных соединений в составе эфирных масел определяет, как правило, антисептическое действие. Сопутствующие вещества - флавоноиды способствуют спазмолитическому действию, а дубильные вещества - вяжущему, антисептическому, противовоспалительному.

При наружном применении отдельные компоненты эфирных масел раздражающе действуют на кожу и слизистые оболочки. Используют в виде мазей, линиментов, спиртовых растворов, а при болезнях носа и горла - в виде ингаляций. Так, ментол при нанесении на слизистые оболочки или втирании в кожу раздражает нервные окончания, вызывает ощущение холода и покалывания. Это отвлекающее средство при невралгиях («Меновазин») и мигрени («Ментоловый карандаш»). Раздражение холодовых рецепторов приводит к сужению поверхностных кровеносных сосудов (в случае насморка уменьшаются выделения из носа – препарат «Бороментол») и к рефлекторному расширению сосудов внутренних органов, в том числе коронарных (облегчаются боли при стенокардии – препарат «Валидол»).

При приеме внутрь эфирные масла всасываются в желудочно-кишечном тракте и затем выделяются через бронхи, почки, печень, раздражая их. Например:

1. Ментол, раздражая рецепторы слизистой желудка и кишечника, вызывает усиление перистальтики.
2. Терпинеол из эфирного масла можжевельника раздражает почки, усиливает фильтрацию в почечных клубочках, тормозит обратную реабсорбцию ионов Na^+ и Cl^- в извилистых канальцах почек, следовательно, оказывает мочегонное действие.
3. Анетол из эфирного масла аниса и фенхеля выделяется через бронхи, способствует усилению секреции слизистых оболочек трахеи, гортани, бронхов, разрыхлению воспалительных налетов, разжижению мокроты, повышению активности реснитчатого эпителия дыхательных путей, следовательно, ускоряет эвакуацию мокроты и, кроме того, рефлекторно возбуждает дыхание («Грудной эликсир», «Нашатырно-анисовые капли»).

Противопоказания, предостережения. Эфирные масла гиперемизируют слизистые оболочки и повышают секреторную функцию бронхов (при ингаляциях и при приеме внутрь) лишь в малых дозах. В больших концентрациях эфирные масла вызывают сгущение секрета, вследствие чего возникают сухость и першение в горле. Поэтому передозировка недопустима. Возможны и другие нежелательные эффекты и побочные действия. Например:

1. При передозировке лекарственных средств тимьяна и чабреца развивается тошнота. Противопоказаны препараты при беременности, декомпенсации сердечной деятельности, болезнях печени и почек.
2. Использование ментола для лечения детей раннего возраста до года противопоказано, т.к. возможны рефлекторное угнетение и остановка дыхания.

3. Большие дозы эфирного масла ромашки аптечной вызывают головную боль и общую слабость.

4. Передозировка препаратов валерианы вызывает сонливость, чувство подавленности, угнетение, снижение работоспособности; длительное применение приводит к расстройству работы желудочно-кишечного тракта.

Эфирные масла и эфирномасличное сырье используют в лекарствах не только как лекарственные средства, но и как корректирующие вещества для улучшения и изменения вкуса и запаха (например, ментол).

Интерес к эфирным маслам в последнее время возрастает. Это связано с тем, что эфирные масла стимулируют защитные реакции клеток и тканей, активизируют процессы регенерации.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ.

Практическая работа №1. Определите подлинность и чистоту эфирных масел. Сопоставьте полученные результаты с данными НД, внесите в протокол, сделайте выводы.

1. *Определение подлинности образца эфирного масла (ГФ XI, вып. I, с.287):*

а) определите цвет и прозрачность анализируемого образца, сравнивая его со стандартным образцом того же наименования;

б) определите запах: 2 капли масла наносят на полоску фильтровальной бумаги длиной 12 см и шириной 5 см. Через каждые 15 минут сравнивают запах испытуемого образца с запахом контрольного образца, нанесенного таким же образом на другую полоску фильтровальной бумаги. В течение одного часа запах должен быть одинаков;

в) определите вкус, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей эфирного масла.

2. Определите температуру застывания эфирного масла путем перемещения пробирки с высотой слоя масла не менее 5 см в специальный сосуд с охлаждающей смесью, отмерив при этом с помощью термометра наиболее высокую температуру, остающуюся с момента застывания вещества.

3. Определите угол вращения плоскости поляризации исследуемого эфирного масла на поляриметре.

4. Определите показатель преломления исследуемого масла на рефрактометре. Для мятного масла показатель преломления равен 1,459-1,470, а для масла эвкалипта 1,458-1,470.

5. *Определение посторонних примесей (чистота):*

I. определите примесь спирта:

а) 2-3 капли эфирного масла наносят на воду, налитую на часовое стекло и наблюдают на черном фоне: не должно быть заметного помутнения вокруг капель масла;

б) 1 мл эфирного масла наливают в пробирку, закрывают рыхлым комочком ваты, в середину которого помещен кристалл фуксина, и доводят до кипения. При наличии спирта пары его растворяют фуксин, и вата окрашивается в фиолетово-розовый цвет;

II. определите примесь жирных и минеральных масел: 1 мл эфирного масла взбалтывают с пробирке с 10 мл спирта: не должно наблюдаться помутнения и капель жирного масла. Укажите, на каких свойствах основана эта проба, и примесь всех ли жирных масел может быть обнаружена таким образом.

6. Определение химических констант (ГФ XI, вып.1, с.191):

а) определите кислотное число (см. тему I "Анализ жирных масел");

б) определите эфирное число (ГФ XI, вып. I, с.286).

Эфирным числом называют количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого образца. **Напишите схемы реакций, имеющих место при определении эфирного числа после ацетилирования.**

Для определения эфирного числа используют раствор, оставшийся после определения кислотного числа. К раствору прибавляют 20 мл спиртового раствора едкого калия (0,5 моль/л), соединяют колбу с воздушным холодильником и нагревают на водяной бане в течение 1 часа с момента закипания. Одновременно в ту же баню помещают в равных условиях 20 мл спиртового раствора едкого калия (0,5 моль/л). Контрольный опыт необходим потому, что фактор спиртового раствора щелочи не стабилен, особенно при нагревании. По окончании омыления в обе колбы добавляют по 100 мл воды, и избыток едкого калия титруют раствором хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л) до обесцвечивания (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число X вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \times 28,05}{b},$$

где a - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование в контрольном опыте;

b - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества;

v - навеска вещества в граммах; 28,05 - количество миллиграммов гидроксида калия, соответствующее 1 мл раствора едкого кали (0,5 моль/л).

Эфирное число используют для вычисления содержания сложных эфиров или связанных спиртов в процентах X_1 по формуле:

$$X_1 = \frac{X \times M \times 100}{56,1 \times 1000} = \frac{X \times M}{561},$$

где X - эфирное число; M - молекулярная масса эфира или спирта; 56,1 - молекулярная масса едкого калия.

в) определите эфирное число после ацетилирования (ГФ XI, вып.1, с. 289-290).

Эфирным числом после ацетилирования обозначают количество миллиграммов едкого калия, необходимое для омыления сложных эфиров, содержащихся первоначально в 1 г масла и образовавшихся при ацетилировании. Определение этой константы позволяет рассчитать содержание свободных спиртов (ментола, линалола и др.).

10 г масла помещают в специальную колбу для ацетилирования с пришлифованным воздушным холодильником, приливают 10 мл уксусного ан-

гидрида и прибавляют около 2 г безводного натрия ацетата. Смесь кипятят на песчаной бане при частом взбалтывании в течение 15 мин. Затем смесь переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и отделяют слой масла. Масло 4-5 раз промывают при взбалтывании 50 мл насыщенного раствора натрия хлорида (до нейтральной реакции промывных вод, индикатор метиловый оранжевый), затем масло дважды промывают порциями воды по 20 мл для удаления следов натрия хлорида, обезвоживают безводным натрия сульфатом (около 3 г) и фильтруют.

1-2 г полученного масла (с точностью до 0,001 г) взвешивают в конической колбе, растворяют в 5 мл спирта, нейтрализуют спиртовым раствором едкого кали (0,5 моль/л) и определяют эфирное число, как описано выше (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число после ацетилирования X_2 вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{28,05 \times V_1}{B},$$

где V_1 - объем раствора едкого кали (0,5 моль/л), израсходованного на омыление эфиров после ацетилирования, мл; B - масса навески, г; 28,05 - количество миллиграммов едкого калия, содержащихся в 1 мл спиртового раствора едкого калия (0,5 моль/л).

Содержание свободных спиртов X_3 в процентах вычисляют по формуле:

$$X_3 = \frac{(X_2 - X) \times M \times 100}{56,1 \times 1000 \times \left(\frac{I - (X_2 - X) \times 42}{56,1 \times 1000} \right)},$$

где X - эфирное число; X_2 - эфирное число после ацетилирования; M - молекулярная масса спирта, 56,1 - молекулярная масса едкого калия; $[I - (X_2 - X) \times 42 / 56,1 \times 1000]$ - поправка на увеличение массы эфирного масла за счет присоединения ацетильного остатка с молекулярной массой 42.

Общее содержание спиртов выражается суммой связанных и свободных спиртов.

Результаты внесите в протокол анализа. Заполните таблицу:

Результаты определения показателей подлинности, доброкачественности эфирного масла

Наименование масла	Цвет и прозрачность	Запах, вкус	Тз	Угол вращения	показатель преломления	Наличие примесей		Хим. константы		
						Спирт	мин. масла	КЧ	ЭЧ	ЭЧПА
1.										
2.										
3.										

Сделайте общее заключение о соответствии требованиям НД исследуемого образца масла.

Практическая работа № 2. Определите количественное содержание эфирного масла в растительном сырье

Задание 1. Возьмите 10,0 -20,0 г лекарственного растительного сырья (листья шалфея или листья мяты перечной), измельчите его в соответствии с требованиями ГФ, загрузите колбу для перегонки, залейте 300 мл воды, соберите прибор для определения эфирного масла, включите холодильник и осуществляйте перегонку продолжительностью не менее 1 часа.

Задание 2. Определите полноту перегонки, для чего снимите показания на градуированном приемнике, с интервалом 10 мин. При отсутствии ощутимого увеличения эфирного масла выключите нагрев.

Задание 3. После остывания разберите прибор: а) определите цену деления градуированного приемника путем нахождения двух отметок с цифрами и соответствующих расчетов; б) определите объем эфирного масла в мл; в) вылейте эфирное масло с специальную склянку для сбора и отстоя масла.

Методика I (ГФ XI, вып. I, с. 290). Навеску измельченного сырья помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл воды и закрывают резиновой пробкой с обратным шариковым холодильником. В пробке снизу укреплены металлические крючки, на которые подвешивают градуированный приемник так, чтобы конец холодильника находился над воронкообразным расширением приемника, не касаясь его. Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенок, и отстоять от уровня воды не менее, чем на 50 мм. Цена деления градуированной части приемника 0,025мл. Колбу с содержимым нагревают в течение времени, указанного в соответствующем НД. По истечении срока, указанного в статье на анализируемое сырье, выключить прибор. Вынув и остудив приборчик Гинзберга (У-образную трубку) до комнатной температуры, отсчитать деления, занятые маслом, вычислить его содержание в сырье. Содержание эфирного масла X в объемно-весовых процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)},$$

где V - объем эфирного масла, мл; m - масса сырья, г; W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Задание 4. Произведите в протоколе расчет количественного содержания эфирного масла в % с учетом влажности сырья. Сделайте выводы о соответствии сырья требованиям НД по количественному содержанию эфирного масла и запишите в протокол. Зарисуйте приборы, с помощью которых определяют количественное содержание эфирного масла по методу I и 2.

РАЗДЕЛ 7: ГЛИКОЗИДЫ. АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ И САПОНИНОВ.

Цель занятия: научиться умению проводить химический анализ на доброкачественность сырья, содержащего сердечные гликозиды и сапонины.

Этапы достижения цели:

1. Овладеть методикой проведения качественного определения сердечных гликозидов и сапонинов в лекарственном растительном сырье;
2. Овладеть методикой определения количественного содержания сапонинов в лекарственном растительном сырье.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте понятие о гликозидах, приведите общую характеристику и классификацию.
2. Дайте определение, общую характеристику и классификацию сердечных гликозидов.
3. Охарактеризуйте особенности строения агликона и сахарного остатка в сердечных гликозидах.
4. Опишите физико-химические свойства в сердечных гликозидах.
5. Перечислите и обоснуйте методы качественного и количественного определения сердечных гликозидов в лекарственном растительном сырье.
6. Что называется биологической стандартизацией сырья, содержащего сердечные гликозиды.
7. Приведите общую характеристику сапонинов. Классификация. Физико-химические свойства. Использование в медицине и фармации.
8. Методы выделения сапонинов из растительного лекарственного сырья.
9. Качественное обнаружение сапонинов в растительном лекарственном сырье.
10. Перечислите и охарактеризуйте методы количественного определения сапонинов в лекарственном растительном сырье (гравиметрия, физико-химические методы).

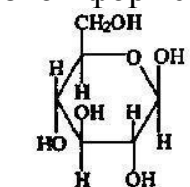
Учебный материал по теме

В настоящее время к гликозидам относят природные углеводсодержащие вещества органического характера, преимущественного растительного происхождения. В состав молекулы гликозидов входит несахаристая часть – агликон (генин) и сахаристая часть – гликон (гликозил). **Гликозиды** – природные соединения, производные циклических форм сахаров, которые в процессе гидролиза распадаются на продукты, среди которых всегда есть сахаристое вещество. Слово «гликозиды» произошло от греческого слова «*glycos*» – сладкий. Термин введен в начале XIX века немецкими учеными Ф. Велером и Ю. Либихом. Они выделили гликозид амигдалин из семян горького миндаля и установили, что в его состав входит глюкоза, и дали название «глюкозиды». Теперь это название сохранилось только для соединений, в со-

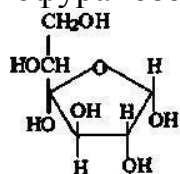
став которых входит глюкоза. Другие гликозиды называют по названию сахаров, входящих в их состав, - «рамнозиды», «галактозиды» и т.д. В целом же эту группу соединений называют «гликозидами».

Агликон и гликон соединены между собой гликозидной связью, поэтому молекула гликозида легко расщепляется в присутствии воды под влиянием энзимов, содержащихся в этом растении. Связь гликозила с генином осуществляется либо через кислород (О-гликозиды), либо через азот (N-гликозиды), либо через серу (тиогликозиды), либо углерод (С-гликозиды).

В состав гликозидов входят гексозы (моносахариды, содержащие 6 углеродных атомов) и пентозы (содержащие 5 углеродных атомов), а также их окисленные производные - уроновые кислоты. Циклические формы моносахаридов могут быть в пиранозной форме (в основе их структуры лежит пирановое кольцо) и фуранозной форме (в основе - фурановое кольцо). Например: глюкоза относится к гексозам (состоит из 6 углеродных атомов), существует в пиранозной форме (в этом случае называется глюкопиранозой) и в фуранозной форме (называется глюкофуранозой).



β-глюкопираноза



α-глюкофураноза

Образование гликозидной связи происходит за счет полуацетальных гидроксильных групп моносахаридов, поэтому их называют гликозидными гидроксилами. В зависимости от конфигурации полуацетального гидроксила у C₁ различают *альфа*- и *бета*-формы.

В зависимости от того, какая форма моносахаридов участвует в образовании гликозидов, различают *альфа*- и *бета*-гликозиды. В растениях *бета*-гликозиды встречаются чаще, они более устойчивы к гидролизу и фармакологически более активны.

Фармакологическое действие гликозидов на организм обуславливается в основном агликонами, присутствие гликона усиливает или ускоряет это действие.

Классификация гликозидов

В настоящее время в зависимости от химического строения агликона все лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие гликозиды, делят на две группы – лекарственное растительное сырье, содержащее гомогликозиды и лекарственное растительное сырье, содержащее гетерогликозиды.

Гомогликозиды (полисахариды, полиозы) – гликозиды, в которых агликон и гликон принадлежат к одному классу соединений и, следовательно, содержат только углеводные остатки (крахмал, клетчатка, слизи, камеди, пектины): алтей лекарственный, подорожник большой, ламинария.

Характеристика гомогликозидов приведена в разделе «Полисахариды».

Гетерозиды классифицируют:

- по углеводной части молекулы;
- по характеру гликозидной связи;
- по структуре аглика.

Классификация гетерозидов по углеводной части молекулы.

В зависимости от количества моносахаридов в углеводной части молекулы различают:

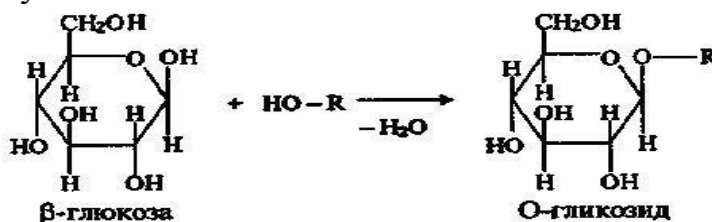
- 1) *монозиды* - углеводный компонент содержит моносахарид;
- 2) *биозиды* - углеводный компонент содержит дисахарид;
- 3) *триозиды* - углеводный компонент содержит трисахарид;
- 4) *тетразиды* - углеводный компонент содержит тетрасахарид;
- 5) *олигозиды* - углеводный компонент содержит олигосахарид (5 и более моносахаридов).

Гликозиды, содержащиеся в живом растении, называются *первичными*, или *нативными*. Они, как правило, с медицинской точки зрения наиболее ценные. При ферментативном гидролизе происходит постепенное отщепление сахаров, т.е. ступенчатый гидролиз. Гликозиды, образующиеся в процессе гидролиза, называются *вторичными*, *третичными* и т.д. При кислотном и щелочном гидролизе идет практически одновременное расщепление всех гликозидных связей.

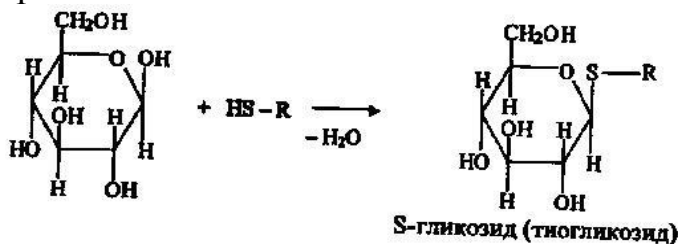
Классификация гетерозидов по характеру гликозидной связи

Соединение сахарной части и аглика происходит за счет полуацетального гидроксильного циклической формы сахара и водорода гидроксильной группы или других функциональных групп аглика. В зависимости от природы связывающего атома выделяют несколько типов гликозидов:

1. *O-гликозиды* - присоединение аглика идет через атом кислорода. Это наиболее многочисленная группа гликозидов, они легко подвергаются гидролизу.



2. *S-гликозиды (тиогликозиды)* – присоединение аглика идет через атом серы.

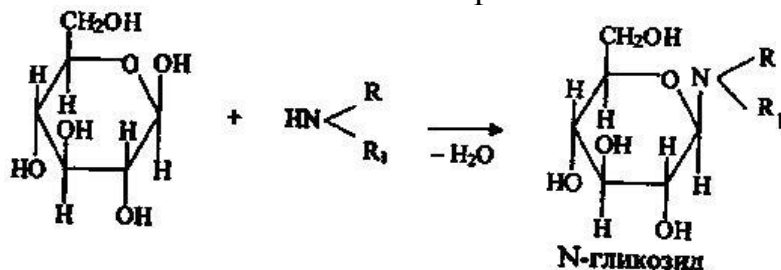


Тиогликозиды очень устойчивы к кислотному гидролизу, но легко подвергаются ферментативному и щелочному гидролизу. S-гликозиды обыч-

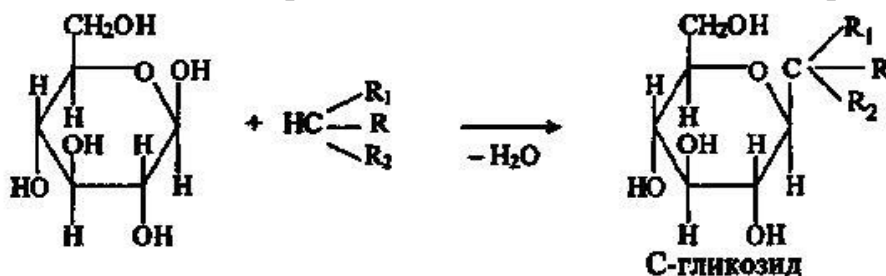
но имеют сложный агликон, который при гидролизе распадается на компоненты, в числе которых всегда имеется серосодержащее эфирное масло. Серосодержащие эфирные масла раздражающе действуют на слизистые оболочки и кожу. Благодаря этому свойству растения, содержащие свободные серосодержащие эфирные масла (лук, чеснок) или тиогликозиды (горчицы черная и сарептская), издавна используются для получения лекарственных средств, оказывающих местное раздражающее или отвлекающее действие.

Обезжиренный жмых семян горчицы используют для изготовления горчичников. Семена горчицы содержат тиогликозид синигрин. В присутствии воды при температуре 30-40°C под влиянием фермента мирозина отщепляется аллилизотиоцианат, называемый горчичным эфирным маслом.

3. *N-гликозиды* – присоединение агликona идет через атом азота. Образуются в основном плесневыми грибами.



4. *C-гликозиды* – присоединение агликona идет через атом углерода.



C-гликозиды отличаются большой устойчивостью к гидролизу. Они содержатся в растениях семейств розоцветных, бобовых, крестоцветных и др.

Классификация гетерозидов по характеру агликona.

Наиболее многочисленную группу O-гликозидов классифицируют по характеру агликona.

1. *Алкилгликозиды* – агликонами являются алифатические углеводороды и их производные.



2. *Цианогенные гликозиды* - агликон содержит цианогенную, или нитрильную группу ($-C\equiv N$). Наиболее характерны для растений семейства розоцветных, подсемейства сливовых. Локализуются в семенах. В медицинской практике применяется горькоминдальная вода, которую получают из жмыха семян горького миндаля перегонкой с водяным паром. Амигдалин под влиянием фермента *бета*-глюкозидазы расщепляется на 2 молекулы глюкозы, бензальдегид и синильную кислоту (содержание свободной и связанной синильной кислоты в горькоминдальной воде составляет 0,1 %). Горькоминдальная вода применяется в каплях и в микстурах в качестве успокаивающего и обезболивающего средства.

3. *Терпеновые гликозиды*:

- 1) монотерпеновые (горечи);
- 2) тритерпеновые сапонины.

4. *Стероидные гликозиды* - агликонами являются производные циклопентанпергидрофенантрена:

- 1) кардиотонические (сердечные) гликозиды;
- 2) стероидные сапонины;
- 3) стероидные алкалоиды (гликоалкалоиды)

5. *Фенольные гликозиды*

- 1) группа простых фенольных соединений;
- 2) кумарины;
- 3) флавоноиды;
- 4) антрагликозиды;
- 5) дубильные вещества гидролизуемой группы
6. Гликозиды неустоенного строения.

Физические и химические свойства гликозидов

Гликозиды - это твердые кристаллические или аморфные вещества, чаще бесцветные, иногда окрашенные. Некоторые гликозиды имеют специфический вкус или запах. Гликозиды большей частью растворяются или набухают в воде, растворяются в этиловом спирте слабой концентрации, нерастворимы в органических растворителях. Обладают оптической активностью.

Гликозиды в растениях находятся в растворенном виде в клеточном соке. Химические свойства многообразны и обусловлены наличием гликозидной связи и строением составляющих гликозида, т.е. сахаров и агликона. Под действием ферментов при наличии воды гликозиды гидролизуются на составные части. Возможен гидролиз не только ферментативный, но также кислотный и щелочной.

Гликозиды и ферменты находятся в живых растениях в динамическом равновесии. При заготовке лекарственного растительного сырья клеточные мембраны теряют барьерные свойства, и ферменты и гликозиды, находившиеся в разных клетках, вступают во взаимодействие. Оптимальной для ферментативного гидролиза является температура 30-40°C. При 25°C актив-

ность ферментов снижается, при 50-60 °С ферменты инактивируются. Все это учитывают при заготовке, сушке и хранении сырья.

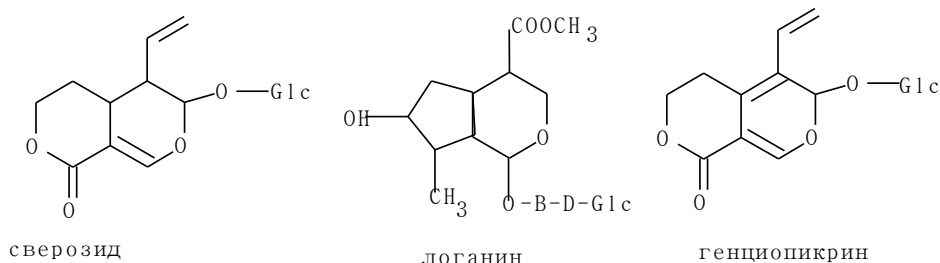
Горькие вещества или горечи (Amara) растительные, по преимуществу безазотистые вещества сильно горького вкуса, повышающие секрецию пищеварительных желез и, следовательно, аппетит.

Горечи встречаются в растениях различных семейств, но наиболее широко представлены в семействе Горечавковые, находят их также в семействах Яснотковых, Астровых и ряде других.

По химической природе горечи в большинстве относятся к гликозидам, агликоны которых, в основном являются терпеноидами. Часть из них соединения монотерпеноидной группы, в ряде растений горечи – сесквитерпеноиды, встречаются также дитерпеновые и монотерпеновые горечи. Все терпеноидные горечи сильно окислены, характеризуются наличием карбоки-, гидроки-, эпокси-, а также сложноэфирных, эфирных или лактонных группировок.

Монотерпеноидные горечи (чистые горечи) – главным образом иридоидные гликозиды, иногда терпеноидные алкалоиды.

Иридоиды (псевдоиндиканы) – группа циклопентаноидных монотерпеноидов, название которых связано с ириодиалем, который был получен из рода муравьев *Iridomyrmex*, псевдоиндиканами названы за способность давать синюю окраску в кислой среде. Наиболее характерными представителями этой группы являются логанин и сверозид из вахты трехлистной, генциопикрин и генцианин из золототысячника красного.



Сесквитерпеноидные горечи представлены преимущественно лактонами, производными гвайянового ряда (артабсин, абсинтин в полыне горькой и ахиллин в тысячелистнике).

Тритерпены обнаружены в одуванчике лекарственном (гликозиды тараксацин и тараксацерин).

В отличие от пряных веществ, содержащих эфирные масла, горечи повышают секрецию медленно, но устойчиво. Вещества данной группы не обладают ясно выраженным резорбтивным действием, и в отличие от горьких веществ других групп (например, алкалоидов) не обладают токсичностью и каким-либо иным специфическим действием.

Применение в медицине горечей связано на их рефлекторном действии на функцию желудочно-кишечного тракта; они раздражают вкусовые рецепторы, рефлекторно возбуждают парасимпатические волокна, подходящие к желудку и слюнным железам. В результате повышается секреция желудочно-

го сока, панкреатического сока, а также перистальтика кишечника. Препараты горечей назначаются за 15-20 минут до еды при расстройствах пищеварения, сопровождающихся отсутствием аппетита, диспепсическими явлениями, ахилией, а также при гипацидных и атрофических гастритах, в сочетании с желчегонными и другими лекарственными средствами.

Противопоказаны горечи при повышенной желудочной секреции, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Общих методов стандартизации сырья этой группы нет. Ранее определяли показатель горечи органолептически (методика зарубежных фармакопей) по степени разведения первичного водного извлечения из сырья, при котором еще ощущается горький вкус. В настоящее время этот показатель для отечественного сырья не применяется. Для оценки качества сырья используют сопутствующие вещества (флавоноиды, эфирные масла, экстрактивные вещества).

Растения и лекарственное растительное сырье, содержащие горечи, подразделяют на две подгруппы. Подгруппа горько-ароматического сырья включает траву полыни, корневища аира, траву тысячелистника. Подгруппа сырья, содержащего чистые горечи, включает корни одуванчика, листья вахты трехлистной, траву золототысячника, траву пиона уклоняющегося. Близки по действию некоторые растения, дающие пряно-ароматическое сырье: кору корицы, гвоздику и имбирь.

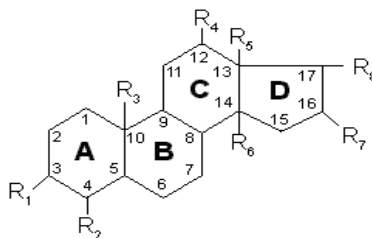
КАРДИОТОНИЧЕСКИЕ (СЕРДЕЧНЫЕ) ГЛИКОЗИДЫ

Кардиотоническими (сердечными) гликозидами называется группа природных фармакологически активных веществ, оказывающих избирательное кардиотоническое действие на сердечную мышцу. Агликоном этих соединений являются производные циклопентанпергидрофенантрена, содержащие в 17-м положении ненасыщенное пятичленное или шестичленное лактонное кольцо. Учитывая, что во всем мире сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в общей структуре заболеваемости, эта группа веществ в арсенале медицинских средств имеет первостепенное значение. Лекарственные растения служат единственным источником получения кардиотонических гликозидов. Растения, содержащие кардиотонические гликозиды, известны давно. У народов разных стран они в течение многих веков применялись для лечения сердечных и других заболеваний. Древние египтяне и римляне употребляли морской лук как сердечное и мочегонное средство, греки пользовались желтушником, африканские племена использовали семена строфанта для изготовления яда для смазывания наконечников стрел и копий.

Характеристика агликона

Как и все гликозиды, гликозиды кардиотонического действия состоят из двух частей: углеводной и неуглеводной - агликона. Агликон является производным циклопентанпергидрофенантрена (и относится к классу стероидов). У агликонов кардиотонических гликозидов могут быть заместители у угле-

родных атомов в положении: C₃, C₅, C₁₀, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₆, а в положении C₁₇ находится ненасыщенное лактонное кольцо. Заместителями могут быть: R₁ - OH; R₂ - OH, H; R₃ - CH₃, C-OH, CH₂-OH; R₄ - OH, H; R₅ - CH₃; R₆ - OH; R₇ - OH, H.



R₈ - ненасыщенное лактонное кольцо. У всех гликозидов в положении C₃ и C₁₄ имеются гидроксильные группы, а в положении C₁₃ - метильная группа. Гидроксильные группы также могут находиться в положениях C₁, C₂, C₁₁, C₁₅. Лактонное кольцо может находиться в *альфа*- и *бета*-положениях. Видимо, лактонное кольцо обуславливает кардиотоническое действие, так как отсутствие или разрыв кольца приводят к полной потере физиологической активности. Например, содержащийся в наперстянке гликозид дигитонин, имеющий стероидное строение, но лишенный лактонного кольца, кардиотонического действия не оказывает.

Характеристика углеводного компонента

Кроме обычных сахаров - глюкозы, фруктозы, рамнозы, в кардиотонических гликозидах встречаются специфические дезоксисахара (обедненные кислородом): дигитоксоза и цимароза. Сахаристые вещества присоединяются к агликону за счет спиртового гидроксила в положении C₃. Длина углеводной цепочки может быть от 1 до 5 моносахаридов. Обычно вначале присоединяются дезоксисахара, а в конце цепочки глюкоза.

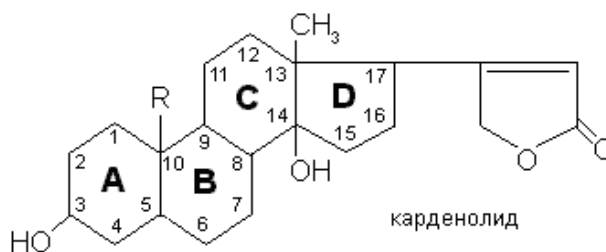
Биологическая активность кардиотонических гликозидов зависит от числа метильных и особенно гидроксильных групп у углеродных атомов «скелета». С увеличением числа гидроксильных групп повышается растворимость гликозидов в воде.

На скорость и силу кардиотонического эффекта, кроме того, оказывает влияние характер углеводного компонента: наиболее сильное, но кратковременное воздействие вызывают монозиды; с удлинением углеводной цепочки действие становится более мягким и длительным. Чистые агликоны плохо удерживаются сердечной мышцей, поэтому действуют кратковременно.

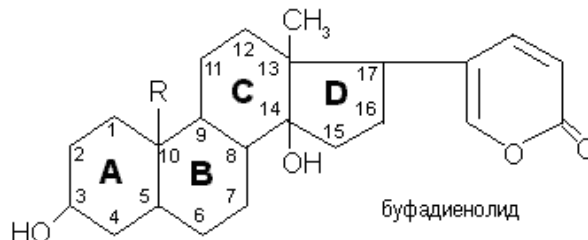
Классификация

В зависимости от строения ненасыщенного лактонного кольца все кардиотонические гликозиды делятся на две группы:

- 1) *карденолиды* - с пятичленным лактонным кольцом (гликозиды наперстянки, строфанта, ландыша, горицвета);



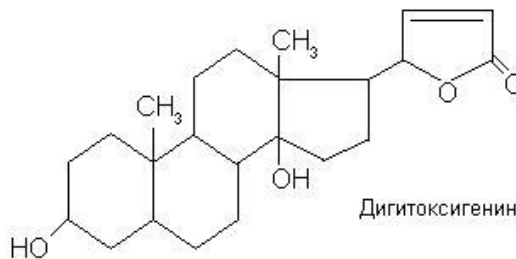
2) *буфадиенолиды* - с шестичленным лактонным кольцом (гликозиды морозника, морского лука).



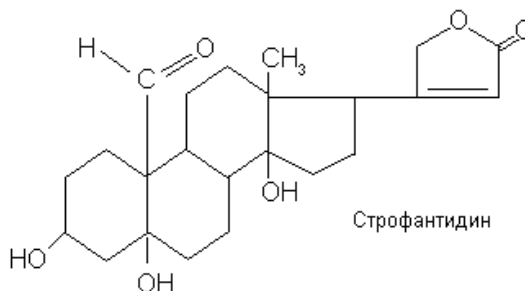
В настоящее время выделено около 400 индивидуальных гликозидов, из них большая часть (380) – карденолиды.

В зависимости от заместителя в положении C_{10} карденолиды подразделяются на подгруппы.

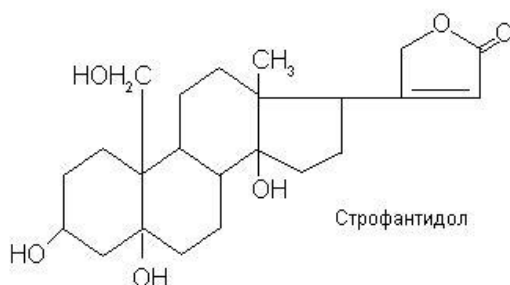
1. *Подгруппа наперстянки* включает гликозиды, агликоны которых в положении C_{10} имеют метильную группу - CH_3 . Гликозиды этой подгруппы медленно всасываются и медленно выводятся из организма, обладают кумулятивным действием, например гликозид дигитоксин (агликон – дигитоксигенин).



2. *Подгруппа строфанта* включает гликозиды, агликон которых имеет в положении C_{10} альдегидную группу - $C=O$. Эти гликозиды быстро всасываются, быстро выводятся из организма и не обладают кумулятивным действием, например гликозид строфантин (агликон – строфантинин).



Подгруппа объединяет кардиотонические гликозиды, имеющие в положении C_{10} спиртовую группу - CH_2OH .



Физико-химические свойства

Кардиотонические гликозиды в основном кристаллические вещества, бесцветные или кремоватые, без запаха, горького вкуса; характеризуются определенной точкой плавления и углом вращения плоскости поляризации. Обладают способностью флуоресцировать в УФ-свете оттенками желтого, зеленого и голубого цветов. Кардиотонические гликозиды растворяются в спиртах этиловом и метиловом, в воде, хлороформе и не растворяются в органических растворителях (петролейном и диэтиловом эфире). Агликоны кардиотонических гликозидов растворяются в органических растворителях. В зависимости от растворимости в воде и липидах, кардиотонические гликозиды делятся на две группы:

1. Гидрофильные (полярные) кардиотонические гликозиды.
2. Липофильные (неполярные) кардиотонические гликозиды.

Гидрофильные кардиотонические гликозиды хорошо растворяются в воде, мало растворимы в липидах. Полярность этих соединений обусловлена наличием альдегидной ($-CHO$) группы в C_{10} положении агликона, а также присутствием дополнительных гидроксильных ($-OH$) групп в структуре агликона. Гидрофильными свойствами обладают карденолиды подгруппы строфанта.

Липофильные кардиотонические гликозиды легко растворяются в липидах, плохо - в воде. Липофильность этих кардиотонических гликозидов обусловлена наличием в C_{10} положении агликона метильной ($-CH_3$) группы. Липофильными свойствами обладают карденолиды подгруппы наперстянки. Наличие ацетилированных моносахаридов в углеводной цепи (ацетилдигитоксоза) приводит к повышению гидрофильности гликозидов этой подгруппы.

В организме кардиотонические гликозиды взаимодействуют с белками плазмы крови. Прочность связи прямо пропорциональна растворимости в липидах и обратно пропорциональна степени полярности сердечных гликозидов. Прочные связи затрудняют ресорбцию кардиотонических гликозидов из крови белками органов. В миокарде фиксируется до 10 % поступивших в организм кардиотонических гликозидов, что в 20 раз больше, чем в других органах. При этом действие сердечных гликозидов проявляется на каждое мышечное волокно миокарда.

Химические свойства обусловлены особенностями строения кардиотонических гликозидов - наличием стероидного ядра, лактонного кольца, углеводной цепи и присутствием гликозидной связи. Самыми нестойкими в молекулах сердечных гликозидов являются лактонное кольцо и гликозидная связь. Лактонное кольцо легко изомеризуется под действием щелочей. Благодаря наличию гликозидной связи кардиотонические гликозиды легко подвергаются ферментативному гидролизу в присутствии воды. Гидролитическое расщепление углеводной цепи происходит постепенно, что обуславливает ступенчатый распад сердечных гликозидов. При гидролизе монозидов (адонитоксин, конваллотоксин, эризимин) образуются соответствующие агликон и моносахарид.

Кардиотонические гликозиды гидролизуются также кислотами и щелочами, а некоторые из них даже при кипячении с водой. При кислотном и щелочном гидролизе сразу происходит глубокое расщепление сердечных гликозидов до агликона и углеводных компонентов.

Качественные реакции

Качественные реакции на кардиотонические гликозиды проводятся с индивидуальными веществами или очищенными спиртовыми извлечениями из растительного сырья. На кардиотонические гликозиды выделяют три группы химических реакций на различные части молекулы:

1. Реакции на стероидное ядро.

Основаны на способности стероидного ядра кардиотонических гликозидов подвергаться дегидратации под действием кислотных реагентов (уксусный ангидрид, кислота серная концентрированная, кислота трихлоруксусная и др.) с образованием окрашенных комплексных соединений. Для кардиотонических гликозидов обычно проводят реакции:

Реакция Либермана–Бурхарда. При взаимодействии кардиотонических гликозидов со смесью уксусного ангидрида и кислоты серной концентрированной (50:1) появляется розовое окрашивание, переходящее в зеленое, а затем в синее.

Реакция Розенгейма. При взаимодействии кардиотонических гликозидов с 90 % водным раствором кислоты трихлоруксусной появляется розовое окрашивание, переходящее в лиловое, а затем в синее.

Реакция с хлоридом сурьмы (III). Кардиотонические гликозиды при взаимодействии с раствором сурьмы треххлористой в среде уксусного ангидрида образуют лиловое окрашивание.

2. Реакции на ненасыщенное пятичленное лактонное кольцо. Основаны на способности ненасыщенного лактонного кольца легко окисляться полинитросоединениями в щелочной среде с образованием окрашенных продуктов реакции. Для кардиотонических гликозидов обычно проводят реакции:

Реакция Балье. При взаимодействии с кислотой пикриновой в щелочной среде кардиотонические гликозиды образуют комплексы, окрашенные в оранжевый цвет.

Реакция Кедде. При взаимодействии с кислотой 3,5-динитробензойной кардиотонические гликозиды образуют комплексы, окрашенные в фиолетово-красный цвет.

Реакция Легалья. При взаимодействии с натрия нитропруссидом в щелочной среде кардиотонические гликозиды образуют комплексы, окрашенные в красный цвет.

Реакция Раймонда. При взаимодействии с *мета*-динитробензолом кардиотонические гликозиды образуют комплексы, окрашенные в красно-фиолетовый цвет.

3. Реакции на углеводную часть молекулы. Основаны на способности моносахаридов углеводной цепи образовывать окрашенные комплексы с различными реактивами. Моносахариды, входящие в состав кардиотонических гликозидов, после предварительного гидролиза вступают во все цветные реакции, свойственные углеводам (Фелинга, серебряного зеркала и др.). Для дезоксисахаров предложена **реакция Келлера–Килиани**. Дезоксисахара в присутствии железа сульфата (III) с кислотой уксусной ледяной и кислотой серной концентрированной образуют комплексы, окрашенные в синий или сине-зеленый цвет. Необходимым условием для проведения этой реакции является отсутствие на конце углеводной цепи обычных сахаров (глюкозы).

Достоверное заключение о присутствии в лекарственном растительном сырье кардиотонических гликозидов можно сделать только при положительном результате всех трех групп качественных реакций на различные части молекулы.

В ГФ XI на сырье наперстянок пурпуровой и крупноцветковой, видов ландыша и горицвета весеннего качественных реакций не предусмотрено.

Кроме того, кардиотонические гликозиды образуют нерастворимые комплексы с растворами дубильных веществ, что используется при отравлении препаратами сердечных гликозидов.

Для идентификации буфадииенолидов обязательно снятие их УФ-спектров, где они имеют характерную полосу поглощения при 300 нм.

Количественное определение

Количественную оценку качества сырья, содержащего кардиотонические гликозиды, проводят методом биологической стандартизации (ГФ XI, вып. 2, с. 163-175).

Метод основан на способности кардиотонических гликозидов вызывать в токсических дозах остановку сердца животных в стадию систолы. В качестве подопытных животных используют лягушек, голубей или кошек. Чувствительность животных к кардиотоническим гликозидам определяют в сравнении со стандартными образцами: индивидуальными веществами или очищенными экстрактами, которые вырабатывают в специальных научно-исследовательских институтах. Активность лекарственного сырья и препаратов кардиотонических гликозидов выражают в единицах действия (ЕД), которые, в зависимости от вида животных, обозначают: ЛЕД - «лягушачьи» ЕД, КЕД - «кошачьи» ЕД или ГЕД - «голубиные» ЕД.

1 ЛЕД соответствует наименьшей дозе стандартного препарата, вызывающей остановку сердца стандартной лягушки (самец травяной лягушки массой 28-33 г). Сырье и препараты видов наперстянок, ландыша и горицвета весеннего должны вызывать остановку сердца лягушки в течение 1 часа, а видов строфанта и желтушника седеющего - в течение 2 часов.

Под 1 КЕД или 1 ГЕД понимают дозу стандартного препарата из расчета на 1 кг массы животного.

В нормативной документации на лекарственное сырье, содержащее кардиотонические гликозиды, обязательно в разделе «Числовые показатели» указывается количество ЕД в 1 г сырья.

Недостатками метода биологической стандартизации являются его трудоемкость, высокая стоимость, большая ошибка опыта (до 25 %). Поэтому нормативная документация на некоторые виды сырья (листья наперстянки шерстистой - *Folia Digitalis lanatae*) и препараты кардиотонических гликозидов требует определять их количественное содержание физико-химическими (хроматофотоэлектроколориметрическим или хроматоспектрофотометрическим) методами. Они основаны на предварительном хроматографическом разделении кардиотонических гликозидов с последующим фотоэлектроколориметрическим или спектрофотометрическим определением.

Медицинское применение сырья и препаратов, содержащих кардиотонические гликозиды

Лекарственное растительное сырье, содержащее кардиотонические гликозиды, и их препараты применяют как кардиотонические средства:

- для профилактики и лечения хронической сердечной недостаточности любого происхождения;
- для лечения острой сердечной недостаточности;
- для снятия аритмий, особенно возникающих на фоне тахикардии;
- при нарушениях коронарного кровотока.

Выбор препарата для терапевтического применения зависит не только от активности кардиотонических гликозидов, но и быстроты наступления эффекта и продолжительности действия, что в значительной степени зависит от физико-химических свойств гликозидов, а также от способов введения препарата. Продолжительность действия препаратов кардиотонических гликозидов зависит от прочности связывания с белками, скорости разрушения и выведения из организма. Эти факторы определяют способность препаратов сердечных гликозидов накапливаться (кумуляировать) в организме.

В зависимости от скорости и продолжительности действия все кардиотонические гликозиды можно разделить на 3 группы:

1. Кардиотонические гликозиды длительного действия.

Действие характерно для липофильных карденолидов подгруппы наперстянки. Они хорошо растворяются в липидах, поэтому хорошо всасываются в кишечнике, поступают в печень, выделяются с желчью и вновь реабсорбируются в желудочно-кишечном тракте, откуда с кровью поступают в сердце и фиксируются миокардом.

Действие на сердце развивается медленно (через 2-3 часа после приема), достигает максимума через 8-12 часов, прекращается через 2-3 недели. Кардиотонические гликозиды этой группы кумулируют в организме.

Применяются для лечения хронической сердечной недостаточности. Эта группа включает препараты наперстянки пурпуровой, которые используются преимущественно в виде экстемпоральных лекарственных форм (порошок, настой), таблеток и суппозиторий, реже - растворов для инъекций. Вводятся в организм *per os* или *per rectum*, реже - внутривенно.

2. Кардиотонические гликозиды короткого действия.

Действие характерно для гидрофильных карденолидов подгруппы строфанта. Они мало растворимы в липидах и плохо всасываются в кишечнике, поэтому их применяют парентерально. Кардиотонические гликозиды растворяются в плазме крови, фиксируются миокардом, выводятся из организма с мочой.

Действие на сердце развивается быстро (через 5-10 минут), максимум достигается через 25-30 минут, прекращение действия - через 2-3 дня. Карденолиды этой группы не кумулируют в организме.

Применяются для лечения острой сердечной недостаточности. Являются препаратами скорой помощи. Эта группа включает препараты строфанта и препарат ландыша «Коргликон». Используются в виде растворов для инъекций. Внутривенно вводятся медленно, перед введением разводятся в 10-20 мл 40 % раствора глюкозы.

Относящиеся к этой же группе по структуре кардиотонических гликозидов и их физико-химическим свойствам препараты адониса и настойка ландыша при приеме внутрь менее активны, применяются преимущественно при сравнительно легких формах хронической недостаточности кровообращения. Кроме того, они применяются самостоятельно и в составе комплексных препаратов как успокаивающие средства при неврозах, вегетососудистых дистониях и др.

3. Кардиотонические гликозиды среднего действия.

Занимают промежуточное положение. Эта группа включает препараты наперстянки шерстистой. Карденолиды наперстянки шерстистой проявляют как липофильные, так и гидрофильные свойства, они достаточно хорошо растворяются как в липидах, так и в воде, способны кумулировать, но выводятся из организма значительно быстрее кардиотонических гликозидов наперстянки пурпуровой.

При приеме внутрь кардиотонический эффект наступает через 1-2 часа и достигает максимума в течение 8 часов.

При внутривенном введении действие развивается через 15-30 минут и достигает максимума через 2-3 часа.

Используются в виде растворов, таблеток (принимаются внутрь), растворов для инъекций (вводятся внутривенно) для лечения хронической и острой сердечной недостаточности.

Препараты кардиотонических гликозидов противопоказаны при выраженной брадикардии, атриовентрикулярной блокаде различной степени;

использование при стенокардии и инфаркте миокарда возможно лишь при наличии сердечной недостаточности.

В связи с токсичностью, при кумуляции и передозировке кардиотонических гликозидов могут возникать осложнения:

- нарушение сердечного ритма;
- расстройство деятельности желудочно-кишечного тракта (рвота, диспепсия);
- нарушения со стороны ЦНС (головные боли, беспокойство, бессонница, депрессивные явления, нарушения зрения).

САПОНИНЫ (сапонизиды) - гликозиды (гетерозиды), производные стероидов и тритерпеноидов, обладающие гемолитической и поверхностной активностью и токсичностью для холоднокровных животных.

Название «сапонин» (от лат. «*sapo*» - мыло) впервые появилось в 1819 г., когда из мыльнянки (растения семейства гвоздичных) было выделено вещество, образующее с водой обильную пену.

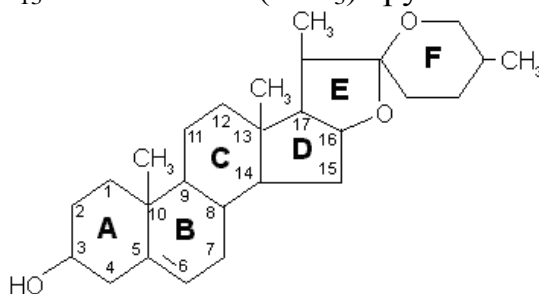
Классификация

Сапонины по строению их агликона (сапогенина) делятся на две группы: стероидные и тритерпеновые.

Стероидные сапонины. Сапогенины этих сапонинов являются производными циклопентанпергидрофенантрена, как и агликоны кардиотонических гликозидов. Однако стероидные сапонины не оказывают кардиотонического действия, так как не имеют лактонного кольца при C₁₇ и ряда других функциональных групп.

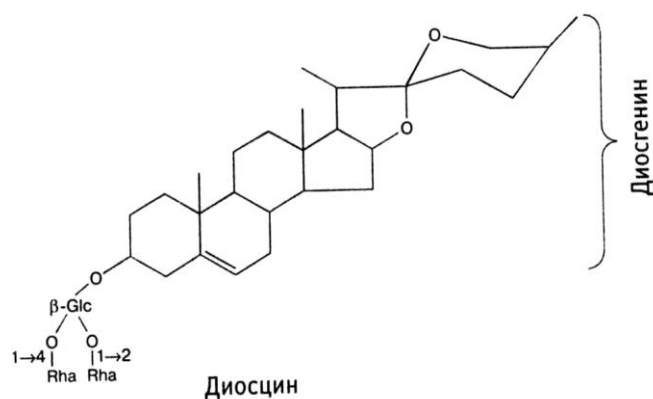
Сапогенины всех стероидных сапонинов имеют:

- у C₃ кольца А – гидроксильную (-ОН) группу;
- в положении 16-17 - спирокетальную группировку за счет окисления боковой цепи;
- в положении 5-6 - двойную связь (-CH=CH-);
- в положениях C₁₀ и C₁₃ - метильные (-CH₃) группы.



Диосгенин

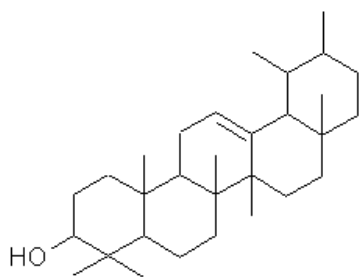
Углеводная часть молекулы стероидных сапонинов присоединяется в положении C₃ агликона и может содержать от 1 до 9 моносахаридов (глюкоза, галактоза, рамноза, галактуроновая кислота и др.). Моносахариды могут образовывать как линейные, так и разветвленные цепи. Например, стероидный сапонин диосцин (диоскорея nipponica – *Dioscorea nipponica*, якорцы стелющиеся – *Tribulus terrestris*) состоит из агликона диосгенина, к которому присоединяется разветвленная триоза:



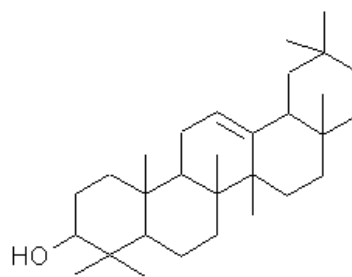
Стероидные сапонины встречаются редко, преимущественно в растениях тропического климата. В семействах диоскорейных, норичниковых, спаржевых, амариллисовых стероидные сапонины часто встречаются совместно с кардиотоническими гликозидами (наперстянка, ландыш и др.).

Тритерпеновые сапонины имеют общую формулу $(C_5H_8)_6$ и, в зависимости от количества колец в структуре агликона, делятся на пентациклические и тетрациклические.

а) *Тетрациклические* - содержат в структуре агликона 4 кольца и подразделяются на производные даммарана (даммарандиол), циклоартана (циклоартенол), зуфана. В основе этой группы лежит даммаран. Производные даммарана легко окисляются с образованием гетероциклов (панаксдиол и панакстриол). Соединения подобного строения обнаружены в женьшене (*Panax ginseng*), заманихе высокой (*Oplopanax elatus*), березе (*Betula* spp.).
 б) *Пентациклические* - содержат в структуре агликона 5 колец. Среди этой группы выделяют производные урсана (*альфа*-амирин), олеанана (*бета*-амирин), лупана (лупеол), гопана. С медицинской точки зрения, наиболее важными являются производные урсана и олеанана, которые отличаются друг от друга расположением заместителей – метильных ($-CH_3$) групп в положениях 19 и 20 кольца E.



альфа-Амирин



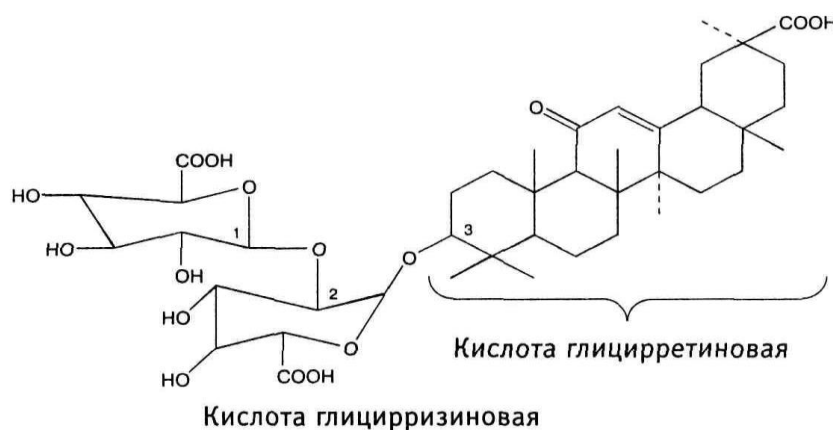
бета-Амирин

Альфа-амирин лежит в основе различных соединений, которые найдены в ортосифоне тычиночном, или почечном чае (*Orthosiphon stamineus*), лапчатке прямостоячей (*Potentilla erecta*) и других. Наиболее важным представителем является кислота урсоловая (28-карбокси-*альфа*-амирин). Кислота урсоловая обнаружена во многих растениях (бруснике - *Vaccinium vitis-idaea*, клюкве

болотной - *Oxycoccus palustris* и др.), причем встречается как в виде гликозидов, так и свободного агликона.

Бета-амирин лежит в основе следующих соединений:

- 1) кислота олеаноловая (28-карбокси-*бета*-амирин). Кислота олеаноловая и ее производные являются агликонами сапонинов аралии высокой (*Aralia elata*), синюхи голубой (*Polemonium caeruleum*), конского каштана (*Aesculus hippocastanum*), первоцвета весеннего (*Primula veris*), календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), патринии средней (*Patrinia intermedia*) и др.
- 2) кислота глицирретиновая (11-оксо-29-карбокси-*бета*-амирин). Кислота глицирретиновая является агликоном кислоты глицирризиновой (в C_3 положении присоединяется углеводная цепь из двух молекул глюконовой кислоты). Кислота глицирризиновая содержится в солодке голой (*Glycyrrhiza glabra*) и солодке уральской (*G. uralensis*).



Углеводная часть тритерпеновых сапонинов может присоединяться к агликону в различных положениях:

- в C_3 положении за счет гидроксильной (-ОН) группы;
- в C_{28} положении за счет карбоксильной (-COOH) группы (при этом связь агликона с сахаром называется ацилгликозидной);
- с сапогенином могут быть связаны две углеводные цепи (за счет гидроксильной группы в C_3 положении и карбоксильной группы в C_{28} положении). В этом случае сапонины относятся к дигликозидам.

Тритерпеновые сапонины могут быть нейтральными и кислыми. Кислотные свойства обусловлены наличием карбоксильных групп сапогенина и углеводной части молекулы. Гидроксильные группы могут быть ацилированы уксусной, тиглиновой, пропионовой, ангеликовой и другими кислотами.

Углеводная часть тритерпеновых сапонинов может содержать от 1 до 11 моносахаридов (глюкоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза, глюконовая и галактуроновая кислоты). Она может быть линейной и разветвленной (например, у аралозидов - сапонинов аралии высокой). Разветвление углеводной цепи происходит от первого сахарного остатка, связанного с агликоном.

На накопление сапонинов влияют стадии онтогенеза растений. Максимальное количество сапонинов в сырье содержится в фазы:

- бутонизации и начала цветения (ортосифон тычиночный и астрагал шерстистоцветковый);
- в конце вегетации, когда биомасса лекарственного растительного сырья максимальна (солодки, синюха, заманиха, аралия, женьшень, диоскорея);
- в период плодоношения (конский каштан).

На содержание сапонинов в лекарственном сырье влияют возраст растений и место их произрастания:

- дикорастущая синюха голубая достигает максимальной продуктивности к 5-6-му году жизни, а в культуре - к 2-3-му году. При этом содержание сапонинов в подземных органах находится на одном уровне;
- культивируемый женьшень рекомендуется собирать на 5-6-ой год, т.к. корни быстро растут до 3-х лет и далее их рост замедляется, а с 13 лет наблюдается уменьшение биомассы корней. Это связано с постепенным отмиранием боковых корней.

Влияние факторов внешней среды на накопление сапонинов строго специфично. Растения семейства аралиевых являются эндемиками Дальнего Востока, где сложился особый климатический и почвенный режим; зависимость накопления глицирризиновой кислоты от типа почвы и ее засоленности характерна для солодки. Чем больше засоленность, тем меньше глицирризиновой кислоты содержат корни солодки. Повышение влажности почвы способствует накоплению глицирризиновой кислоты.

Физические, химические и биологические свойства сапонинов

Физические свойства. Сапонины - бесцветные или желтоватые аморфные вещества. В кристаллическом состоянии выделены гликозиды, имеющие в углеводной цепи до 4 моносахаридов. Оптически активны. Гликозиды растворимы в воде. Растворимость увеличивается с возрастанием количества моносахаридов в углеводной цепи. В разведенных (60-70 %) спиртах растворяются на холоду; в более крепких (80-90 %) спиртах - только при нагревании, а при охлаждении выпадают в осадок. Нерастворимы в органических растворителях (ацетон, хлороформ, бензол). Свободные сапогенины не растворяются в воде и хорошо растворимы в органических растворителях. В зависимости от pH водных извлечений сапонины делят на: нейтральные - стероидные и тетрациклические тритерпеновые сапонины; кислые - пентациклические тритерпеновые сапонины. Их кислотность обусловлена наличием карбоксильных (-COOH) групп в структуре агликона или присутствием уоновых кислот в углеводной цепи. Специфическим свойством сапонинов является их способность снижать поверхностное натяжение жидкостей (воды) и давать при встряхивании стойкую обильную пену. Такая поверхностная активность связана с наличием в молекулах сапонинов одновременно как гидрофильного, так и липофильного остатков.

Химические свойства обусловлены структурой агликона, наличием отдельных функциональных групп, а также присутствием гликозидной связи. Сапонины гидролизуются под влиянием ферментов и кислот. Производные кислот олеаноловой и глицирретиновой гидролизуются под воздействием щелочей. При взаимодействии с кислотными реагентами (сурьмы (III) хлорид, сурьмы (V) хлорид, железа (III) хлорид, кислота серная концентрированная и др.) образуют окрашенные продукты. Кислые сапонины образуют нерастворимые комплексы с солями тяжелых металлов (Ba, Pb, Cu). Сапонины способны образовывать комплексы с белками, стеринами, липидами, фенольными соединениями. В составе комплексов сапонины не обладают гемолитической и поверхностной активностью. Сапонины, имеющие в своей основе стероидное ядро, вступают в специфическую реакцию Либермана–Бурхарда.

Биологические свойства. Сапонины обладают гемолитической активностью. Они способны растворять липидную часть оболочки эритроцитов. В результате этого оболочка из полупроницаемой становится проницаемой. Гемоглобин свободно поступает в плазму крови и растворяется в ней. Образуется красный прозрачный раствор - «лаковая» кровь. Гемолитической активностью обладают только гликозиды. В связи с этим сапонины не применяются для внутривенного введения, т.к. вызывают анемию. При приеме внутрь, после гидролиза в желудочно-кишечном тракте до агликонов, сапонины теряют гемолитическую активность. Гемолиз эритроцитов вызывают не все сапонины. Этим свойством не обладают сапонины солодки. Сапонины токсичны для холоднокровных животных (рыбы, лягушки, круглые черви). Они нарушают функцию жабр, которые являются не только органом дыхания, но и регулятором солевого осмотического давления в организме. Сапонины парализуют или вызывают гибель холоднокровных животных даже в больших разведениях (1:1 000000). Агликоны сапонинов для холоднокровных животных не токсичны.

Оценка качества сырья, содержащего сапонины. Методы анализа

Наличие сапонинов в лекарственном растительном сырье можно установить при помощи качественных реакций, которые проводят непосредственно с сырьем или с водным извлечением из него.

Качественные реакции на сапонины основаны на их физических, химических и биологических свойствах.

Государственная фармакопея XI издания (вып. 2) рекомендует использовать качественные реакции для подтверждения подлинности для трех видов сырья.

1. Корневища с корнями синюхи голубой. С водным извлечением проводят реакцию пенообразования, основанную на способности сапонинов снижать поверхностное натяжение жидкости (воды) и давать в отваре стойкую обильную пену после встряхивания.
2. Корни аралии маньчжурской. Метанольное извлечение хроматографируют в тонком закрепленном слое силикагеля (на пластин-

ках «Силуфол») в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (61:32:7). В качестве свидетеля используют раствор сапарала. Хроматограмму проявляют 20 % раствором кислоты серной и нагревают в сушильном шкафу ($t = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Появляются пятна вишневого цвета.

3. Корни женьшеня. а) Реакция с порошком корней женьшеня (на гликозиды). При нанесении кислоты серной концентрированной на порошок корней женьшеня через 1-2 минуты появляется кирпично-красное окрашивание, переходящее в красно-фиолетовое, а затем - в фиолетовое.

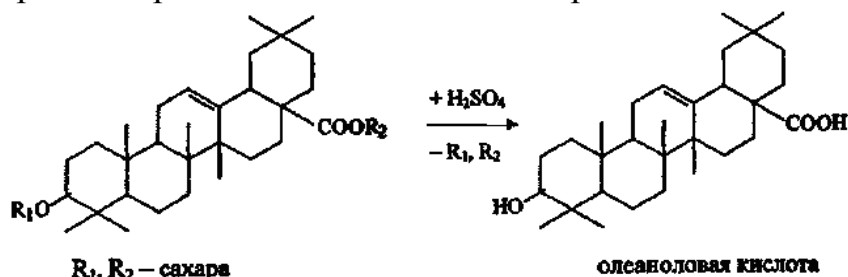
б) Наличие панаксозидов доказывают при помощи разделения извлечения из корней женьшеня в тонком слое силикагеля и последующего проявления полученной хроматограммы раствором кислоты фосфорно-вольфрамовой при нагревании. Панаксозиды проявляются в виде розовых пятен.

Общих методов **количественного определения** сапонинов в лекарственном растительном сырье нет. Чаще всего используют методы:

1. Потенциометрический метод. Метод основан на определении изменения электродвижущей силы (ЭДС) в результате титрования. Метод используется для определения суммы аралозидов в корнях аралии маньчжурской (а. высокой).

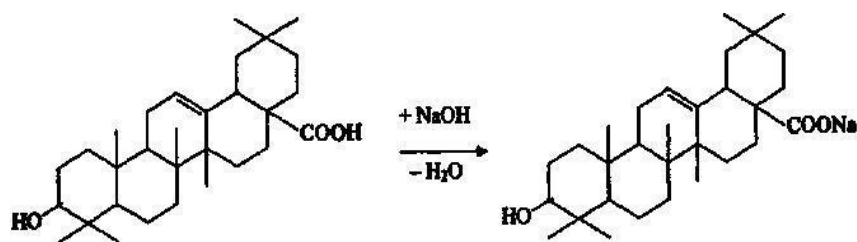
Этапы определения:

- подготовительный;
- экстракция аралозидов метиловым спиртом и их кислотный гидролиз;



очистка от сопутствующих веществ - осаждение кислоты олеаноловой в результате смены растворителя (разбавление спиртового извлечения водой и охлаждение);

- растворение кислоты олеаноловой в горячей смеси метилового и изобутилового спиртов (1:1,5);
- количественное определение - титрование раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л) в смеси метилового спирта и бензола:



Точку эквивалентности определяют потенциометрически.

2. *Спектрофотометрический* метод. Метод основан на способности сапонинов и их окрашенных комплексов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны. Метод предложен для определения содержания сапонинов в следующих видах сырья:

а) корневища с корнями диоскореи ниппонской. Проводят кислотный гидролиз сапонинов с последующим проведением реакции свободного агликона (диосгенин) с реактивом (*пара*-диметиламинобензальдегид). Образуется окрашенный комплекс;

б) корни солодки. Проводят осаждение кислоты глицирризиновой концентрированным раствором аммиака. Осадок растворяют и определяют оптическую плотность полученного раствора.

3. *Гравиметрический* метод - определение экстрактивных веществ. Метод основан на определении сухого остатка после высушивания суммы веществ, извлеченных из сырья соответствующим экстрагентом. Метод предложен для оценки качества сырья женьшеня, почечного чая, синюхи голубой, солодки.

Медицинское применение сырья и препаратов, содержащих сапонины

Сапонины обладают широким спектром фармакологического действия.

1. *Гипохолестеринемическое и противосклеротическое* действие. Сапонины обладают способностью снижать уровень холестерина в крови, что приводит к снижению склеротических изменений в кровеносных сосудах, уменьшению их ломкости и т.д. Действие характерно для стероидных сапонинов диоскореи ниппонской и якорцев стелющихся.

2. *Тонизирующее, стимулирующее, адаптогенное* действие. Характерно для сапонинов женьшеня, заманихи высокой, аралии высокой. Их препараты применяют при переутомлении, усталости, гипотонии, как иммуномодуляторы.

3. *Отхаркивающее* действие. Сапонины повышают секрецию желез верхних дыхательных путей. Это ведет к разжижению мокроты, что облегчает ее эвакуацию. Такое действие характерно для сапонинов солодки и синюхи голубой.

4. *Диуретическое* действие характерно для сырья почечного чая и астрагала шерстистоцветкового, которые применяются при отеках сердечного происхождения.

5. Легкое *слабительное* действие характерно для корней солодки.

6. *Кортикотропное* действие (подобное действию кортизона и других гормонов коркового слоя надпочечников). Регулируется водно-солевой обмен, проявляется противовоспалительное и антиаллергическое действие. Характерно для сырья солодки, применяют при астме, экземе, дерматитах.
7. *Седативное* действие характерно для сырья синюхи голубой.
8. *Гипотензивное* действие при начальных стадиях сердечно-сосудистой недостаточности проявляют биологически активные вещества астрагала шерстистоцветкового.
9. *Противоязвенное* действие проявляется у сбора, в состав которого входит сырье синюхи голубой и сушеницы топяной.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ.

Практическая работа №1. Проведите качественный анализ сырья, содержащего сердечные гликозиды.

Задание 1. Проведите извлечение сердечных гликозидов из сырья ландыша майского по методике: 3 г воздушно-сухого измельченного сырья залейте 20 мл 70% спирта этилового и нагревайте в течение 10 мин на водяной бане с обратным холодильником. После остывания процедите через вату в коническую колбу на 50 мл. Остаток на фильтре промойте 70% этиловым спиртом. Полученный экстракт перемешайте с 2 г оксида алюминия (для хроматографии) в плоскодонной колбе в течение 5 мин. После отстаивания профильтруйте через складчатый бумажный фильтр. Полученный экстракт используют для обнаружения карденолидов.

Задание 2. Проведите качественный анализ на стероидный цикл:

Реакция Либермана - Бурхарда: 0,5 – 1,0 мл извлечения выпаривают на водяной бане досуха в фарфоровой чашке. К остатку добавляют 10 капель свежеприготовленного уксусного ангидрида и по стенке 1 – 2 капли концентрированной H_2SO_4 . Образуется быстропроходящее красновато-оранжевое окрашивание (карденолиды) или голубое (буфадиенолиды).

Задание 3. Проведите анализ на функциональные группы:

Реакция Балье: к 0,5 мл извлечения добавляют 0,5 мл спиртового раствора пикрата натрия (0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия и 9,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты). Жидкость окрашивается в оранжевый цвет в течение 15-20 мин (пятичленное ненасыщенное лактонное кольцо). Подобные окрашивания могут давать свободные сахара, но окраска в этом случае развивается лишь через 15 – 20 минут.

Реакция Легала: готовят два раствора: 1 – 5% раствор нитропруссиды натрия, 2 – 10% раствор едкого натра. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в 0,5 мл 100% метилового спирта. Полученный раствор вливают в пробирку и добавляют 1 – 2 капли раствора 1. Затем осторожно (не взбалтывая) по стенке добавляют 1 – 2 капли раствора 2. На границе двух растворов появляется красное окрашивание в виде кольца (**пятичленное лактонное кольцо**).

Задание 4. Проведите анализ на углеводную часть гликозида:

Реакция Молиша: к 0,5 мл извлечения добавляют 1 – 2 капли свеже-приготовленного спиртового раствора α -нафтола (или тимола) и осторожно по стенке пробирки наливают равный объем концентрированной серной кислоты. Появление кармино-красного окрашивания на границе слоёв свидетельствует о наличии углеводного компонента.

Реакция Келлера-Килиани: к 0,5 мл извлечения добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей 0,5 % хлорида железа, перемешивают, и полученный раствор наслаивают на равный объем концентрированной серной кислоты. На границе соприкосновения жидкостей появляется красно-коричневое кольцо, а выше над кольцом через несколько минут появляется сине-зеленое окрашивание (дезоксисахариды).

Задание 5. Проведите хроматографическое исследование сердечных гликозидов

Полученный спиртовый экстракт нанесите на линию старта хроматографической пластинки «Силуфол». Хроматографирование проводите в системе растворителей хлороформ:ацетон:вода (84:15:0,7), бензол, хлороформ-спирт (9:1), хлороформ-спирт (5:5). Для проявления хроматограммы используйте 2% раствор динитробензола, после его улетучивания 6% раствор хлорида сурьмы. Сердечные гликозиды обнаруживают по появлению сине-фиолетовых пятен.

Практическая работа №2. Проведите качественный анализ сапонинов в лекарственном растительном сырье.

1. Экстрагирование:

1. Возьмите 3,0 г измельченного сырья, поместите в колбу, прибавьте 30 мл дистиллированной воды и проэкстрагируйте на кипящей водяной бане в течение 30 минут, процедите через вату, используйте для проведения качественных реакций.

2. Возьмите 1,0 г измельченного сырья, поместите в колбу, прибавьте 30 мл изотонического раствора натрия хлорида и проэкстрагируйте на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Профильтруйте, используйте для реакции гемолиза.

2. Качественное определение

а) Реакции, основанные на физических свойствах

Реакция пенообразования (Фонтала-Кандела). Взять две пробирки, в одну прилить 2 мл 0,1 н HCl, а в другую 2 мл 0,1 н NaOH. Затем в обе пробирки добавляют по 2-3 капли извлечения и пробирки энергично встряхивают в течение 1 мин. При наличии в сырье тритерпеновых сапонинов в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и стойкости. Если сырье содержит сапонины стероидной группы, то в щелочной среде образуется пена в несколько раз больше по объему и стойкости.

б) Реакции, основанные на химических свойствах сапонинов

1. К 2 мл водного настоя в пробирке прибавить несколько капель ацетата свинца. Тритерпеновые сапонины осаждаются средним ацетатом свинца, а стероидные основным. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

2. К 1 мл исследуемого раствора сапонинов прибавить несколько капель 1 % спиртового раствора холестерина. Образуется осадок. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

3. 1 мл исследуемого извлечения прибавьте несколько капель гидрата окиси бария. Образуется осадок белого цвета. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

4. **Реакция Либермана-Бурхарда.** 1 мл исследуемого извлечения упарьте на водяной бане в выпарительной чашке досуха. Сухой остаток растворите в 1 мл уксусного ангидрида, перенесите в сухую пробирку и осторожно (по стенкам пробирки) прилейте 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе соприкосновения слоев образуется красное окрашивание, переходящее затем в фиолетовое, синее, изумрудно-зеленое. Реакцию выполните в вытяжном шкафу. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

5. К 1 мл исследуемого водного извлечения прибавьте несколько кристаллов хлоралгидрата и осторожно прибавьте концентрированную серную кислоту, при этом образуется желтое кольцо, переходящее в пурпурно-красное, а затем в фиолетовое. Реакцию выполните в вытяжном шкафу. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

6. **Реакция Лафона.** К 2 мл спирто-водного извлечения в пробирке прибавляют 1 каплю 10% раствора меди сульфата, 1 мл кислоты серной концентрированной и осторожно нагревают. При нагревании появляется сине-зеленое окрашивание. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

7. к 2 мл водного извлечения прибавить 1 мл 10% раствора нитрита натрия и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется кроваво-красное окрашивание. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

8. **Реакция Сальковского.** 0,5 г растительного сырья помещают в коническую колбу на 100 мл, соединяют с обратным холодильником, заливают 10 мл 50% спирта и кипятят в течение 15 мин. После охлаждения отфильтровывают. К 2 мл спиртового извлечения прибавляют 1 мл хлороформа и несколько капель конц. H_2SO_4 . Возникает окрашивание от желтого до красного цвета. Сделайте вывод и внесите результат в таблицу.

в) Реакции, основанные на биологических свойствах сапонинов.

Гемолиз эритроцитов. Для проведения этой реакции из растительного сырья готовят настой на изотоническом растворе. К 1мл настоя добавить 1 мл дефибринированной крови. Образуется красный, прозрачный раствор, так называемая лаковая кровь (кроме сапонинов корня солодки).

Сделайте вывод о соответствии исследуемого сырья требованиям НД и внесите в протокол. Заполните таблицу:

Наименование сырь	Реакция пенообразова-	С раствором ацетата свин-	С нитритом	Реакция Сальковского	Реакция Лафона	С хлоралгидратом	Реакция Либермана-	Реакция Лафона	С гидратом окиси бария	С раствором холестерина	Гемолиз

Практическая работа №3. Изучите методы оценки содержания сапонинов сырья

- 1. Определите пенное число по Варлакову.** 1,0 г измельченного сырья заливают 100 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин, затем извлечение охлаждают и фильтруют. 10 мл полученного извлечения наливают в мерный цилиндр на 25мл и энергично встряхивают в течение 15 секунд, после чего наблюдают за стойкостью образования пены

Практическая работа №4. Определите количественное содержание сапонинов в семенах каштана конского.

Методика. Навеску сырья (0,05 г) растворяют в 4 мл концентрированной серной кислоте. Полученный раствор термостатируют в сушильном шкафу при температуре 70⁰ С в течение 3 часов. Раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 405 нм относительно концентрированной серной кислоты в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора, который готовят следующим образом:

0,015 г (точная навеска) олеаноловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, и растворяют в 10 мл этилового спирта 96%, затем этанолом (96%) доводят до метки. Отбирают пипеткой 0,5 мл этого раствора в колбуа и растворитель отгоняют досуха на водяной бане, а затем термостатируют в сушильном шкафу при температуре 105⁰ С в течение 1 часа. После охлаждения до комнатной температуры в колбу с осадком прибавляют пипеткой 4 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое встряхивают до полного растворения осадка и полученный раствор термостатируют в сушильном шкафу при температуре 70⁰ С в течение 3 часов. Раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм относительно концентрированной серной кислоты.

Процентное содержание сапонинов, в пересчете на агликон рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A * C_{\text{ст}} * V_{\text{ст}} * 100}{A_{\text{ст}} * C * V}$$

где A – оптическая плотность раствора экстракта;
 $A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца олеаноловой кислоты;
 C – концентрация раствора экстракта;
 $C_{\text{ст}}$ – концентрация стандартного раствора олеаноловой кислоты;
 V – объем раствора экстракта, взятого для анализа, мл;
 $V_{\text{ст}}$ – объем стандартного раствора, взятого для анализа.

Примечание. Для пересчета содержания сапонинов с их генина на гликозиды использовали средномолекулярный коэффициент, равный отношению средномолекулярной массы гликозидов соответствующего вида сырья к молекулярной массе олеаноловой кислоты.

Сделайте вывод о соответствии исследуемого сырья требованиям НД.

Раздел 8: ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ. АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПРОСТЫХ ФЕНОЛОВ, ЛИГНАНОВ, КУМАРИНОВ, ХРОМОНОВ, ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И ФЛАВОНОИДОВ.

Цель занятия: сформировать у студентов знания, умения и навыки, касающиеся фитохимического анализа сырья, содержащего флавоноиды, кумарины, дубильные вещества, лигнаны.

Перечень учебно-целевых вопросов, рекомендуемых к рассмотрению во время разбора материала занятия.

1. Дайте определение понятия «Фенольные соединения», приведите их классификацию. Напишите формулы: гидрохинона, арбутина, спирта салицилового, салициловой кислоты, салидрозида, родиолозида, общую формулу фенолкарбоновых кислот.
2. Дайте классификацию, физико-химические свойства простых фенолов. Как фенольные соединения распространены в растительном мире?.
3. Какие существуют методы идентификации простых фенолов в растительном сырье?
4. Дайте общую характеристику кумаринов. Приведите классификацию и опишите физико-химические свойства кумаринов.
5. Дайте общую характеристику хромонов. Приведите классификация и опишите физико-химические свойства хромонов.
6. Приведите методы идентификации кумаринов и хромонов в растительном сырье.
7. Дайте понятие «дубильным веществам». Приведите классификацию дубильных веществ и лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества.
8. Опишите физические и химические свойства дубильных веществ.
9. Охарактеризуйте и поясните методы анализа дубильных веществ в лекарственном растительном сырье.
10. Напишите формулы фенольных соединений, входящих в дубильные вещества, обуславливающие их бактерицидное действие.
11. Опишите этапы количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье.
12. Приведите общую характеристику и классификацию флавоноидов (привести формулы).
13. Приведите физико-химические свойства флавоноидов и опишите методы выделения их из лекарственного растительного сырья.
14. Назовите методы качественного обнаружения флавоноидов в сырье.
15. Назовите методы количественного обнаружения флавоноидов в растительном сырье.

Учебный материал по теме

Природные *фенольные соединения* - вещества растительного происхождения, содержащие одно или несколько ароматических колец с одной или несколькими свободными или связанными гидроксильными группами.

Фенольные соединения имеют универсальное распространение в растительном мире. Они свойственны каждому растению и даже каждой растительной клетке. В настоящее время известно свыше двух тысяч природных фенольных соединений. На долю веществ этой группы приходится до 2-3 % массы органического вещества растений, а в некоторых случаях - до 10 % и более. Фенольные соединения обнаружены также в грибах, лишайниках, водорослях. Животные потребляют фенольные соединения в готовом виде и могут их только преобразовывать.

В растениях фенольные соединения играют очень важную роль. Они являются обязательными участниками всех метаболических процессов: дыхания, фотосинтеза, гликолиза, фосфорилирования.

1. Исследованиями русского ученого-биохимика В.И. Палладина (1912 г., Санкт-Петербург) установлено и подтверждено современными исследованиями, что фенольные соединения участвуют в процессе клеточного дыхания. Фенольные соединения выступают в качестве акцепторов (переносчиков) водорода на конечных этапах процесса дыхания, а затем вновь окисляются специфическими ферментами оксидазами.

2. Фенольные соединения являются регуляторами роста, развития и репродукции растений. При этом оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее (замедляющее) действие.

3. Фенольные соединения используются растениями как энергетический материал, выполняют структурную, опорную и защитную функции (повышают устойчивость растений к грибковым заболеваниям, обладают антибиотическим и противовирусным действием).

Классификация фенольных соединений

В основу классификации природных фенольных соединений положен биогенетический принцип. В соответствии с современными представлениями о биосинтезе и, исходя из структурных особенностей углеродного скелета, можно выделить следующие классы растительных фенолов.

Классификация фенольных соединений

Углеродный скелет	Примеры соединений
Фенольные соединения	
<i>С одним бензольным кольцом</i>	
C_6	Простые фенолы, фенологликозиды
C_6-C_1	Фенолоспирты, фенолоальдегиды, фенолокислоты
C_6-C_2	Кислоты фенилуксусные
C_6-C_3	Гидроксикоричные кислоты, кумарины, хромоны
$(C_6-C_3)_2$	Лигнаны (димерные соединения)
<i>С двумя бензольными кольцами</i>	
$C_6-C_1-C_6$	Бензофеноны, ксантоны
$C_6-C_2-C_6$	Стильбены
$C_6-C_3-C_6$	Флавоноиды
Хиноны	
<i>С одним кольцом</i>	Бензохиноны
<i>С двумя кольцами</i>	Нафтохиноны
<i>С тремя кольцами</i>	Антрахиноны и другие производные антрацена
Полимерные фенольные соединения	
Дубильные вещества $(C_6-C_1)_n$ $(C_6-C_2)_n$ $(C_6-C_3-C_6)_n$	Гидролизуемые танины Конденсированные танины
$(C_6-C_3)_n$	Лигнины

Биосинтез фенольных соединений

Механизм биосинтеза фенольных соединений был расшифрован в 60-х годах XX века в результате:

- применения меченых изотопами атомов углерода C_{14} и кислорода - O_{18} ;
- неклоточных систем;
- различных генетических методов.

Большой вклад в изучение биосинтеза фенольных соединений внесли такие ученые как американский ученый Г.Гризебах, канадский ученый Е. Андерхилл, отечественный ученый профессор института физиологии растений М.Н.Запрометов. Установлено, что биосинтез бензольного кольца в структуре фенольных соединений идет двумя путями:

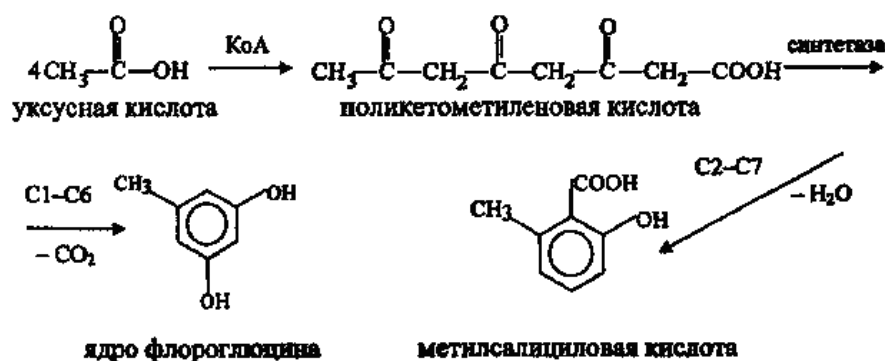
4. ацетатно-малонатный;
5. шикиматный.

Фенольные соединения образуются тремя путями: первые два и третий путь - смешанный (отдельные части одного и того же соединения синтезируются разными путями).

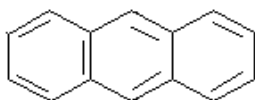
1. **Ацетатно-малонатный путь.** Установлен американскими учеными Берчем и Донованом в 1955 году. Предшественником является кислота уксусная, которая образуется при гликолизе сахаров.

В результате альдольной ступенчатой конденсации остатков кислоты уксусной образуются поликетометиленовые кислоты. Присоединение происходит по типу «голова» - «хвост» при обязательном участии фермента коэнзима А с промежуточным образованием ацетил-коэнзима А, а затем малонил-коэнзима А (поэтому называют ацетатно-малонатный путь. Циклизация поликетонов идет под действием фермента синтетазы.

Схема биосинтеза:



Если наращивать цепочку до 16-ти углеродных атомов (8 остатков кислоты уксусной) образуется ядро антрацена:



По ацетатно-малонатному пути идет биосинтез простых фенолов и производных антрацена в грибах и лишайниках; антрахинонов группы хризацина, колец А и С антрахинонов группы ализарина у растений; кольца А в молекуле флавоноидов; госсипола, содержащегося в коре корней хлопчатника.

2. **Шикиматный путь.**

Биосинтез идет через кислоту шикимовую, соединение близкое к ароматическим соединениям. В расшифровке этого пути биосинтеза большая заслуга принадлежит ученому Б. Дэвису (1951-55 гг.).

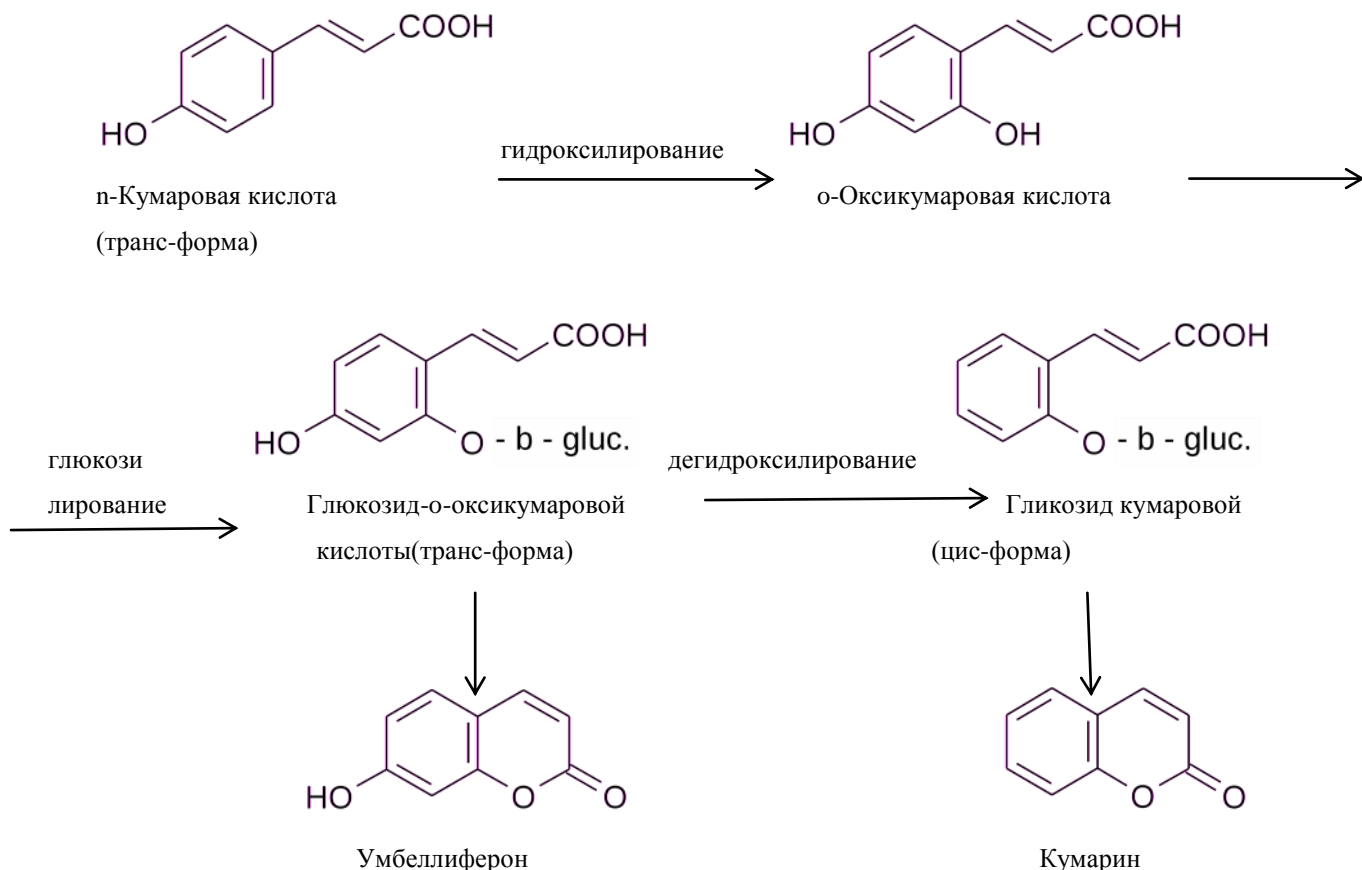
Исходными продуктами биосинтеза служат фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат, образующиеся в процессе гликолиза и пентозного цикла сахаров. В результате ряда ферментативных реакций и конденсации из них образуется кислота шикимовая.

Далее в процессе последовательных ферментативных реакций, протекающих при участии АТФ, присоединяется еще фосфоенолпируват, количество двойных связей увеличивается до двух - образуется кислота префеновая, а затем до трех - образуется кислота фенилпировиноградная или кислота пара-гидроксифенилпировиноградная. Далее под воздействием ферментов

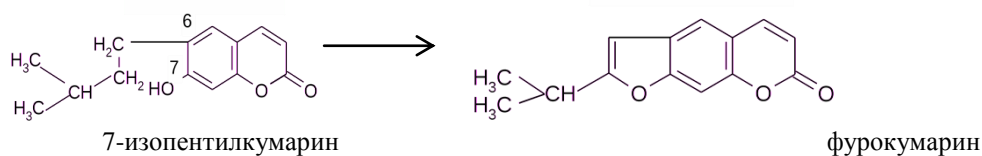
трансминаз образуются ароматические аминокислоты - фенилаланин и тирозин.

При участии ферментов от аминокислот отщепляется аммиак, и возникают соответственно кислоты коричная и *para*-гидроксикоричная. Это исходные продукты синтеза *para*- и *орто*-фенолов в растениях, кумаринов, хромонов, лигнанов, кольца В в молекуле флавоноидов, кольца В антрахинонов группы ализарина у растений, гидролизующих дубильных веществ.

Биосинтез кумаринов идет по шикиматному пути по следующей схеме:



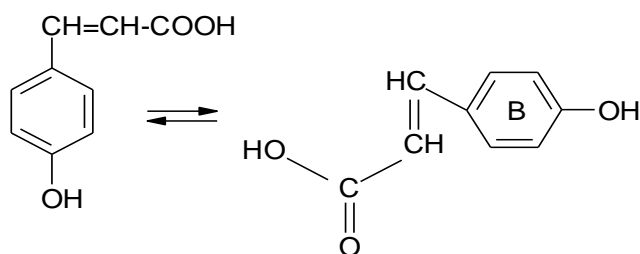
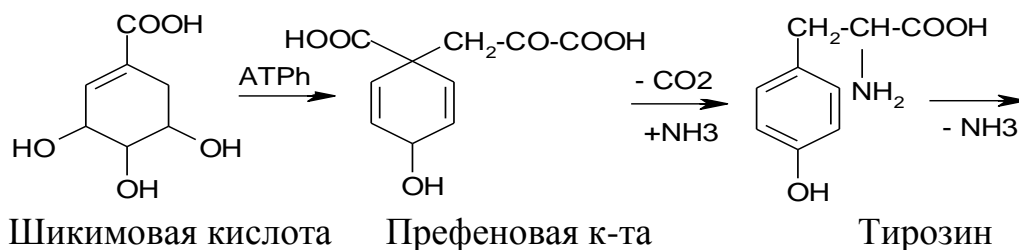
Образование фуранокумаринов окончательно экспериментально не подтверждено, предполагают, что фуранокумарины могут образовываться из 7-изопентилкумарин, имеющих у С-6 изопентильный заместитель



3. Смешанный путь.

По смешанному пути синтезируются флавоноиды и антрахиноны, производные ализарина. Флавоноиды являются источником синтеза конденсированных дубильных веществ.

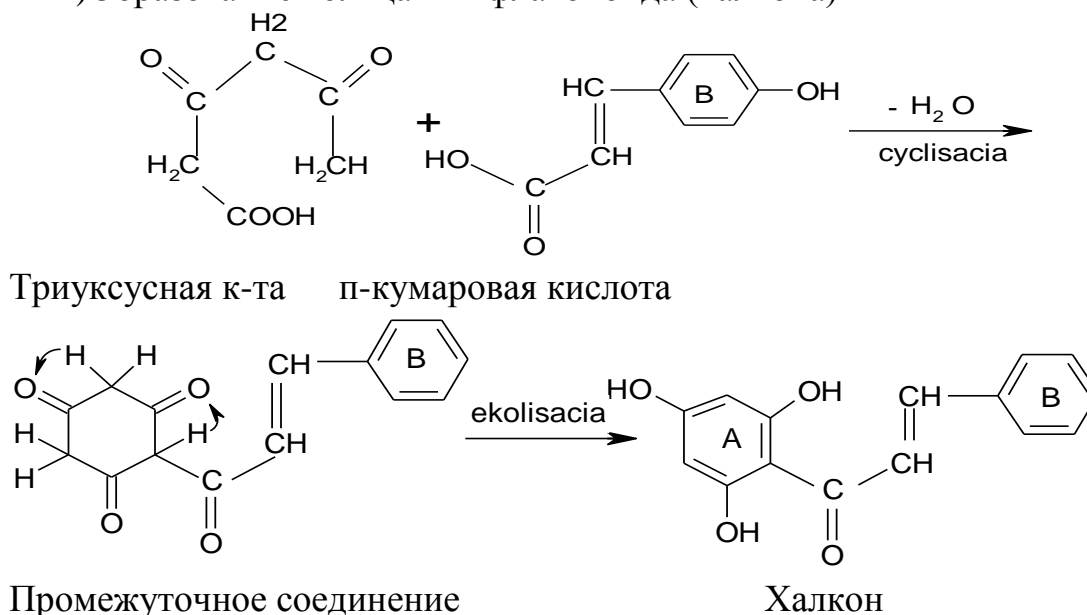
1) Образование кольца В флавоноидов:



Кольцо В.

Образовавшаяся при гликолитическом распаде сахаров шикимовая кислота при участии АТФ последовательно проходит через ряд промежуточных соединений и превращается в префеновую кислоту. Префеновая кислота является ключевым промежуточным веществом в биосинтезе не только флавоноидов, но и кумаринов, ароматических аминокислот и других фенольных соединений. Она способна превращаться в целый ряд продуктов, например к образованию п-кумаровой кислоты. Вначале происходит аминирование префеновой кислоты с одновременным ее декарбоксилированием. Образуется тирозин, дезаминирование которого приводит к п-кумаровой кислоте, формулу которой можно написать двояко, причем второе обозначение отчетливо показывает кольцо В, вернее, структурный фрагмент $-C_3-C_6$.

2) Образование кольца А и флавоноида (халкона)



Кольцо А.

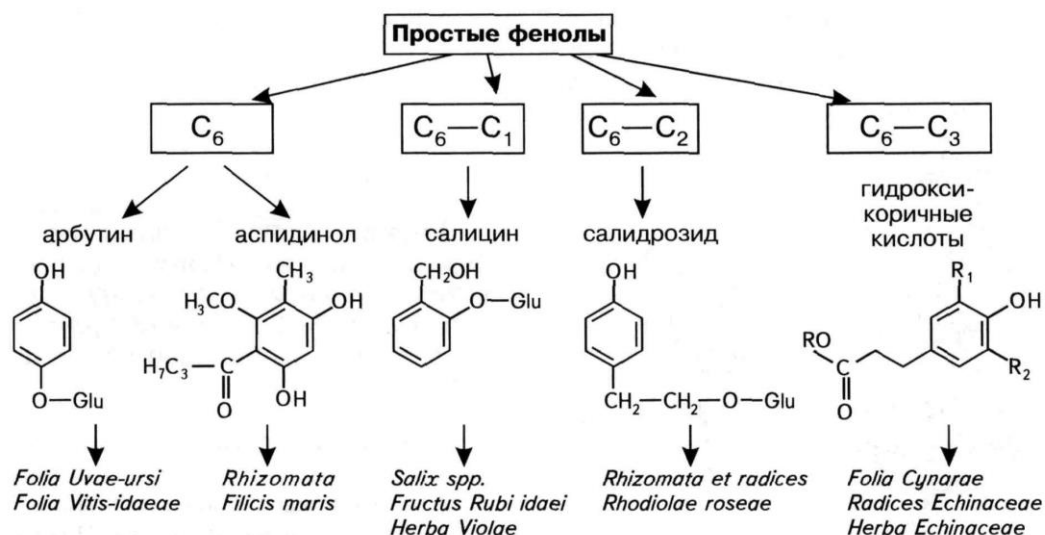
Уксусная кислота (ацетил-Ко А) полимеризуется в **триуксусную** кислоту, которая вступает в реакцию с **п-кумаровой** кислотой.

В результате их конденсации, замыкания цепи и энолизации образуется **халкон**. Халкон считается предшественником всех других групп флавоноидов:

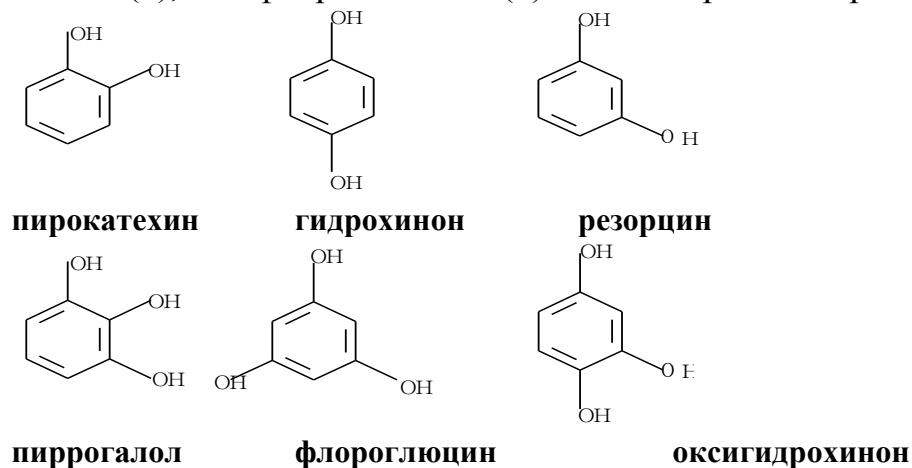
При окислении халконов образуются флавоны, флавонолы, а при восстановлении – антоцианидины, катехины, лейкоантоцианидины.

ПРОСТЫЕ ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Простые фенольные соединения - это соединения с одним бензольным кольцом, имеющие структуру C_6 , C_6-C_1 , C_6-C_2 , C_6-C_3 . Простейшие фенольные соединения с одним бензольным кольцом и одной или несколькими гидроксильными группами в растениях встречаются редко, чаще они находятся в связанном виде (в форме гликозидов или сложных эфиров) или же являются структурными единицами более сложных соединений. Наиболее широко в растениях представлены фенологликозиды – соединения, в которых гидроксильная группа связана с сахаром. Классификация простых фенольных соединений представлена на схеме.

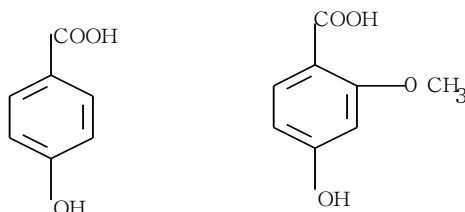


Простые фенолы (соединения C_6), в свою очередь делятся на моногидроксипроизводные бензола (фенол), дигидроксипроизводные (тип пирокатехина (1), тип гидрохинона (2) и тип резорцина (3), тригидроксипроизводные (тип пиррогалла (4), тип флороглюцина (5) и тип оксигидрохинона (6).

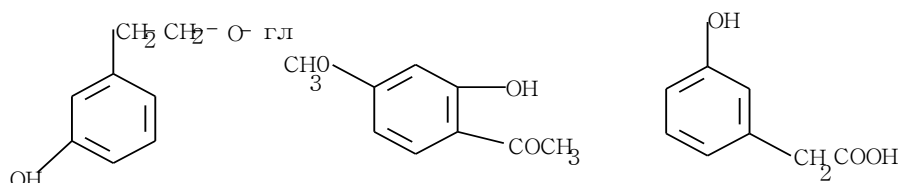


Растительные фенольные соединения находятся чаще в виде связанных с углеводными остатками (гликозиды) или в свободном состоянии.

Соединения со структурой C_6-C_1 – фенолокислоты (оксибензойная кислота и ее производные).



Соединения со структурой C_6-C_2 – фенолоспирты, ацетофеноны, фенилуксусные кислоты.



Соединения со структурой C_6-C_3 – оксикоричные кислоты (фенилпропаноиды), их производные, лигнаны, кумарины, хромоны.

Димерные соединения, содержащие С-С связь между мономерами – гексагидроксидифеновая и эллаговая кислоты, димерные протоантоцианиды (переходная группа от полифенолов к дубильным веществам).

Полимерные соединения – дубильные вещества, лигнины и меланины.

Соединения иной структуры – ограничено распространенные хромоны, ксантолы или представляющие смешанные фенолы – флаволигнаны (напр., силибин и силихристин из расторопши пятнистой).

Физические и химические свойства простых фенольных соединений

Физические свойства. Простые фенольные соединения - это бесцветные, реже слегка окрашенные, кристаллические вещества с определенной температурой плавления, оптически активны. Имеют специфический запах, иногда ароматный (тимол, карвакрол). В растениях чаще встречаются в виде гликозидов, которые хорошо растворимы в воде, спирте, ацетоне; нерастворимы в эфире, хлороформе. Агликоны слабо растворимы в воде, но хорошо растворимы в эфире, бензоле, хлороформе и этилацетате. Простые фенолы имеют характерные спектры поглощения в УФ и видимой областях спектра. Фенольные кислоты - кристаллические вещества, растворимы в спирте, этилацетате, эфире, водных растворах натрия гидрокарбоната и ацетата.

Химические свойства. Химические свойства простых фенольных соединений обусловлены наличием: ароматического кольца, фенольного гидроксила, карбоксильной группы; гликозидной связи.

Для фенольных соединений характерны химические реакции:

1. *Реакция гидролиза* (за счет гликозидной связи). Фенольные гликозиды легко гидролизуются под действием кислот, щелочей или ферментов до агликона и сахаров.

2. *Реакция окисления.* Фенольные гликозиды легко окисляются, особенно в щелочной среде (даже кислородом воздуха), образуя хиноидные соединения.
3. *Реакция солеобразования.* Фенольные соединения, обладая кислотными свойствами, образуют со щелочами растворимые в воде феноляты.
4. *Реакции комплексообразования.* Фенольные соединения образуют с ионами металлов (железа, свинца, магния, алюминия, молибдена, меди, никеля) комплексы, окрашенные в различные цвета.
5. *Реакция азосочетания с солями диазония.* Фенольные соединения с солями диазония образуют азокрасители от оранжевого до вишнево-красного цвета.
6. *Реакция образования сложных эфиров (депсидов).* Депсиды образуют фенолокислоты (кислоты дигалловая, тригалловая).

Оценка качества сырья, содержащего простые фенольные соединения. Методы анализа

Качественный и количественный анализ сырья основан на физических и химических свойствах.

Качественный анализ.

Фенольные соединения извлекают из растительного сырья водой. Водные извлечения очищают от сопутствующих веществ, осаждая их раствором свинца ацетата. С очищенным извлечением выполняют качественные реакции. Фенологликозиды, имеющие свободный фенольный гидроксил, дают все реакции, характерные для фенолов (с солями железа, алюминия, молибдена и др.). Специфические реакции (ГФ XI):

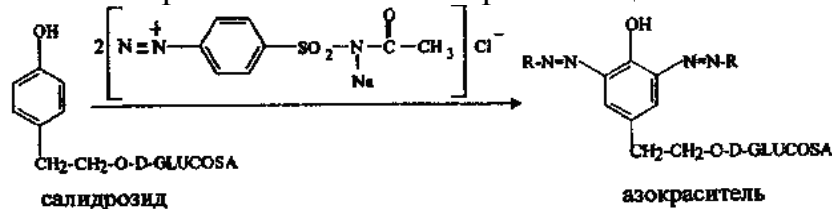
1. на арбутин (сырье брусники и толокнянки):

а) *с кристаллическим железом закисного сульфатом.* Реакция основана на получении комплекса, изменяющего окраску от сиреневой до темно-фиолетовой, с дальнейшим образованием темно-фиолетового осадка.

б) *с 10 % раствором натрия фосформолибденовокислого в кислоте хлористоводородной.* Реакция основана на образовании комплексного соединения синего цвета.

2. на салидрозид (сырье родиолы розовой):

а) *реакция азосочетания с диазотированным натрием сульфацилом* с образованием азокрасителя вишнево-красного цвета.



Хроматографическое исследование:

Используют различные виды хроматографии (бумажная, тонкослойная и др.). При хроматографическом анализе обычно используют системы растворителей: н-бутанол-уксусная кислота-вода (БУВ 4:1:2; 4:1:5); хлороформ-метанол-вода (26:14:3); 15 % кислота уксусная.

Хроматографическое исследование спиртового извлечения из сырья родиолы розовой

Используется тонкослойная хроматография. Проба основана на разделении в тонком слое силикагеля (пластинки «Силуфол») метанольного извлечения из сырья в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (26:14:3) с последующим проявлением хроматограммы диазотированным натрием сульфацилом. Пятно салидрозидов с $R_f = 0,42$ окрашивается в красноватый цвет.

Количественное определение.

Для количественного определения фенологликозидов в лекарственном растительном сырье используют различные методы: гравиметрические, титриметрические и физико-химические.

1. *Гравиметрическим методом* определяют содержание флороглюцидов в корневищах папоротника мужского. Метод основан на извлечении флороглюцидов из сырья диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета. Извлечение очищают, отгоняют эфир, полученный сухой остаток высушивают и доводят до постоянной массы. В пересчете на абсолютно сухое сырье содержание флороглюцидов должно быть не менее 1,8 %.

2. *Титриметрический йодометрический метод* используется для определения содержания арбутина в сырье брусники и толокнянки. Метод основан на окислении агликона гидрохинона до хинона 0,1 М раствором йода в кислой среде и в присутствии натрия гидрокарбоната после получения очищенного водного извлечения и проведения кислотного гидролиза арбутина. Гидролиз проводится кислотой серной концентрированной в присутствии цинковой пыли, чтобы выделившийся свободный водород предотвращал собственное окисление гидрохинона. В качестве индикатора используют раствор крахмала.

3. *Спектрофотометрический метод* используется для определения содержания салидрозидов в сырье родиолы розовой. Метод основан на способности окрашенных азокрасителей поглощать монохроматический свет при длине волны 486 нм. Определяют оптическую плотность окрашенного раствора, полученного по реакции салидрозидов с диазотированным натрием сульфацилом, с помощью спектрофотометра. Рассчитывают содержание салидрозидов с учетом удельного показателя поглощения ГСО салидрозидов $E_{1\text{см}}^{1\%} = 253$.

Препараты на основе фенольных соединений широко используются в качестве противомикробных, противовоспалительных, гемостатических, желчегонных, диуретических, гипотензивных, тонизирующих, вяжущих и слабительных средств. Они, как правило, малотоксичны и не вызывают побочных эффектов.

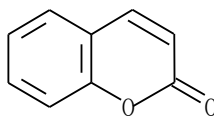
КУМАРИНЫ

Производные кумарина широко распространены в растительном мире (представители семейств сложноцветных, пасленовых, злаковых, каштановых, яснотковых, маревых и др.) и встречаются в продуктах животного про-

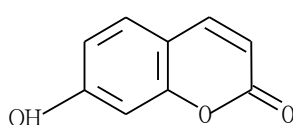
исхождения.

Производные кумарина классифицируют на следующие группы (по Э.Шпету):

1. Кумарин и его простейшие производные (дигидрокумарин, кумариновая и кумаровая кислоты и их гликозиды);

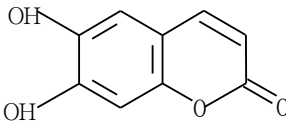


2. Окси- и метокси-(алокси-)кумарины, метилendigидрокумарины, алкилированные в бензольном или α -пионовом ядре. Сюда относятся умбеллиферон, эскулетин и скополетин:

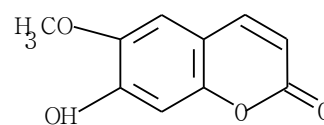


Умбеллиферон

(7-гидроксикумарин)

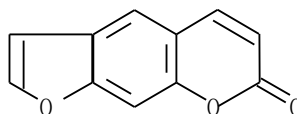


Эскулетин



Скополетин

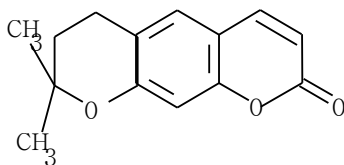
3. Фурукумарины (кумарин кумароны), содержащие ядро фурана, конденсированные с кумарином в 6,7-ом и 7,8 положениях углеродных атомов и циклах. Самая многочисленная группа, широко представленная в растениях сем. Зонтичные и Бобовые.



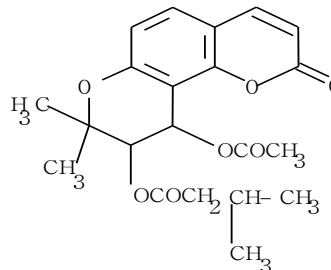
Псорален

(фуру-2',3':7,6-кумарин)

4. Пиранокумарины или хромено- α -пироны), содержащие ядро 2, 2'-диметилпирана, конденсированное с кумарином в 6,7-ом и 7,8 положениях углеродных атомов и замещенных в хроменовом бензольном и пионовом кольце:

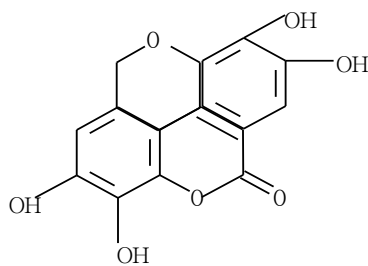


Ксантилетин



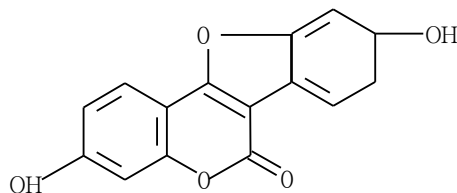
Виснадин

5. 3,4-бензокумарины, содержащие бензольное ядро, конденсированное с кумарином в 3-4 положениях углеродных атомов



эллаговая кислота

6. Куместаны – кумарины, содержащие систему бензофурана, конденсированную с кумарином в 3,4-положениях (куместрол-куместан и др.)



куместрол

В небольших количествах кумарины встречаются в пищевых растениях (пастернак, цикорий, инжир). Наибольшее распространение они находят в видах семейств сельдерейных, рутовых, реже встречаются в представителях семейств астровых, пасленовых, злаковых, каштановых, яснотковых и др.

Для качественного анализа кумаринов в растениях и сырье используют свойства лактонного кольца и проводят реакцию азосочетания кумаринов в щелочной среде с диазореактивом по Кузнецовой. Диазореактив (соль диазония) получают путем диазотирования (раствор натрия нитрита и хлороводородной кислоты) п-нитроанилина или сульфониловой кислоты.

Изучение строения кумаринов проводят методами УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии, масс-спектроскопии. При количественном анализе чаще всего применяют физико-химические методы – фотоэлектроколориметрию, спектрофотометрию. Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях диазотирования.

Спектр фармакологической активности кумаринов широк. Известно противоопухолевое, коронарорасширяющее (фурокумарины амми зубной, пиранокумарины вздутлоплодника сибирского), эстрогенное (кумарины куместрола), фотосенсибилизирующее (фурокумарины пастернака, амми большой, инжира) действие кумариносодержащих растений.

В медицинской практике применяются:

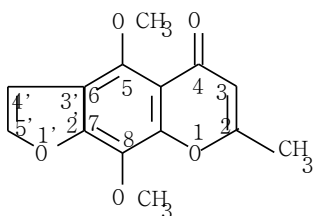
- Аммифурин (фурокумарины амми большой), Бероксан, Бергаптен и Ксантотоксин (фурокумарины пастернака), Псорален (смесь фурукумаринов псоралеи костянковой) для лечения гнездовой плешивости и лейкодермии (болезнь витилиго);
- Дигидроксомидин, Фловерин (пиранокумарины вздутлоплодника сибирского) как спазмолитические средства при болезнях Рейно, эндотериитах, хронической коронарной недостаточности;
- Пастиацин (фурокумарины пастернака посевного) – стенокардии, для расширения коронарных и сосудов бронхов.

Хромоны – природные соединения, получающиеся в результате конденсации γ-пиронов и бензольных колец. По своей структуре хромоны близки к флавоноидам, так и к кумаринам, однако, в природе встречаются реже.

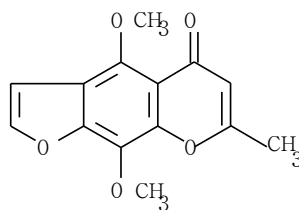
Реакции обнаружения хромонов:

1. с 0,1 % водным раствором уранилацетата – красное, фиолетовое, оранжевое или желтое окрашивание, в том случае, если при С-5 гидроксильная группа не замещена.
2. В отличие от флавоноидов не дают реакции со смесью борной и лимонной кислот; от кумаринов можно отличить по спектрам поглощения.

В медицине нашли применение фуранохромоны, образованные конденсацией хромона с фурановым кольцом. Фуранохромоны – келлин и виснагин – содержатся в плодах виснаги морковевидной.



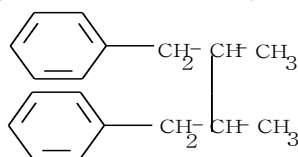
Келлин (2-метил-5,8-диметоксифуранохромон)



виснагин (2-метил-5-метоксифуранохромон)

Лигнаны являются димерами фенилпропана и присутствуют в растениях в свободном состоянии и в форме гликозидов, в растворенном виде в жирном и эфирном маслах, смолах или выпадают в виде «бусин» (лигнаны лимонника). Лигнаны фармакологически активные вещества, обладающие действием противоопухолевым (лигнаны подофилла), стимулирующим ЦНС (лигнаны лимонника), антигеморрагическим (кунжутное масло), гепатопротекторным (флаволигнаны расторопши пятнистой).

Общую формулу можно представить следующей схемой:

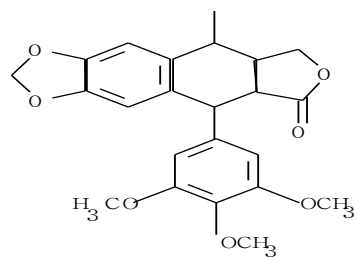


Разнообразие лигнанов наличием различных заместителей в бензольных кольцах и характером связи между ними, степенью ненасыщенности боковых цепей и степенью окисления β-углеродных атомов. Наиболее часто в составе ароматических колец имеются гидроксильные, метоксильные и метилendioгидроксигруппы.

Лигнаны разделяют на несколько групп:

Диарилбутановый тип:

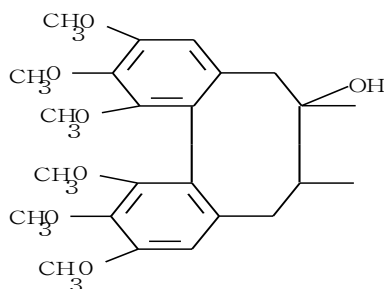
1-фенилтетрагидронафталиновый тип – лигнаны смолы и подземных органов подофилла щитковидного – подофиллотоксин и пеллатины:



подофиллотоксин

Циклогексалигнаны (сезаминовый тип) – лигнан сезамин из семян кунжута (*Sesamum indicum*) и сирингарезинол из корневищ и корней элеутекокка колючего.

Циклоокталигнаны – схизандрин и схизандрол из плодов и семян лимонника китайского.



схизандрин

Особую группу соединений составляют флаволигнаны, имеющие сложную структуру и сочетающие в себе свойства флавоноидов и лигнанов, например силибин, силидианин и силихристин из семян расторопши пятнистой.

Лигнаны твердые кристаллические вещества липофильного характера. Их растворимость в спирте и хлороформе варьирует.

ДУБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА (таниды) - это сложные смеси растительных высокомолекулярных полимеров фенольных соединений с молекулярной массой от 300 до 5000 (порядка 500-3000), обладающие вяжущим вкусом, способные образовывать прочные связи с белками, превращая невыделанную кожу животных в дубленую кожу.

Полифенольные соединения с более низкой молекулярной массой (менее 300) только адсорбируются на белках, но не способны образовывать устойчивые комплексы, и в качестве дубителей не используются. Высокомолекулярные полифенолы (с молекулярной массой более 5000) также не являются дубителями, так как их молекулы слишком велики и не проникают между фибриллами коллагена.

Таким образом, главное отличие дубильных веществ от других полифенольных соединений - это способность образовывать прочные водородные связи с белками.

Термин «дубильные вещества» был впервые использован французским ученым Сегеном в 1796 году для обозначения присутствующих в экстрактах некоторых растений веществ, способных осуществлять процесс дуб-

ления. Другое название дубильных веществ – «танниды» происходит от латинизированной формы кельтского названия дуба – «*tan*», кору которого издавна использовали для обработки кож.

Первые научные исследования в области химии дубильных веществ относятся ко второй половине XVIII века. Они были вызваны практическими запросами кожевенной промышленности. Первая опубликованная работа – работа Гледича (1754 г.) «Об использовании плодов черники как сырья для получения дубильных веществ». Первой монографией была монография Деккера, вышедшая в 1913 году, которая обобщала весь накопленный материал по дубильным веществам. Поиском, выделением и установлением структуры дубильных веществ занимались отечественные ученые Л.Ф. Ильин, А.Л. Курсанов, М.Н. Запрометов, Ф.М. Флавицкий, Г. Поварнин, А.И. Опарин и др.; зарубежные ученые Г. Проктер, К. Фрейденберг, Э. Фишер, П. Каррер и др.

Классификация дубильных веществ

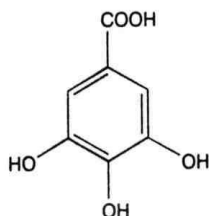
Так как дубильные вещества представляют собой смеси различных полифенолов с разнообразным химическим составом, классификация их затруднена.

Наибольшее признание получила классификация Г. Поварнина (1911 г.) и К. Фрейденберга (1933 г.), основанная на химической природе дубильных веществ и их отношении к гидролизующим агентам. Согласно этой классификации дубильные вещества делятся на две большие группы:

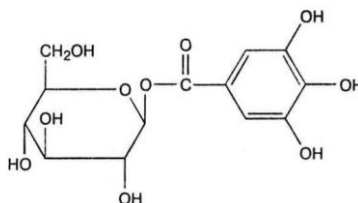
1. гидролизуемые танниды;
2. конденсированные танниды.

1. Гидролизуемые дубильные вещества – это смеси сложных эфиров фенол-карбоновых кислот с сахарами и несакаридами. В водных растворах под действием кислот, щелочей и ферментов они способны гидролизоваться на составные части фенольной и нефенольной природы. Гидролизуемые дубильные вещества можно разделить на три группы.

1.1. Галлотаннины – сложные эфиры кислоты галловой, дигалловой и других ее полимеров с циклическими формами сахаров (обычно D-глюкозой).



Кислота галловая

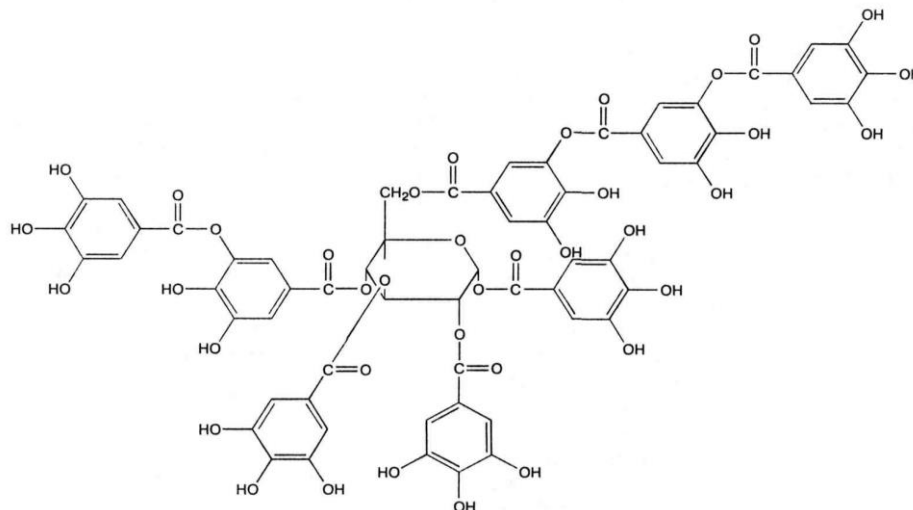


бета-Глюкогаллин

Промышленными источниками галлотаннинов, применяемых в медицине (медицинского таннина), являются галлы турецкие – патологические наросты, образующиеся на дубе красильном (*Quercus infectoria* Oliv.), галлы китайские, образующиеся на сумахе китайском (*Rhus chinensis* Mill.), листья сумаха дубильного (*Rhus coriaria* L.) и листья скумпии кожевенной (*Cotinus*

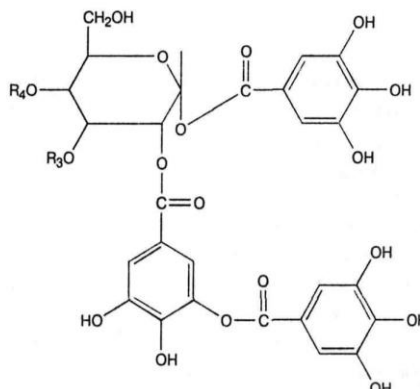
coggygia Scop.). Таннин представляет собой гетерогенную смесь веществ различного строения. Встречаются моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и полигаллоильные эфиры.

Детальная расшифровка строения таннина была дана в 1961-1963 гг. В. Хэуорсом. Китайский таннин, выделенный из китайских галлов, является окта- и наогаллоилглюкозой.



Структура китайского таннина

Турецкий таннин, выделенный из турецких галлов, представляет собой гекса- и гептагаллоилглюкозу.

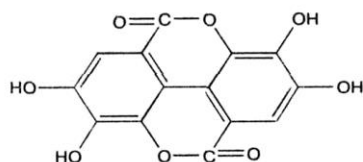


Структура турецкого таннина

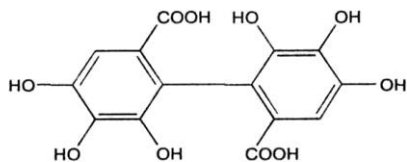
(R_3 = кислота галловая; R_4 = кислота m-дигалловая)

Дубильные вещества этой группы содержатся и преобладают в корневищах и корнях кровохлебки, корневищах змеевика, корневищах бадана, соплодиях ольхи, коре дуба.

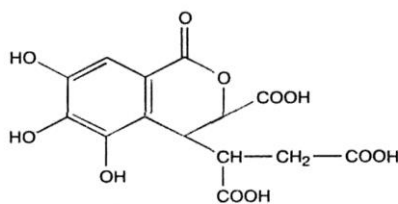
1.2. *Эллаготаннины* - эфиры кислоты эллаговой и других кислот, имеющих с ней биогенетическое родство, с циклическими формами моносахаридов (D-глюкозой).



Кислота эллаговая



Кислота гексагидроксифеновая

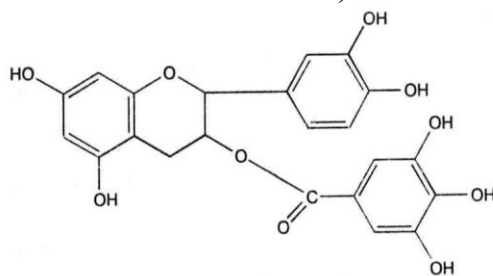


Кислота хебуловая

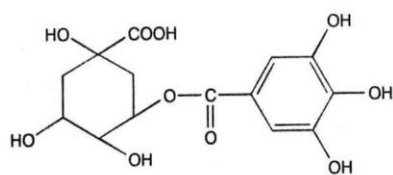
Эллаготаннины сложны по структуре и содержатся главным образом в тропических и субтропических растениях. Найдены в околоплоднике плодов гранатника, коре эвкалипта, околоплоднике грецкого ореха, коре дуба, соплодиях ольхи, листьях и соцветиях кипрея узколистного (иван-чая).

Галлотаннины и эллаготаннины в растениях могут встречаться одновременно.

1.3. *Несахаридные эфиры фенолкарбоновых кислот* представляют собой эфиры кислоты галловой с кислотами хинной, гидроксикоричными (хлорогеновой, кофейной, гидроксикоричной), а также с флаванами (катехингаллат). Эта группа широко распространена в растениях. Эфиры кислоты галловой и катехинов находятся в листьях чая китайского – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Из зеленого чая выделен теогаллин, представляющий собой эфир кислот хинной и галловой (кислота 3-О-галлоилхинная).



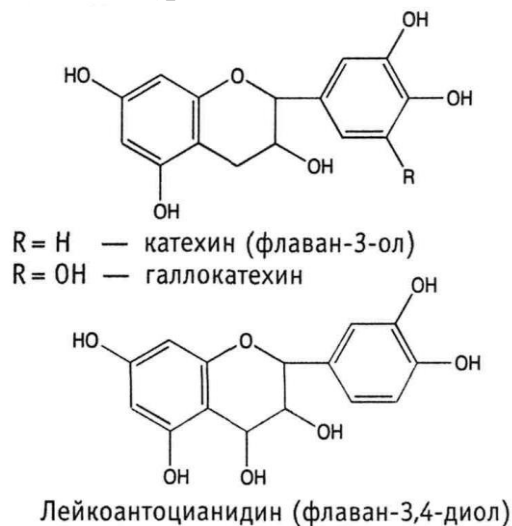
Катехингаллат



Теогаллин

2. *Конденсированные дубильные вещества* не обладают характером эфиров, полимерная цепь этих соединений образована посредством углерод-

углеродных связей (-C-C-), что обуславливает их устойчивость к воздействию кислот, щелочей и ферментов. При действии минеральных кислот они не расщепляются, а увеличивают молекулярную массу с образованием продуктов окислительной конденсации – *флобафенов*, или красеней, красно-коричневого цвета. Конденсированные дубильные вещества - это продукты конденсации катехинов (флаван-3-олов), лейкоантоцианидинов (флаван-3,4-диолов), реже гидроксистильбенов (фенилэтиленов).



Образование конденсированных дубильных веществ может идти двумя путями. По К. Фрейденбергу, оно сопровождается разрывом пиранового кольца катехинов, и C₂-атом одной молекулы соединяется углерод-углеродной связью с C₆- или C₈-атомом другой молекулы.

По Д. Е. Хатуэю, конденсированные дубильные вещества образуются в результате ферментативной окислительной конденсации молекул катехинов и лейкоантоцианидинов по типу «голова к хвосту» (кольцо А к кольцу В) или «хвост к хвосту» (кольцо В к кольцу В) по положениям 5'→8; 5'→2" и др.

Конденсированные дубильные вещества содержатся и преобладают в коре калины, корневищах лапчатки, плодах черники, плодах черемухи, траве зверобоя, листьях чая.

В состав смесей дубильных веществ входят также простые фенолы (резорцин, пирокатехин, пирогаллол, флороглюцин и др.) и свободные фенолкарбоновые кислоты (галловая, эллаговая, протокатеховая и др.).

Чаще всего в растениях встречается смесь гидролизуемых и конденсированных таннидов с преобладанием той или иной группы, поэтому классифицировать лекарственное растительное сырье по типу дубильных веществ достаточно сложно. В некоторых видах сырья отмечено почти одинаковое содержание обеих групп дубильных веществ (например, корневища змеевика). Дубильные вещества в больших количествах накапливаются, главным образом, в подземных органах многолетних травянистых растений (корневища бадана, змеевика, лапчатки, корневища и корни кровохлебки), в коре и древесине деревьев и кустарников (кора дуба, калины), в плодах (плоды черемухи, черники, соплодия ольхи), реже в листьях (листья скумпии, сумаха, чая).

Накопление таннидов зависит от генетических факторов, климатических и экологических условий. У травянистых растений, как правило, минимальное количество дубильных веществ отмечается весной в период отрастания побегов, затем их содержание увеличивается и достигает максимума в период бутонизации и цветения (например, корневища лапчатки). К концу вегетации количество дубильных веществ постепенно снижается. У кровохлебки максимум дубильных веществ накапливается в фазу развития розеточных листьев, в фазу цветения их содержание снижается, а осенью вновь увеличивается. Фаза вегетации влияет не только на количество, но и на качественный состав дубильных веществ. Весной, в период сокодвижения в коре деревьев и кустарников и в фазу отрастания побегов у травянистых растений преимущественно накапливаются гидролизуемые танниды, а осенью в фазу отмирания растений - конденсированные танниды и продукты их полимеризации - флобафены (красени).

Наиболее благоприятными для накопления таннидов являются условия умеренного климата (лесная зона и высокогорный альпийский пояс).

Наибольшее содержание дубильных веществ отмечено у растений, произрастающих на плотных известковых почвах, на рыхлых черноземных и песчаных почвах их содержание меньше. Способствуют накоплению дубильных веществ почвы, богатые фосфором, богатые азотом почвы снижают содержание таннидов.

Физические и химические свойства

Дубильные вещества выделяются из растительного сырья в виде смеси полимеров и представляют собой аморфные вещества желтого или желто-бурого цвета, без запаха, вяжущего вкуса, очень гигроскопичные. Хорошо растворяются в воде (особенно в горячей) с образованием коллоидных растворов, растворимы также в спиртах этиловом и метиловом, ацетоне, этилацетате, бутаноле, пиридине. Нерастворимы в хлороформе, бензоле, диэтиловом эфире и других неполярных растворителях, оптически активны. Легко окисляются на воздухе. Способны образовывать прочные межмолекулярные связи с белками и другими полимерами (пектиновые вещества, целлюлоза и др.). Под действием ферментов и кислот гидролизуемые дубильные вещества распадаются на составные части, конденсированные дубильные вещества - полимеризуются. Из водных растворов осаждаются желатином, алкалоидами, свинца основного ацетатом, калия бихроматом, кардиотоническими гликозидами. Как вещества фенольной природы, дубильные вещества легко окисляются калия перманганатом в кислой среде и другими окислителями, образуют окрашенные комплексы с солями тяжелых металлов, трехвалентного железа, бромной водой. Способны легко адсорбироваться на каждом порошке, целлюлозе, вате.

Анализ сырья, содержащего дубильные вещества

Для получения суммы дубильных веществ растительное сырье экстрагируют горячей водой в соотношении 1:30 или 1:10.

Качественный анализ. Используют качественные реакции (осаждения и цветные) и хроматографическое исследование.

I. *Общие реакции осаждения* – для обнаружения дубильных веществ в сырье:

II. 1. Специфической реакцией является реакция осаждения желатином, используют 1 % раствор желатина на 10 % растворе натрия хлорида. Появляется хлопьевидный осадок или муть, исчезающие при добавлении избытка желатина. Отрицательная реакция с желатином свидетельствует об отсутствии дубильных веществ.
2. Реакция с солями алкалоидов, используют 1 % раствор хинина хлорида. Появляется аморфный осадок за счет образования водородных связей между гидроксильными группами дубильных веществ и атомами азота алкалоида.

Эти реакции дают одинаковый эффект независимо от группы таннидов. Ряд реакций позволяют определить принадлежность дубильных веществ к определенной группе.

II. *Групповые качественные реакции* на дубильные вещества:

№	Реактив	Гидролизуемые танниды	Конденсированные танниды
1	разбавленная кислота серная	гидролиз	красно-коричневые флобафены (красени)
2	бромная вода (5г брома в 1 л воды)	-----	оранжевый или желтый осадок
3	1 % раствор квасцов железозаммонийных (железа окисного хлорид не используют, т.к. его раствор имеет кислую реакцию среды)	черно-синее окрашивание или осадок	черно-зеленое окрашивание или осадок
4	10 % раствор свинца среднего ацетата (одновременно добавляют 10 % раствор кислоты уксусной)	белый осадок, нерастворимый в кислоте уксусной (осадок отфильтровывают и в фильтрате определяют содержание конденсированных таннидов, с	белый осадок, растворимый в кислоте уксусной

		1 % раствором квасцов железоммонийных - черное окрашивание)	
5	проба Стиасни (40 % раствор формальдегида с концентрированной кислотой хлористоводородной)	-----	осадок кирпично-красного цвета (осадок отфильтровывают и в фильтрате определяют содержание гидролизующих таннидов, в нейтральной среде с 1 % раствором квасцов железоммонийных - черное окрашивание)
6	1 % раствор ванилина в концентрированной кислоте хлористоводородной	-----	оранжево-красное окрашивание (катехины)

Реакция с 1 % спиртовым раствором квасцов железоммонийных включена во все нормативные документы на лекарственное сырье как реакция для определения их подлинности. Реакция рекомендована ГФ XI и проводится как с отваром из сырья (кора дуба, корневища змеевика, соплодия ольхи, плоды черники), так и для открытия дубильных веществ непосредственно в сухом сырье (кора дуба, кора калины, корневища бадана).

Количественное определение. Известно около 100 различных методов количественного определения дубильных веществ, которые можно разделить на следующие основные группы.

1. *Гравиметрические*, или *весовые* методы - основаны на количественном осаждении дубильных веществ желатином, ионами тяжелых металлов или адсорбцией кожным (гольевым) порошком.

Для технических целей во всем мире стандартным является гравиметрический метод с применением гольевого порошка - весовой единый метод (ВЕМ). Водный экстракт дубильных веществ делят на две равные части. Одну часть экстракта выпаривают и высушивают до постоянной массы. Другую часть экстракта обрабатывают кожным порошком и фильтруют. Дубильные вещества адсорбируются на кожном порошке и остаются на фильтре. Фильтрат и промывные воды выпаривают и высушивают до постоянной массы.

Содержание дубильных веществ рассчитывают по разнице в массе сухих остатков.

Метод неточный, т.к. кожный порошок адсорбирует и низкомолекулярные фенольные соединения, довольно трудоемкий и дорогой.

2. *Титриметрические* методы. К ним относятся:

а) *Желатиновый* метод - основан на способности дубильных веществ образовывать нерастворимые комплексы с белками. Водные извлечения из сырья титруют 1 % раствором желатина, в точке эквивалентности комплексы желатинотаннаты растворяются в избытке реактива. Титр устанавливают по чистому таннину. Точку эквивалентности определяют путем отбора наименьшего объема титрованного раствора, вызывающего полное осаждение дубильных веществ.

Метод наиболее точный, т.к. позволяет определить количество истинных дубильных веществ. Недостатки: длительность определения и трудность установления точки эквивалентности.

б) *Перманганатометрический* метод (метод Левенталя-Нейбауера в модификации А.Л. Курсанова). Это фармакопейный метод, основан на легкой окисляемости дубильных веществ калия перманганатом в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора индигосульфокислоты, которая в точке эквивалентности переходит в изатин, и цвет раствора меняется от синего до золотисто-желтого.

Особенности определения, позволяющие оттитровать только макромолекулы дубильных веществ: титрование проводится в сильно разбавленных растворах (извлечение разбавляется в 20 раз) при комнатной температуре в кислой среде, калия перманганат добавляется медленно, по каплям, при интенсивном перемешивании.

Метод экономичный, быстрый, прост в исполнении, но недостаточно точный, т.к. калия перманганат окисляет частично и низкомолекулярные фенольные соединения.

3. *Физико-химические* методы.

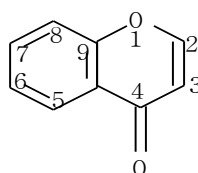
а) *Фотоэлектроколориметрические* методы основаны на способности дубильных веществ образовывать окрашенные соединения с солями трехвалентного железа, кислотой фосфорно-вольфрамовой, реактивом Фолина-Дениса и др.

б) *Хроматоспектрофотометрические* и *нефелометрические* методы используют в научных исследованиях.

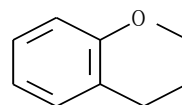
Лекарственное растительное сырье, содержащее дубильные вещества, применяют для получения препаратов, используемых как вяжущие, кровоостанавливающие, противовоспалительные, антимикробные средства. Сырье, содержащее конденсированную группу дубильных веществ, может применяться как антиоксидантное средство. Препараты дубильных веществ, образуя нерастворимые комплексы с белками эпителиальной тканей и белками бактерий, приводят к образованию пленок, защищающих ткани от взаимодействия внешних факторов и оказывают дезинфицирующее действие. По-

этому дубильные вещества можно использовать как противоядия при отравлении алкалоидами, солями тяжелых металлов и гликозидами. Кроме того, установлено, что гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества проявляют высокую Р-витаминную активность, антигипоксическое и антисклеротическое действие. Конденсированные дубильные вещества из флаван-3-ола обладают противоопухолевой активностью.

ФЛАВОНОИДЫ - это фенольные соединения, содержащие 15 углеродных атомов. Структурное родство флавоноидов обусловлено наличием дифенилпропанового фрагмента $C_6 - C_3 - C_6$, общего для всех представителей. Молекула флавоноида состоит из двух фенильных остатков, соединенных алифатическим звеном, их можно рассматривать как производные хромона и производные хромана, содержащие в положении 2,3 или 4-арильный радикал.



хромон



хроман

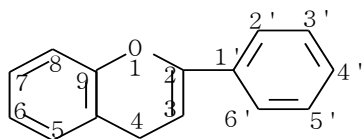
Флавоноиды являются одной из самых распространенных групп фенольных соединений. Они обнаружены в представителях почти всех семейств высших растений (споровых, голосемянных, покрытосемянных), а также во мхах, зеленых водорослях, папоротниках. Лишь грибы и лишайники не содержат флавоноиды. В большинстве случаев флавоноиды представлены в растениях гликозидами, метиловыми эфирами, комплексов с солями тяжелых металлов.

Название этой группе соединений дано польским химиком С.Костенецким в 1895 г по окраске веществ и является производным от латинского слова «flavus» – желтый. Термин «флавоноиды» впервые введен в 1949 г. Позднее к флавоноидам стали относить многочисленную группу природных красителей, объединенных общей структурой из сочетания $C_6 - C_3 - C_6$ -углеродных единиц. Однако сочетание $C_6 - C_3 - C_6$ -углеродных единиц присуще не только флавоноидам, но и другим группам природных веществ (антоцианы, катехины и др.), отличающимися от флавоноидов физическими свойствами и окраской, т.е. флавоноиды составляют отдельную группу такого типа соединений, в составе их пропанового фрагмента обязательно содержится кетогруппа.

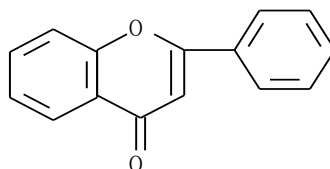
Классификация флавоноидных агликонов зависит от степени окисления пропанового фрагмента, положения бокового фенильного радикала, величины гетероцикла и др. Различают следующие основные подгруппы флавоноидов: собственно флавоноиды (эуфлавоноиды) с боковым фенильным радикалом с C_2 ; изофлавоноиды с фенильным радикалом у C_3 ; неофлавоноиды – производные 4-арилхромона; бифлавоноиды.

К подгруппе эуфлавоноидов или собственно флавоноидам относятся флаваны, флавоны, флаванолы, халконы, дигидрохалконы, антоцианидины и

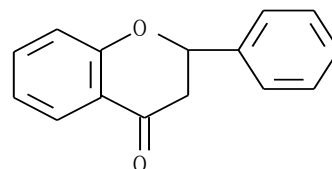
ауруны:



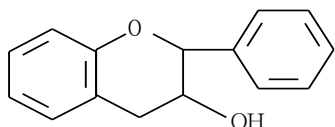
флаван



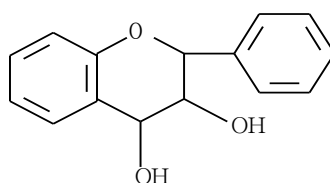
флавон



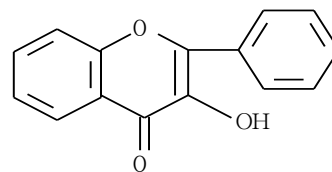
флаванон



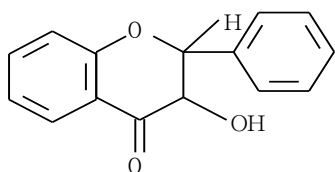
катехин



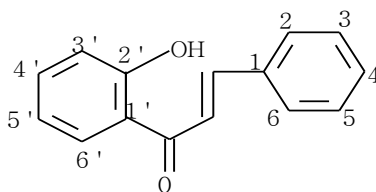
лейкоантоцианидин



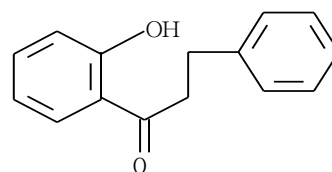
флаванол



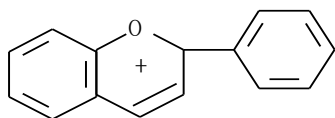
флаванонол



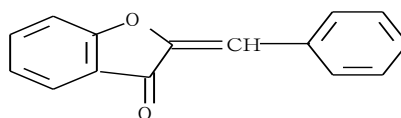
халкон



дигидрохалкон

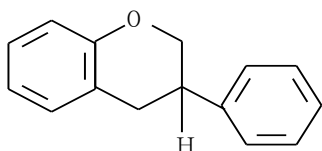


антоцианидин

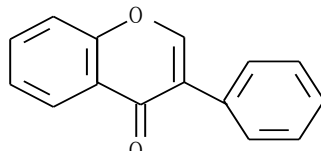


аурон

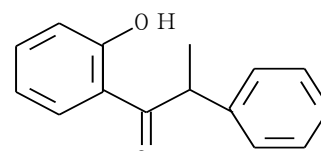
Изофлавоноиды включают производные 3-фенил- α - или γ -бензпирана, производные пирана, ротеноиды, гомоизофлавоноиды и другие соединения.



Изофлаван

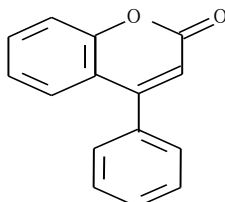


Изофлавон

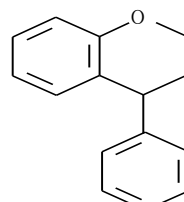


изохалкон

К подгруппе неофлавоноидов относятся 4-арилкумарины, 4-арилхромоны и некоторые другие, являющиеся производными диарилпропена.

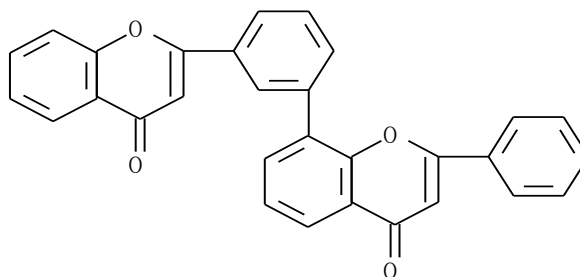


4-бензокумарин



4-бензохроман

Наряду с мономерными флавоноидами в растениях встречаются полимерные флавоноиды – бифлавоноиды, состоящие из ядер флавонов, флавонолов и изофлавонов, например бифлаван:



В растениях флавоноиды, кроме катехинов и лейкоантоцианидинов, сравнительно редко встречаются в свободном состоянии. Большинство их представлено в виде разнообразных гликозидов, многообразие которых обусловлено значительным набором моносахаридов и возможностями присоединения их в ряде положений агликонов, а также тем, что моносахариды могут иметь различную величину окислых циклов, конфигурацию гликозидных связей и порядок сочетания между ними.

Во флавоноидных гликозидах углеводный компонент чаще всего обнаруживается у C_7 , затем у C_3' , и C_4' и очень редко в положениях у C_5 , C_6 , C_8 . Среди флавоноловых гликозидов обычны замещения у C_3 и C_7 и не встречаются замещения у C_5 при свободной гидроксигруппе у C_3 . Среди моносахаридов в углеводных компонентах часто встречаются: D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, D-глюкуроновая кислота, L-рамноза, L-арабиноза.

Обычно флавоноиды являются биозидами, димонозидами, триозидами и или часто биозидо-монозидами. Известны случаи, когда остатки моносахаридов находятся в различных положениях, обычно в 3, 4' и 7 (например, кемпферол-3-рамно-4-арабинозид). В случае присоединения углеводов в двух положениях вещество называют дигликозидом. Связь углеводного компонента с агликоном осуществляется, в основном, через кислород, т.е. О-гликозиды. Обнаружены также С-гликозиды (гликофлавоноиды), в которых углевод соединен с агликоном углеродной С-С связью (например, витексин, ориентин).

Известны ацилированные гликозиды, ацилирующими агентами которых могут быть бензойная, кофейная, уксусная, протокатеховая, феруловая и другие кислоты.

Физико-химические свойства

Флавоноиды представляют собой преимущественно кристаллические соединения белого, желтоватого (катехины, лейкоантоцианидины), желтого (флавоны, флавононы), оранжевого (халконы), красного, синего и фиолетового (антоцианидины) цветов. Желтая окраска обусловлена наличием у 2 атома углерода фенильного радикала и присутствием в структуре гидроксильных групп. Интенсивность желтой окраски от количества и положения в структуре флавона гидроксигрупп. ОН-группа в положении 3 вызывает появление бледно-желтого цвета, а в положении 3, 4 – глубоко желтого цвета. Одновременно присутствие ОН-групп в положениях 3, 3', 4' – ведет к усилению окраски в сторону оранжевого цвета. Хромон и флавон, составляющие основу флавоноидов бесцветны.

Флавоноиды склонны к взаимным превращениям и участвуют в окислительно-восстановительных реакциях в растениях.

Агликоны флавоноидов плохо растворимы в воде, хорошо растворимы в этаноле, частично растворимы в органических растворителях. Наличие в ядре агликона, в качестве радикала, нескольких метоксильных групп, значительно увеличивает их растворимость в ацетоне и этилацетате.

Гликозиды, в случае наличия в их структуре длинной моносакхаридной цепочки, растворимы в этаноле, в горячей и теплой (55-60⁰С) воде. В холодной воде флавоноиды растворимы плохо, поэтому это свойство используется при очистке флавоноидов от полярных веществ, которые одинаково хорошо растворяются и в горячей и в холодной воде (например, очистка рутина-биозида).

Флавоноиды легко окисляются в щелочной среде.

Присутствие углеводного компонента повышает растворимость флавоноидных гликозидов в клеточном соке растения. На их растворимость часто влияют поверхностно-активные вещества (например, сапонины), находящиеся одновременно в клеточном соке.

Качественные реакции на флавоноиды

1. с раствором хлорида железа (III) водно-спиртовое извлечение из растительного сырья дает окраску от желто-зеленого до зеленовато-коричневого цвета;
2. с парами аммиака – желтое окрашивание (на хроматограммах);
3. борно-лимонная проба. Спиртовый раствор флавоноидов со смесью равных объемов 1% растворов борной и лимонной кислот, дает ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией;
4. с треххлористой сурьмой – оранжево-желтое окрашивание
5. с треххлористым алюминием – желтое окрашивание

Следует отметить, что с указанными реактивами катехины не дают цветных реакций.

Характерной реакцией на катехины является реакция с концентрированной серной кислотой (красное окрашивание).

6. Проба Синода (цианидиновая проба) – наиболее специфическая реакция на группы флавоноидов. К спиртовому извлечению флавоноидов прибавляют концентрированную хлороводородную кислоту (гидролиз), а затем металлический магний – наблюдается красное окрашивание (флавоны), фиолетовое (флаваноны), желто-зеленое (флавонолы). Эту реакцию не дают изофлавоноиды, катехины, антоцианы и лейкоантоцианидины.

Для идентификации и разделения флавоноидов используют **методы бумажной, колоночной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента.**

Используют различные системы растворителей: для БХ чаще всего БУВ (бутанол – кислота уксусная - вода) 4:1:5; 4:1:2; для ТСХ - хлороформ-метанол 8:3; 8:2.

Идентифицируют флавоноиды по характерному свечению на хроматограммах в УФ-свете до и после проявления хромогенными реактивами.

Катехины и лейкоантоцианидины не флуоресцируют. Гликозиды фла-

вонов и изофлавонов флуоресцируют голубым или синим цветом, флавонолов - темно-коричневым или черным, агликоны флавонов - коричневым, флавонолов - желтым, халконы и ауруны имеют желтую или оранжевую флуоресценцию.

Для проявления флавоноидов на хроматограммах используют:

- 1) пары аммиака 25 %. Происходит усиление окраски пятен в УФ-свете или изменение окраски на желтую.
- 2) 2-5 % спиртовой раствор алюминия хлорида. Наблюдается желто-зеленая флуоресценция в УФ-свете, в видимом свете - желтое окрашивание пятен.
- 3) Катехины проявляют 1 % раствором ванилина в кислоте концентрированной хлористоводородной, в видимом свете наблюдается красное окрашивание.

Реже используют реактив Вильсона, 2 % метанольный раствор хлороксициркония, раствор сурьмы пятихлористой в хлороформе, диазореактив.

В ГФ XI приводится исследование методом бумажной хроматографии халконов и аурунов в траве череды, изофлавонов в корнях стальника; хроматографии в тонком слое сорбента на пластинке «Силуфол» - флавоноидов в цветках и плодах боярышника, флавоно-5-гликозидов в траве хвоща полевого.

Количественное определение

Для количественного определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье используют физико-химические методы анализа (преимущественно фотоэлектроколориметрические и спектрофотометрические методы).

Фотоэлектроколориметрический (ФЭК) метод.

ФЭК-метод основан на измерении оптической плотности окрашенных растворов, полученных по реакции флавоноидов с солями металлов или азосочетания с солями диазония.

ГФ XI приводит ФЭК-метод для определения содержания суммы флавоноидов в листьях вахты трехлистной. Предварительно сырье очищают от хлорофилла хлороформом, получают спиртовое извлечение флавоноидов, затем проводят реакцию образования азокрасителя с диазотированным стрептоцидом и измеряют оптическую плотность окрашенного раствора с помощью ФЭК. Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному образцу рутина.

Спектрофотометрический метод (СФМ).

СФМ основан на способности флавоноидов или их окрашенных комплексов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны.

1. Получают спиртовое извлечение и измеряют собственное поглощение:

- в цветках бессмертника песчаного при длине волны 315 нм, рассчитывают содержание флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид с использованием оптической плотности ГСО изосалипурпозиды;
- в корнях стальника при длине волны 260 нм, рассчитывают в пересчете на ононин с учетом оптической плотности ГСО ононина;

- в цветках пижмы измеряют оптическую плотность флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в буферном растворе и пересчитывают на лютеолин с учетом оптической плотности ГСО лютеолина.

2. Получают спиртовое извлечение, затем проводят реакцию образования комплекса с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и измеряют оптическую плотность:

- в траве зверобоя в пересчете на рутин с учетом оптической плотности ГСО рутина;
- в траве горца перечного в пересчете на кверцетин с учетом удельного показателя поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом;
- в траве спорыша (горца) птичьего в пересчете на авикулярин с учетом удельного показателя поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом.

Получают извлечение антоцианов 1 % раствором кислоты хлористоводородной из цветков василька синего, при этом образуются окрашенные оксониевые соли, у которых измеряют оптическую плотность и пересчитывают на 3,5-дигликозид цианидина (цианин) с учетом удельного показателя поглощения цианина в 1 % растворе кислоты хлористоводородной.

Хроматоспектрофотометрический метод.

1. Предварительное разделение флавоноидов в тонком слое сорбента (цветки боярышника).

Стадии определения:

- получение спиртового извлечения;
- очистка извлечения;
- хроматографическое разделение флавоноидов на пластинке «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол 8:2 вместе со свидетелем ГСО гиперозида;
- идентификация гиперозида и свидетеля на пластинках в УФ-свете;
- элюирование гиперозида и ГСО смесью диоксана и воды 1:1;
- измерение оптической плотности испытуемого раствора и ГСО при длине волны 365 нм;
- расчет содержания гиперозида.

2. Предварительное разделение на колонке с полиамидом (плоды боярышника).

Стадии определения:

- получают спиртовое извлечение;
- отгоняют спирт и обрабатывают остаток 10 % раствором натрия хлорида;
- полученный раствор наносят на колонку с полиамидом;
- элюируют флавоноиды с колонки 95 % этанолом, собирают окрашенный в желтый цвет элюат в мерную колбу на 25 мл;
- измеряют оптическую плотность элюата при длине волны 365 нм;
- параллельно измеряют оптическую плотность элюата ГСО гиперозида, полученного аналогично элюату флавоноидов;

- пересчитывают на гиперозид с учетом оптической плотности элюата ГСО гиперозида.

3. В траве сушеницы топяной выделяют следующие стадии количественного определения флавоноидов:

- получают спиртовое извлечение;
- отгоняют спирт и остаток обрабатывают 10 % раствором натрия хлорида;
- полученный раствор переносят на колонку с полиамидом;

Флавоноиды обладают широким спектром фармакологической активности. Препараты флавоноидов применяются в качестве капилляроукрепляющих, желчегонных, сердечных, противоопухолевых, эстрогенных, гепато-защитных средств. Особенностью этой группы природных соединений является преимущественно их применение в суммарном виде (галеновые и новогаленовые препараты), реже используются препараты индивидуальных флавоноидов и их сочетаний с другими фармакологически активными препаратами (аминокислотами, минералами, сапонинами, витаминами).

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

Практическая работа №1 Проведите фитохимический анализ сырья, содержащего простые фенолы

Измельченные листья толокнянки и брусники в количестве 0,5 г прокипятить с 10 мл воды в течение 2-3 мин и профильтровать через бумажный фильтр.

1. К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавить 4 мл раствора аммиака и по каплям 1 мл 10% раствора натрия фосфорномолибденового кислого в хлористоводородной кислоте. Появляется синее окрашивание (арбутин). Результаты занесите в таблицу.

2. К 1 мл фильтрата прибавляют несколько кристаллов сульфата закисного железа, появляется красное, переходящее в фиолетовое окрашивание, а затем фиолетовый осадок (арбутин).

3. К 2-3 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют несколько капель железистоаммониевых квасцов, появляется черно-синее окрашивание (дубильные вещества пирогалловой группы). Настой брусничного листа с железистоаммониевыми квасцами образует черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества пирокатехиновой группы).

Практическая работа №2 Проведите фитохимический анализ сырья, содержащего кумарины

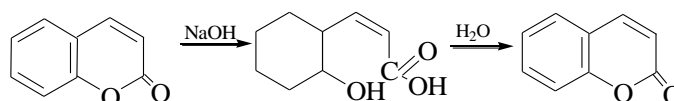
Получение экстракта. Возьмите 1.0 измельченного сырья, содержащего кумарины поместите в колбу вместимостью 100 мл, залейте 15 мл 70 % этилового спирта, присоедините колбу к холодильнику и нагрейте на кипящей водяной бане 30 минут. Охладите, процедите экстракт через ватный тампон и используйте извлечение для проведения качественных реакций и хроматографического анализа.

Реакция с 10% раствором калия гидроксида. К 3 мл спиртового извлечения прибавьте 10 капель 10%-ного этанольного раствора калия гидроксида и

нагревайте в течение 5 минут на водяной бане. Наблюдайте появление желтого окрашивания. Сделайте вывод и внесите в протокол.

Лактонная проба. К 2 мл спиртового извлечения прибавьте 5 капель 10%-ного этанольного раствора калия гидроксида, нагрейте раствор на водяной бане. В присутствии кумаринов появляется желтое окрашивание. Содержимое пробирки охладите, прибавьте 2 мл дистиллированной воды и 10% раствор кислоты хлористоводородной до кислой реакции (по индикаторной бумаге). Появление осадка или помутнение раствора указывает на возможное присутствие кумаринов в сырье. Сделайте вывод и внесите в протокол.

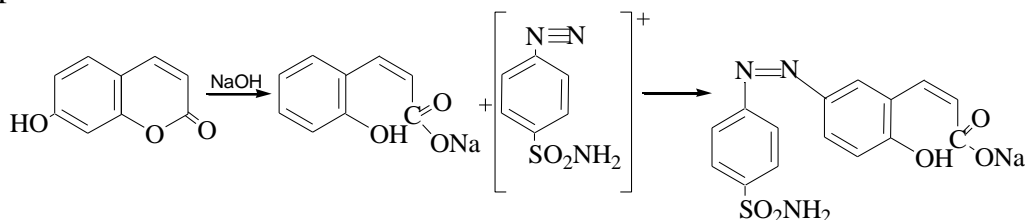
Реакция основана на способности кумаринов в щелочной среде образовывать соли желтого цвета, растворимые в воде. При подкислении раствора образуется кислота кумариновая, которая переходит в исходный кумарин, растворимый в воде.



Реакция азосочетания. К 2 мл спиртового извлечения прибавьте 5 капель 10%-ного этанольного раствора калия гидроксида. Жидкость нагрейте на водяной бане в течение 5 минут. Прибавьте несколько капель свежеприготовленного диазореактива.

Реактив: 4,5 г сульфаниловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 4,5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, растворяют в 40 мл воды, доводят объем раствора водой до метки. Срок хранения – 1 месяц.

5 мл раствора кислоты сульфаниловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл 10% раствора натрия нитрита. Смесь оставляют на льду в течение 5 минут, затем прибавляют еще 10 мл 10% раствора натрия нитрита, взбалтывают, оставляют на льду в течение 5 минут, и доводят объем раствора водой до метки. Реактив сохраняют на льду. При наличии кумаринов появляется окрашивание от коричнево-красного до вишневого. Сделайте вывод и внесите в протокол.



Практическая работа №3 Проведите фитохимический анализ лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества

1) Приготовление извлечения. 1 г измельченного сырья заливают 50 мл кипящей воды, нагревают на водяной бане в течение 15 мин, профильтровывают через складчатый фильтр. С полученным фильтратом проводят качественные реакции.

С белками. К 2 мл очищенного извлечения добавить 2 – 3 капли 1% раствора желатина в 10% растворе NaCl. При наличии танидов появляется осадок или муть от образовавшихся желатинтаннатов (смотреть на черном фоне, сравнивая с отваром), растворимых в избытке реактива.

С алкалоидами. К 2 мл извлечения добавить 3-5 капли раствора солей кодеина, хинина или другого алкалоида. Появляется аморфный осадок.

С солями 3-х валентного железа: к 2 мл извлечения добавить 4 капли 1% раствора железоаммониевых квасцов. Гидролизующие дубильные вещества дают черно-синее окрашивание, а конденсированные черно-зеленое.

С бихроматом калия. К 3-5 мл извлечения добавить 2-3 капли 5% раствора калия бихромата. При наличии танинов наблюдается потемнение раствора или выпадение желто-коричневого осадка.

С раствором Фолина - Дениса (смесь фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот). К 3-5 мл извлечения добавляют 3-5 капель раствора Фолина - Дениса и небольшое количество натрия карбоната. При наличии танинов образуется вольфрамовая или молибденовая синь. Окраска устойчива. Эта реакция может быть использована для количественного определения дубильных веществ.

Со средним ацетатом свинца в уксуснокислой среде. К 1 мл извлечения прибавить 2 мл 10% уксусной кислоты и 2 мл 10% раствора среднего уксуснокислого свинца. При наличии гидролизующих дубильных веществ образуется осадок белый осадок. Осадок отфильтровать. Добавить 5 капель 10% раствора железоаммонийных квасцов и 0,1 г натрия ацетата (не встряхивать!). При наличии в сырье конденсированных дубильных веществ фильтрат окрашивается в черно-зеленый цвет.

С формальдегидом и концентрированной соляной кислотой. К 5 мл извлечения прибавить 1 мл 40% раствора формальдегида и 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Нагреть. Если, образуется кирпично-красный осадок; то это свидетельствует о наличии галловой кислоты или дубильных веществ конденсированной группы. После охлаждения жидкость отфильтровать, налить в пробирку 1 мл, добавить 0,1 мл раствора железоаммониевых квасцов и несколько кусочков ацетата натрия кристаллического или плавленого (после добавления ацетата натрия раствор не взбалтывать). При наличии дубильных веществ гидролизующей группы жидкость возле кусочков ацетата натрия приобретает синее или фиолетовое окрашивание.

Сделайте вывод о характере дубильных веществ в данном сырье. Заполните таблицу:

Результаты качественного анализа

Наименование сырья	Результаты реакции						
	1	2	3	4	5	6	7

2) *количественное определение дубильных веществ:*

Методика. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают около 100 мл в коническую колбу вместимостью 250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Затем отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия 0,1 моль/л до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание дубильных веществ (х, %) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{(V - V_1) \cdot T \cdot W \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot W_1 \cdot (100 - B)}$$

где V - объем титранта, израсходованный на титрование извлечения, мл;

V₁ - объем титранта, в контрольном опыте, мл;

a - навеска сырья, г;

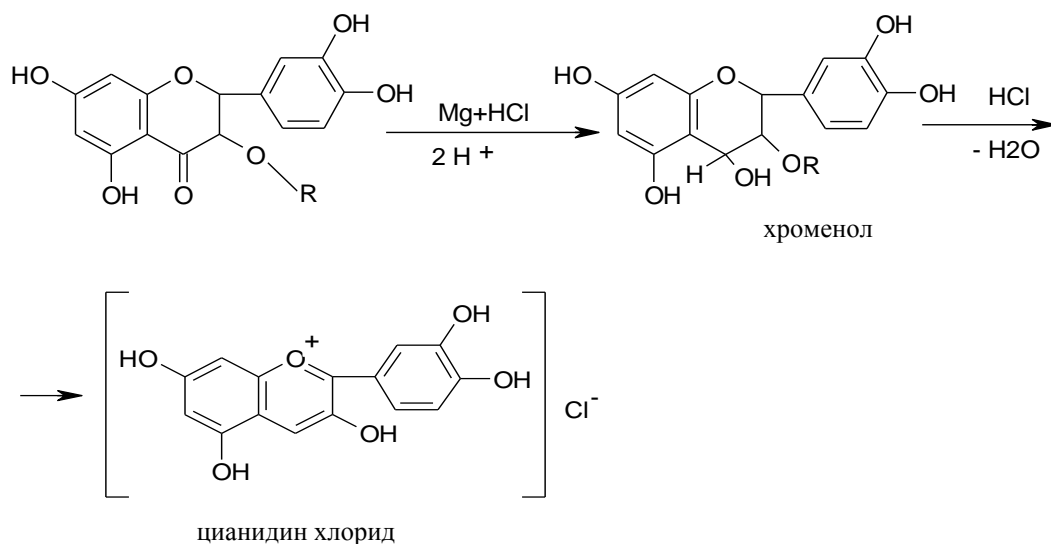
T – титр, г/мл.

B – влажность сырья, %

Практическая работа №4 Проведите фитохимический анализ сырья, содержащего флавоноиды

1. Качественное определение флавоноидов. 3-5 г высушенного и измельченного сырья заливают 30 -50 мл 70% спирта этилового в колбе с обратным холодильником и проводят экстракцию на водяной бане в течение 20- 30 минут. Извлечение охлаждают, фильтруют через 4 слоя марли или фильтровальную бумагу. Полученное извлечение упаривают до ½ объема и используют для проведения качественных реакций. Проведите качественные реакции с извлечением из лекарственного растительного сырья. В качестве образца сравнения используйте 1 % спиртовой раствор рутина. Наиболее часто используют следующие реакции:

Цианидиновая реакция (проба Синода). К 1 мл извлечения прибавляют 2-3 капли кислоты хлористоводородной концентрированной и 1-2 щепотки металлического магния. Наблюдают образующуюся окраску. Флавоноиды обычно дают неяркие оранжево – красные окраски, флавонолы и флавононы развивают глубокую розовую, алую или малиновую окраску. Если в извлечении присутствуют антоцианы, халконы, ауроны и катехины, то вследствие образования оксониевых солей они дают окраску без добавления металлического магния.



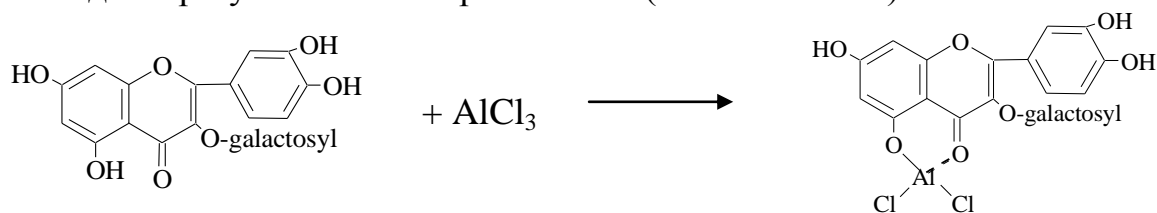
Окрашивание развивается вследствие того, что происходит восстановление флавонов и флавонолов до антоцианидинов, которые в кислой среде образуют окрашенные оксониевые соли.

Цианидиновая реакция по Брианту (продолжение первой реакции).

К окрашенному продукту цианидиновой реакции добавляют 1/3 часть октанола или бутанола по объему, разбавляют водой до разделения слоев, встряхивают и отмечают переход пигментов в водную и органическую фазы. Пигменты гликозидов остаются в воде, а агликоны переходят в слой органического растворителя.

Реакция со щелочью. К 1 мл извлечения прибавляют 1-2 капли 10% спиртоводного раствора калия или натрия гидроксида. Флавоны и флавонолы растворяются в щелочах с образованием желтой окраски. Раствор желтеет или естественная желтая окраска усиливается. Халконы и ауруны сразу же образуют со щелочами красные или пурпурные растворы (эта реакция для них очень специфична).

Реакция с 1 % спиртовым раствором хлорида алюминия. К 1 мл извлечения прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида. Флавоноиды образуют желтое окрашивание (желто-зеленое).



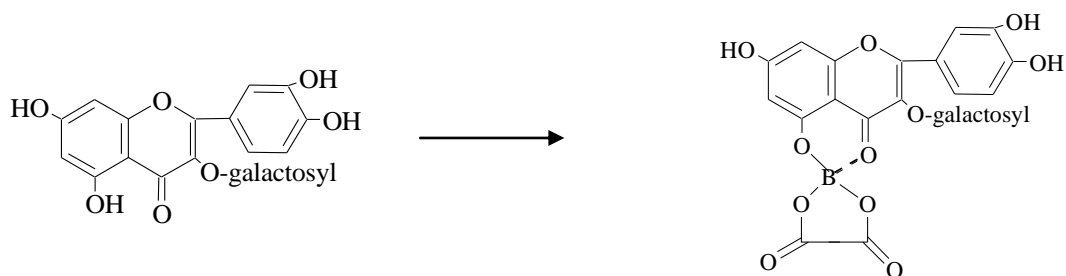
Гиперозид

Батохромный комплекс гиперозида

Реакция с железом хлоридом (III). К 1 мл извлечения прибавьте 2 – 3 капли 1 % спиртового раствора железа хлорида. При наличии в сырье 5 – оксифлавонов образуются комплексы, окрашенные в зеленый цвет; халконы, флавонолы и флаванолы образуют комплексы, окрашенные в коричневый цвет.

Борно-лимонная реакция (реакция Вильсона). К 2 мл извлечения прибавляют 1 мл 2 % раствора кислоты борной и 1 мл 2% раствора кислоты ли-

монной (или щавелевой). При наличии 5 – оксифлавонов и 5 – оксифлавонолов наблюдается образование ярко-желтого окрашивания с желто – зеленой флуоресценцией.



Гиперозид

Батохромный комплекс гиперозида

Реакция с раствором основного ацетата свинца. К 1 мл извлечения добавляют 3 –5 капель 2% основного ацетата свинца. Появление желтого окрашивания свидетельствует о наличии флавоноидов.

Реакция с раствором аммиака. Флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванолы дают желтое окрашивание при нагревании переходящее в оранжевое или красное. Халконы и ауруны тотчас же дают красное или пурпурное окрашивание. Чистые катехины окрашивания не дают, однако присутствие даже в небольшом количестве примесей (продуктов окисления) вызывает появление желтой окраски. Антоцианы в присутствии аммиака или карбоната натрия дают синее или фиолетовое окрашивание.

Реакция с 1% ванилином в концентрированной соляной кислоте. К 1 мл извлечения прибавляют несколько капель 1 % раствора ванилина в кислоте хлористоводородной концентрированной. Катехины образуют красно – малиновое окрашивание (производные флороглюцина и резорцина).

Результаты качественных реакций оформите в следующем в виде таблицы.

Результаты качественных реакций на флавоноиды

Реактив	Результат реакции	
	С исследуемым извлечением	С раствором рутина
1.		
2. и. т. д.		

2. Хроматографический анализ флавоноидов

ТСХ-анализ. На линию старта пластинки “Силуфол УФ-254”, “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” или “Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ” микропипеткой наносят 0,03 мл полученного извлечения из анализируемого сырья (травя зверобоя) рядом наносят такие же объемы 0,1% раствора ГСО гиперозида и раствора ГСО рутина. Пластинку высушивают на воздухе и помещают в хроматографическую камеру. Хроматографическую пластинку помещают в камеру, которую предварительно насыщают не менее 1 ч смесью растворителей бутанол-1 - кислота ледяная уксусная - вода (БУВ 4:1:5) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 13 см (силуфол) или 8 см (сорбфил), пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и 366 нм. Отмечают зоны коричневого цвета – флавоноиды. Затем хроматограмму опрыскивают из пульверизатора 2 % раствором алюминия хлорида в спирте этиловом 95 % или раствором диазобензолсульфокислоты и нагревают 3 минуты в сушильном шкафу при температуре 100 - 105 °С. При этом пятна приобретает желтую окраску в видимом свете и ярко-желтую флуоресценцию в УФ-свете.

По результатам проведенных исследований подтвердите наличие флавоноидов в лекарственном растительном сырье. Результаты хроматографического изучения суммы флавоноидов зарисуйте.

На хроматограмме извлечения из травы зверобоя обнаруживаются пятна доминирующих веществ травы зверобоя: рутина (R_f около 0,4), гиперозида (R_f около 0,5), гиперидина (R_f около 0,6) и бисапигенина (R_f около 0,8). При этом пятна, соответствующие рутину, гиперозиду и бисапигенину флуоресцируют фиолетовым светом в УФ-свете при длине волны 254 нм на уровне соответствующих стандартов и проявляются раствором диазобензолсульфокислоты в желто-коричневый цвет (рутин и гиперозид) и в коричнево-оранжевый цвет (бисапигенин); пятно, соответствующее гиперидину, проявляется в УФ-свете при длине волны 366 нм (розово-красная флуоресценция). Допускается наличие и других пятен.

Примечание: 1. Подготовка пластинок. Пластины “Силуфол УФ 254” 15 x 15 см, “Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ” или “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ” (ТУ 26-11-17-89) перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 ч. Пятна исследуемых растворов наносят на линию старта, проведенную вдоль линий накатки.

2. Приготовление раствора гиперозида. 0,025 г гиперозида (ВФС 42-1088-81) помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 15-20 мл 70% спирта, растворяют на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят 70% этиловым спиртом до метки. Срок годности 0,1% раствора ГСО гиперозида – 1 месяц.

3. Приготовление раствора ГСО рутина Около 0,025 г (точная навеска) рутина (ФС 42-2508-87) помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После растворения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки.

4. Приготовление раствора диазобензолсульфокислоты. 0,01 г диазобензолсульфокислоты (ГФ Х, стр. 876) растворяют в 10 мл 10 % раствора натрия карбоната. Раствор используют свежеприготовленным.

3.Количественное определение флавоноидов

Определите количественное содержание флавоноидов в траве зверобоя по методике ГФ XI изд.

Методика: Точную навеску измельченного сырья помещают в коническую колбу, вместимостью 250 мл, приливают 100 мл экстрагента, взвешивают колбу с точностью до 0,01 г, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Затем охлаждают, взвешивают, пополняют экстрагентом (если необходимо до первоначальной массы, фильтруют и отбрасывают первые 10-15 мл фильтрата) - раствор А.

0,5 мл извлечения - раствора А, вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл спирта этилового 96 % и 2 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида. Через 10 мин приливают 0,1 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки спиртом этиловым 96 % -

раствор Б. Контрольную пробу подкисляют уксусной кислотой для перевода флавоноидов и сопутствующих им веществ в недиссоциированную форму с целью улучшения воспроизводимости результатов.

Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения (готовят аналогично раствору Б, но без добавления алюминия хлорида) на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1,0 см при длине волны 410 нм.

Параллельно через 30 мин после приготовления измеряют оптическую плотность стандартного раствора рутина, относительно раствора сравнения, для чего с 1 мл 0,05 % раствора рутина в спирте этиловом 95 % поступали как указано выше, на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1,0 см при длине волны 410 нм (раствор А₁).

Содержание суммы флавоноидов (х, %) в сырье (в пересчете на рутин) рассчитывают по формуле:

$$x \% = \frac{A_x \cdot a_{\text{ст}} \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - B)} = \frac{A_x \cdot 1,25 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot a_x \cdot (100 - B)}$$

где А_х, А_{ст} - соответственно оптическая плотность исследуемого извлечения и стандартного раствора рутина;

а_{ст} - масса стандартного раствора рутина, г;

а_х - масса сырья, г;

В - влажность, %.

Результаты проведенных исследований представьте в виде таблицы

Содержание суммы флавоноидов в сырье в пересчете на рутин

№ п/п	Оптическая плотность	Найдено суммы флавоноидов	Метрологические характеристики
1			x=
2			S _x =
3			Δx=
4			- x±Δx=
5			ε % =
6			

Сделайте заключение о соответствии качества сырья требованиям НД.

РАЗДЕЛ 9: АЛКАЛОИДЫ

Цель занятия: сформировать у студентов умения и практические навыки определения алакалоидо в лекарственном растительном сырье.

Учебный материал по теме

Алкалоиды - это особая группа органических азотсодержащих соединений основного характера, встречающихся в растительных организмах и обладающих сильным физиологическим действием. Термин «*алкалоид*» - «щелочеподобный» (от арабского «*alcali*» - щелочь и греческого «*eidos*» - подобный) предложил в 1819 году немецкий ученый К. Мейснер. Название указывает на основной характер соединений.

В природе существует множество различных веществ, содержащих в своей структуре азот. Например, в растениях встречаются простейшие амины (метиламин, диметиламин, различные аминокислоты), которые обладают ярко выраженными основными свойствами, но не относятся к алкалоидам. Существуют также природные соединения (протеиногенные амины), которые занимают положение между алкалоидами и другими азотистыми соединениями.

История изучения алкалоидов

Алкалоиды издавна применялись в народной медицине. Более 400 лет известны лечебные (противомалярийные) свойства коры хинного дерева. Отваром этой коры от малярии была вылечена королева Перу графиня Чинchon, в честь которой растение получило название *Cinchona* – цинхона.

Первые исследования в области изучения алкалоидов относятся к началу XIX века. В 1806 году немецкий фармацевт Ф. В. Сертюрнер выделил из опия (высохшего млечного сока мака) в чистом виде и изучил снотворное действие алкалоида, названного им «морфин» (в честь греческого бога сна Морфея).

Большой вклад в изучение алкалоидов внесли русские ученые. В 1816 г. профессор Харьковского университета Ф.И. Гизе из коры хинного дерева выделил в чистом виде хинин. В Европе это открытие осталось неизвестным.

Несколько позднее французские химики Пелетье и Кавенту повторно открыли хинин и доказали, что он является основным действующим веществом коры хинного дерева. Этим ученым принадлежит также честь открытия алкалоидов семян чилибухи - стрихнина и бруцина. За открытие хинина Пелетье и Кавенту во Франции поставлен памятник.

Профессор Юрьевского (г. Тарту) университета Г. Драгендорф изучил химические свойства алкалоидов, разработал методы их обнаружения и анализа. Реактив Драгендорфа (калия тетраiodовисмутат – $K[BiI_4]$) широко используется при анализе алкалоидов.

Установление структуры алкалоидов стало возможным только на основе теории химического строения, которую предложил А.М. Бутлеров. Ученик Бутлерова академик А.М. Вишнеградский изучил строение многих алкалоидов - производных пиридина и хинолина.

В связи с началом первой мировой войны потребовалось большое количество обезболивающих и протившоковых препаратов. Химики А.М. Родионов и А.Е. Чичибабин в 1914 году разработали промышленный способ получения алкалоидов из опиума. Эти ученые являются основоположниками химико-фармацевтической промышленности в России.

Огромная заслуга в изучении алкалоидов принадлежит А.П. Орехову, организовавшему при ВНИХФИ (г. Москва) отдел, который занимался изучением алкалоидов. За 10 лет (1928-1939 гг.) этим отделом было открыто и изучено около 100 новых алкалоидов. А.П. Орехов создал новое комплексное направление в науке, которое включает поиск алкалоидоносных растений, разработку методов анализа, изучение фармакологического действия и промышленный выпуск препаратов на основе алкалоидов. Его монография «Химия алкалоидов» (1938 г.) не потеряла своего значения и в настоящее время. Исследования А.П. Орехова продолжили его ученики: С.Ю. Юнусов, А.М. Рабинович, А.С. Садыков и др. С.Ю. Юнусов возглавил Институт химии растительных веществ Академии наук Узбекистана. В этом институте изучены многие алкалоидоносные растения азиатской флоры (эфедра хвощевая и др.).

В Пятигорской фармацевтической академии под руководством профессора Д.А. Муравьевой детально изучены растения из рода крестовник (*Senecio*) и их основные алкалоиды платифиллин и сенецифиллин. Исследования алкалоидов проводятся и зарубежными учеными - в Японии, Канаде, Англии, Индонезии, Индии, Бирме. Так, английский биохимик Р. Робинсон (Оксфордский университет) разработал теорию биосинтеза тропановых алкалоидов в растениях.

Обычно **содержание алкалоидов в растениях** невелико и составляет 0,01-0,1 %. Если в растении накапливается 1-3 % алкалоидов, сырье считается высокоалкалоидным. Только некоторые растения, например культивируемые сорта хинного дерева, накапливают в коре до 15-20 % алкалоидов. Большинство растений содержат несколько алкалоидов (катарантус розовый - более 60). Чаще всего, в растении количественно преобладает один или 2-3 алкалоида, содержание других значительно меньше. Алкалоиды одного растения, как правило, имеют довольно близкое строение. Алкалоиды накапливаются в листьях, плодах, семенах, коре, подземных органах. У некоторых растений алкалоиды содержатся во всех частях в значительных количествах (красавка). Но у большинства алкалоиды преобладают только в каком-либо одном органе или части растения. Так, например, в чае китайском алкалоиды накапливаются в листьях, в дурмане индийском, чилибухе – в плодах или семенах, в раувольфии, безвременнике – в подземных органах.

Различные части растения отличаются не только по количественному содержанию алкалоидов, но и по качественному составу. Например, у термопсиса ланцетного в траве преобладает алкалоид термопсин, а в семенах – цитизин.

Биосинтез алкалоидов

Большинство алкалоидов образуются из аминокислот. В зависимости от происхождения и местоположения атома азота в структуре молекулы, все алкалоиды делят на три группы:

- *истинные алкалоиды* – соединения, которые образуются из аминокислот и содержат атом азота в составе гетероцикла;
- *протоалкалоиды* – соединения, которые образуются из аминокислот, но не имеют гетероциклов и содержат алифатический атом азота в боковой цепи;
- *псевдоалкалоиды* – азотсодержащие соединения терпеновой и стероидной природы, образуются из кислоты мевалоновой по типу синтеза изопреноидов.

Классификация алкалоидов

В настоящее время открыто около 10 000 алкалоидов, из которых около 4 000 имеют доказанное строение. Такое огромное количество и многообразие алкалоидов не дают возможности разработать единую классификацию.

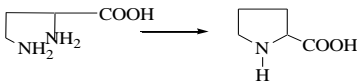
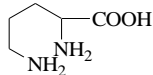
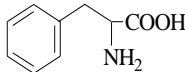
В основу классификации алкалоидов положены разные принципы, поэтому различают несколько видов классификаций алкалоидов.

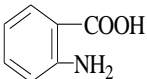
1. В основе *фармакологической классификации* лежит характер фармакологического действия алкалоидов на организм:

- наркотические алкалоиды;
- местноанестезирующие алкалоиды;
- спазмолитические алкалоиды и т.д.

2. В основе *ботанической классификации* лежит систематическая принадлежность растений, из которых выделены алкалоиды, к определенному роду или семейству: алкалоиды табака; алкалоиды мака; алкалоиды спорыньи и т.д.

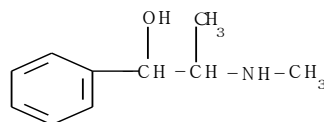
3. В основе *биогенетической классификации*, предложенной английским ученым Хегнауэром, лежит строение аминокислот, которые являются вероятными предшественниками алкалоидов в растениях: алкалоиды триптофана; алкалоиды фенилаланина и т.д.

Группа аминокислот	Алкалоиды
1. группа орнитина – пролина 	Гигрин, кускигрин, тропин, атропин, кокаин, никотин и др.
2. группа лизина 	Пиперидин, лобелин, анабазин, цитизин и др.
3. группа фенилаланина 	Эфедрин, сальсолин, папаверин, морфин, тропин, ликорин и др.
4. группа триптофана	Аймалин, резерпин, стрихнин, гармин, бревикалин и др.

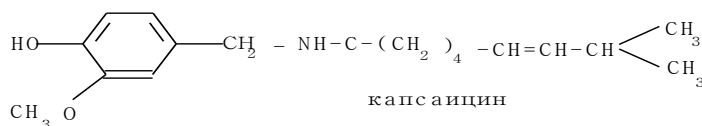
	
5. группа анраниловой кислоты	Меликопин, пеганин и др.
	
6. группа гистидина	Гистамин, пилокарпин, кофеин и др.
	

4. Наиболее удобна и чаще всего используется в фармакогнозии *химическая классификация*, предложенная А.П. Ореховым, в основе которой лежат особенности химического строения алкалоидов, в частности, структура азотсодержащего гетероцикла. В основу классификации положено деление на 13 групп в зависимости от строения углеродного скелета. Некоторые группы встречаются редко и поэтому не изучаются.

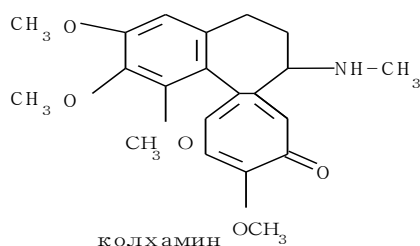
1. Алкалоиды с азотом в боковой цепи. В эту группу входят: капсаицин из красного перца, эфедрин их различных видов эфедры, сферофизин из сферофизы солонцевой, колхицин и колхамин из клубнелуковиц безвременников.



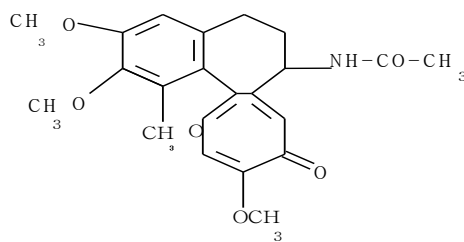
Эфедрин (фенилметиламинопропанол)



капсаицин

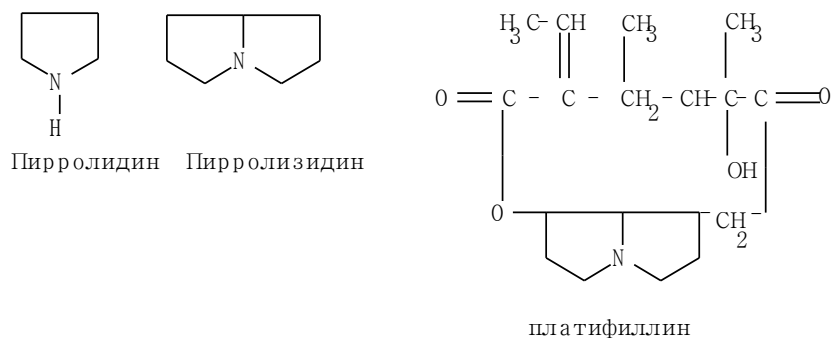


КОЛХАМИН

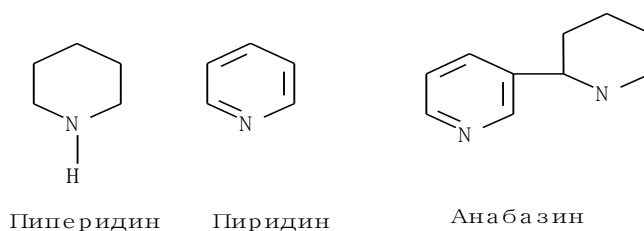


КОЛХИЦИН

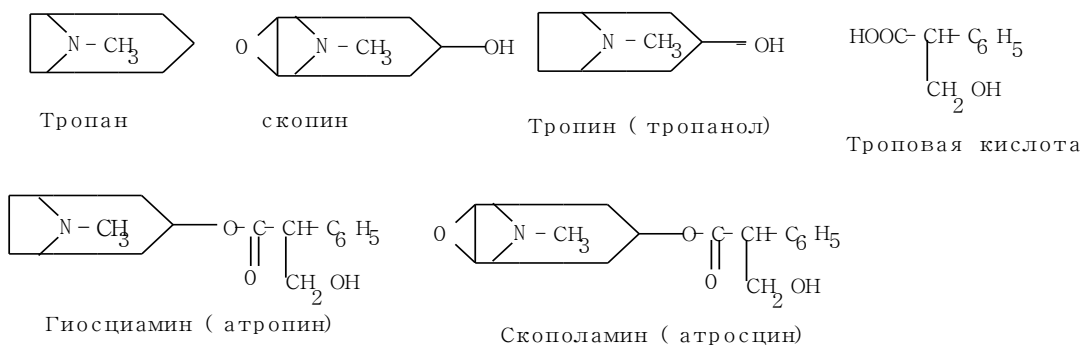
2. Производные пирролидина и пирролизидина (платифиллин, саррацин, сенецифиллин из крестовника плосколистного и ромболистного).



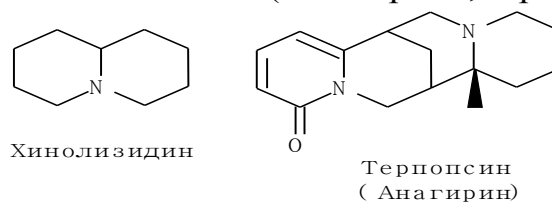
3. Производные пиридина и пиперидина (анабазин, лобелин из анабазиса безлистного и лобелии одутлой)



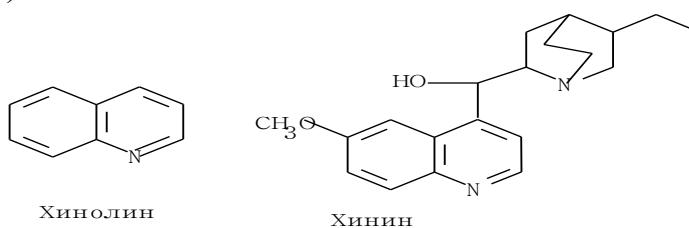
4. Алкалоиды с конденсированными пирролидиновыми и пиперидиновыми кольцами (производные тропана) – гиосциамин, атропин, скополамин.



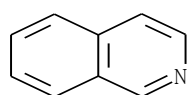
5. Производные хинолизидина (пахикарпин, термопсин).



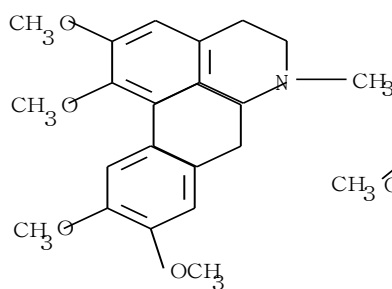
6. Производные хинолина (хинин из хинной коры, эхинопсин из мордовника).



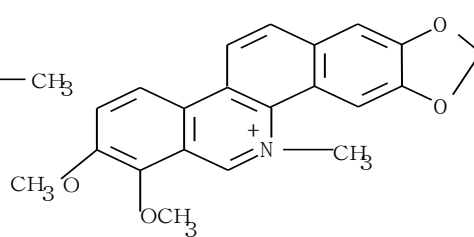
7. Производные изохинолина (сальсолин из солянки Рихтера, берберин, галантамин, хелеретрин, сангвинарин, глауцин и др.).



Изохинолин

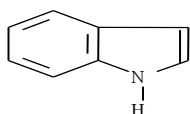


Глауцин

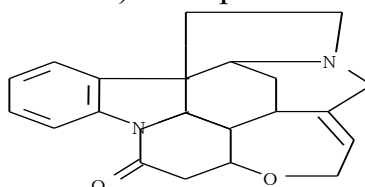


Хелеритрин

8. Производные индола (алкалоиды спорыньи и пассифлоры, резерпин из корня раувольфии, стрихнин из семян чилибухи, секуринин из секуренеги, винканин (барвинкан) из барвинка малого).

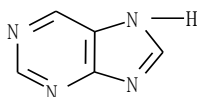


Индол

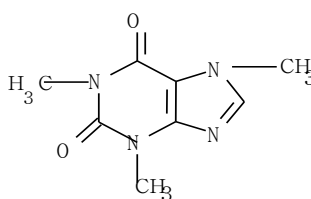


Стрихнин

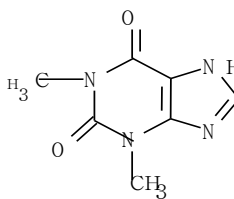
9. Производные пурина: кофеин из листьев чая, зерен кофе, бобов какао.



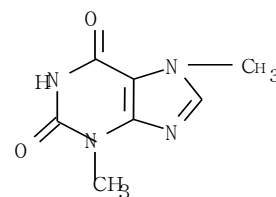
Пурин



Кофеин
(1,3,7-триметилксантин)

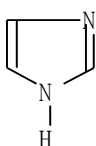


Теofilлин
(1,3-диметилксантин)

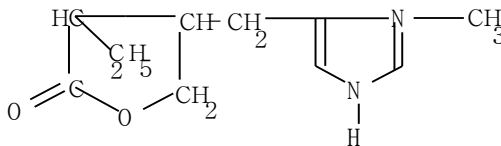


Теобромин
(3,7-диметилксантин)

10. Производные имидазола (эрготионин из спорыньи, пилокарпин из пилокарпуса яборанди).

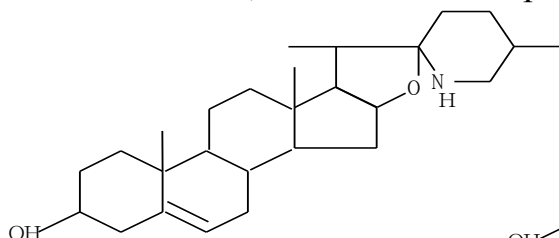


Имидазол

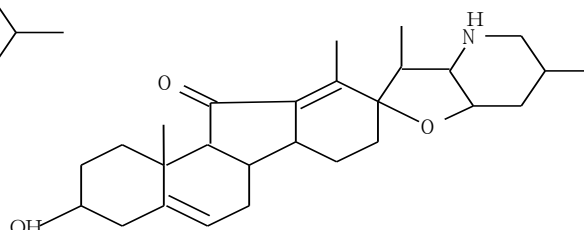


Пилокарпин

11. Стероидные алкалоиды (гликоалкалоиды – соласодин паслена дольчатого, алкалоиды чемерицы и др.).



Соласодин



Йервин

12. Дитерпеновые алкалоиды: алкалоиды аконитов и живокостей.

13. Алкалоиды неустановленного строения.

Физические и химические свойства алкалоидов

Большинство алкалоидов, кроме атомов азота (N), углерода (C) и водорода (H), содержат атом кислорода (O). Некоторые алкалоиды (нуфлеин) содержат в своем составе атом серы (S). Алкалоиды, содержащие кислород, и бескислородные алкалоиды различаются по физическим свойствам.

Кислородсодержащие алкалоиды – твердые кристаллические вещества, реже аморфные, с определенной температурой плавления, без запаха, горького вкуса, как правило, бесцветные, лишь некоторые алкалоиды окрашены – берберин в желтый, сангвинарин в оранжевый цвет. Бескислородные алкалоиды – летучие маслянистые жидкости с сильным неприятным запахом, легко перегоняющиеся с водяным паром. К этой группе относятся анабазин, никотин, конииин, пахикарпин.

Отдельные алкалоиды способны сублимироваться (возгоняться) при нагревании (кофеин, никотин); пары хинина малинового цвета. Обладают оптической активностью, причем у левовращающих изомеров фармакологическая активность, как правило, выше (гиосциамин, эфедрин). Некоторые алкалоиды флуоресцируют в УФ-свете. Например, цитизин флуоресцирует фиолетовым цветом, берберин – желто-зеленым. Основные свойства выражены в различной степени. В природе чаще встречаются алкалоиды, которые относятся к третичным аминам, реже – к вторичным либо к четвертичным аммонийным основаниям. Благодаря основному характеру алкалоиды образуют с кислотами соли разной степени прочности.

Соли алкалоидов хорошо растворимы в воде и этиловом спирте (особенно в разбавленном) при нагревании, плохо или совсем нерастворимы в органических растворителях (хлороформ, этиловый эфир и др.). Как исключения можно назвать хинина сульфат (плохо растворяется в воде) и скополамина гидробромид (растворяется в хлороформе). Соли алкалоидов легко разлагаются под действием щелочей и аммиака. При этом выделяются свободные основания.

Алкалоиды-основания обычно не растворяются в воде, но легко растворимы в органических растворителях. Исключение составляют цитизин, кофеин и кодеин, которые хорошо растворяются как в воде, так и в органических растворителях.

Алкалоиды образуют нерастворимые (или слабо растворимые) комплексы с солями тяжелых металлов, комплексными неорганическими кислотами, высокомолекулярными органическими веществами кислого характера. Алкалоиды вступают в реакции, зависящие от наличия в их молекулах различных функциональных групп. Например, морфин содержит фенольный гидроксил, поэтому образует со щелочами феноляты и вступает в реакцию с солями трехвалентного железа. Некоторые алкалоиды представляют собой сложные эфиры (атропин, скополамин) и подвергаются гидролизу кислотами и щелочами.

Оценка качества сырья, содержащего алкалоиды. Методы анализа

В растительном сырье алкалоиды содержатся в основном в виде солей, реже в виде алкалоидов-оснований.

Наличие алкалоидов в растительном сырье подтверждают качественными реакциями, которые основаны на физических и (или) химических свойствах алкалоидов. Качественная реакция на кору хины (реакция Грахе) основана на физических свойствах: способности возгоняться при нагревании, окраске паров и конденсата.

Большинство качественных реакций основаны на щелочных свойствах алкалоидов, их способности образовывать нерастворимые либо окрашенные комплексы.

Качественные реакции выполняют:

- непосредственно на сырье (если наблюдению результата реакции не мешают пигменты). Такие реакции предусмотрены нормативной документацией (НД) на корни барбариса обыкновенного и клубни с корнями стефании гладкой;
- с извлечением из растительного сырья. Извлечение может быть очищенное от сопутствующих веществ или неочищенное. Алкалоиды извлекаются в виде оснований или в виде солей.

Неочищенное извлечение из сырья, содержащего алкалоиды, получают экстрагированием органическим растворителем при подщелачивании (алкалоиды-основания) либо нагреванием измельченного сырья с разбавленными кислотами (алкалоиды-соли). Согласно НД, неочищенное извлечение, содержащее алкалоиды-основания, для выполнения качественных реакций получают из семян чилибухи; неочищенные извлечения, содержащие алкалоиды-соли, получают из листьев барбариса обыкновенного, склероциев спорыньи, листьев унгернии Виктора, листьев фирмианы простой (стеркулии платановолистной), травы пассифлоры воплощенной.

Мешают проведению реакций на алкалоиды азотсодержащие вещества - амины и их производные. Они дают такие же результаты реакций. Для освобождения от сопутствующих веществ используют прием смены растворителей либо метод распределительной хроматографии.

Прием смены растворителей основан на различной растворимости свободных алкалоидов-оснований и их солей и заключается в следующем:

- 1) алкалоиды-основания экстрагируют из растительного сырья органическим растворителем после подщелачивания;
- 2) полученное извлечение обрабатывают 1-5 %-ной кислотой. Основания алкалоидов образуют с кислотой соответствующие соли, которые растворяются в воде, а основная масса сопутствующих гидрофобных веществ остается в органическом растворителе;
- 3) к водному раствору добавляют щелочь для перевода солей алкалоидов в основания и обрабатывают несмешивающимся с водой органическим растворителем (на последних стадиях очистки чаще всего используют хлороформ). Алкалоиды-основания переходят в органический растворитель, его отделяют; в водной фазе остаются водорастворимые (гидрофильные) сопут-

ствующие вещества;

4) органический растворитель отгоняют. Сухой остаток представляет собой очищенную сумму алкалоидов.

С полученным сухим остатком очищенной суммы алкалоидов могут быть выполнены качественные реакции (на алкалоиды травы барвинка малого).

Другой способ очистки - метод распределительной хроматографии.

Метод хроматографии используют для отделения алкалоидов от сопутствующих веществ и разделения алкалоидов травы крестовника плосколистного и листьев катарантуса розового. Алкалоиды крестовника плосколистного идентифицируют по величине R_f , алкалоиды катарантуса розового - в сравнении с эталонным образцом розевина после проявления хромогенными реактивами.

Различают общие качественные реакции, с помощью которых доказывают присутствие алкалоидов в сырье или в извлечении из сырья, и частные качественные реакции, с помощью которых устанавливают наличие индивидуального алкалоида или определенной группы алкалоидов.

Общие качественные реакции

I. Реакции осаждения основаны на способности алкалоидов к комплексообразованию. Образующиеся комплексы нерастворимы или мало растворимы в воде. Общеалкалоидные осадочные реактивы можно разделить на несколько групп:

1. Йод и его растворы. Образуют с алкалоидами периодиды, плохо растворимые в воде: пары йода используют для открытия алкалоидов на хроматограммах; раствор йода в растворе калия йодида – $K[I_3]$ (реактив Вагнера, реактив Бушарда). С алкалоидами образуют бурые, трудно растворимые в воде осадки.

2. Комплексные йодиды металлов:

- реактив Драгендорфа – раствор висмута основного нитрата и калия йодида с добавлением кислоты уксусной - $K[BiI_4]$ (калия тетраiodовисмутат) - образует оранжевые или красно-бурые нерастворимые осадки. Реакцию с реактивом Драгендорфа, согласно действующей НД, используют для обнаружения (проявления) алкалоидов крестовника плосколистного на хроматограмме в качественном и количественном анализе, алкалоидов травы термопсиса очередноцветкового на хроматограмме в количественном анализе;
- реактив Майера – раствор ртути дихлорида и калия йодида - $K_2[HgI_4]$ (тетрайодомеркурат калия) - образует осадки белого или желтоватого цвета.
- Реакцию с реактивом Майера широко используют для проверки полноты экстракции алкалоидов при их количественном определении в листьях и траве красавки обыкновенной, в листьях белены черной, листьях дурмана обыкновенного, траве эфедры хвощевой, семенах чилибухи.

3. Реактивы комплексных неорганических кислот:

- реактив Бертрана – 1 %-ный водный раствор кислоты кремне-вольфрамовой ($\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - образует белый аморфный осадок. Реакцию с реактивом Бертрана используют для подтверждения наличия алкалоидов в извлечении из листьев барбариса обыкновенного (качественная реакция); для проверки полноты экстракции алкалоидов при их количественном определении в траве крестовника плосколистного и траве чистотела, листьях и корнях барбариса обыкновенного, семенах дурмана индейского;
- реактив Шейблера – 1 %-ный водный раствор кислоты фосфорно-вольфрамовой ($\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - образует белые аморфные осадки;
- реактив Зонненштейна – 1 %-ный водный раствор кислоты фосфорно-молибденовой ($\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - образует желтоватые аморфные осадки.

Все эти реактивы высокочувствительны и часто используются в научно-исследовательских работах.

4. Органические соединения кислотного характера:

- раствор кислоты пикриновой - образует осадки желтого цвета. Реакцию используют для осаждения алкалоида скополамина при его гравиметрическом определении в семенах дурмана индейского;
- раствор таннина - образует беловатые или бурые осадки. Таннин используют в качестве противоядия при отравлении алкалоидами.

II. Реакции окрашивания (частные реакции) основаны на окислении, конденсации, дегидратации алкалоидов концентрированными кислотами и другими окислителями. Используют:

- концентрированную кислоту серную - качественная реакция на корни барбариса обыкновенного (берберин) (оранжево-красное окрашивание);
- концентрированную кислоту азотную - качественная реакция на корни барбариса обыкновенного (берберин) (красно-бурое окрашивание);
- раствор пероксида водорода - качественная реакция на корни барбариса обыкновенного (берберин) (фиолетовое окрашивание);
- раствор калия бихромата и концентрированную кислоту серную - качественная реакция на семена чилибухи (стрихнин) (красно-фиолетовое окрашивание);
- раствор калия бихромата и концентрированную кислоту азотную - качественная реакция на семена чилибухи (бруцин) (оранжево-красное окрашивание).

В анализе могут быть использованы:

- реактив Эрсмана - смесь концентрированных кислот серной и азотной;

- реактив Марки - раствор формалина в концентрированной кислоте серной;
- реактив Фреде - раствор аммония молибдата в концентрированной кислоте серной.

Окраска в зависимости от структуры алкалоидов различна.

Для некоторых алкалоидов существуют **групповые качественные реакции**, такие как мурексидная проба (на пуриновые алкалоиды), реакция Витали-Морена (на тропановые алкалоиды) и другие, которые подробно рассматриваются в курсе фармацевтической химии.

III. **Частные реакции основаны** также на специфических свойствах алкалоидов и наличии в их структуре функциональных групп. Например, реакция на алкалоиды спорыньи - алкалоиды переводят в соли кислоты винной и добавляют реактив Ван-Урка (концентрированная кислота серная + железа (III) хлорид + пара-диметиламинобензальдегид) - появляется фиолетовое окрашивание. Эту реакцию используют для подтверждения подлинности сырья, а также в методе количественного определения алкалоидов.

Таким образом, общей специфической качественной реакции на алкалоиды не существует. Если проводят поиск алкалоидсодержащих растений, то всегда выполняют 5-10 реакций с общеалкалоидными реактивами, т.к. чувствительность реакций различна. Обычно эти реакции выполняют капельным образом на стеклянных пластинках.

Количественное определение алкалоидов проводят для всех видов сырья, кроме травы пассифлоры воплощенной (определяют экстрактивные вещества) и листьев фирмианы простой (стеркулии платанолистной) (определяют сумму азотистых оснований в пересчете на холина хлорид).

Единой методики количественного определения содержания алкалоидов в растительном сырье не существует, т.к. их химическая структура, физические и химические свойства различны.

Разработаны индивидуальные методики определения содержания алкалоидов или групповые методики (определение тропановых алкалоидов).

Все методики количественного определения алкалоидов в растительном сырье многоэтапные. Относительная точность их невелика, ошибка составляет 10 % и более.

В ходе анализа обычно выделяют следующие этапы (стадии):
I. Извлечение суммы алкалоидов из сырья.

Алкалоиды извлекают в виде солей или в виде оснований.

В первом случае сырье обрабатывают слабыми растворами органических или минеральных кислот, соли которых хорошо растворимы в воде или спирте. Используют винную, лимонную, уксусную, серную, соляную и другие кислоты. В извлечение попадают углеводы, белки и другие сопутствующие вещества.

Во втором случае сырье смачивают концентрированным раствором аммиака. Щелочи не используют, т.к. они образуют феноляты, вызывают гидролиз, изомеризацию алкалоидов. Раствор аммиака вытесняет алкалоиды-

основания из солей. Алкалоиды-основания извлекают органическим растворителем (эфиром, хлороформом, бензолом и др.). В извлечение попадают воски, смолы, каротиноиды, фенольные соединения.

Извлечение проводят многократно новыми порциями до полного истощения сырья. Полученные порции объединяют.

II. Очистка извлечения от балластных веществ. Обычно проводят путем двукратной или трехкратной смены растворителя. Реже используют ионообменную или адсорбционную хроматографию.

III. Разделение суммы алкалоидов и выделение индивидуальных алкалоидов.

Выполняют в тех случаях, когда оценку качества сырья проводят не по всей сумме алкалоидов, а по содержанию алкалоида, определяющего основное фармакологическое действие сырья. Разделение основано на различных физико-химических свойствах алкалоидов, извлеченных из сырья: на способности перегоняться с водяным паром. Например, пахикарпин из суммы алкалоидов травы софоры толстоплодной отделяют путем отгонки его с водяным паром; на различной растворимости алкалоидов в органических растворителях. Например, колхамин из суммы алкалоидов клубнелуковиц безвременника отделяют, используя его плохую растворимость в ацетоне; на различной растворимости полученных комплексов с общеалкалоидными реактивами, т.е. используют реакции осаждения. Например, скополамин из суммы алкалоидов семян дурмана индийского отделяют, осаждая его в виде солей кислоты пикриновой (пикрата); на различной адсорбции и десорбции хроматографируемых веществ. Например, колхамин отделяют хроматографическим разделением суммы алкалоидов клубнелуковиц безвременника, капсаициноиды плодов стручкового перца отделяют хроматографически.

IV. Собственно количественное определение проводят различными методами:

1. Гравиметрический (весовой) метод. Алкалоиды переводят в весовую форму, осадок отделяют, высушивают, взвешивают. Этим методом определяют алкалоиды листьев барбариса обыкновенного, травы гармалы обыкновенной, травы баранца обыкновенного, клубнелуковиц безвременника, семян и плодов дурмана индийского;

2. Титриметрические методы:

а) ацидиметрическое прямое или обратное титрование (алкалоиды листьев белены, листьев дурмана обыкновенного, листьев и травы красавки, травы термопсиса ланцетного, травы эфедры хвощевой, побегов анабазиса, семян чилибухи);

б) титрование в неводных средах:

точку эквивалентности определяют, используя индикатор (алкалоиды травы барвинка малого);

в) потенциометрическое титрование (алкалоиды травы чистотела);

3. Физико-химические (инструментальные) методы:

а) фотоэлектроколориметрический метод (алкалоиды листьев катарантуса розового, листьев унгернии Виктора, травы крестовника плосколистного, травы мачка желтого, травы софоры толстоплодной, травы паслена дольчатого);

го, клубней с корнями стефании гладкой, склероциев спорыньи);
б) спектрофотометрический метод (алкалоиды корней барбариса обыкновенного, травы маклейи, травы термопсиса очередноцветкового, плодов стручкового перца);
в) полярографический метод (алкалоиды семян термопсиса ланцетного, корневищ кубышки желтой).

Так, например, количественное определение алкалоидов группы тропана в листьях красавки, белены, дурмана Государственная Фармакопея XI (вып. 2, ст. 13, 17, 24) предлагает проводить ацидиметрическим методом (вариант обратного титрования). При этом предварительно алкалоиды переводят в форму оснований, извлекают их из сырья эфиром, проводят очистку методом двукратной смены растворителей, удаляют экстрагент и растворяют сухой остаток суммы оснований алкалоидов в кислоте хлористоводородной, избыток которой титруют натрием гидроксидом.

Подобное определение рекомендовано и для травы термопсиса ланцетного (ГФ XI, вып. 2, ст. 59).

Оценку количественного содержания алкалоидов в семенах чилибухи (ГФ X, ст. 606) проводят ацидиметрическим методом (прямое титрование). При этом предварительно алкалоиды переводят в форму оснований, извлекают их из сырья хлороформом, проводят очистку путем двукратной смены растворителя, удаляют экстрагент, растворяют сухой остаток суммы оснований алкалоидов в этаноле и титруют кислотой хлористоводородной.

Количественное определение алкалоидов в сырье спорыньи проводят фотоэлектроколориметрическим методом (ГФ X, ст. 599). Метод основан на измерении степени поглощения монохроматического света устойчивым окрашенным комплексом алкалоидов спорыньи с реактивом Ван-Урка с помощью фотоэлектроколориметра при зеленом светофильтре. При этом склероции спорыньи обезжиривают петролейным эфиром, сумму алкалоидов-оснований извлекают из сырья эфиром, очищают алкалоиды путем смены растворителя (переводят сумму алкалоидов в соли кислоты винной, удаляют эфир), проводят реакцию образования комплекса алкалоидов-солей с реактивом Ван-Урка и определяют оптическую плотность окрашенного раствора.

Медицинское применение сырья и препаратов, содержащих алкалоиды

Алкалоиды обладают широким спектром фармакологического действия. В настоящее время в современной медицине с различной целью используются около 80 алкалоидов. Алкалоидоносное растительное сырье и получаемые из него лекарственные формы и препараты классифицируют либо по месту проявления фармакологического эффекта, либо по механизму действия:

I. Средства, действующие преимущественно на центральную нервную систему.

1. Седативные средства (оказывают успокаивающее и противосудорожное действие):

- препараты пассифлоры (жидкий экстракт, «Ново-Пассит»);

- гиндарины гидрохлорид (клубни с корнями стефании гладкой).

2. Средства, стимулирующие центральную нервную систему.

а) Психомоторные стимуляторы (оказывают стимулирующее влияние на функции головного мозга, активизируют психическую и физическую деятельность организма):

- кофеин (листья чая, семена кофе, семена кола).

б) Аналептические средства (возбуждают сосудодвигательный и дыхательный центры продолговатого мозга). Показания: препараты скорой помощи при остановке дыхания:

- «Цититон» (0,15 % раствор алкалоида цитизина (семена термопсиса ланцетного, трава термопсиса очередноцветкового));
- лобелина гидрохлорид (трава лобелии вздутой);
- анабазина гидрохлорид (побеги анабазиса безлистного).

Входят в состав препаратов, облегчающих отвыкание от курения: «Табекс» (цитизин), «Лобесил» (лобелина гидрохлорид), «Гамибазин» (анабазина гидрохлорид).

в) Стимуляторы функций спинного мозга (возбуждают сосудодвигательный и дыхательный центры, тонизируют скелетную мускулатуру и мышцу сердца). Показания: парезы, параличи, атония желудка, поражение спинного мозга. В токсических дозах – судорожные яды:

- стрихнина нитрат (семена чилибухи);
- секуринина нитрат (побеги секуринеги).

3. Анальгезирующие средства (наркотические анальгетики):

- морфина гидрохлорид, «Морфилонг», «Омнопон» (мак снотворный).

4. Наркотические противокашлевые средства (уменьшают возбудимость кашлевого центра):

- кодеин, кодеина фосфат (мак снотворный).

5. Ненаркотические противокашлевые средства:

- глауцина гидрохлорид, «Бронхолитин» (трава мачка желтого).

II. Средства, действующие преимущественно на периферические нейромедиаторные процессы.

1. Средства, действующие на периферические холинергические процессы.

а) Холиномиметики (возбуждают периферические М-холинорецепторы, вызывают усиление секреции пищеварительных и бронхиальных желез, сужение зрачка с одновременным уменьшением внутриглазного давления и улучшением трофики тканей глаза, повышение тонуса гладких мышц бронхов, кишечника, желчного и мочевого пузырей, матки). Показания: пилокарпина гидрохлорид применяют в офтальмологии:

- пилокарпина гидрохлорид (листья пилокарпуса (яборанди)).

б) Ингибиторы холинэстеразы (антихолинэстеразные средства) (активируют процесс синаптической передачи в холинергических нервных окончаниях, облегчают проведение нервных импульсов в центральную нервную систему, усиливают процессы возбуждения, вызывают повышение тонуса гладких мышц, сужение зрачка с одновременным уменьшением внутриглазного дав-

ления и улучшением трофики тканей глаза). Показания: парезы, параличи, миастения, миопатия, глаукома:

- галантамина гидробромид (листья унгернии Виктора, луковицы подснежника Воронова);
- стефаглабрина сульфат (клубни с корнями стефании гладкой);
- дезоксипеганина гидрохлорид (трава гармалы обыкновенной);
- «Сангвиритрин» (трава маклейи);
- физостигмина салицилат (семена физостигмы (калабарские бобы)).

в) Антихолинергические средства (М-холиноблокаторы) (блокируют преимущественно периферические холинергические синапсы, понижают тонус гладкой мускулатуры бронхов, органов брюшной полости, уменьшают секрецию слюнных, потовых желез). Показания: в офтальмологии для расширения зрачка, при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и других заболеваниях для снятия спазмов и уменьшения боли:

- атропина сульфат, настойка и экстракты красавки;
- сбор противоастматический: листья красавки, белены, дурмана обыкновенного;
- скополамина гидробромид (плоды и семена дурмана индийского);
- «Аэрон» (скополамина камфорат и гиосциамина камфорат) (для профилактики и лечения морской и воздушной болезней как противорвотное, успокаивающее средство);
- платифиллина гидротартрат (трава крестовника плосколистного).

г) Ганглиоблокирующие средства (повышают тонус и сократительную способность матки, улучшают функцию мышц при миопатии, эндартериите):

- пахикарпина гидройодид (трава софоры толстоплодной).

2. Средства, действующие на периферические адренергические процессы.

а) Адреномиметики (вызывают сужение сосудов, повышение артериального давления, расширение бронхов, торможение перистальтики кишечника, расширение зрачка). Показания: диагностические цели, лечение аллергических заболеваний:

- эфедрина гидрохлорид (побеги эфедры хвощевой).

б) *Альфа*-адреноблокаторы. Показания: лечение нарушений периферического и мозгового кровообращения, лечение и профилактика мигрени, гипертонической болезни и др.:

- дигидроэрготамин, дигидроэрготоксин (склероции спорыньи).

III. Средства, действующие преимущественно в области чувствительных (афферентных) нервных окончаний.

1. Средства, стимулирующие рецепторы слизистых оболочек, кожи и подкожных тканей. Показания: раздражающие, отвлекающие, согревающие средства при невралгиях, радикулитах, миозитах, люмбаго и др.:

- препараты плодов перца стручкового: настойка, мазь от обморожения, «Капситрин», перцово-камфорный и перцово-аммиачный

линименты, пластырь перцовый, мази «Эспол», «Эфкамон», крем «Никофлекс», линименты «Камфоцин», «Капсин» и др.

2. Отхаркивающие средства (стимулируют секреторную функцию бронхиальных желез):

- препараты травы термопсиса ланцетного: настой (1:400; 1:200), экстракт сухой (входит в состав комбинированных препаратов: таблетки от кашля, «Коделак», сухая микстура от кашля для взрослых);
- ликорина гидрохлорид (листья унгернии Северцова).

IV. Средства, действующие на сердечно-сосудистую систему.

1. Антиаритмические средства:

- хинидина сульфат (кора хинного дерева);
- «Аймалин» (алкалоид корней раувольфии змеиной).

2. Средства, улучшающие кровоснабжение органов и тканей.

а) Средства, улучшающие мозговое кровообращение (сосудорасширяющее, гипотензивное и седативное действие). Показания: нарушения мозгового кровообращения:

- «Винканор» (сумма алкалоидов барвинка малого);
- «Кавинтон» («Винпоцетин») (полусинтетический препарат на основе алкалоида травы барвинка малого винкамина).

б) Спазмолитические средства (расслабляют гладкие мышцы внутренних органов, кровеносных сосудов, бронхов):

- платифиллина гидротартрат (трава крестовника плосколистного);
- папаверина гидрохлорид (мак снотворный);
- теобромин (семена какао);
- теофиллин (листья чая и семена кофе).

3. Гипотензивные средства:

- резерпин (алкалоид корней раувольфии змеиной);
- «Раунатин» (сумма алкалоидов корней раувольфии змеиной);
- папаверина гидрохлорид (мак снотворный);
- «Винканор» (сумма алкалоидов барвинка малого).

V. Желчегонные средства:

- берберина бисульфат (корни барбариса обыкновенного);
- настойка листьев барбариса обыкновенного;
- 2,5 %-ный настой травы чистотела.

VI. Стимулирующие мускулатуру матки. Показания: атония матки, маточные кровотечения:

- эргометрина малеат, эрготамина тартрат, «Эрготал» (склерозии спорыньи);
- настойка листьев барбариса обыкновенного.

VII. Противомикробные, противовирусные и противопаразитарные средства.

1. Антипротозойные (противомалярийные) средства:

- хинина гидрохлорид, хинина дигидрохлорид, хинина сульфат (кора хинного дерева).
2. Антимикробные средства. Показания: незаживающие раны, язвы, пародонтоз и др.:
- «Сангвиритрин» (трава маклейи).
3. Протистоцидные средства. Показания: трихомонадные заболевания, местное контрацептивное действие:
- «Лютенурин» (сумма алкалоидов корневищ кубышки желтой).
4. Инсектицидные (противопаразитарные) средства:
- настойка чемерицы, чемеричная вода (корневища с корнями чемерицы Лобеля);
 - анабазина сульфат (побеги анабазиса безлистного).
- VIII. Противоопухолевые (цитостатические) средства (средства для лечения онкологических заболеваний):
- «Винкристин», «Розевин» («Винбластин») (листья катарантуса розового);
 - «Колхамин», «Колхицин» (клубнелуковицы безвременника великолепного);
 - «Мазь колхаминовая» (клубнелуковицы безвременника великолепного).
- IX. Средства для лечения алкоголизма:
- 5 %-ный отвар травы баранца обыкновенного.

Работа №1 Проведите качественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего алкалоиды

1. Выделите алкалоиды в форме солей из образца ЛРС

Методика. 1,0 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в колбу со шлифом, заливают 25 мл 1%-ного раствора кислоты хлороводородной и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически помешивая. Охлажденное извлечение фильтруют и используют для проведения качественных реакций.

2. Проведите общие осадочные реакции на алкалоиды.

Методика. К 1 мл полученного фильтрата прибавляют 2-3 капли реактива. При наличии алкалоидов сразу или через некоторое время образуется осадок или помутнение. Проводят следующие реакции:

- Опыт 1.** С реактивом Вагнера-Бушарда (раствор йода в растворе калия йодида).
- Опыт 2.** С реактивом Майера (смесь растворов ртути дихлорида и калия йодида)
- Опыт 3.** С реактивом Драгендорфа (раствор нитрата висмута основной, калия йодида и кислоты уксусной).

Опыт 4. С реактивом Шейблера (1%-ный водный раствор кислоты фосфорно-вольфрамовой).

Опыт 5. С реактивом Бертрана (1%-ный водный раствор кислоты кремне-вольфрамовой).

Опыт 6. С реактивом Зонненштейна (1%-ный водный раствор фосфорно-молибденовой

Опыт 7. С 1%-ным водным раствором кислоты пикриновой.

Опыт 8. С 0,1%-ным водным раствором танина.

Опыт 9. С кислотой серной концентрированной.

Опыт 10. С кислотой азотной концентрированной.

Опыт 11. С реактивом Эрдмана (смесь концентрированных серной и азотной кислот).

Опыт 12. С реактивом Фреде (раствор аммония молибдата в кислоте серной концентрированной).

Опыт 13. С реактивом Марки (раствор формальдегида в кислоте серной концентрированной).

Опыт 14. С реактивом Манделина (раствор аммония ванадата в кислоте серной концентрированной).

Опыт 15. С 1%-ным водным раствором натрия нитропрусида.

Запишите наблюдения в тетрадь для практических работ в виде табл. и по совокупности результатов сделайте заключение о присутствии алкалоидов в сырье.

Таблица 1

Результаты изучения ЛРС на содержание алкалоидов

Лекар- ственное расти- тельное сырье	Реактивы													
	Осадительные							Специальные						
	Драгендорфа K[BiI ₄]	Бушарда-Вагнера K[J ₃]	Зоненштейна H ₃ PO ₄ *12MoO ₃ *2H ₂ O	Бертрана SiO ₂ *12WO ₃ *2H ₂ O	раствор танина	кислота пикриновая	Майера K ₂ [HgI ₄]	Шейблера H ₃ PO ₄ *12WO ₃ *2H ₂ O	конц H ₂ SO ₄	конц. HNO ₃	Натрия нитропруссидNa ₂ [Fe(CN s) NO]*2H ₂ O	Эрдмана конц H ₂ SO ₄ +конц. HNO ₃	Фреде (NH ₄) ₂ MoO ₄ +конц. H ₂ SO ₄	Марки
1														
2														
3														
4														

Работа №2. Проведите хроматографический анализ ЛРС содержащего тропановые алкалоиды

Проведите хроматографический анализ листьев красавки.

Методика. Исследуемый раствор. К 0,6 г измельченного растительного сырья (листья красавки, листья белены, листья дурмана) в пробирке добавляют 15 мл кислоты серной (0,05 моль/л), тщательно взбалтывают в течение 15 мин и фильтруют. Промывают фильтр кислотой серной (0,05 моль/л) до получения 20 мл фильтрата. К полученному фильтрату добавляют 1 мл концентрированного раствора аммиака и из смеси основания алкалоидов в делительной воронке извлекают эфиром двумя порциями по 10 мл. Объединенные эфирные извлечения обезвоживают, пропуская через фильтровальную воронку с помещенным в её устье безводным натрия сульфатом. Эфир из извлечения отгоняют на водяной бане в вытяжном шкафу досуха, а полученный остаток растворяют в 0,5 мл спирта.

Приготовление раствора сравнения. Растворяют 50 мг гиосциамина сульфата в 9 мл спирта. Растворяют 15 мг скополамина гидробромида в 10 мл спирта. Смешивают растворы в соотношении 8:1,8.

На пластинку для ТСХ наносят по 20 мкл на линию старта исследуемого и сравниваемого раствора на расстоянии по 1 см друг от друга. Пластинку помещают в камеру с системой ацетон—вода—концентрированный раствор аммиака (90:7:3). После прохождения фронта подвижной фазы на 10 см пластинку вынимают из хроматографической камеры, высушивают при 100—105°C в течение 15 мин, затем охлаждают и обрабатывают реактивом Драгендорфа. Алкалоиды на пластинке проявляются в виде оранжевых или коричневых пятен на общем желтом фоне.

Зарисуйте схему хроматограммы и рассчитайте величину R_f алкалоидов в экстракте в сравнении с достоверными образцами свидетелей.

Работа №3. Проведите количественное определение алкалоидов в лекарственном растительном сырье

Проведите количественное определение тропановых алкалоидов в листьях красавки.

Методика. Экстракция. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья поместите в колбу вместимостью 250 мл, прилейте 150 мл эфира, 7 мл раствора аммиака и взболтайте смесь в течение 1 часа. Эфирное извлечение быстро профильтруйте через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом.

Очистка. К фильтрату прилейте 5 мл воды, энергично взболтайте и оставьте до просветления эфирного слоя, после чего отмерьте с помощью мерного цилиндра 90 мл эфирного извлечения в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополоснуть эфиром порциями по 10 мл, которые присоединить к отмеренному эфирному извлечению. Из эфирного извлечения алкалоиды максимально извлечь 1 % раствором хлороводородной кислоты порциями по 20, 15 и 10 мл (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку такой же вместимости. Фильтр промыть дважды 1 % раствором хлористоводородной кислоты по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению;

К кислотному извлечению добавить концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлечь последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Профильтровать хлороформные извлечения в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно поместить 4-5 г безводного свежепрокаленного натрия сульфата, смоченного хлороформом. Фильтр дважды промыть хлороформом по 5 мл. Хлороформ отогнать на водяной бане до объема: 1-2 мл, остаток хлороформа в колбе удалить продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя.

Титрование. Сухой остаток растворить в 15 мл раствора хлороводородной кислоты (0,02 моль/л) при подогревании на водяной бане, прибавить 2 капли спиртового раствора метилового красного и 1 каплю спиртового раствора метиленового синего. Избыток хлороводородной кислоты оттитровывать раствором гидроксида натрия (0,02 моль/л) до появления зеленой окраски.

Расчет. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \times 0,005780 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)},$$

где 0,005780 - количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл раствора хлороводородной кислоты (0,02 моль/л), в граммах;

V - объем раствора гидроксида натрия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование, в миллилитрах;

m - масса сырья в граммах, соответствующая отмеренному объему эфирного извлечения;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Сделайте заключение о соответствии исследуемого сырья требованиям ГФ XI.

Вопросы к зачету по дисциплине «Химия природных фармакологически активных веществ» для студентов 3 курса фармацевтического факультета

1. Химический состав лекарственных растений. Фармацевтическое понятие о действующих, сопутствующих и балластных веществах.
2. Связь химического состава лекарственного растительного сырья с фармакологическим действием.
3. Понятие о полисахаридах, их классификация. Физические и химические свойства. Распространение в растениях. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
4. Понятия о жирах, их классификация. Физические и химические свойства. Способы получения и очистки. Оценка качества жиров, методы анализа. Медицинское применение.
5. Понятие о витаминах, их классификация. Физические и химические свойства. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
6. Понятие об терпенах, их классификация. Закономерности образования (биосинтез),
7. Понятие об эфирных маслах. Классификация эфирных масел и лекарственного растительного сырья. Способы получения эфирных масел. Пути использования сырья, медицинское применение.
8. Закономерности образования, накопления, распространение в растениях эфирных масел. Физические и химические свойства эфирных масел. Определение подлинности, чистоты и доброкачественности эфирных масел. Фармакопейные методы количественного определения эфирных масел в лекарственном растительном сырье.
9. Понятие о гликозидах, их классификация, физические и химические свойства. Понятия о горечах, их классификация. Физические и химические свойства. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
10. Понятие о сапонилах, их классификация. Особенности структуры агликона и сахарного компонента. Пути использования сырья, медицинское применение.
11. Физические, химические и биологические свойства сапонинов. Оценка качества сырья, методы анализа.
12. Понятие о сердечных гликозидах, их классификация. Особенности структуры агликона и сахарного компонента. Физические и химические свойства. Пути использования сырья, медицинское применение.
13. Физические и химические свойства сердечных гликозидов. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
14. Понятия о простых фенольных соединениях (гликозидах), их классификация. Физические и химические свойства. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение

15. Понятие о кумаринах и хромонах, их классификация. Физические и химические свойства. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
16. Понятие о дубильных веществах, их классификация. Закономерности образования (биосинтез), локализации и распространения в растениях. Пути использования сырья, медицинское применение.
17. Физические и химические свойства дубильных веществ. Оценка качества сырья, методы анализа.
18. Понятия о флавоноидах, их классификация. Физические и химические свойства. Закономерности образования (биосинтез), локализация и распространения в растениях. Оценка качества сырья, методы анализа. Пути использования сырья, медицинское применение.
19. Понятие об алкалоидах, их классификация. Закономерности образования (биосинтез) и распространение в растениях. Пути использования сырья, медицинское применение.
20. Физические и химические свойства алкалоидов. Оценка качества сырья, методы анализа.

Примеры тестовых заданий и ситуационных задач

1. Ситуационные задачи

Задача 1

Фармацевтическое предприятие приобрело растительное сырье «**листья мать-и-мачехи**». Контрольно-аналитическая лаборатория проверила его доброкачественность.

Опишите результаты анализа, используя следующий план:

1. Запишите латинские и русские названия сырья, производящего растения и семейства.
2. Дайте определение понятию «полисахариды».
3. Как можно доказать присутствие в сырье полисахаридов? Назовите реакции, укажите результат.
4. Какой метод можно использовать для количественного определения полисахаридов в сырье? Составьте схему возможной методики, объясняя каждый этап определения.

Задача 2

Фармацевтическое предприятие приобрело сырье «**трава тысячелистника**», контрольно-аналитическая лаборатория предприятия провела анализ сырья с целью проверки его доброкачественности.

Опишите результаты анализа, используя следующий план:

1. Дайте определение понятию «эфирные масла».
2. Укажите химический состав травы тысячелистника. Запишите формулу основного соединения. К какой группе по классификации оно относится?
3. Где локализуется эфирное масло в сырье тысячелистника? Какой реакцией это можно доказать?
4. Какой метод количественного анализа используется НД для определения содержания эфирного масла в сырье? На чем он основан? Опишите методику 3, зарисуйте прибор. Запишите, на каких свойствах эфирных масел основана эта методика.
5. Укажите фармакологическую группу, к которой относится сырье, пути использования сырья, получаемые препараты.

Задача 3

На фармацевтическое предприятие для производства **сока желтушника** поступила **свежая трава желтушника**. Контрольно-аналитическая лаборатория после проведения анализа подтвердила его доброкачественность. Опишите результаты анализа.

При ответе используйте следующий план:

1. Запишите латинские и русские названия сырья, производящего растения и семейства.
2. Опишите внешние признаки сырья (в виде таблицы).
3. Запишите химический состав травы желтушника. Запишите формулу основного сердечного гликозида. К какой группе по классификации оно относится?
4. Дайте определение понятию «сердечные гликозиды».
5. Перечислите числовые показатели, характеризующие качество сырья. Укажите их предельное значение.
6. Какой метод используется для стандартизации сырья? На чем он основан? Дайте определение основным понятиям метода («валор», ЛЕД). Что используется в качестве стандарта при анализе травы желтушника?
7. Укажите фармакологическую группу, к которой относится сырье, пути использования сырья, получаемые препараты.

Задача 4

На фармацевтическое предприятие поступила **трава маклеи**. Контрольно-аналитическая лаборатория проверила подлинность и доброкачественность поступившего сырья.

Опишите результаты анализа, используя следующий план:

1. Запишите латинские и русские названия сырья, производящего растения и семейства.
2. Запишите химический состав травы маклеи. Запишите формулу хелеритрина. К какой группе по классификации А.П.Орехова относится данное соединение?
3. С помощью каких качественных реакций можно доказать присутствие в сырье алкалоидов? Приведите названия реактивов, их состав и результаты реакций.
4. Перечислите числовые показатели, характеризующие качество сырья (в виде таблицы). Укажите регламентацию для каждого показателя.
5. Какой метод используется для стандартизации сырья? Укажите свойства метода и составьте схему методики (в виде таблицы), объясняя каждый этап определения.
7. Запишите возможные пути использования сырья, применение и препараты.

Задача 5

Для производства лекарственных средств фармацевтическое предприятие приобрело сырье «**цветки василька**» и проверило его доброкачественность.

Опишите результаты анализа, пользуясь следующим планом:

1. Запишите латинские и русские названия сырья, производящего растения и семейства.
2. Запишите химический состав цветков василька, формулу основного соединения и укажите группу по классификации, к которой оно относится.
3. Дайте определение понятию «флавоноиды».

4. Какими реакциями можно доказать присутствие в сырье флавоноидов? Запишите химизм реакций на примере кверцетина.
5. Перечислите числовые показатели сырья «цветки василька», укажите их регламентацию (не менее..., не более...).
6. Запишите (в виде таблицы) методику количественного определения в сырье антоцианов, объясняя каждый ее этап. Укажите, на каких свойствах она основана.
7. Укажите фармакологическую группу, к которой относится сырье, пути использования сырья, получаемые препараты.

Задача 6

Для производства лекарственных средств фармацевтическое предприятие приобрело сырье «**корневища и корни кровохлебки**» и проверило его доброкачественность.

Опишите результаты анализа, пользуясь следующим планом:

1. Запишите латинское и русское названия сырья, производящего растения и семейства
2. Запишите химический состав сырья кровохлебки. Какая группа дубильных веществ (по классификации) преобладает в сырье?
3. Дайте определение понятию «дубильные вещества».
4. Как по НД доказывается присутствие в сырье дубильных веществ? Какие еще (кроме фармакопейной) реакции можно провести? Укажите результат реакций.
5. Перечислите числовые показатели сырья «корневища и корни кровохлебки», укажите их регламентацию (не менее..., не более...).
6. Запишите (в виде таблицы) метод количественного определения в сырье дубильных веществ, объясняя каждый этап. Укажите свойства метода и запишите химизм реакции индикатора с титрантом.
7. Укажите фармакологическую группу, к которой относится сырье, пути использования сырья, получаемые препараты.

2. Тестовые задания

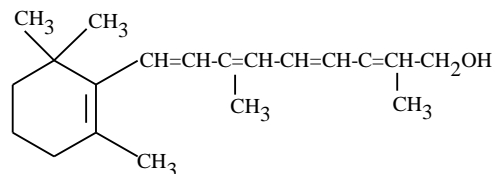
1. *Лекарственное растительное сырье* – это...
 - А. растение, содержащее БАВ, действующие на организм человека и животного, применяемого с лечебной целью.
 - Б. продукты растительного происхождения, применяемые с лечебной целью и разрешенные для использования в установленном порядке.
 - В. высушенные части растений, используемые для приготовления настоев и отваров
 - Г. высушенные и измельченные части лекарственных растений, упакованные в потребительскую упаковку.
 - Д. цельные лекарственные растения или их части, используемые в высушенном или свежем виде, в качестве лекарственного средства или для получения лекарственного вещества и препаратов, и разрешенные для использования в установленном порядке
2. Количественное определение аскорбиновой кислоты (витамина С) в растительном сырье проводят...
 - А. титрометрически
 - Б. гравиметрически
 - В. спектрофотометрически
 - Г. перегонкой с водяным паром
 - Д. методом биологической стандартизации

3. Для проведения анализа используют хроматографические пластинки «Silufol», подвижная фаза – этилацетат-ледяная уксусная кислота (8:2), детектор – 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия. После обработки хроматограммы наблюдаются белые пятна на розовом фоне. Это описание хроматографического анализа присутствия в растительном сырье...

- А. аскорбиновой кислоты
- Б. витамина К
- В. каротиноидов

4. На рисунке изображена формула

- А. аскорбиновой кислоты
- Б. каротина
- В. филлохинона
- Г. ретинол
- Д. токоферола



5. Полисахариды растительного сырья извлекают...

- А. спиртом этиловым
- Б. водой
- В. кислотой
- Г. хлороформом
- Д. петролейным эфиром

6. В анализе полисахаридов используют цветную реакцию с ...

- А. 10% H_2SO_4
- Б. карбазолом
- В. ацетатом свинца
- Г. фосфорно-молибденовой кислотой
- Д. тимолом

8. Ментол согласно химической классификации относится к группе...

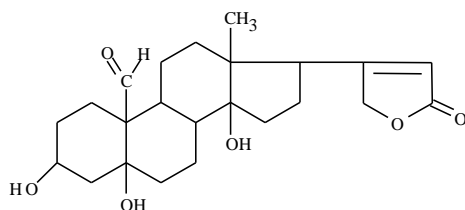
- А. бициклических сесквитерпенов
- Б. моноциклических сесквитерпенов
- В. бициклических монотерпенов
- Г. моноциклических монотерпенов
- Д. ароматических соединений

9. Содержание в растительном сырье эфирного масла, которое легче воды и термостабильно, согласно ГФ Х1 определяют...

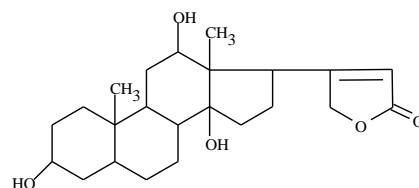
- А. только методом 1
- Б. только методом 2
- В. методом 1 или 2
- Г. методом 3

10. Соединение, относящееся к сердечным гликозидам подгруппы наперстянки, изображено на рисунке...

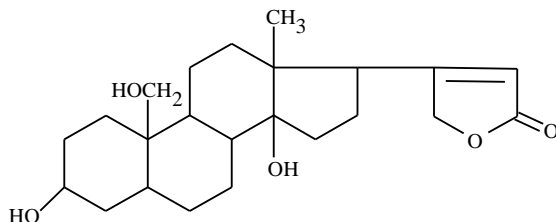
А.



Б.



В.



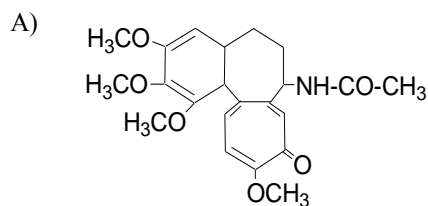
11. Кумарины на хроматограмме обнаруживают по...

- А. реакции с реактивом Кедде
- Б. реакции «лактонная проба»
- В. микровозгонке
- Г. свечению в УФ-свете

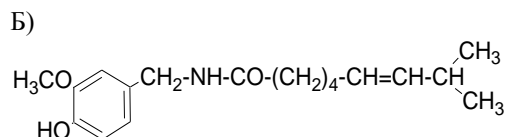
- Д. реакции с хлоридом алюминия
12. Присутствие флавоноидов в растительном сырье можно доказать реакцией...
- осаждения спиртом
 - «лактонной пробы»
 - цианидиновой
 - с тимолом и концентрированной соляной кислотой
 - микровозгонки
13. Согласно требованиям НД при качественном анализе рожков спорыньи проводят реакцию с...
- реактивом Паули
 - реактивом Ван-Урка
 - щелочью
 - ледяной уксусной кислотой
 - концентрированной серной кислотой
14. При проведении количественного определения экстракцию алкалоидов из травы термописа ланцетного проводят...
- хлороформом
 - хлороформом после подкисления
 - 1% раствором аммиака
 - хлороформом после подщелачивания
 - 1% раствором хлористоводородной кислоты
15. Количественное определение суммы алкалоидов в листьях красавки, согласно требованиям НД, проводят методом...
- прямого титрования в неводной среде
 - фотоэлектрокалориметрическим
 - гравиметрическим
 - спектрофотометрическим
 - обратного титрования

16. Установите соответствие

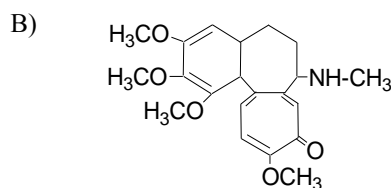
1. колхамин



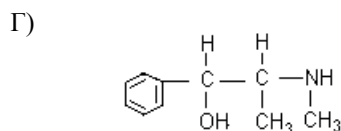
2. колхицин



3. эфедрин



4. капсаицин



17. Для обнаружения алкалоидов в сырье используют реактив

- Балье
- Кедде
- Раймонда
- Драгендорфа
- Молиша

18. Общеалкалоидным реактивом является:

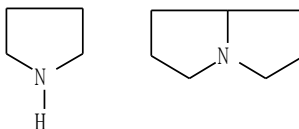
- кремневольфрамовая кислота
- судан III

- в) железоаммониевые квасцы
- г) флороглюцин
- д) реактив Люголя

19. По ГФ XI листья красавки стандартизируют по содержанию суммы алкалоидов в пересчете:

- а) на скополамин;
- б) на гингарин;
- в) на берберин;
- г) на гиосциамин;
- д) на цитизин;

19. На рисунке изображена структура



- а) пирролизидина и пирролидина;
- б) изохинолина и хинолина;
- в) пиридина и пиперидина;

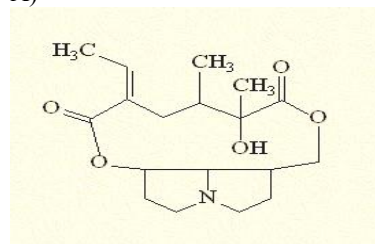
20. Какие аминокислоты участвуют в биосинтезе алкалоида гиосциамина:

- А) орнитин
- Б) фенилаланин
- В) диоксифенилаланин
- Г) лизин
- Д) триптамин

21. Установите соответствие:

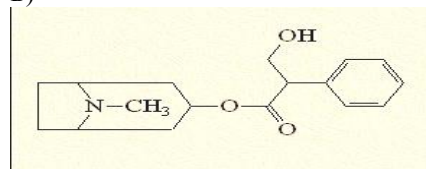
1. платифиллин

А)



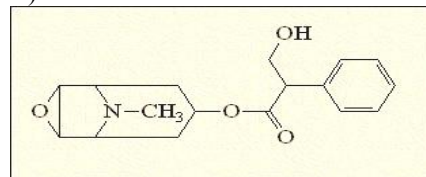
2. атропин

Б)



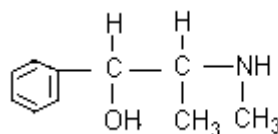
3. гиосциамин

В)



4. скополамин

Г)



22. В качестве промышленного сырья для получения скополамина используют

- а) листья дурмана обыкновенного
- б) семена дурмана индийского
- в) траву красавки обыкновенной
- г) траву крестовника

23. Для обнаружения алкалоидов в сырье используют:

- а) реакции окисления
- б) реакции осаждения

- в) реакцию микросублимации
- г) реакцию пенообразования

24. Для обнаружения алкалоидов в лекарственном растительном сырье используют реактив:

- а) Вагнера
- б) Балье
- в) Легалья
- г) Кедде
- д) Шталя

25. Алкалоиды это:

- а) природные азотсодержащие соединения основного характера
- б) летучие ароматные вещества
- в) природные вещества кардиотонического действия
- г) высокомолекулярные природные соединения, образующие густые коллоидные растворы.
- д) сложные природные соединения, образующие с белками нерастворимые комплексы и обладающие дубящими свойствами.

26. Закончите предложение:

27. После обработки сырья щелочью алкалоиды выделяют в виде _____

28. Дополните предложение – современная химическая классификация алкалоидов предложена академиком _____

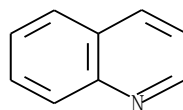
29. Для обнаружения алкалоидов в лекарственном растительном сырье используют реактивы, кроме

- а) Драгендорфа
- б) Келлер-Килиани
- в) раствор танина
- г) кремнефольфрамовой кислоты
- д) Зонненштейна

30. Установите соответствие между названием гетероцикла, лежащего в основе структуры алкалоида и химической структурой алкалоида

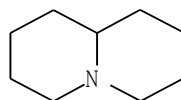
1. Хинолизидин

A.



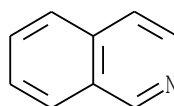
2. изохинолин

B.



3. хинолин

C.



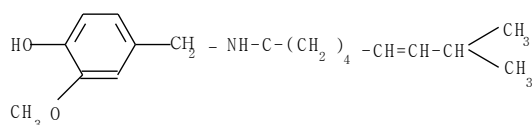
31. Какая аминокислота является предшественником гиосциамина в его биосинтезе:

- а) орнитин
- б) лизин
- в) диоксифенилаланин
- г) триптамин
- д) фенилаланин

32. Установите соответствие между названием алкалоида и его химической структурой

1. эфедрин

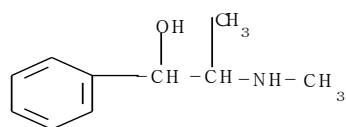
A.



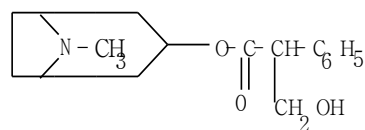
2. капсаицин

B.

3. атропин



С.



33.Алкалоиды-основания растворимы в:

- а) воде
 - б) органических растворителях
 - в) этаноле
- 34.. Количественное содержание эфирного масла в лекарственном растительном сырье проводят
- а) перегонкой с водяным паром
 - б) возгонкой
 - в) измерением массы
35. В эфирных маслах определяют примеси, кроме
- а) спирта
 - б) воды
 - в) жирных и минеральных масел
 - г) органических кислот

36. В эфирных маслах определяют

Числовые показатели:

- 1) кислотное число
- 2) эфирное число
- 3) температура затвердевания

Метод:

- а) алкалиметрия
- б) ацидиметрия
- в) обратной нейтрализации
- г) охлаждения
- д) рефрактометрии

37. В эфирных маслах определяют

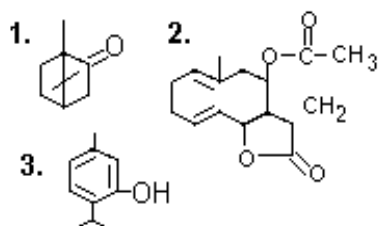
Числовые показатели:

- 1) плотность
- 2) угол вращения
- 3) показатель преломления

Метод:

- а) с применением пикнометра
- б) поляриметрии
- в) рефрактометрии
- г) с применением ареометра
- д) дистилляции

38. Установите соответствие



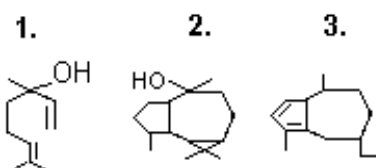
Название соединения:

- а) борнеол
- б) камфора
- в) тимол
- г) миллефолид
- д) хамазулен

39. Установите соответствие

Формула:

Название соединения:

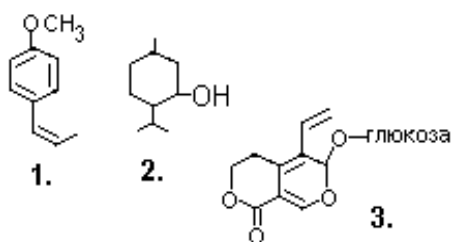


- а) линалоол
- б) ледол
- в) хамазулен
- г) матрицин
- д) карвакрол

40. Установите соответствие

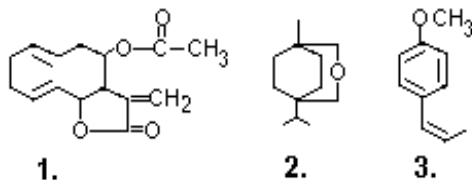
Формула:

Название соединения:



- а) ментол
 б) камфора
 в) анетол
 г) карвакрол
 д) гениопикрин

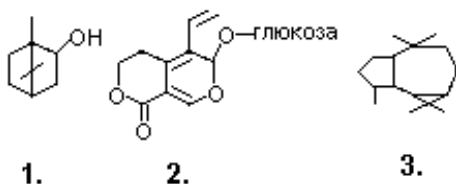
41. Установите соответствие
 Формула



Название соединения:

- а) артабсин
 б) миллефолид
 в) анетол
 г) цинеол
 д) туйон

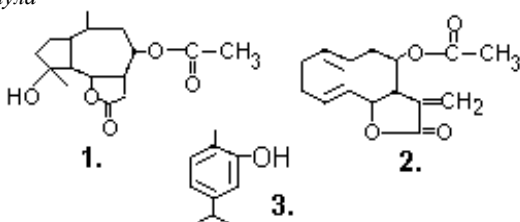
42. Установите соответствие
 Формула



Название соединения:

- а) борнеол
 б) камфора
 в) ледол
 г) логанин
 д) гениопикрин

43. Установите соответствие
 Формула



Название соединения:

- а) артабсин
 б) карвакрол
 в) матрицин
 г) гениопикрин
 д) миллефолид

44. Установите соответствие
 Формула:



Название соединения:

- а) цинеол
 б) акорон
 в) тимол
 г) логанин
 д) борнеол

45. Полисахариды извлекаются из растительного сырья

- а) 95% спиртом
 б) водой
 в) эфиром
 г) хлороформом
 д) петролейным эфиром

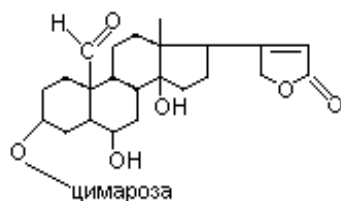
46. Наличие крахмала в лекарственном растительном сырье можно установить по реакции с растворами реактивов

- а) алюминия хлорида
 б) люголя
 в) гидроксида натрия
 г) хинина солянокислого
 д) танина

47. Присутствие слизи в корнях алтея можно доказать

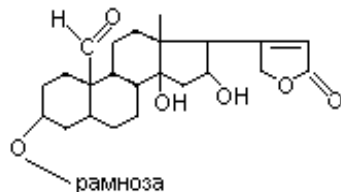
- а) на сухое сырье с раствором гидроксида натрия
 б) после приготовления настоя с раствором алюминия хлорида
 в) после очистки отвара с раствором туши
 г) после микровозгонки с раствором гидроксида натрия

- д) в настое с раствором желатина
48. Крахмал представлен
- амилозой и амилопектином
 - гексозанами и пентозанами
 - фруктозанами
49. Аскорбиновая кислота относится к витаминам
- жирорастворимым
 - водорастворимым
50. Дополните предложение
Содержание каротиноидов в плодах облепихи определяют методом ...
51. Дополните предложение
Для обнаружения и идентификации витаминов в лекарственном растительном сырье используют метод ...
52. На рисунке изображена формула



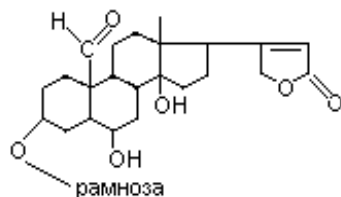
- эризимины
- адонитоксина
- цимарина
- К-строфантина
- конваллятоксина

53. На рисунке изображена формула



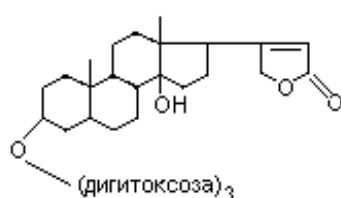
- цимарина
- конваллятоксина
- адонитоксина
- эризимины
- К-строфантина

54. На рисунке изображена формула



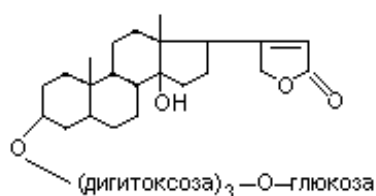
- конваллятоксина
- строфантина
- цимарина
- эризимины
- адонитоксина

55. На рисунке изображена формула



- пурпуреагликозида А
- дигоксина
- дигитоксина
- гитоксина
- ланатозида А

56. На рисунке изображена формула



- ланатозида А
- ланатозида С
- пурпуреагликозида В
- ланатозида В
- пурпуреагликозида А
- строфантина

57. Биологической стандартизации подвергается сырье, содержащее
- алкалоиды
 - эфирное масло
 - сердечные гликозиды
 - антраценпроизводные
 - экдизоны
58. Для обнаружения сердечных гликозидов в лекарственном растительном сырье используют все реактивы, кроме
- Майера
 - Келлер - Килиани
 - Либермана - Бурхарда
 - Легалья

- д) Раймонда
е) Балье
59. Дополните предложение
Количество ЕД в 1 г лекарственного растительного сырья, называ ется ...

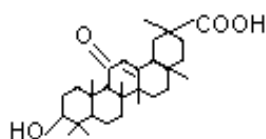
60. Дополните предложение
Для стандартизации сырья горичвета используется метод ...
61. Обильная пена при интенсивном встряхивании настоя или отвара свидетельствует о возможном присутствии

- а) дубильных веществ
б) сапонинов
в) алкалоидов
г) антраценпроизводных
д) жирного масла

62. Соединение, формула которого изображена на рисунке

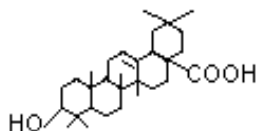
- а) диосцин
б) панаксатриол
в) панаксазид
г) панаксадиол
д) диосгенин

63. Соединение, формула которого изображена на рисунке



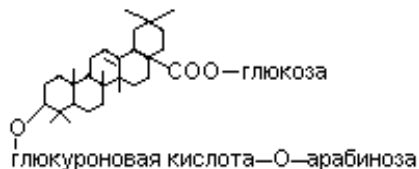
- а) глицирризиновая кислота
б) глицирретиновая кислота
в) олеаноловая кислота
г) урсоловая кислота
д) глюкуроновая кислота

64. Соединение, формула которого изображена на рисунке



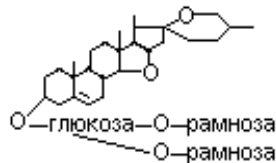
- а) глицирретиновая кислота
б) диосгенин
в) глицирризиновая кислота
г) олеаноловая кислота
д) панаксозид

65. Соединение, формула которого изображена на рисунке



- а) аралозид В
б) диосцин
в) аралозид С
г) аралозид А
д) панаксозид

66. Соединение, формула которого изображена на рисунке



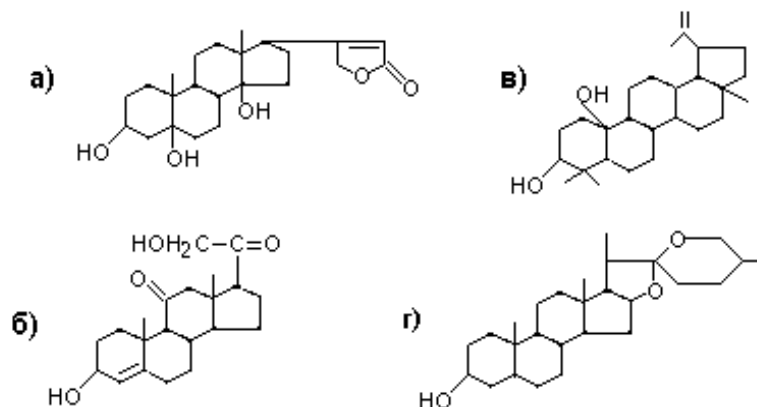
- а) диосцин
б) тиогенин
в) диосгенин
г) панаксозид
д) олеаноловая кислота

67. Содержание глицирризиновой кислоты в корне солодки по НД определяют методом
- а) фотоэлектроколориметрии
 - б) нейтрализации
 - в) спектрофотометрии
 - г) гравиметрии
 - д) газо-жидкостной хроматографии

68. Установите соответствие формуле

Группы сапонинов:

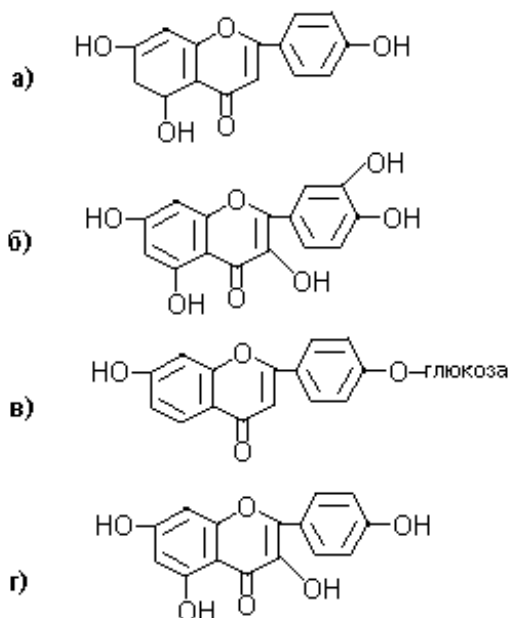
- 1) тритерпеновые сапонины
- 2) стероидные сапонины



69. Дополните предложение

При хроматографическом анализе алкалоидов хроматограммы обрабаты-вают реактивом ...

70. В органических растворителях хорошо растворимы
- а) полисахариды
 - б) алкалоиды-соли
 - в) агликоны флавоноидов
 - г) пектиновые вещества
71. Кверцетин изображен на рисунке



72. Для обнаружения флавоноидов в сырье характерными реакциями являются
- а) лактонная проба
 - б) цианидиновая реакция
 - в) микровозгонка
 - г) реакция с пикриновой кислотой
73. Дополните предложение

Цианидиновую реакцию проводят для обнаружения в сырье ...

74. Дополните предложение
Сумму флавоноидов в пересчете на рутин в траве зверобоя определяют методом ...
75. Установите соответствие

Формула:

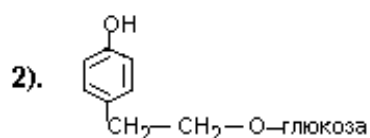
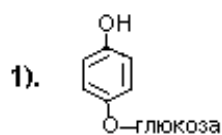
Соединение:



76. Установите соответствие

Формула:

Соединение:



- а) аспидиол
- б) рутин
- в) салидрозид
- г) арбутин
- д) метиларбутин
- е) альбаспидин

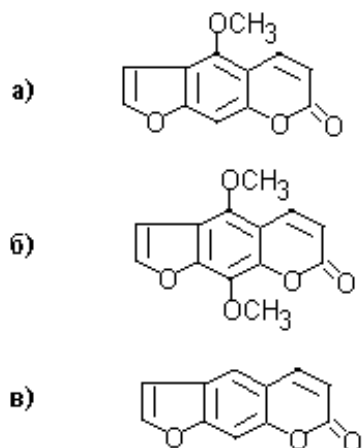
77. Природные соединения, в основе которых лежит бензо- α -пирон (лактон цис-ортооксикоричной кислоты) называют

- а) флавоноидами
- б) кумаринами
- в) дубильными веществами
- г) антраценпроизводными

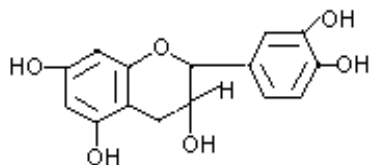
78. Основной качественной реакцией на кумарины является

- а) лактонная проба
- б) цианидиновая реакция
- в) реакция с раствором пикриновой кислоты
- г) с железно-аммониевыми квасцами
- д) с реактивом Балье

79. На рисунке изображена формула бергаптена



80. Характерная реакция на дубильные вещества
- с нитропруссидом натрия
 - с щелочью
 - с растворами солей трехвалентного железа
 - с фосфорномолибденовой кислотой
 - пенообразования
81. Отвар из сырья, содержащего дубильные вещества, дает положительную реакцию
- с гидроксидом натрия
 - с алюминия хлоридом
 - с танином
 - с раствором туши
 - с желатином
82. Положительную реакцию с раствором железо-аммониевых квасцов дают виды сырья, содержащие
- дубильные вещества
 - сапонины
 - полисахариды
 - горечи
 - жирные масла
83. В горячей воде хорошо растворимы
- основания алкалоидов
 - дубильные вещества
 - агликоны антрахинона
 - эфирные масла
 - агликоны халконов
84. Дубильные вещества в коре дуба обнаруживают взаимодействие
- с железо-аммониевыми квасцами
 - с калия перманганатом
 - с п-диметиламинобензальдегидом
 - с алюминия хлоридом
 - с железом (II) сульфатом
85. Количественное содержание дубильных веществ по ГФ XI в лекарственном растительном сырье определяют методом
- гравиметрии
 - перманганатометрии
 - фотоэлектроколориметрии
 - нефелометрии
86. Соединение, формула которого изображена на рисунке



- танин
- гексаоксидореновая кислота
- катехин
- лейкоцианидин
- пирагаллол
- пирокатехин

87. Для проведения анализа используют хроматографические пластинки *Silufol*, подвижная фаза — этилацетат—ледяная уксусная кислота (8:2), детектор — 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия. После обработки хроматограммы наблюдаются белые пятна на розовом фоне. Это описание хроматографического анализа присутствия в растительном сырье:
- Аскорбиновой кислоты.
 - Витамина К.
 - Каротиноидов.
88. Для проведения анализа используют хроматографические пластинки *Silufol*, подвижная фаза — циклогексан—эфир (8:2), детектор — 10% раствор фосфорно-молибденовой кислоты. После обработки хроматограммы наблюдаются синие пятна на желтом фоне. Это описание хроматографического анализа присутствия в растительном сырье:
- Аскорбиновой кислоты.
 - Витамина К.
 - Каротиноидов.
89. Количественное содержание витамина К в растительном сырье определяют:
- Титриметрически.
 - Спектрофотометрически.
 - Перегонкой с водяным паром.
 - Гравиметрически.
90. Определение каротиноидов в растительном сырье проводится:
- Титриметрически.
 - Гравиметрически.
 - Фотоэлектроколориметрически.
 - Перегонкой с водой.
 - Методом биологической стандартизации.

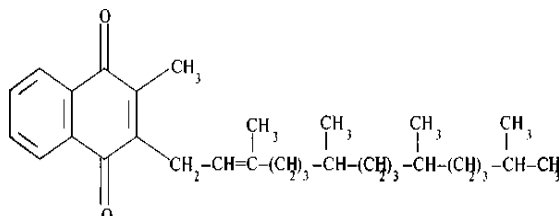
91. Для проведения анализа используют хроматографические пластинки *Silufol*, подвижная фаза — бензол—петролейный эфир (1:1). При просматривании хроматограммы в УФ-свете наблюдаются пятна с желтовато-зеленой флюоресценцией. Это описание хроматографического анализа присутствия в растительном сырье:

- А. Витамин К.
- Б. Аскорбиновой кислоты.
- В. Каротиноидов.

92. Витаминами называют природные органические соединения:

- А. Агликон которых является производным антрацена.
- Б. Содержащие азот.
- В. Разнообразные по химическому строению, принимающие участие в обмене веществ и являющиеся жизненно необходимыми.
- Г. Смесь душистых веществ, относящихся преимущественно к терпеноидам.

93. Представлена формула:



- А. Аскорбиновой кислоты.
- Б. Каротина.
- В. Филлохинона.
- Г. Рибофлавина.
- Д. Токоферола.

94. О-гликозиды устойчивы к гидролизу:

- А. Кислотному.
- Б. Щелочному.
- В. Ферментативному.

95. Полисахариды из растительного сырья извлекают:

- А. Спиртом этиловым.
- Б. Водой.
- В. Кислотой.
- Г. Хлороформом.
- Д. Петролейным эфиром.

96. В анализе полисахаридов используют цветную реакцию с:

- А. 10% H_2SO_4 .
- Б. Карбазолом.
- В. Ацетатом свинца.
- Г. Фосфорно-молибденовой кислотой.
- Д. Тимолом.

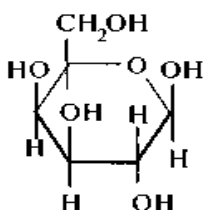
97. Зерна крахмала состоят из:

- А. Полиурановых кислот.
- Б. Фруктозы и фуранозы.
- В. Амилозы и амилопектина.
- Г. Глюкозы.
- Д. Сахарозы.

98. Содержание полисахаридов в слоевище ламинарии по ГФ XI определяют:

- А) Спектрофотометрически.
- Б) Фотоэлектроколориметрически.
- В) Гравиметрически.
- Г) Потенциометрически.
- Д. Титриметрически.

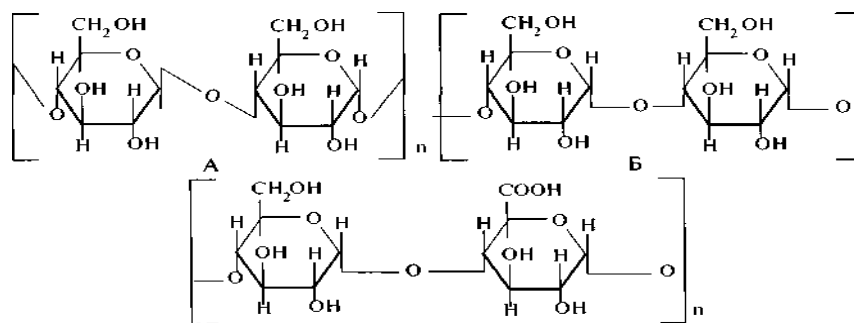
99. Представлена формула:



- А. Глюкозы.
- Б. Фруктозы.

- В. Галактурановой кислоты.
- Г. Галактозы.
- Д. Глюкуроновой кислоты.

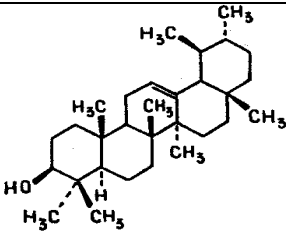
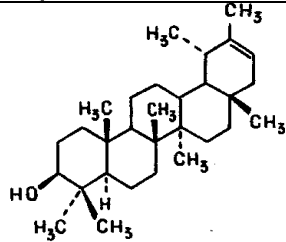
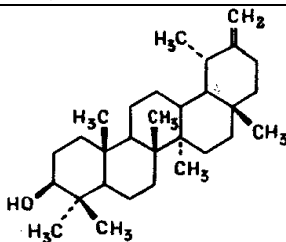
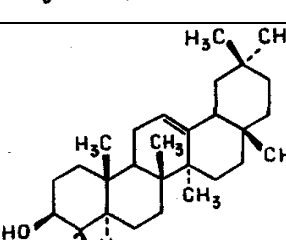
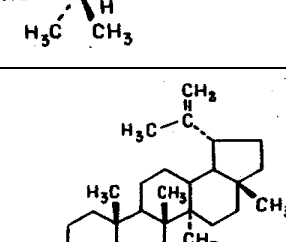
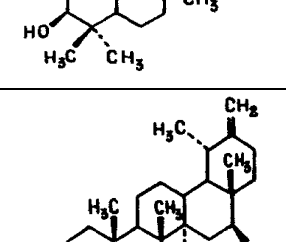
100. Представлена формула:

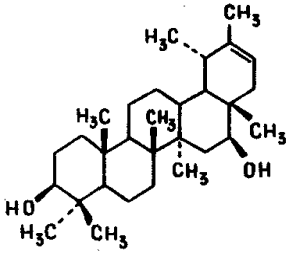
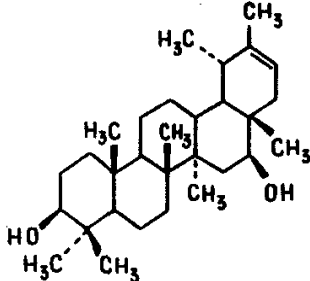
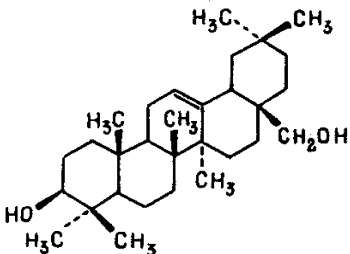
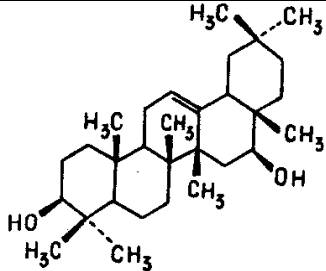
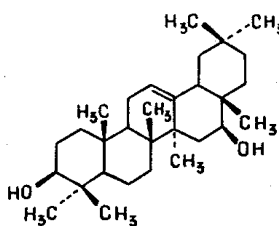
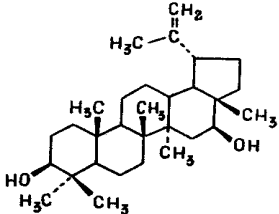
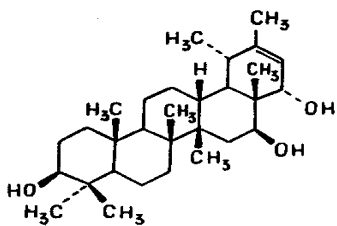


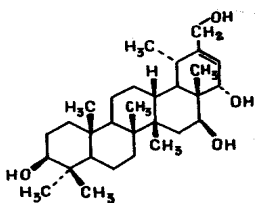
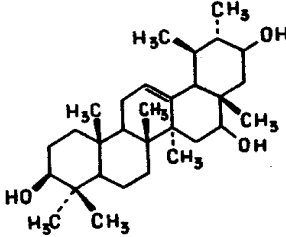
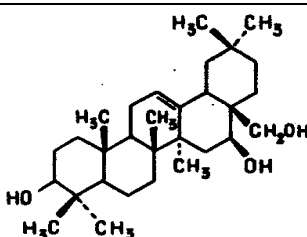
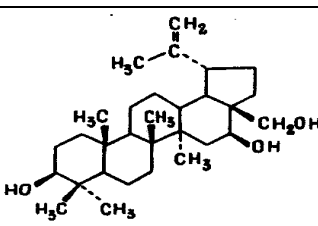
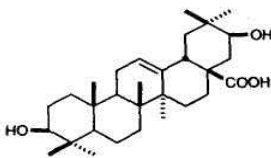
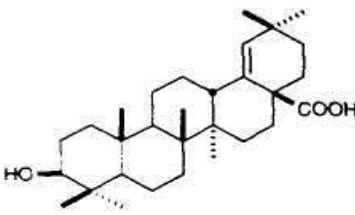
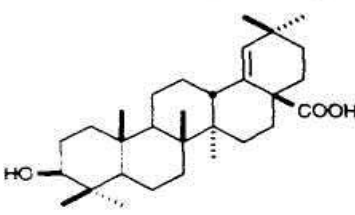
- А. Амилозы.
- Б. Амилопектина.
- В. Арабиноуроновой кислоты.
- Г. Инулина
- Д. Пектовой кислоты.

Приложение 1

Физико-химические характеристики тритерпеновых спиртов

№	Вещество	Структурная формула	Брутто-формула	$T_{пл}, ^\circ C$	$[\alpha]_d$
1	2	3	4	5	6
1	α -амирин		$C_{30}H_{50}O$	186 (этанол)	+91,6 (бензол), +83,5 (хлор- форм)
2	φ -тараксастерол		$C_{30}H_{50}O$	217-219 (этанол хлоро- форм)	+93,5 (хлоро- форм)
3	Тараксастерол		$C_{30}H_{50}O$	225-226 (этанол)	+95,9 (хлоро- форм)
4	β -амирин		$C_{30}H_{50}O$	197- 197,5 (этанол)	+99,8 (хлоро- форм)
5	Лупеол		$C_{30}H_{50}O$	215- 216(сме сь эта нола и метано ла)	+24,4 (хлоро- форм)
6	Арнидиол		$C_{30}H_{50}O_2$	257(ацет он)	+81,2 (хлоро- форм)

1	2	3	4	5	6
7	Фарадиол		$C_{30}H_{50}O_2$	236-273(этанол, петролейный эфир)	+43,1-44,5 (хлороформ)
8	Бреин		$C_{30}H_{50}O_2$	221-222 (метанол)	+63,5 (хлороформ)
9	Эритродиол		$C_{30}H_{50}O_2$	236-237 (этанол)	+77 (хлороформ)
10	Манилладиол		$C_{30}H_{50}O_2$	220-221 (метанол)	+68 (хлороформ)
11	Урсадиол		$C_{30}H_{50}O_2$	240-242 (ацетон)	-48 (хлороформ)
12	Турберин		$C_{30}H_{50}O_2$	206-208 (метанол)	+12 (метанол)
13	Хелиантриол С		$C_{30}H_{50}O_3$		

1	2	3	4	5	6
14	Хелиантриол F		$C_{30}H_{50}O_3$		
15	Урсатриол		$C_{30}H_{50}O_3$	244-250 (смесь дихлорметана и метанола)	
16	лонгиспиногенин		$C_{30}H_{50}O_3$	247-249 (ацетон)	
17	лупенстриол		$C_{30}H_{50}O_3$	300-301 (метанол)	+8 (хлороформ)
18	Махаериновая кислота		$C_{30}H_{46}O_4$	309-312	+20 ⁰
19	Кохалиновая кислота		$C_{30}H_{48}O_4$	303-309	+58 (диоксан)
20	Мороновая кислота		$C_{30}H_{48}O_3$	273	+33 (диоксан)

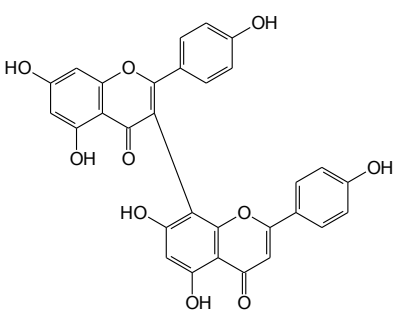
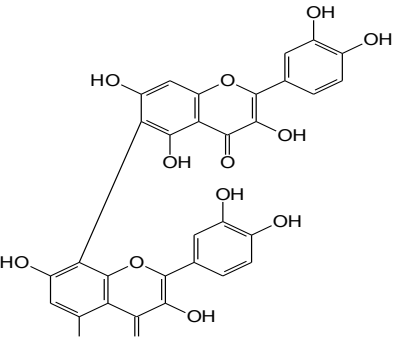
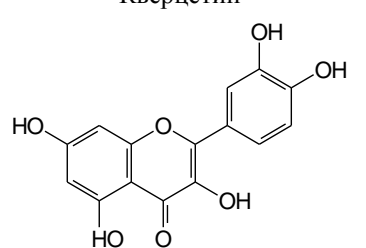
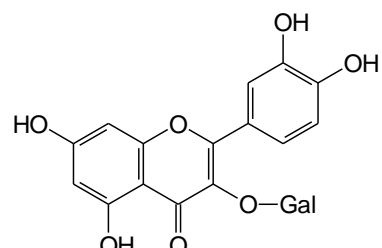
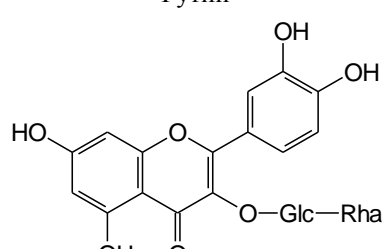
Физические константы и структурные особенности фенольных соединений

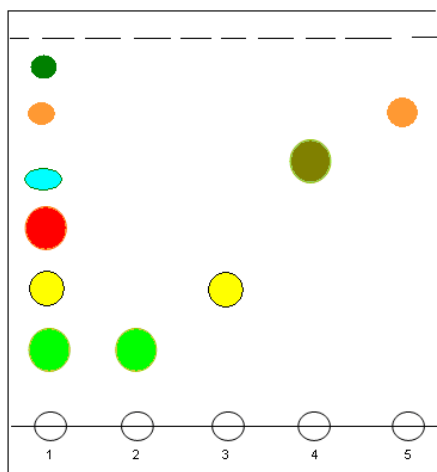
Фенолкарбоновые кислоты

193

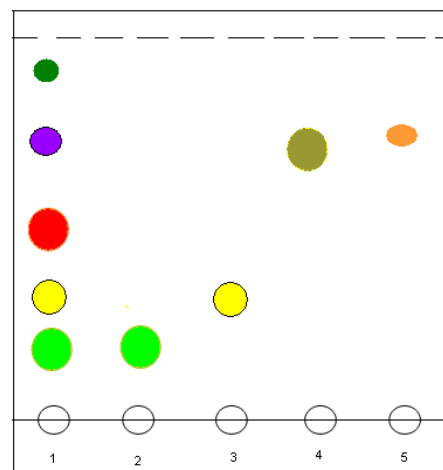
Приложение 3

Физико-химические константы флавоноидов, выделенных из надземной части зверобоя продырявленного

№ п/п	Название, структура	Физико-химические константы
1.	<p>3,8¹¹ – Бисапигенин</p> 	<p>C₃₀H₁₈O₁₀ с т.пл. 233-235⁰С, М⁺ 302 (100 %), УФ-спектр: λ_{max} 270, 330 нм. ¹Н-ЯМР-спектр в дейтероацетоне (δ, м.д.): 13,15 (с, 5-ОН), 12,99 (с, 5¹¹-ОН), 7,71 (д, 9 Гц, 2Н, Н-2^{1,6}), 7,51 (д, 9 Гц, 2Н, Н-2^{11,6}), 6,90 (д, 9 Гц, 2Н, Н-3^{1,5}), 7,79 (д, 9 Гц, 2Н, Н-3^{11,5}), 6,61 (с, Н-3¹¹), 6,60 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,35 (д, 2,5 Гц, Н-6), 6,34 (с, Н-6¹¹).</p>
2	<p>6,8¹¹ – Дикверцетин</p> 	<p>C₃₀H₁₈O₁₄, УФ-спектр в этаноле: λ_{max} 257, 268 пл, 374 нм. ¹Н-ЯМР-спектр в дейтероацетоне (δ, м.д.): 7,83 (д, 9 Гц, Н-2¹), 7,70 (дд, 2 и 9 Гц, Н-6¹), 7,53 (д, 9 Гц, Н-2¹¹), 7,48 (дд, 2 и 9 Гц, Н-6¹¹), 6,98 (д, 9 Гц, Н-5¹), 6,89 (д, 9 Гц, Н-5¹¹), 6,53 (уш. с, Н-8), 6,27 (уш. с, Н-6).</p>
3.	<p>Кверцетин</p> 	<p>C₁₅H₁₀O₇ с т.пл. 312-314⁰С, М⁺ 302 (100 %), УФ-спектр в этаноле: λ_{max} 257, 268 пл, 372 нм. ¹Н-ЯМР-спектр в дейтероацетоне (δ, м.д.): 12,20 (с, 5-ОН), 7,83 (д, 9 Гц, Н-2'), 7,70 (дд, 2 и 9 Гц, Н-6'), 6,99 (д, 9 Гц, Н-5'), 6,53 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,26 (д, 2,5 Гц, Н-6).</p>
4.	<p>Гиперозид</p> 	<p>C₂₁H₂₀O₁₂ с т.пл. 233-235⁰С (водный ацетон); УФ-спектр в этаноле: λ_{max} 258, 266 пл, 362 нм. ¹Н-ЯМР-спектр в смеси дейтероацетона и дейтероводы (δ, м.д.): 12,30 (с, 5-ОН), 7,92 (д, 2,5 Гц, Н-2¹), 7,55 (дд, 2,5 и 9 Гц, Н-6¹), 6,88 (д, 9 Гц, Н-5¹), 6,45 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,21 (д, 2,5 Гц, Н-6), 5,20 (д, 7,5 Гц, Н-1¹¹ галактозы), 3,5-4,0 (м, 6Н галактозы).</p>
5.	<p>Рутин</p> 	<p>C₂₇H₃₀O₁₆; т.пл. 192-194⁰С (водный спирт) УФ-спектр: λ_{max} 258, 266 пл, 362 нм. ¹Н-ЯМР-спектр в смеси дейтероацетона и дейтероводы, 2:1 (δ, м.д.): 7,74 (д 9 Гц, Н-2¹), 7,68 (дд, 2,5 и 9 Гц, Н-6¹), 6,94 (д, 9 Гц, Н-5¹), 6,50 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,27 (д, 2,5 Гц, Н-6), 5,13 (д, 7 Гц, Н-1¹¹ глюкозы), 4,55 (д, 2 Гц, Н-1¹¹ рамнозы), 3,70-3,25 (м, 6Н глюкозы + 4Н рамнозы), 1,08 (д, 6 Гц, 3Н, CH₃ рамнозы).</p>



ТСХ извлечения из травы зверобоя продырявленного в системе растворителей: хлороформ-этиловый спирт-вода в соотношении (26:16:3)



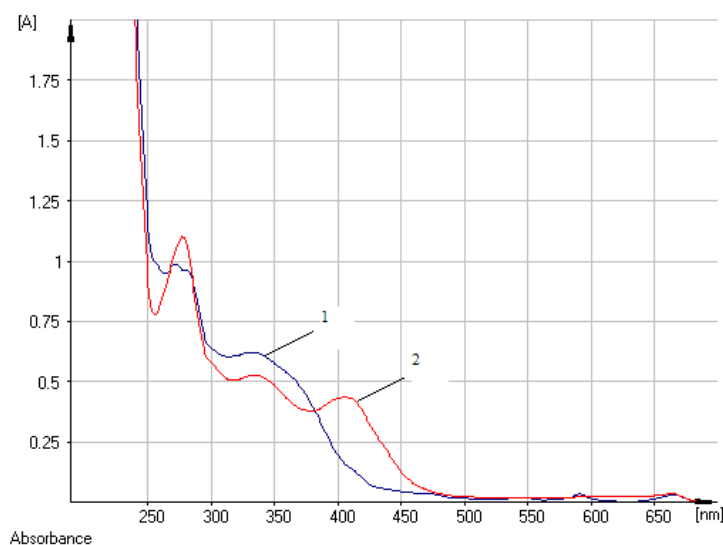
ТСХ извлечения из травы зверобоя продырявленного в системе растворителей: этилацетат - муравьиная кислота - 2 н хлористоводородная кислота в соотношении (85:6:9)

Обозначения:

1. Извлечение из травы зверобоя продырявленного
2. Раствор ГСО рутина
3. Раствор ГСО гиперозида
4. Раствор ГСО кверцетина
5. Раствор РСО бисапигенина



УФ-спектр раствора извлечения травы зверобоя



УФ-спектры раствора извлечения травы зверобоя в присутствии раствора алюминия хлорида

Обозначения:

1 – извлечение из травы зверобоя 1:2500 на 70% этиловом спирте

2 – извлечение из травы зверобоя 1:2500 на 70% этиловом спирте (+AlCl₃).

Приложение 6

Общеалкалоидные реактивы

Название реактива	Состав реактива	Эффект реакции
Майера	$(\text{HgCl}_2 \times 2\text{KI})$	белый или желтоватый осадок
Вагнера - Бушарда	$\text{I}_2 \times 2\text{KI}$	бурый осадок
Драгендорфа	$\text{BiNO}_3 \times \text{KI}$	кирпично-красный или оранжево-красный осадок
Шейблера	1% раствор кислоты фосфорновольфрамовой	белый осадок
Бертрана	1% раствор кремневольфрамовой кислоты	беловатые или желтоватые осадки
Зоненштейна	1% раствор фосфорномолибденовой кислоты	аморфный желтоватый осадок
10 % раствор танина		беловатый или желтоватый осадок
1% раствор пикриновой кислоты		желтый осадок
$\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$		голубая флуоресценция (хинина гидрохлорид)
$\text{HNO}_{3\text{конц}}$		оранжевая (папаверин), красная (морфин), желтая (кодеин)
Эрдмана	$\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}} + \text{HNO}_{3\text{конц}}$	красная (папаверин), синяя (кодеин)
Фреде	раствор аммония молибдата + $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$	фиолетовая (папаверин), сине-фиолетовая (морфин), зеленая (кодеин)
Марки	формальдегид + $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$	Желтая (атропин), красная (папаверин), сине-фиолетовая (морфин, кодеин)
Манделиана	раствор аммония ванадия + $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$	сине-зеленая (папаверин), фиолетовая (морфин), синяя (кодеин)
Натрия нитропруссид		красно-коричневый осадок (пахикарпин), желтоватый осадок (хинин, кодеин, кофеин), красная (пилокарпин)

Литература

1. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. – М.: Медицина. – 2002. – 656с.
2. Муравьева Д.А. Тропические и субтропические лекарственные растения. – М.: Медицина, 1999.- 384 с.
3. Лекарственные растения государственной фармакопеи. Фармакогнозия /под. Ред. Самылиной И.А.- М.:АМНИ, Т.1.- 1999.- 496 с.; Т.2.- 2003. – 534 с.
4. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – 1200 с.
5. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. фармакогнозия: учебное пособие /Под ред.Г.П. Яковлева. – СПб.:СпецЛит, 2013. - 845 с
6. Государственная Фармакопея СССР, X издание – М.: Медицина, 1968. – 1080 с
7. Государственная Фармакопея СССР, XI издание, вып. 1. – М.: Медицина, 1987, вып. 2. – М.: Медицина, 1989.- 400с.
8. Государственная Фармакопея РФ, XII издание, Ч. 1.- М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
9. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья. Методические указания к лабораторным занятиям //Под ред. К.Ф.Блиновой.- Спб.: СПХФА, 1998. – 60с.
10. Фармакогностическое изучение лекарственных растений и сырья, содержащего алкалоиды. Методические указания к лабораторным занятиям //А.М. Сампиев, М.Р. Хочава, А.И. Шевченко, Краснодар, КГМУ, 2008 – 56 с.
11. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии: учебн.пособие /Под ред. И.А.Самылиной, А.А. Сорокиной.–М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007.- 672с.
12. Куркин В.А., Новодранова В.Ф., Куркина Т.В. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: учебное пособие. М., Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. – 188 с.
13. Сорокина А.А., Самылина И.А. Фармакогнозия: Понятия и термины. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 88с.
14. Лесиовская Е.Е., Пастушенков Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии: учебное пособие. – 2-е изд. – М.ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 592 с.
15. Химический анализ лекарственных растений. Под ред. Гринкевич Н.И. Сафронович Л.Н. – М.: Высшая школа, 1983. – 200с
16. Методы биохимического исследования растений /Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Колос, 1982. – 455 с.
17. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. - М.: Медицина, 1985. – 562с.
18. Орехов А.П. Химия алкалоидов. – М.: Изд. АН СССР, 1955. – 860с.

19. Юнусов С.Ю. Алкалоиды. – Ташкент: Изд. ФАН, 1981. – 418 с.
20. Биологические активные вещества лекарственных растений / Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. – Новосибирск: Наука. Сиб.отд-ние, 1990. – 333с.
21. Биологически активные вещества растительного происхождения в трех томах. – Москва, «Наука», 2006
22. В.В. Племенков. Введение в химию природных соединений. – Казань, 2001

ИНТЕРНЕТ РЕСУРСЫ

1. <http://www.fitopreparat.ru> Справочник фитопрепаратов и растительных гомеопатических средств.
2. <http://pharmabook.net> Фармакологический справочник.
3. <http://www.it-med.ru/library/a.htm>. Библиотека медицинской литературы.
4. <http://green-med.ru/> Медицинский информационный портал «GREEN-MED RUSSIA»
5. <http://www.medbook.net.ru/> Медицинская литература.
6. <http://www.fito.nnov.ru>
7. <http://pharmacognosy.ru>
8. <http://www.naturoprof.ru/> Профессиональная ассоциация натуротерапевтов.
9. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00913057> Pharmacology Biochemistry and Behavior
10. <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%292042-7158a/issues> Pharmacy and Pharmacology Communications