

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Под редакцией
проф Н И Гранкевич, доц. Л. Н Сафронич

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебного пособия
для студентов фармацевтических вузов
и факультетов



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1983

Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н., Отряшенкова В. Э., Баландина И. А.,
Гринкевич Н. И., Сорокина А. А., Сокольский И. Н., Глызин В. И.,
Молодожникова Л. М., Митин Ю. С., Самылина И. А., Ермакова В. А.

Рецензенты:
кафедра фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института
(зав. кафедрой проф. Р. Л. Хазанович)
и доц. И. Д. Нешта (Тюменский медицинский институт)

Химический анализ лекарственных растений: Учеб. посо-
Х12 бие для фармацевтических вузов /Ладыгина Е. Я., Сафро-
нич Л. Н., Отряшенкова В. Э. и др. Под ред. Гринкевич Н. И.,
Сафронич Л. Н. — М.: Высш. школа, 1983. — 176 с., ил.

40 к.

В пособие дана краткая характеристика, классификация, физико-химические
свойства, распространение в растительном мире, способы выделения биологиче-
ски активных соединений из лекарственного сырья. Основное внимание уделя-
ется методам анализа лекарственного сырья. Кроме того, в пособие приводятся
новейшие методы исследования.

2803050000—105

X 001(01)—83 142—83

ББК 24.239:52.82

547:615.11

Екатерина Яковлевна Ладыгина, Лидия Николаевна Сафронич,
Вия Эдуардовна Отряшенкова, Ирина Анатольевна Баландина,
Нелли Ивановна Гринкевич, Алла Анатольевна Сорокина,
Игорь Николаевич Сокольский, Владимир Игнатьевич Глызин,
Людмила Михайловна Молодожникова, Юрий Сергеевич Митин,
Ирина Александровна Самылина, Валентина Алексеевна Ермакова

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Зав. редакцией С. Ф. Ковдрашкова. Редактор М. М. Поплавская. Младшие редакторы
Т. С. Костян и С. М. Ерохина. Технический редактор Е. И. Герасимова. Художественный
редактор Т. М. Скворцова. Художник А. И. Шавард. Корректор С. К. Завьялова

ИБ № 3948

Изд. № Хим-701. Сдано в набор 22.06.82. Подл. в печать 11.01.83. Формат 60×90/16.
Бум. тип. № 3. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 11 усл.-печ. л. 11,13 усл.
кр.-отт. 11,93 уч.-изд. л. Тираж 26 000 экз. Зак. № 588. Цена 40 коп.
Издательство «Высшая школа», Москва, К-61, Неглянная ул., д. 29/14
Ордена Октябрьской Революции, ордена Трудового Красного Знамени Ленинградское
производственно-техническое объединение «Печатный Двор» имени А. М. Горького Союз-
полиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательства, полигра-
фии и книжной торговли. 197136, Ленинград, П-136, Чкаловский просп., 15.

© Издательство «Высшая школа», 1983

В последние годы значительно возрос интерес к препаратам
растительного происхождения как в нашей стране, так и за рube-
жом.

На международном фармацевтическом рынке каждый третий пре-
парат, применяемый в медицине, имеет растительное происхожде-
ние, а из средств, используемых для лечения сердечно-сосудистых
заболеваний, 80 % составляют препараты растительного проис-
хождения.

В Государственный реестр СССР включено около 250 наимено-
ваний лекарственного растительного сырья и свыше 600 препара-
тов растительного происхождения.

При разработке нормативно-технической документации (НТД)
на лекарственное растительное сырье ставится задача предусмот-
реть оценку качества сырья по количественному содержанию основ-
ных биологически активных веществ. При этом для определения дей-
ствующих веществ используются современные методы анализа при-
родных соединений.

При выделении и разделении смеси биологически активных
веществ, полученных из лекарственного растительного сырья, с це-
лью их идентификации и количественного определения чаще всего
применяют тонкослойную, бумажную и колоночную хроматогра-
фию. Для исследования биологически активных веществ в сырье
используют люминесцентный метод анализа, газожидкостную хро-
матографию, а также УФ, ИК и масс-спектроскопию.

Овладение современными методами исследования биологически
активных веществ при анализе сырья по НТД, а также при разра-
ботке НТД на лекарственное растительное сырье необходимо сту-
дентам высших фармацевтических заведений в процессе обучения
и дальнейшей их практической деятельности. В настоящее время
в курсе фармакогнозии фитохимический анализ занимает значи-
тельное место.

Следует также отметить, что в последние годы появился ряд
исследований по отдельным группам биологически активных соеди-
нений, которые не успели найти свое отражение в новом учебнике
по фармакогнозии Д. А. Муравьевой, изданном в 1978 г.

Исходя из этого, коллектив сотрудников кафедр фармакогно-
зии I ММИ им. И. М. Сеченова подготовил к изданию пособие по
фитохимическому анализу лекарственного растительного сырья,
в котором приводятся современные методы исследования биологи-
чески активных соединений, некоторые теоретические сведения
по отдельным группам этих соединений, включая их определение,
классификацию, физико-химические свойства, методы identifica-
ции, качественного и количественного определения и т. д.

При написании пособия «Химический анализ лекарственных растений» были использованы утвержденные методики на лекарственное растительное сырье, в которые авторами внесены изменения в соответствии с принятой в настоящее время терминологией.

При составлении пособия коллектив авторов ставил перед собой задачу облегчить студентам самостоятельную подготовку при изучении отдельных групп биологически активных соединений в растениях.

Предлагаемое пособие по фитохимическому анализу может быть также использовано в химических лабораториях, где проводится анализ лекарственного растительного сырья.

В написании книги участвовали: Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н. — Введение; Отряшенкова В. Э. — гл. 1; Баландина И. А. — гл. 2; Гринкевич Н. И., Сорокина А. А. — гл. 3, 11; Гринкевич Н. И., Сорокина А. А., Сокольский И. Н. — гл. 4; Глызин В. И., Молодженкова Л. М. — гл. 5; Ладыгина Е. Я. — гл. 6; Митин Ю. С. — гл. 7; Самылина И. А. — гл. 8; Ермакова В. А. — гл. 9; Сафронич Л. Н. — гл. 10; Сафронич Л. Н., Самылина И. А. — гл. 12.

Выражаем глубокую благодарность проф. Хазанович Р. Л., доц. Нешта И. Д., проф. Блиновой К. Ф., доц. Изотову Б. Н. за ценные замечания, сделанные по рукописи.

Все критические замечания по предлагаемому пособию коллектив авторов примет с глубокой благодарностью.

Авторы

ВВЕДЕНИЕ. ПОДГОТОВКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ АНАЛИЗА

На точность результатов при исследовании растительного сырья, особенно при количественном определении действующих веществ, а также при определении содержания экстрактивных веществ, золы и влаги большое влияние оказывает правильность подготовки образцов сырья для проведения анализа.

Это связано с тем, что содержание действующих веществ в лекарственном сырье невелико: чаще всего от 0,1 до 5 % (реже больше). Причем содержание их в различных частях неодинаково. Колебания могут быть весьма значительными, например, в листьях, как правило, действующих веществ больше, чем в стеблях. Даже в отдельных частях листа содержание действующих веществ может быть различным. Поэтому в зависимости от того, каких частей (листьев или стеблей) взято больше для определения, результат может быть завышенным или заниженным. Отсюда следует, что брать сырье для анализа необходимо так, чтобы не нарушить естественного соотношения всех частей сырья.

Необходимо строго соблюдать все правила взятия средней пробы и выделения из нее аналитической пробы, предназначенной для фитохимического анализа [ГОСТ 24027.0—80, Государственная Фармакопея СССР, X изд., с. 854 (ГФ X)]. Второе правило, которое необходимо соблюдать, — измельчать сырье следует полностью, без остатка.

Отделение грубых, трудно измельчающихся элементов также ведет к нарушению естественного соотношения отдельных частей растительного сырья.

ГЛАВА 1. ВИТАМИНЫ

Витамины — сложные биологически активные, низкомолекулярные органические соединения, имеющие различное химическое строение. Они необходимы для нормального течения процессов обмена веществ. Большинство из них входит в состав ферментов, являясь их коферментами.

Витамины в организме не синтезируются или некоторые синтезируются, но в недостаточном количестве. Отсутствие витаминов или недостаток их в организме приводит к развитию различных заболеваний — гипо- или авитаминозам. Источниками витаминов служат в основном пищевые продукты, растения, а также продукты животного происхождения.

Лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, используется для приготовления витаминных сборов; кроме того, из него готовят следующие препараты: рутин, кверцетин, таблетки витамина Р, сироп из плодов шиповника, сок и витамин Р из плодов аронии черноплодной, пеплавит (Р витамин) из травы зверобоя, масло облепихи, масло шиповника, каротин и др.

Как правило, лекарственные растения не накапливают один витамин, а содержат комплекс витаминов. В то же время в растительном сырье преобладает один какой-то витамин:

Наименование витаминов	Сырье, содержащее витамины
Аскорбиновая кислота (витамин С)	Плоды шиповника, плоды и листья грецкого ореха; листья примулы, крапивы, капусты; хвоя сосны; фрукты, ягоды; плоды красного перца; цитрусовых, актинидии, черной смородины; зеленый лук
Провитамин А (каротин)	Плоды облепихи, шиповника, рябины обыкновенной, красного перца, черной смородины; цветки ноготков; трава череды, сушеницы топяной; лист крапивы
Витамин К	Кукурузные рыльца; лист крапивы; трава пастушьей сумки, тысячелистника, горца почечуйного, водяного перца
Витамин Р	Бутоны софоры японской; плоды черноплодной рябины; кожура плодов цитрусовых; трава гречихи; лист чая
Витамины В ₁ , В ₂ Токоферол (витамин Е)	Плоды шиповника, облепихи; лист крапивы. Масло облепиховое, кукурузное, подсолнечное, хлопковое

§ 1. Классификация

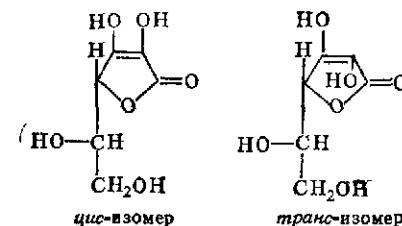
По мере открытия отдельных витаминов им давались названия букв латинского алфавита. Буквенная классификация не отражала ни биологические свойства, ни химическую структуру витаминов, поэтому была принята классификация, по которой витамины делились на жирорастворимые и водорастворимые. К витаминам, растворимым в жирах, относятся: провитамин А (каротин), D (кальциферол), Е (токоферол), К (викасол), F (линолевая и линоленовая кислоты). К витаминам, растворимым в воде, относятся витамины С (аскорбиновая кислота), В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₆ (пиридоксин), РР (никотиновая кислота), Р (рутин) и др.

После того как была установлена химическая природа витаминов, выяснилось, что все они относятся к различным классам органических соединений. Поэтому стало возможным принять химическую классификацию:

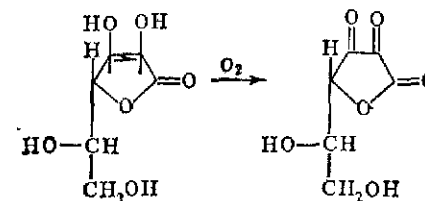
1) витамины алифатического ряда (С, В₃, F и др.); 2) витамины алициклического ряда (А, D и др.); 3) витамины ароматического ряда (группа К); 4) витамины гетероциклического ряда (Е, Р, РР, В₆, В₁, В₂, В₁₂).

§ 2. Физико-химические свойства

Аскорбиновая кислота. Представляет собой γ-лактон-2,3-дегидро-α-гулоновую кислоту. Наличие двойной связи в молекуле обуславливает *цис*-, *транс*-изомерию:



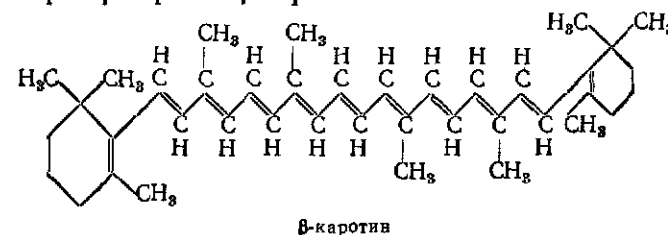
Это белый кристаллический порошок кислого вкуса, легко растворимый в воде, спирте, нерастворимый в органических растворителях, таких, как эфир, хлороформ, бензол. Легко окисляется, поэтому принимает участие в окислительно-восстановительных процессах:



Аскорбиновая кислота — нестойкое вещество — в водных растворах она легко разрушается; воздух, свет ускоряют ее окисление.

Каротиноиды. Это группа природных пигментов желтого или оранжевого цвета; по своей химической природе относится к тетра-терпенам (C₄₀H₆).

В растениях витамины А группы А отсутствуют, однако в них содержится каротин — провитамин А, который под влиянием ферментов превращается в организме в витамин А. Каротин в растениях может быть в форме трех изомеров: α-, β- и γ-каротина. Из них наиболее распространен β-каротин:



Каротин легко образует пероксиды, поэтому может окислять различные вещества. Каротины нерастворимы в воде, растворимы в жирных маслах, хлороформе, эфире, ацетоне, бензине и трудно растворимы в спирте. Неустойчивы на воздухе и свету.

§ 3. Качественное определение

Для обнаружения и идентификации витаминов в лекарственном сырье в основном используют хроматографические методы.

Учитывая разнообразное строение витаминов, методы количественного определения их различны. Для определения аскорбиновой кислоты используют титрометрические методы, каротинов — колориметрический метод, витамина Р (рутина) — хромато-спектрофотометрический метод (рассматривается в разделе «Флавоноиды»).

Методика хроматографического определения аскорбиновой кислоты в плодах шиповника (*Fructus Rosae*). В ступке измельчают 0,5 г плодов шиповника, заливают 5 мл воды, перемешивают, оставляют на 15 мин и фильтруют. Полученное извлечение наносят капилляром на пластинку (один капилляр), рядом как свидетель наносят чистую аскорбиновую кислоту; пластинку помещают в хроматографическую камеру — с системой растворителей этилацетат — ледяная уксусная кислота (80 : 20). Хроматографирование ведут ~ 20 мин (пробег растворителя ~ 13 см), после чего хроматограмму высушивают на воздухе.

Хроматограмму обрабатывают 0,04 % (или 0,001 н.) раствором 2,6-дихлорфенолиндифенолятом натрия в воде. Аскорбиновая кислота обнаруживается в виде белого пятна на розовом фоне.

Методика хроматографического определения каротиноидов в плодах рябины обыкновенной (*Fructus Sorbi*). 1 г измельченных плодов рябины заливают 5 мл хлороформа в колбе вместимостью 25 мл, экстрагируют 1,5 ч, после чего фильтруют и полученное извлечение наносят капилляром на пластинку, рядом наносят свидетель — β -каротин. Пластинку помещают в камеру с системой растворителей — циклогексан — эфир (80 : 20). Хроматографирование ведут ~ 20 мин (пробег растворителя ~ 13 см). После этого хроматограмму высушивают на воздухе.

Затем хроматограмму обрабатывают 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этиловом спирте. После прогрева пластинок при температуре 60—80 °С каротиноиды проявляются в виде пятен синего цвета на желто-зеленом фоне.

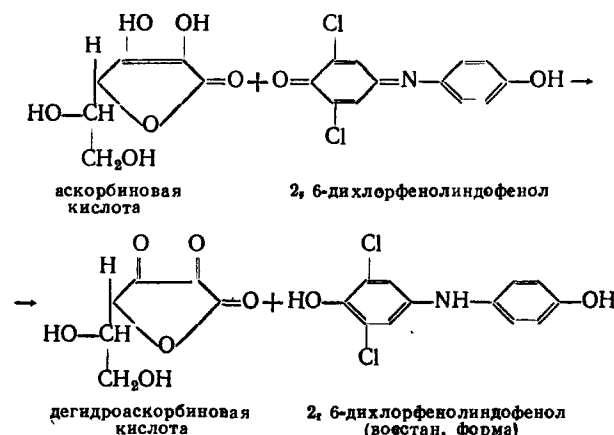
Приготовление реактива. 10 г фосфорномолибденовой кислоты добавляют к 100 мл этилового спирта, полученную суспензию нагревают и нерастворившуюся часть отфильтровывают.

Реактивы и оборудование: вода дистиллированная; аскорбиновая кислота; этилацетат; ледяная уксусная кислота; натрий 2,6-дихлорфенолиндофенолят; хлороформ; β -каротин; циклогексан; эфир; фосфорномолибденовая кислота; этиловый спирт 95%-ный (этанол).

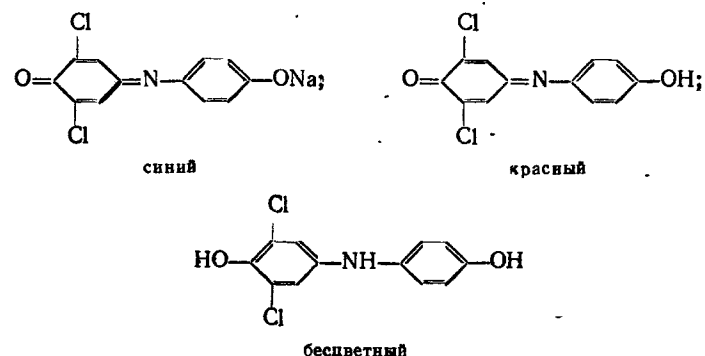
Хроматографическая пластинка «Силуфол»; вата гигроскопическая; бумага фильтровальная; весы ручные; ступка фарфоровая с пестиком; капилляры стеклянные; камера хроматографическая для ТСХ; пульверизатор; колбы вместимостью 25 мл; колбы конические вместимостью 150—200 мл; цилиндры мерные на 100 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5—10 см.

§ 4. Количественное определение

Методика количественного определения аскорбиновой кислоты в плодах шиповника (*Fructus Rosae*) (по ГФ X, ст. 293). Метод количественного определения аскорбиновой кислоты основан на способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол:



2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой — красную, а при восстановлении обесцвечивается:



20 г целых или 10 г очищенных плодов шиповника в ступке растирают со стеклянным порошком (около 5 г) при постепенном добавлении 300 мл дистиллированной воды. Настаивают 10 мин, затем размешивают, центрифугируют или фильтруют. В коническую колбу вместимостью 50—100 мл вносят 1 мл 2%-ного раствора HCl, затем 1 мл полученного извлечения и 13 мл воды и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 1/2—1 мин. Титрование должно проводиться не более 2 мин. В случае интенсивной окраски центрифугата или фильтрата или высокого содержания аскорбиновой кислоты (расход раствора 2,6-ди-

хлорфенолиндофенолята натрия более 2 мл), обнаруженного пробным титрованием, их разводят перед титрованием водой в два раза или более.

1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия соответствует 0,00088 г аскорбиновой кислоты.

Процентное содержание аскорбиновой кислоты (x) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{VF_0,00088V_1 \cdot 100}{mV_2(100 - w)},$$

где V — объем 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, мл; F — поправка на титр 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия; V_1 — объем извлечения, соответствующий всей навеске, мл; m — масса навески сырья, г; V_2 — объем извлечения, взятого для титрования, мл; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Приготовление 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята. 0,22 г 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 500 мл свежeproкипяченной и охлажденной воды при энергичном взбалтывании (для растворения навеску оставляют на ночь). Раствор фильтруют в мерную колбу и доводят объем раствора водой до 1 л. Срок годности раствора не более 7 сут при условии хранения в холодном, темном месте.

Установка титра. Несколько кристаллов (3—5) аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл 2%-ного раствора H_2SO_4 . Полученный раствор в количестве 5 мл титруют из микробюретки рабочим раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 1—2 мин. Другие 5 мл этого же раствора аскорбиновой кислоты титруют точно 0,001 н. раствором иодата калия в присутствии нескольких кристаллов (около 2 мг) иодида калия и 2—3 капель раствора крахмала до появления голубого окрашивания.

Поправочный коэффициент K вычисляют по формуле $K = V/V_1$, где V — объем точно 0,001 н. раствора иодата калия, пошедшего на титрование, мл; V_1 — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл.

Содержание аскорбиновой кислоты должно быть для цельного сырья не менее 1 % (ГФ X).

Реактивы и оборудование: вода дистиллированная; аскорбиновая кислота; натрий 2,6-дихлорфенолиндофенолят; HCl 2%-ная; H_2SO_4 2%-ная; калий иодид; калий иодат; крахмал (р-р).

Бумага фильтровальная; вата гигроскопическая; стеклянный порошок; весы ручные; ступка фарфоровая с пестиком; колбы конические вместимостью 50, 100, 500 мл; цилиндры мерные на 15, 50, 100 мл; колбы мерные вместимостью 1 л; стаканы химические вместимостью 300 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5—10 см; бюретки вместимостью 25 мл; пипетки измерительные вместимостью 25 мл.

Методика количественного определения каротина в плодах рябины обыкновенной (*Fructus Sorbi*). Метод основан на экстракции каротина органическими растворителями (ацетон, бензин), очистки от сопутствующих веществ методом хроматографической адсорбции. Количество каротина в очищенном растворе определяют колориметрически по интенсивности желтой окраски раствора сравнением его с раствором азобензола или раствором дихромата калия, который стандартизован по чистому каротину.

5—20 г измельченного сырья тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклянным порошком. Так как каротин

в кислой среде неустойчив, то для нейтрализации кислот при растирании добавляют немного карбоната натрия. После растирания в ступку постепенно прибавляют 10 мл ацетона и снова растирают материал. Затем содержимое ступки фильтруют под вакуумом, смывают ступку ацетоном и промывают материал на фильтре небольшими порциями ацетона до исчезновения окраски стекающего фильтрата. Ацетоновый экстракт переносят в делительную воронку. Чтобы перевести пигмент в бензин, к экстракту в делительной воронке добавляют 10—20 мл бензина и смесь тщательно перемешивают. Ацетон из смеси удаляют промыванием водой, добавляя ее в делительную воронку небольшими порциями и слегка встряхивая смесь. Промывные воды сливают, они не должны содержать растворимых в бензине пигментов.

Полностью освобожденный от ацетона бензиновый раствор сушат фильтрованием через безводный сульфат натрия. После этого хроматографической адсорбцией в бензиновом растворе отделяют каротин от хлорофилла, ксантофилла, ликопина и других пигментов.

На дно хроматографической колонки (диаметр 1—1,5 см, длина 15—20 см) плотно вставляют ватный тампон толщиной 1 см, который препятствует прохождению адсорбентов в приемник. Затем в колонку вносят небольшими порциями оксид алюминия, слегка уплотняя каждую порцию стеклянной палочкой. Длина столбика адсорбента в колонке должна составлять 5—7 см. Бензиновый раствор пигментов при слабом отсасывании пропускают через хроматографическую колонку (необходимо следить, чтобы на поверхности адсорбента постоянно был слой бензина, так как каротин окисляется под действием воздуха). Затем через колонку пропускают чистый бензин, пока весь каротин, отделяясь от других пигментов в виде желтой полосы, не пройдет в приемник. Каротин адсорбируется оксидом алюминия слабее других пигментов. Конец хроматографирования определяют по исчезновению желтой окраски вытекающего из колонки элюата. Бензиновый раствор каротина переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят бензином до метки. Так как химически чистый каротин нестойкое вещество, то при колориметрировании в качестве стандартного раствора используют раствор азобензола или раствор дихромата калия.

При колориметрировании в одну кювету наливают стандартный раствор, а в другую раствор каротина. Если раствор каротина получается слишком концентрированным, то рекомендуется перед колориметрированием разбавить его бензином.

Процентное содержание суммы каротиноидов вычисляют по формуле

$$x = \frac{K100Vh_1 \cdot 100}{mh_2(100 - w)},$$

где K — количество каротина в 1 мл стандартного раствора равно 0,00208 мг, если стандартный раствор — дихромат калия, и 0,00235 мг, если стандартный раствор — азобензол; V — объем бензинового раст-

вора каротина, мл; n_1 — оптическая плотность стандартного раствора; n_2 — оптическая плотность исследуемого раствора каротина; m — масса навески абсолютно сухого сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Приготовление стандартных растворов. Приготовление стандартного раствора азобензола: 0,145 г предварительно перекристаллизованного из этилового спирта и высушенного азобензола растворяют в 100 мл 95%-ного этилового спирта. Для работы основной раствор азобензола разбавляют в 10 раз: берут 10 мл основного раствора и доводят до метки 95%-ным этиловым спиртом в мерной колбе вместимостью 100 мл. Хранят раствор в темном месте.

Приготовление стандартного раствора дихромата калия: 0,360 г перекристаллизованного дихромата калия растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Реактивы и оборудование: азобензол; калия дихромат; ацетон; бензин; алюминия оксид (просеянный через сито с размером отверстий 0,25 мм); Na_2CO_3 ; Na_2SO_4 (безвод.).

Вата гигроскопическая; кварцевый песок или стеклянный порошок; ступка фарфоровая с пестиком; колба вместимостью 25 мл; воронки стеклянные для фильтрации диаметром 3—5 см; колонка хроматографическая; воронки делительные вместимостью 200 мл; колбы Бунзена; колбы мерные вместимостью 50, 100 и 1000 мл; цилиндры мерные на 50 мл; фотоэлектрокolorиметр ФЭК-М.

Вопросы для подготовки

1. Определение витаминов.
2. Классификация витаминов.
3. Физико-химические свойства витамина С и каротиноидов.
4. Растения, богатые витамином С и каротиноидами.
5. Методы обнаружения витамина С и каротиноидов в растительном сырье.
6. Количественное определение витамина С и каротиноидов.

Литература

- Гаммерман А. Ф. Курс фармакогнозии. — Л.: Медицина, 1967.
 Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. — М.: Медицина, 1974.
 Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: Медицина, 1977.
 Плещиков Б. П. Практикум по биохимии растений. — М.: Колос, 1968.
 Березовская Н. Н. О витаминах. — М.: Медицина, 1975.

ГЛАВА 2. ЭФИРНЫЕ МАСЛА

Эфирные масла (*Olea aetherea*) — смесь душистых летучих веществ, образующихся в растениях и относящихся к различным классам органических соединений, преимущественно терпеноидам (кислородные соединения терпенов), реже к ароматическим и алифатическим соединениям. Среди них встречаются углеводороды, спирты, кетоны, альдегиды, фенолы, лактоны, кислоты, простые и сложные эфиры и др.

Свое название эфирные масла получили благодаря наличию характерного ароматного запаха и маслообразной консистенции. В отличие от жирных масел они испаряются, не оставляя жирного пятна. Эфирные масла широко распространены в растительном мире. В настоящее время известно до 2500 эфирномасличных расте-

ний, относящихся к различным классам — от низших до покрытосемянных. При этом ряд семейств выделяется особенно большим числом эфирномасличных растений; это астровые (сложноцветные), яснотковые (губоцветные), сельдерейные (зонтичные), миртовые, лавровые, розоцветные и др.

Эфирные масла могут накапливаться в любых органах растений: цветках розы и лаванды, плодах сельдерейных и цитрусовых, листьях яснотковых, в подземных органах аира, ириса, девясила. Их содержание для различных растений составляет от тысячных долей процента до 5 %, а для некоторых видов, например бутонов гвоздичного дерева, — 20 %.

В растениях эфирное масло локализуется, как правило, в специальных образованиях. Различают экзогенные и эндогенные образования.

Экзогенные: а) эфирномасличные железки, которые имеют разное строение; б) железистые волоски; в) железистые пятна.

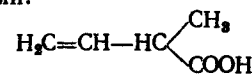
Эндогенные: а) эфирномасличные вместилища; б) эфирномасличные каналы; в) секреторные ходы; г) специализированные паренхимные клетки.

§ 1. Классификация

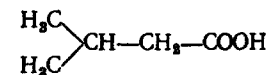
В зависимости от количества изопреновых звеньев

($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) терпеноиды делятся на: 1) полутерпены C_8H_8 ; 2) монотерпены $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$; 3) сесквитерпены $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$.

Полутерпены C_8H_8 . В основном представлены кислотами и альдегидами:



тигелиновая кислота

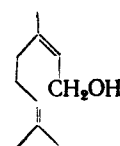


изовалериановая кислота

Кислоты обычно входят в состав сложных эфиров, т. е. связаны с различными спиртами, например борнилизовалерианат — в эфирном масле валерианы.

Монотерпены $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$. Алифатические монотерпены представляют собой главную, наиболее ценную часть эфирного масла таких растений, как роза, герань, лаванда, жасмин, цитрусовые. Эфирные масла обладают тонким приятным запахом и применяются в парфюмерии.

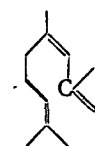
В состав эфирного масла часто входят также сложные эфиры гераниола и линалоола с органическими кислотами, такими, как уксусная, изовалериановая, реже масляная, капроновая и др.:



гераниол



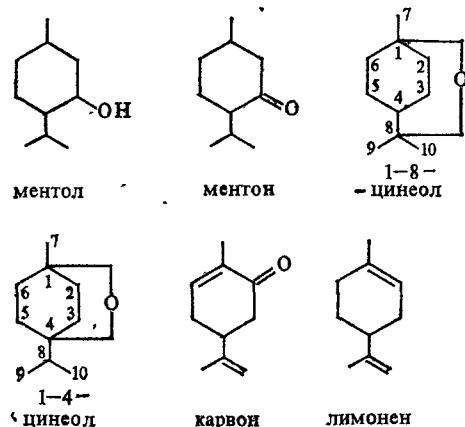
линалоол



цитраль

Циклические монотерпены — это наиболее широко распространенная группа терпенов и, как правило, количественно преобладающая в эфирных маслах многих растений.

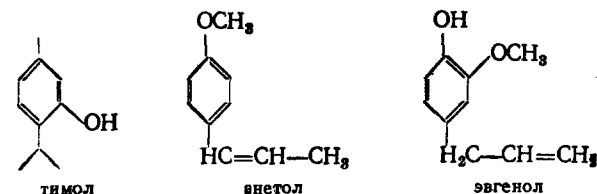
Моноциклические монотерпены используются как ценные лекарственные средства в индивидуальном виде (ментол) или являются основными компонентами ряда эфирных масел. Ментол и его кетон ментон содержатся в эфирном масле мяты перечной. Цинеол содержится в эфирном масле листьев эвкалипта, шалфея лекарственного, соцветий цитварной полыни. Цинеол встречается в виде двух изомеров (1—8 и 1—4). Карвон — главный компонент эфирного масла плодов тмина. Лимонен содержится в эфирном масле лимона, сосны и др.:



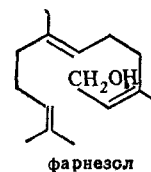
Дидициклические монотерпены; из них наибольшую ценность представляют следующие соединения: камфора, борнеол, пинен. Камфора — главный компонент эфирного масла камфорного лавра, камфорного базилика, некоторых видов полыни и др. Борнеол обычно встречается в виде сложных эфиров с уксусной (пихта), изовалериановой (валериана) и другими кислотами. Пинен — главный компонент скипидара (сосна), имеющего широкое применение в медицине. Пинен используется в органическом синтезе и технике. Туйон и туйол содержатся в эфирном масле полыни горькой, пижмы обыкновенной, шалфея лекарственного, туйи и других растениях. Туйол обладает ядовитыми свойствами:



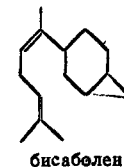
Ароматические соединения, как правило, обладают сильным бактерицидным свойством, что находит использование в медицинской практике. Тимол содержится в эфирном масле ажгона, тимьяна, чабреца, душицы и других растений. Анетол — главный компонент эфирного масла плодов аниса, фенхеля. Эвгенол содержится в эфирном масле гвоздики, эвгенольного базилика, эвгенольной камелии и др.:



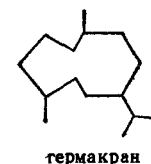
Сесквитерпены — $C_{15}H_{24}$. **Алифатические** сесквитерпены входят в состав эфирного масла липы:



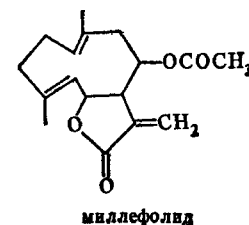
Моноциклические сесквитерпены. Тип бисаболана. Бисаболен содержится в эфирном масле ромашки, липы и других растениях:



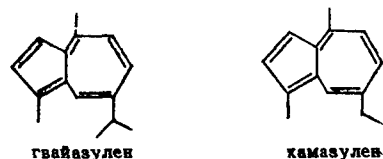
Тип гермакрана:



Представителем является миллефолид, который содержится в тысячелистнике:

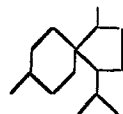


Бициклические сесквитерпены. Тип гваяна:

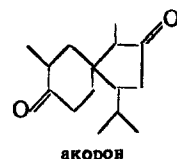


Хамазулен содержится в эфирном масле ромашки аптечной, тысячелистника обыкновенного, гваязулен — в эвкалипте.

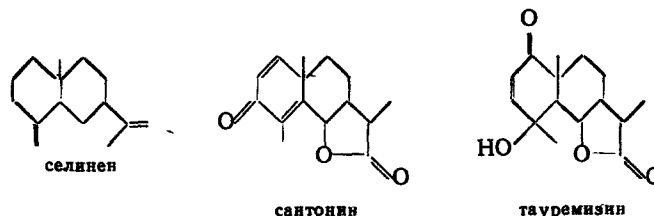
Тип акорана:



Его дикетон — акорон содержится в эфирном масле аира:



Тип эвдесмана (селинена):



Сантонин содержится в полыни цитварной, тауремизин — в полыни таврической.

§ 2. Физико-химические свойства

Эфирные масла представляют собой бесцветные, реже различно окрашенные жидкости (например, коричневое эфирное масло — темно-коричневое; тимьянное — красноватое; эфирное масло тысячелистника и ромашки — ярко-синее; аира — желтоватое). Они обладают специфическим запахом и вкусом. Большинство эфирных масел легче воды, и лишь некоторые из них (эфирное масло гвоздики, корицы) имеют плотность более единицы.

Под влиянием кислорода воздуха и света многие эфирные масла изменяются, постепенно окисляясь, меняют цвет (темнеют) и запах. Некоторые эфирные масла загустевают после отгонки или при хранении.

Эфирные масла мало, очень мало или практически нерастворимы в воде, но при взбалтывании с водой придают ей запах и вкус. Они растворимы в жирных и минеральных маслах, спирте, эфире и других органических растворителях.

Температура кипения эфирных масел колеблется в пределах от 140 до 260 °С; они оптически активны, имеют определенную температуру застывания и коэффициент рефракции. Реакция масел нейтральная или кислая, в зависимости от их состава.

При охлаждении ряда эфирных масел, а иногда и при комнатной температуре некоторые компоненты выкристаллизовываются (анетол, ментол, тимол, камфора). Твердую часть эфирных масел принято называть стеароптен, жидкую часть — элеоптен.

§ 3. Методы получения

Перегонка. 1. Для получения эфирного масла из растительного сырья используют метод перегонки с водяным паром, основанный на физическом законе парциального давления — две несмешивающиеся жидкости, нагреваемые вместе, закипают при температуре ниже точки кипения каждой жидкости в отдельности, и на свойствах эфирного масла — летучести и практической нерастворимости в воде. Пары воды из парообразователя, проходя через растительный материал, увлекают эфирное масло, которое конденсируется в холодильнике и собирается в приемник.

2. В некоторых случаях для получения эфирного масла применяют перегонку с водой. Этот метод требует менее сложной аппаратуры, но дает меньший выход масла, качество которого может снижаться за счет подгорания сырья.

3. Перегонка с перегретым паром при повышенном давлении.

4. Перегонка при пониженном давлении. Уменьшение давления позволяет снизить температуру перегонки и тем самым сохранить составные части эфирных масел в неизменном виде.

Во всех случаях перегонки эфирных масел с водяным паром получается дистиллят, который собирается в приемник и отстаивается. Эфирные масла с плотностью меньше единицы собираются в верхней части приемника над водой. В случае перегонки эфирных масел с плотностью больше единицы оно собирается под водой.

Экстрагирование. Применяется, как правило, в парфюмерии для получения эфирных масел, ценные компоненты которых разлагаются при перегонке.

1. Эфирные масла извлекают из сырья низкокипящими растворителями (эфиром, хлористым метилом), а также сжиженным газом (пропаном, бутаном). Растворитель легко удаляется, остаток подвергается очистке.

2. Эфирные масла извлекают жирным маслом при $t = 50-70$ °С, из которого эфирное масло можно извлечь спиртом.

Прессование (выжимание). Используется для получения эфирных масел из сырья, где оно содержится в крупных вместилищах в больших количествах, например из околоплодников citrusовых.

§ 4. Анализ растительного сырья

Количественное определение эфирного масла в сырье проводят объемным методом. По ГФ X определение эфирного масла проводят перегонкой с водяным паром из растительного сырья с последующим измерением его объема. Перегонку проводят в колбе с обратным холодильником. По методу 1 приемник укрепляют внутри колбы; по методу 2а и 2б приемник располагается вне колбы. Методом 2б пользуются, когда эфирные масла при перегонке претерпевают изменения (образуют эмульсию или легко загустевают) или имеют плотность больше или близкую единице. Отгонку проводят с использованием декалина, который поглощает эфирное масло.

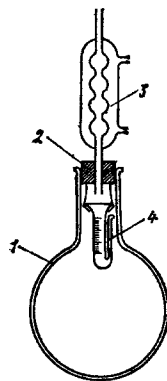


Рис. 1. Прибор для определения эфирного масла в растительном сырье по методу 1 ГФ X:

1 — колба; 2 — резиновая пробка; 3 — холодильник; 4 — градуированный приемник

Методики количественного определения эфирного масла. Количественное определение эфирного масла в лекарственном растительном сырье проводят по ГФ X с. 816—818 (методы 1, 2а, 2б). Навеска сырья, степень измельчения, время перегонки и метод, которым следует проводить определение, указываются в соответствующих частных статьях на растительное сырье.

Метод 1. Определение проводят в приборе (рис. 1). Навеску измельченного сырья помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу 1 вместимостью 700—800 мл, приливают 300 мл воды и закрывают резиновой пробкой 2 с обратным холодильником 3. В пробке снизу укрепляют металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивают градуированный приемник 4 так, чтобы конец холодильника находился точно над воронкообразным расширением приемника, не касаясь его. Цена деления градуированной части приемника 0,025 мл. Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенки горла, и отстоять от уровня воды не менее чем на 50 мм. Колбу с содержимым нагревают до кипения и слабо кипятят в течение времени, указанного в соответствующих статьях для каждого вида сырья.

Пары воды и эфирного масла конденсируются в холодильнике и жидкость стекает в приемник. Масло отстаивают в градуированном колене приемника, а вода через меньшее колено приемника вытекает обратно в колбу.

После окончания перегонки и охлаждения отсчитывают объем отстоявшегося слоя эфирного масла и вычисляют его процентное содержание x по формуле

$$x = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - w)},$$

где V — объем эфирного масла, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Для определения методами 2а и 2б используют прибор (рис. 2), состоящий из колбы 1 для перегонки вместимостью 1000 мл, паропроводной изогнутой трубки 2, холодильника 3, градуированного приемника 4, оканчивающегося внизу краном 5 и сливной трубкой 9. Между холодильником и приемником имеется расширение 6 с боковой трубкой 7, которое служит для внесения растворителя в дистиллят.

Перед каждым определением прибор очищают пропусканием пара в течение 15—20 мин. После 6—8 определений прибор промывают последовательно ацетоном и водой.

Метод 2а. Навеску измельченного растительного сырья помещают в колбу 1, приливают 300 мл воды, колбу соединяют через шлиф с паропроводящей трубкой и заполняют водой градуированную трубку через кран при помощи шланга, оканчивающегося воронкой. Содержимое колбы нагревают до бурного кипения и кипятят с интенсивностью, при которой скорость стекания дистиллята должна быть 60—65 капель в 1 мин в течение времени, указанного в соответствующих статьях для каждого вида сырья. Через 5 мин после окончания перегонки замеряют объем эфирного масла в градуированной части приемника. Для этого открывают кран и спускают часть дистиллята до уровня делений градуированной трубки.

Процентное содержание эфирного масла вычисляют, как указано в методе 1.

Метод 2б. Навеску измельченного растительного сырья помещают в колбу 1, приливают 300 мл воды, колбу соединяют через шлиф с паропроводящей трубкой и заполняют водой градуированную трубку через кран при помощи резинового шланга, оканчивающегося воронкой. Затем через воздушную трубку 7 при помощи пипетки приливают в приемник 0,5 мл декалина и точно замеряют объем взятого декалина, опуская уровень жидкости в градуированную часть трубки приемника. Далее поступают, как описано в методе 2а.

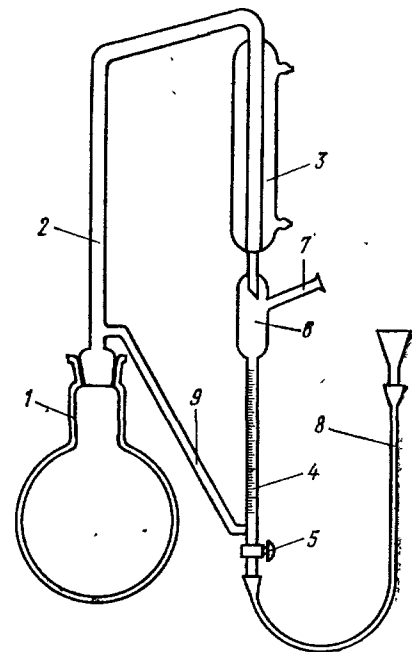


Рис. 2. Прибор для определения эфирного масла в растительном сырье по методу 2а и 2б ГФ X:

1 — колба; 2 — паропроводная изогнутая трубка; 3 — холодильник; 4 — градуированный приемник; 5 — спусковой кран; 6 — расширение приемника; 7 — боковая трубка приемника; 8 — резиновый шланг; 9 — сливная трубка

Объем декалина вычитают из объема раствора масла в декалине и вычисляют содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах x по формуле

$$x = \frac{(V - V_1) \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - w)},$$

где V — объем раствора эфирного масла в декалине, мл; V_1 — объем декалина, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

§ 5. Анализ эфирного масла

При исследовании эфирного масла определяют его подлинность, отсутствие примесей и числовые показатели — плотность, угол вращения, кислотное число, эфирное число до и после ацетилирования (ГФ X, с. 481).

Подлинность испытуемого масла устанавливают, определяя цвет, запах и вкус масла.

Цвет (и прозрачность) устанавливают, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного бесцветного стекла диаметром 2—3 см, наблюдая в проходящем свете.

Запах определяют следующим образом: 0,1 мл (2 капли) масла наносят на полоску фильтровальной бумаги длиной около 12 см и шириной 5 см так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и сравнивают запах испытуемого образца через каждые 15 мин с запахом контрольного образца, нанесенного таким же образом на фильтровальную бумагу. В течение 1 ч запах должен быть одинаков с запахом контрольного образца.

Вкус устанавливают, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей масла или крупинку смеси 1 г сахарной пудры с 1 каплей испытуемого масла.

Температуру застывания определяют в специальном приборе, состоящем из сосуда с охлаждающей смесью, в который помещают пробирку с испытуемым маслом. Высота слоя масла должна составлять не менее 5 см. С помощью термометра отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной с момента застывания вещества, и принимают ее за температуру застывания.

Определение примесей. Спирт этиловый. Несколько капель испытуемого масла наносят на воду, налитую на часовое стекло, и наблюдают на черном фоне; не должно быть заметного помутнения вокруг капли масла.

1 мл испытуемого масла наливают в пробирку, закрывают рыхлым комочком ваты, в середине которого помещают кристалл фуксина, подогревают до кипения; при наличии спирта его пары растворяют фуксин, окрашивая вату в красный цвет.

Жирные и минеральные масла. 1 мл эфирного масла взбалтывают в пробирке с 10 мл 90%-ного этилового спирта; не должно появляться мути и жирных капель.

Вода. Содержание воды устанавливают методом дистилляции по ГФ X, с. 760.

Числовые показатели. Плотность эфирного масла определяют пикнометром по ГФ X, с. 772.

Угол вращения плоскости поляризации определяют в поляриметре. В зависимости от природы вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, вращение плоскости поляризации происходит вправо (по движению часовой стрелки), то вещество называют правовращающим и перед названием ставят индекс d или знак «+», если же вращение плоскости поляризации происходит влево (против часовой стрелки), то вещество называют левовращающим и перед названием ставят индекс l или знак «—». Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой α . Обычно определение оптического вращения проводят при $t = 20^\circ\text{C}$ и длине волны линии спектра натрия (589,3 нм).

Поляриметрическую трубку наполняют исследуемым маслом так, чтобы в нее не попал воздух, и помещают в полярископ. Вращением алидады находят такое положение, чтобы при самом незначительном повороте резкая тень заменялась хорошо освещенным полукругом и наоборот. Между этими двумя положениями устанавливают среднее положение полутени, когда все поле зрения освещено ровно, закрепляют алидаду и отсчитывают угол вращения.

Для *Oleum Menthae piperitae* угол вращения должен быть не менее -18° , для *Oleum Eucalypti* — от 0 до $+10^\circ$.

Показатель преломления определяют в рефрактометре. Показателем преломления называют отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Показатель преломления зависит от природы вещества, температуры и длины волны света.

Рефрактометр имеет две призмы, одна из которых (верхняя) может приподниматься. Перед проведением измерения на нижнюю призму рефрактометра наносят 1—2 капли жидкости, после чего опускают верхнюю призму и плотно ее прижимают. Пучок света с помощью зеркала направляют в верхнее окошко призмы. Вращая рукоятку, совмещают три черточки, нанесенные по диаметру круга, с границей светотени. Вращением ручки компенсатора добиваются совпадения границы темной и светлой частей поля с тремя черточками. Отсчет показателя преломления производится по левой шкале с точностью до четвертого знака.

Время от времени рефрактометр необходимо проверять с помощью воды, имеющей показатель преломления 1,3330 при 20°C .

Для *Oleum Menthae piperitae* показатель преломления должен быть 1,459 — 1,470; для *Oleum Eucalypti* 1,458—1,470.

Кислотное число — это количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации свободных кислот в 1 г исследуе-

мого вещества. Обычно количество кислот в эфирном масле незначительно, но при длительном хранении в результате окислительных процессов количество кислот увеличивается.

Пробу эфирного масла 1,5—2,0 г, взятую с точностью до 0,01 г, растворяют в 5 мл 95%-ного этилового спирта, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину 0,1 н. NaOH (если нужно, нагревают с обратным холодильником на водяной бане до полного растворения). Прибавляют 1 мл раствора фенолфталеина и титруют при постоянном перемешивании 0,1 н. NaOH до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. 1 мл 0,1 н. NaOH соответствует 5,61 мг КОН. Кислотное число вычисляют по формуле

$$\text{кислотное число} = \frac{V \cdot 5,61}{m},$$

где V — объем 0,1 н. NaOH, израсходованный на титрование, мл;
 m — масса навески эфирного масла, г.

Эфирное число. Эфирным числом называют количество миллиграммов КОН, необходимое для омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Эфирное число определяют в растворе, полученном после определения кислотного числа. К этому раствору прибавляют 20 мл 0,5 н. спиртового раствора КОН и нагревают на водяной бане в колбе с воздушным холодильником (диаметр трубки 1 см, длина 100 см) в течение 1 ч, считая с момента закипания. По окончании омыления раствор разбавляют 100 мл воды и избыток КОН титруют 0,5 н. H_2SO_4 (индикатор — фенолфталеин).

Эфирное число X вычисляют по формуле

$$X = \frac{28,05V}{m},$$

где V — объем 0,5 н. КОН, пошедший на омыление эфиров, мл;
 m — масса навески масла, г; 28,05 — масса КОН, мг, содержащегося в 1 мл его 0,5 н. спиртового раствора.

Эфирное число после ацетилирования — количество миллиграммов КОН, необходимое для омыления суммы сложных эфиров, содержащихся первоначально в 1 г масла и образовавшихся при ацетилировании. Определение проводят следующим образом.

10 г масла помещают в специальную колбу для ацетилирования с пришлифованным воздушным холодильником, приливают 10 мл уксусного ангидрида и прибавляют около 2 г безводного ацетата натрия. Смесь кипятят на песчаной бане в течение 2 ч. После охлаждения прибавляют 20 мл воды и вновь нагревают на водяной бане при частом взбалтывании в течение 10—15 мин для превращения не вошедшего в реакцию уксусного ангидрида в уксусную кислоту. Затем смесь переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и отделяют слой масла, который затем промывают при взбалтывании 50 мл насыщенного раствора NaCl (в несколько приемов) до

нейтральной реакции промывных вод (индикатор — метиловый оранжевый). Затем масло промывают 20 мл воды для удаления следов NaCl. Промытое масло обезвоживают безводным Na_2SO_4 и фильтруют.

1—2 г полученного эфирного масла (с погрешностью не более 0,01 г) взвешивают в конической колбе, растворяют в 5 мл этилового спирта, нейтрализуют 0,5 н. спиртовым раствором КОН и определяют эфирное число как описано выше, применяя для расчета ту же формулу.

Содержание сложных эфиров или связанных спиртов x_1 (процентное содержание) вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{\text{эфирное число} \cdot M}{561},$$

где M — молекулярная масса эфира или спирта.

Содержание свободных спиртов x_2 (процентное содержание) находят:

$$x_2 = \frac{(\text{эфирное число после ацетилирования} - \text{эфирное число}) M}{561 - 0,42 (\text{эфирное число после ацетилирования} - \text{эфирное число})}.$$

Общее содержание спиртов x_3 выражают суммой связанных и свободных спиртов.

Содержание фенолов определяют следующим образом: в кассиёву колбу вместимостью 200—250 мл с шейкой, градуированной на 10 мл (с погрешностью до 0,01 мл), вносят пипеткой 5 мл испытуемого масла и 150 мл 5%-ного NaOH и взбалтывают в течение 15 мин. Отстоявшееся масло вводят в градуированную шейку колбы прибавлением такого же раствора NaOH. Через 1 ч отсчитывают количество непрореагировавшего масла.

Процентное содержание фенолов x_4 вычисляют по формуле

$$x_4 = (5 - V) 20,$$

где V — объем масла, не прореагировавшего с раствором NaOH, мл (температура масла при внесении в колбу и при отсчете должна быть одинакова).

Одним из новых методов определения компонентов эфирных масел является газожидкостная хроматография.

Газожидкостная хроматография основана на разделении веществ между двумя несмешивающимися фазами, из которых одна неподвижная — жидкость, а другая подвижная — газ. Неподвижная фаза — это высокомолекулярная жидкость (полиэтиленгликоль, бальзам Шостаковского и др.) предварительно наносится на твердый носитель (хромосорб и т. д.). В качестве подвижной фазы используется один из инертных газов: гелий, водород, азот. Основной частью хроматографа служит колонка, заполненная неподвижной фазой, через которую движется газ-носитель. Разделение веществ происходит за счет разности растворимости K веществ в жидкости и газе.

Основные параметры газожидкостного хроматографа: длина и диаметр колонки; фазы — подвижная и неподвижная; твердый носитель; детектор; температура испарителя, колонки и детектора; скорость газа-носителя и диаграммной ленты.

Количественное определение окрашенных компонентов эфирного масла — азуленов — проводят методом фотоэлектроколориметрии. Содержание азуленовых производных устанавливают по калибровочному графику, построенному с помощью раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Количество цинеола в эфирном масле устанавливают после предварительного извлечения сырья гексаном с последующим определением оптической плотности на приборе ИКСФ-м. Аналитическая полоса поглощения при 990^{-1} см. Количество цинеола определяют по калибровочной кривой.

Для количественного определения компонентов эфирного масла, имеющих кетогруппу (типа камфоры), используют кислотно-щелочное титрование продуктов оксимирования, либо определяют оптическую плотность продуктов взаимодействия полученных оксимонов с солями трехвалентного железа на ФЭК.

Кроме того, для идентификации компонентов эфирного масла используют также методы УФ, ИК и ПМР спектроскопии.

Методика количественного определения ментола в мятном масле — *Oleum Menthae piperitae* (ГФ Х, с. 488). В колбе для омыления с пришлифованной пробкой взвешивают 1 г (с погрешностью до 0,01 г) мятного масла. К навеске приливают точно 4 мл (автоматическая пипетка) ацетилирующей смеси, закрывают пробкой и оставляют на 1 ч. Затем к колбе присоединяют пришлифованный обратный холодильник и смесь подогревают на кипящей водяной бане. Добавляют 20 мл воды (50—60 °С), перемешивают, приливают автоматической пипеткой 20 мл 0,5 н. NaOH и дотитровывают из бюретки таким же раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления слабо-розового окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. Процентное содержание свободного ментола x вычисляют по формуле

$$x = \frac{(V - V_1) 156,26}{20m},$$

где m — масса навески эфирного масла, г; V — объем 0,5 н. NaOH, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; V_1 — объем 0,5 н. NaOH, израсходованного на титрование пробы с навеской, мл.

Содержание свободного ментола должно быть не менее 46 %.

Методика количественного определения ментола в мятном масле методом газожидкостной хроматографии. Анализ проводят в лабораторном газовом хроматографе ГХМ-72 на s-образных насадочных колонках длиной 3 м с внутренним диаметром 4 мм. Твердый носитель — хромосорб W (60—80 меш), неподвижная фаза — полиэтиленгликоль, газ-носитель — гелий, в качестве детектора — ката-

рометр. Температура в термостате 200 °С, в испарителе 250, в колонке 130 °С.

В испаритель вводят 0,4 мкл мятного масла. Скорость газа-носителя 80 мл/мин, скорость диаграммной ленты 20 мм/мин. Масштаб записи 1:2.

На хроматограмме (рис. 3) обнаруживается 2 пика, соответствующих разным компонентам мятного масла. Качество масла оценивается по времени удерживания отдельных компонентов. Для идентификации компонентов к пробе масла добавляют чистый ментол и проба вновь вводится в колонку.

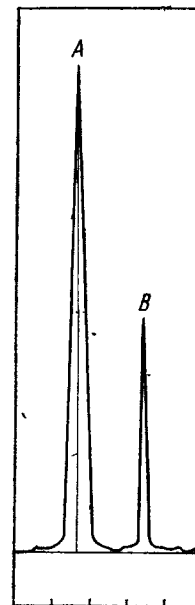


Рис. 3. Хроматограмма эфирного масла мяты перечной:

A — ментол; B — ментон

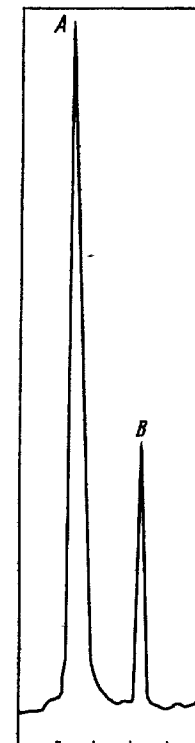


Рис. 4. Хроматограмма эфирного масла мяты перечной после подкалывания:

A — ментол; B — ментон

На хроматограмме (рис. 4) высота пика A увеличивается пропорционально введенному ментолу, следовательно, пик соответствует ментолу.

Расчет процентного содержания компонентов мятного масла проводят по формуле

$$x_A = \frac{S_A 100}{S_A + S_B},$$

где S_A , S_B — площадь пика, равная произведению высоты пика

на его ширину на половине высоты; x_d — процентное содержание ментола.

Методика количественного определения цинеола в эвкалиптовом масле (ГФ X, с. 486). В кассиеву колбу вместимостью 100 мл с шейкой, градуированной на 4 мл с погрешностью до 0,1 мл, вносят 3 мл испытуемого масла и 75 мл раствора резорцина. Смесь взбалтывают в течение 15 мин и после отстаивания доливают такое количество раствора резорцина, чтобы отстоявшееся масло собралось в градуированную часть колбы. Спустя 1 ч отсчитывают объем непрореагировавшего масла. Отмеривание масла для анализа и отсчет непрореагировавшего масла производят при одинаковой температуре. Процентное содержание цинеола по объему x вычисляют по формуле

$$x = \frac{(3 - V) 100}{3},$$

где V — количество непрореагировавшего масла, мл.

Содержание цинеола должно быть не менее 60 % по объему.

Методика количественного определения цинеола в эвкалиптовом масле методом газожидкостной хроматографии. Анализ проводят в лабораторном газовом хроматографе ГХМ-72 на s -образных насадочных колонках длиной 3 м с внутренним диаметром 4 мм. Твердый носитель — хромсорб W (60—80 меш), неподвижная фаза — полиэтиленгликоль, газ-носитель — гелий, в качестве детектора — катарометр. Температура в термостате 200 °C, в испарителе 250, в колонке 120 °C.

В испаритель вводится 0,5 мкл эвкалиптового эфирного масла. Скорость гелия 30 мл/мин, скорость диаграммной ленты 240 мм/ч. На хроматограмме обнаруживается 3 пика (рис. 5). Расчет количественного содержания цинеола — пик А, проводят по формуле

$$x_A = \frac{S_A 100}{S_A + S_B + S_C},$$

Рис. 5. Хроматограмма эфирного масла эвкалипта:

А — цинеол

где S_A, S_B, S_C — площадь пика, равная произведению высоты пика на его ширину на половине высоты; x_A — процентное содержание цинеола.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); декалин; резорцина раствор; КОН 0,5 н. раствор в этиловом спирте; NaOH 0,1 н.; фенолфталеин; натрия ацетат безводный; уксусный ангидрид; фуксин; метиловый оранжевый; ментол синтетический чистый.

Колбы конические вместимостью 100 и 250 мл; колбы широкогорлые вместимостью 800 мл; колба с притертой пробкой вместимостью 100 мл; колба круглодонная с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; бюретки вместимостью

25 мл; эксикатор; стекла часовые; сетки асбестовые; пробирки стеклянные; бумага фильтровальная; весы лабораторные аналитические; рефрактометр; поляриметр; набор трубок для поляриметра длиной 5—20 см; термометр ртутный стеклянный лабораторный с делением на 0,5 °C; пикнометр Реньо (или микропикнометр); весы ручные до 100 г; прибор для определения эфирного масла по методу 1 ГФ X; прибор для определения эфирного масла по методу 2а и 2б ГФ X; лабораторный хроматограф ГХМ-72; бани водяные лабораторные; ступки фарфоровые и металлические с пестиком; цилиндры на 100 и 1000 мл; холодильник (обратный) стеклянный лабораторный с нормальным шлифом.

Вопросы для подготовки

1. Определение эфирных масел.
2. Классификация эфирных масел (примеры формул из каждой группы).
3. Физические свойства эфирных масел.
4. Что такое «стеароптен» (примеры формул)?
5. Какие числовые показатели определяются с целью установления подлинности и доброкачественности эфирных масел?
6. Как определить в эфирном масле примесь спирта, жирного масла?
7. Семейства, представители которых богаты эфирным маслом.
8. Локализация эфирных масел у растений семейств сельдерейных, яснотковых, астровых, рутовых.
9. Условия сушки и хранения растительного сырья, содержащего эфирные масла.
10. Использование эфирномасличного сырья.
11. Методы получения эфирного масла из растительного сырья.
12. Сущность методов количественного определения эфирного масла по ГФ X. Для каких видов сырья количественное определение эфирного масла проводят методом 2б (ГФ X)?
13. Устройство приемника в приборах для количественного определения эфирного масла по методу 1, 2а и 2б (ГФ X).
14. Методы количественного определения эфирного масла и идентификация его отдельных компонентов.
15. Формулы: линалоола, ментола, цинеола, тимола, анетола, туйона, туйола, камфоры, борнеола, борнилацетата, хамазулена, матрицина, пинена. В каких растениях они содержатся (русские и латинские названия).

Литература

- Гаммерман А. Ф. Курс фармакогнозии. — Л.: Медицина, 1967.
 Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г. Руководство к практическим занятиям по газожидкостной хроматографии. — М.: 1978.
 Зенин В. С. — ХПС, № 1, 1975.
 Пигулевский Г. Ф. Терпеноиды и кумарины. — М.: Наука, 1965.

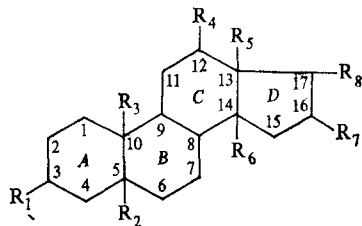
ГЛАВА 3. СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ

Сердечными гликозидами называются гликозиды, агликоном которых являются производные циклопентано-пергидрофенантрена, содержащие в положении 17 ненасыщенное пятичленное или шестичленное лактонное кольцо и оказывающие специфическое действие на сердечную мышцу. Сердечные гликозиды пока не имеют себе равных синтетических заменителей; растения служат единственным источником их получения. Действие сердечных гликозидов проявляется в изменении всех основных функций сердца. Под влиянием терапевтических доз сердечных гликозидов наблюдается:

а) усиление систолических сокращений сердца, длительность систолы уменьшается; б) удлинение диастолы, ритм сердца замедляется, улучшается приток крови к желудочкам; в) понижение возбудимости приводящей системы сердца, удлиняется промежуток между сокращениями предсердий и желудочков.

Характеристика агликона. В основе строения агликонов сердечных гликозидов лежит циклопентанопергидрофенантроновая система, полностью или частично гидрированная. Кольца А/В могут иметь как *цис*-, так и *транс*-сочленение. Относительно кольца В кольцо С всегда занимает *транс*-положение. А кольца С/Д в отличие от других природных стероидов имеют всегда *цис*-сочленение.

У агликонов сердечных гликозидов могут быть заместители у 3, 5, 10, 12, 13, 14, 16 углеродных атомов, а в положении 17 находится ненасыщенное лактонное кольцо:



R_1 —ОН; R_2 —ОН,—Н; R_3 —CH₃,—C(=O)—CH₂ОН; R_4 —ОН,—Н; R_5 —CH₃; R_6 —ОН;
 R_7 —ОН,—Н; R_8 —ненасыщенное лактонное кольцо

Кроме того, гидроксильные группы могут находиться в положениях 1, 2, 11, 15. Гидроксил при C₁₆ в некоторых агликонах может быть этерифицирован муравьиной, уксусной или изовалериановой кислотами. Выделены из растений также агликоны сердечных гликозидов, содержащие в стероидной части молекулы двойные С=С-связи, кетогруппы, эпоксидные кольца.

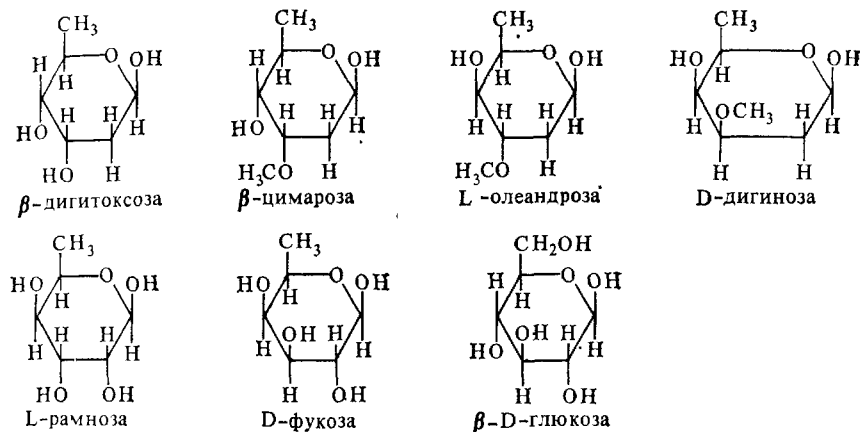
Заместители у C₃ находятся в α -положении, у C₅ и C₁₄ — в *цис*-положении, лактонное кольцо может находиться в α - и β -положении.

Биологическая активность сердечных гликозидов зависит от стереохимического строения гликозидов. Активны только те гликозиды, у которых кольца А/В имеют *цис*-сочленение.

Специфическое действие веществ этой группы на сердечную мышцу обусловлено наличием в их молекуле ненасыщенного лактонного кольца. Любые изменения в структуре лактонного кольца ведут к потере этими веществами характерного сердечного действия. Такими изменениями могут быть: 1) расщепление лактонного кольца под действием щелочи; 2) образование при гидрировании гидролактона.

Строение сахарного компонента. Сахарные компоненты присоединяются к агликону за счет спиртового гидроксила в положении 3. Длина сахарной цепочки у различных гликозидов разная — от одной молекулы до нескольких.

В составе сердечных гликозидов обнаружено до 30 различных сахаров, причем большинство из них (кроме глюкозы, фруктозы и рамнозы) сахара, специфические для сердечных гликозидов, в других веществах растительного происхождения они не встречаются. Характерная особенность специфических сахаров, входящих в состав сердечных гликозидов, та, что они обеднены кислородом, т. е. относятся к дезоксисахарам. Это 6-дезоксидеоза, 2,6-дидезоксигексозы, которые, кроме того, часто содержат метоксильные или ацетильные группы в различных положениях, например дигитоксоза, цимароза, олеандроза, дигиноза и др.:

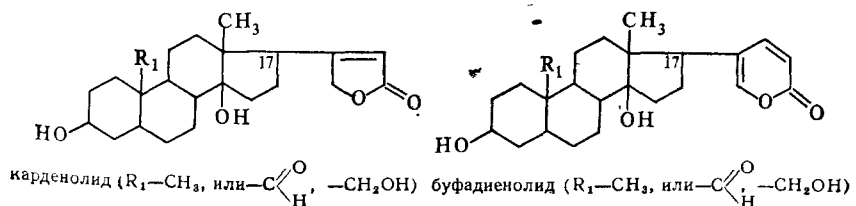


Углеводные компоненты природных сердечных гликозидов построены линейно, к агликону присоединяются сначала дезоксисахара, а концевым моносахаридом служит глюкоза.

Биологическая активность сердечных гликозидов зависит от числа групп —CH₃ и особенно —ОН у углеродных атомов «скелета». С увеличением числа гидроксильных групп повышается полярность соединения и, естественно, растворимость в воде. По кардиотоническому действию агликоны мало отличаются от исходных сердечных гликозидов, но быстро инактивируются в печени.

§ 1. Классификация

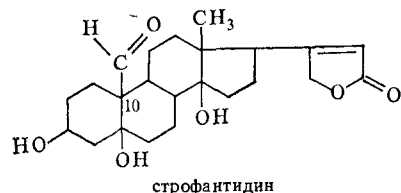
В зависимости от строения ненасыщенного лактонного кольца все природные сердечные гликозиды делятся на две группы: с пятичленным лактонным кольцом — карденолиды, и шестичленным лактонным кольцом — буфадиинолиды:



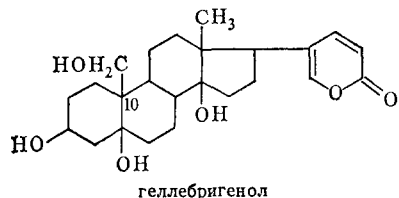
В зависимости от заместителя в положении 10 карденолиды подразделяются на три подгруппы. Первая подгруппа — подгруппа наперстянки; к ней относятся гликозиды, агликоны которых в положении 10 имеют метильную группу ($-\text{CH}_3$). Гликозиды этой подгруппы медленно всасываются и медленно выводятся из организма, обладают кумулятивным действием:



Вторая подгруппа — подгруппа строфанта включает сердечные гликозиды, агликон которых в положении 10 имеет альдегидную группу ($-\text{C}(=\text{O})\text{H}$). Эти гликозиды быстро выводятся из организма, не обладают кумулятивным действием:



Третья подгруппа объединяет сердечные гликозиды, имеющие в положении 10 спиртовую группу ($-\text{CH}_2\text{OH}$):



Сердечные гликозиды можно еще классифицировать по количеству сахарных остатков в углеводной части молекулы. Их можно разделить на монозиды, биозиды, триозиды и т. д.

§ 2. Физико-химические свойства

Сердечные гликозиды представляют собой в большинстве случаев кристаллические вещества бесцветные или беловатые, иногда с кремовым оттенком, не имеющие запаха и обладающие горьким вкусом. Они характеризуются определенной точкой плавления и углом вращения. Многие сердечные гликозиды обладают специфической флуоресценцией в УФ свете. Например, ланатозиды наперстянки шерстистой имеют следующие свечения в УФ свете: ланато-

зид А — желто-зеленое; ланатозид В — голубовато-зеленое, ланатозид С — голубое.

Большинство сердечных гликозидов мало растворимы в этиловом эфире, хлороформе, петролейном эфире, в воде, но хорошо растворимы в водных растворах метилового и этилового спиртов. Чем длиннее сахарная цепочка, тем лучше растворяются сердечные гликозиды. Агликоны же сердечных гликозидов лучше растворимы в органических растворителях.

Сердечные гликозиды легко могут подвергаться гидролизу. Гидролиз может быть кислотным, щелочным и ферментативным. Наиболее мягкое, ступенчатое расщепление протекает при ферментативном гидролизе. Из первичных, нативных гликозидов при ферментативном гидролизе образуются вторичные, которые отличаются длиной углеводной цепи. Например, при ферментативном гидролизе пурпуреагликозида А вначале образуется дигитоксин и отщепляется молекула глюкозы, а затем образуются дигитоксигенин и 3 молекулы дигитоксозы. При кислотном или щелочном гидролизе сразу происходит глубокое расщепление до агликона и сахарных компонентов.

§ 3. Методы выделения

При выделении сердечных гликозидов используются органические растворители (этиловый, метиловый спирты), которые не вызывают гидролиза сердечных гликозидов, а если нужно получать не нативные, а вторичные гликозиды, то заранее проводят ферментативный гидролиз.

Выделение сердечных гликозидов из растительного сырья можно разделить на следующие этапы: 1) экстракция сердечных гликозидов из растительного сырья; 2) очистка полученного извлечения; 3) разделение суммы сердечных гликозидов; 4) перекристаллизация и выделение индивидуальных сердечных гликозидов.

Основная трудность при выделении сердечных гликозидов заключается в том, что это крайне лабильные соединения, а поэтому малейшее нарушение в температурном режиме приводит к их разрушению.

Экстракцию сердечных гликозидов из растительного сырья чаще всего проводят метиловым или этиловым спиртами (концентрация 70—80 %). Полученное спиртовое извлечение, содержащее сумму сердечных гликозидов, подвергают очистке от сопутствующих веществ. Сопутствующими веществами бывают пигменты (хлорофилл, ксантофилл, каротиноиды), смолы и другие органические вещества, растворимые в спиртах.

Для очистки упаренное под вакуумом (при температуре 51—52 °С) спиртовое извлечение подвергают многократной обработке органическими растворителями, чаще всего четыреххлористым углеродом, до полного удаления сопутствующих веществ или же применяют сорбционные методы очистки, используя оксид алюминия, который наносится на стеклянные фильтры.

Разделение суммы сердечных гликозидов проводят чаще всего на хроматографических колонках, заполненных сорбентами (оксид алюминия, силикагель). В дальнейшем нужные зоны элюируют определенными растворителями. Так, для нативных гликозидов наперстянки элюирование проводят смесью хлороформа с изопропиловым спиртом (3:1). Полученные элюаты выпаривают под вакуумом досуха при $t = 51\text{--}52^\circ\text{C}$, затем проводят перекристаллизацию для получения индивидуально чистых веществ.

Для установления строения сердечных гликозидов используются различные физико-химические методы: УФ, ИК, ЯМР-спектроскопия и др.

Так в УФ области спектра пятичленное лактонное кольцо вызывает интенсивное поглощение при 215—220 нм, а ИК область характеризуется расщепленной полосой при 1750 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ группа) и полосой при 1625 см^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ -связь).

Отсутствие строго специфических реактивов на шестишленное лактонное кольцо требует снятия для этих веществ УФ спектров, где они показывают характерную полосу поглощения при 300 нм. Поглощение в этой области использовано также для проявления хроматограммы при облучении УФ светом с длинами волн 290—360 нм. В ИК области спектра шестишленное лактонное кольцо характеризуется интенсивной полосой поглощения при 1730 см^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ -группа) и двумя полосами при 1640 и 1540 см^{-1} (сопряженные $\text{C}=\text{C}$ -связи).

Большое значение для выяснения строения вещества имеет установление в нем числа спиртовых групп и числа ацетилирующихся из них, т. е. первичных и вторичных. Общее число ОН-групп можно установить либо методом Церевитинова (определение активного водорода), либо с помощью ИК спектроскопии. Однако первый метод требует значительного количества вещества и поэтому, в основном, используется метод ИК спектроскопии, при использовании которого достаточно 1—2 мг вещества.

К сожалению, применение этих методов в отношении сердечных гликозидов и агликонов встречает препятствия. Главное из них то, что карденолиды и буфадиенолиды, будучи высокомолекулярными многоатомными спиртами, дают сложные для идентификации спектры.

§ 4. Качественное определение

Несмотря на отсутствие строго специфических реакций, применение следующего комплекса проб позволяет сделать заключение о наличии сердечных гликозидов. Качественные реакции проводятся либо с индивидуальными веществами, либо с очищенным извлечением из растительного сырья. Для этого несколько капель извлечения упаривают досуха на часовом стекле или в выпарительной чашке, а сухой остаток растворяют в нужном растворителе.

Все реакции на сердечные гликозиды можно разделить на 3 группы: 1) реакции на углеводную часть молекулы (2-дезоксиса-

хара) (реакция Келлер — Килиани); 2) реакции на стероидное ядро (реакция Либермана — Бурхарда; реакция Розенгейма и др.); 3) реакции на лактонное ненасыщенное кольцо. Для установления наличия пятичленного лактонного кольца проводятся реакции: Легала (с нитропруссидом натрия); Раймонда (с *m*-динитробензолом); Кедде (с 3,5-динитробензойной кислотой); Балье (с пикриновой кислотой). Реакции проводятся в щелочной среде. На шестишленное лактонное кольцо не найдены достаточно специфические реактивы. Для обнаружения буфадиенолидов на хроматограммах используют 20%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.

Методики качественных реакций. Приготовление извлечения. 5 г измельченных листьев наперстянки заливают 50 мл 80%-ного этилового спирта, настаивают 24 ч. Спирт отгоняют под вакуумом, водный остаток промывают в делительной воронке четыреххлористым углеродом 6 раз по 10 мл. Сердечные гликозиды извлекают смесью хлороформ — изопропиловый спирт (3:1) 4 раза по 10 мл. К полученному извлечению добавляют 2 г безводного Na_2SO_4 , дают постоять 3—5 мин, а затем отфильтровывают через бумажный фильтр.

Качественные реакции. Реакция Келлер — Килиани. Готовят два раствора: 1 — ледяная уксусная кислота, содержащая следы $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; 2 — концентрированная серная кислота также со следами $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в растворе 1 и осторожно по стенке пробирки вливают раствор 2. При наличии дезоксисахара верхний слой через некоторое время окрасится в васильково-синий цвет.

Реакция Либермана — Бурхарда. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в ледяной уксусной кислоте и добавляют смесь уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (50:1). Через некоторое время развивается окраска от розовой к зеленой и синей.

Реакция Розенгейма. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в хлороформе и смешивают с 90%-ным водным раствором трихлоруксусной кислоты. Появляются сменяющие друг друга окраски от розовой до лиловой и интенсивно синей.

Реакция Легала. Готовят два раствора: 1 — 5%-ный раствор нитропрусида натрия; 2 — 10%-ный раствор едкого натра. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в 0,5 мл 100%-ного 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 2 растворов появляется красное окрашивание в виде кольца.

§ 5. Количественное определение

До настоящего времени не представлялось возможным установить содержание того или иного сердечного гликозида в присутствии других, так как реактивы, предложенные для количественного определения гликозидов, являются общими. Поэтому весьма пер-

спективным считается сочетание хроматографии с дальнейшим использованием фотометрии, потенциометрии, полярографии, флуориметрии и др.

Хорошие результаты получают при хроматографии на бумаге, пропитанной формамидом. В этом случае применение систем бензол — хлороформ (9:1); (7:5); (3:7) или смесей толуол — *n*-бутанол (9:1); (4:1); (2:1); (1:1), смесей состава этилацетат — бензол — вода (84:16:50), хлороформ — бензол — *n*-бутанол (78:12:5) или просто хлороформа в качестве подвижной фазы позволяет достичь четкого разделения отдельных групп гликозидов. В последние годы также широко используется тонкослойная хроматография. В качестве сорбента могут применяться тальк, силикагель, кизельгур и др. Системы используются такие же, как для бумажной хроматографии.

Для обнаружения гликозидов на хроматограммах применяют реактивы, вызывающие флуоресценцию или окрашивание. Наиболее широко применяют смесь 25%-ной трихлоруксусной кислоты и 3%-ного раствора хлорамина в этиловом спирте (15:1). В УФ свете производные дигитоксигенина дают четкую золотисто-желтую флуоресценцию; гитоксигенина — голубую; дигоксигенина — стальную.

Для количественного определения наиболее простыми и доступными считаются фотометрические методы — фотоколориметрия и спектрофотометрия сердечных гликозидов и их генинов в видимой области спектра. Эти методы основаны на цветных реакциях сердечных гликозидов с различными нитросоединениями (пикрат натрия, 3,5-динитробензол и др.) или ксантгидролом. Для приготовления эталонного раствора можно использовать кристаллические гликозиды, но ввиду трудности их получения были рекомендованы также растворы дихромата калия и сульфата натрия.

Флуориметрические методы основаны на способности сердечных гликозидов флуоресцировать под действием сильных кислот (концентрированные серная, фосфорная кислоты) и окислителей (перхлорат железа, хлорное железо) после кратковременного облучения УФ светом. Эти методы применимы только к сердечным гликозидам, которые в результате дегидрирования образуют моно- и диангидросоединения.

В основе полярографических методов определения сердечных гликозидов лежит их способность восстанавливаться на ртутно-капельном электроде при потенциалах 1,9—2,0 В, образуя диффузные токи, волны которых пропорциональны концентрациям сердечных гликозидов.

В последние годы для количественного определения сердечных гликозидов стал применяться метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). При этом вначале сердечные гликозиды превращают в летучие производные путем силилирования, ацетилирования и получения гептафторбутиратов, а затем подвергают анализу.

Нормативно-техническая документация на лекарственное растительное сырье, содержащее сердечные гликозиды, наряду с физико-химическими методами количественного определения требует обязательной стандартизации сырья биологическими методами.

По требованиям ГФ Х биологическая стандартизация сердечных гликозидов проводится на лягушках, кошках и голубях. Активность оценивают по сравнению со стандартным кристаллическим препаратом и выражают в единицах действия (лягушачьих, кошачьих и голубиных).

Одна лягушачья единица действия (ЛЕД) соответствует наименьшей дозе стандартного препарата, вызывающей систолическую остановку сердца стандартной лягушки (лягушка-самец массой 28—33 г) в течение 1 ч, если испытывают сырье и препараты наперстянки, ландыша и горицвета, или 2 ч, если испытывают сырье и препараты строфанта, желтушника и олеандра. Под одной кошачьей или голубиной единицей действия (1 КЕД или 1 ГЕД) подразумевают дозу стандартного препарата из расчета на 1 кг массы животного.

В НТД на лекарственное растительное сырье, содержащее сердечные гликозиды, обязательно указывается валор. Валор сырья — это количество единиц действия в 1 г сырья.

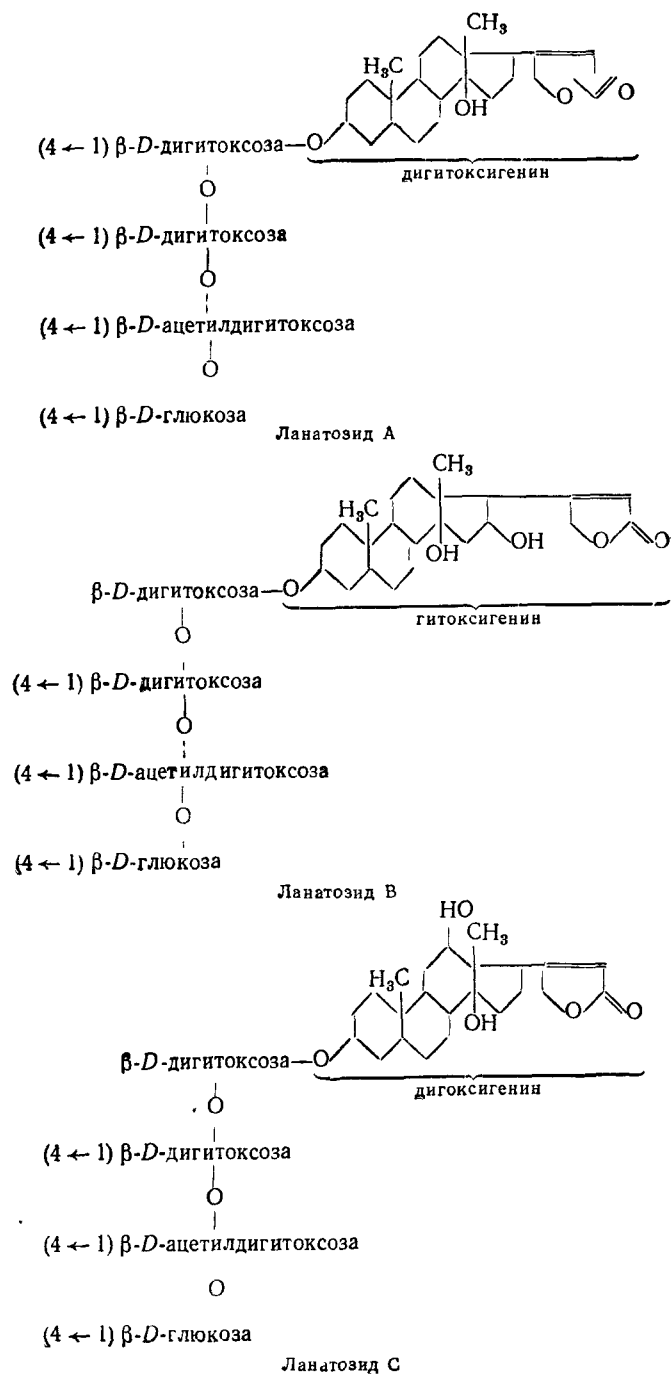
Наиболее часто используется стандартизация на лягушках. К основным недочетам этого метода относятся следующие: 1) исследования проводятся на холоднокровных животных, генетически далеко отстоящих от человека; 2) определяется смертельная доза, тогда как для клиники важно правильно определить терапевтические дозы; 3) лягушки используемых видов распространены не во всех районах нашей страны и не во всех странах; 4) малая точность метода (± 20 —25 %) ввиду резко изменяющейся чувствительности лягушек в зависимости от времени года и других условий.

Метод биологической стандартизации на кошках, принятый ГФ Х, более точен (± 5 —10 %), но также достаточно трудоемок.

Методики количественного определения. Ни один из вышеназванных методов количественного определения сердечных гликозидов не является идеальным, каждый имеет свои недостатки. Количественное определение таких лабильных веществ, как сердечные гликозиды, нуждается в индивидуальном подходе в каждом конкретном случае.

Методика количественного определения ланатозидов А, В, С в листьях наперстянки шерстистой — *Folium Digitalis lanatae*. Методика основана на хроматографическом разделении сердечных гликозидов с последующим спектрофотометрическим определением.

5 г измельченного сырья (точная навеска) (сито с диаметром отверстий 1 мм) помещают в склянку темного стекла с притертой пробкой, заливают 50 мл 80%-ного метилового спирта и настаивают в течение 24 ч. Жидкость фильтруют на воронке Бюхнера и берут для исследования 40 мл извлечения (что соответствует 4 г сырья). Извлечение упаривают на водяной бане под вакуумом при температуре 50—60 °С до удаления спирта. К оставшемуся объему (3—4 мл) добавляют 5—7 мл воды и помещают в делительную воронку. Водный раствор очищают четыреххлористым углеродом 5 раз по 10 мл. Из очищенного водного раствора гликозиды извле-



яют смесью хлороформа и изопропанола (3:1) 4 раза порциями по 10 мл. Полноту извлечения гликозидов контролируют реакцией Легала. Хлороформно-изопропанольное извлечение обезвоживают сульфатом натрия и фильтруют через бумажный фильтр. Сульфат натрия на фильтре промывают 5 мл обезвоженной смеси, которую присоединяют к фильтрату и отгоняют досуха под вакуумом на водяной бане при 50 °С. Сухой остаток количественно переносят в откалиброванный пикнометр вместимостью 3 мл с помощью смеси хлороформ — метиловый спирт (1:1). Полученный раствор подвергают хроматографированию.

Хроматография проводится в тонком слое сорбента (талк). На подготовленной хроматографической пластинке размером 13 × 18 см намечают стартовую линию на расстоянии 1,5 см от нижнего края. На стартовую линию пипеткой с оттянутым в капилляр носиком наносят два пятна раствора гликозидов по 0,01 мл и пятно (0,01 мл) — раствор абицина («свидетель»). Пластинку помещают в камеру и хроматографируют восходящим способом 30—35 мин. Длина пробега подвижной фазы 12 см. В качестве подвижной фазы используется система: хлороформ — этиловый спирт — бензол — формамид (59 : 10 : 30 : 1).

Пластинку высушивают на воздухе 5 мин, затем 10 мин в сушильном шкафу при $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Одну половину пластинки (пятно «свидетеля» и 1 пятно извлечения) обрабатывают 25%-ным раствором трихлоруксусной кислоты в этиловом спирте с добавлением 0,2 % хлорамина Т. После обработки пластинку высушивают 10 мин в сушильном шкафу при $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 6). Ланатозиды проявляются в виде пятен серо-синего цвета. Точные границы устанавливают в ультрафиолетовом свете. Ланатозид А обладает ярко-желтой флуоресценцией; В — зеленовато-голубой; С — голубой.

На второй половине пластинки (необработанной) пятна ланатозидов отмечают по проявленной полосе и стандарту. R_f пятен ланатозидов в этой системе: А — 0,74; В — 0,43; С — 0,24.

После установления границ пятна ланатозидов А, В, С снимают с пластинки, количественно переносят на стеклянный фильтр № 4 и элюируют 20 мл смеси хлороформ — метиловый спирт (1 : 1). Элюат упаривают досуха на водяной бане под вакуумом при $t = 50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$. К сухому остатку добавляют 5 мл ксантгидролового реактива, нагревают 5 мин на кипящей водяной бане, охлаждают 5 мин в холодной воде и выдерживают 15—20 мин при ком-

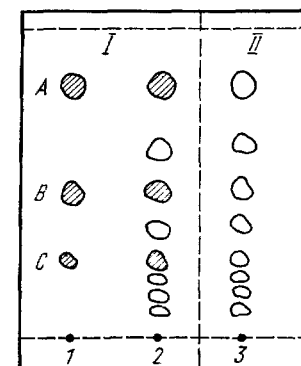


Рис 6. Схема тонкослойной хроматограммы сердечных гликозидов наперстянки шерстистой:

I — часть хроматографической пластинки, обработанная реактивом; II — необработанная реактивом, 1 — спиртовой раствор «абицина»; А — ланатозид А; В — ланатозид В; С — ланатозид С, 2 и 3 — очищенное извлечение из листьев наперстянки

натной температуре. Появляется окрашивание от розовых до малиновых тонов. Окрашенный раствор помещают в кювету толщиной 1 см и определяют оптическую плотность при 528—532 нм на спектрофотометре СФ-4А на фоне контроля *. Контролем служит элюат с чистого сорбента. Калибровочный график строят по ланатозиду С (целаниду), процентное содержание ланатозида в абсолютно сухом сырье рассчитывается по формуле

$$x = \frac{1,05aV_1 10}{V_2 m 100 000},$$

где a — количество вещества, найденное по калибровочному графику; V_1 — объем экстракта, мл (пикнометр); V_2 — объем экстракта, нанесенного на пластинку, мл; m — масса навески абсолютно сухого сырья, г; 1,05 — поправочный коэффициент.

Подготовка хроматографических пластинок. 4 г талька помещают в колбу на 25 мл, приливают 7 мл 95%-ного этилового спирта и 1 мл смеси формамид — ацетон (3:7). Смесь взбалтывают 30—40 с и выливают на пластинку, равномерно распределяя по всей площади. Пластинку высушивают на воздухе 20—25 мин и 10 мин в сушильном шкафу при $t = 50—60^\circ\text{C}$. Для хроматографии необходимы только свежеприготовленные пластинки.

Подготовка камеры для хроматографирования. В качестве подвижной фазы используют систему 95%-ный этиловый спирт — бензол — хлороформ — формамид (10:30:59:1). Систему помещают в делительную воронку и взбалтывают 10 мин, затем отстаивают 10 мин. Заливают в камеру так, чтобы верхний слой формамида не попал в камеру. Насыщение камеры идет 20—25 мин. Для лучшего насыщения камеры стенки выкладываются фильтровальной бумагой. Снаружи камера должна быть закрыта черной бумагой. Систему необходимо менять при последующем хроматографировании.

1. Приготовление ксантгидролового реактива. 10 мг ксантгидрола растворяют в 99 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 1 мл концентрированной HCl.

2. 25%-ный раствор трихлоруксусной кислоты с добавлением 0,2 % хлорамина Т — готовится непосредственно перед проявлением.

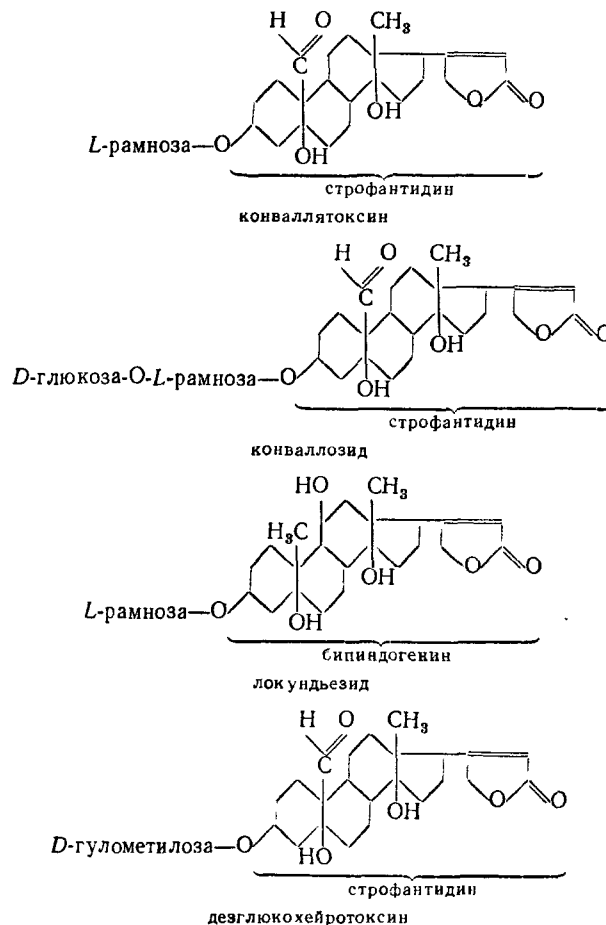
3. Проведение реакции Легала. Готовятся «ex tempore» 2 раствора: 1 — 5%-ный раствор нитропруссид натрия (готовится в мерной колбе) и 2 — 10%-ный раствор едкого натра (водный). В выпарительной чашке 3—4 капли извлечения упаривают досуха, растворяют в 0,5 мл 100%-ного метилового спирта. Растворенный сухой остаток вливают в пробирку и добавляют 1—2 капли реактива 1, затем осторожно по стенке добавляют 1—2 капли реактива 2 и, не взбалтывая, смотрят. Если есть сердечные гликозиды, то на границе 2 растворов появляется красное окрашивание в виде кольца.

4. Построение калибровочного графика. Калибровочный график строится по стандартному раствору ланатозида С (целанида). 25 мг целанида растворяют в 25 мл смеси метиловый спирт — хлороформ (1:1) в мерной колбе. Наносят на хроматографическую пластинку в количестве от 0,01 до 0,08 мл раствора, а далее поступают как с испытуемым извлечением.

Реактивы и оборудование: метиловый спирт (метанол); четыреххлористый углерод; изопропиловый спирт (изопропанол); хлороформ; ацетон; формамид; Na_2SO_4 (безводн.); тальк; этиловый спирт (этанол); ксантгидрол; трихлоруксусная кислота; хлорамин Т; HCl (конц.); уксусная кислота (лед.); бензол; NaOH 10%-ный; нитропруссид натрия 5%-ный; абицина раствор в смеси метиловый спирт — хлороформ (1:1).

Склянки темного стекла с притертой пробкой вместимостью 100 мл; воронки Бюхнера; колбы Бунзена; колба с нормальным шлифом вместимостью 50 мл; воронка делительная вместимостью 200 мл; цилиндры мерные на 50 и 10 мл; колбы плоскодонные вместимостью 25, 100 и 250 мл; колбы мерные вместимостью 25 мл; воронки стеклянные для фильтрации диаметром 5 см; пикнометр вместимостью 3 мл; микропипетка измерительная вместимостью 0,1 мл; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13 × 18 см; пробирки стеклянные; холодильник стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; бюретка с притертым краем вместимостью 25 мл; камера хроматографическая для ТСХ; пульверизатор; игла препаровальная, фильтры бумажные; штативы лабораторные.

Методика количественного определения главных сердечных гликозидов в листьях ландыша (*Folium Convallariae*). Методика основана на хроматографическом разделении и последующем спектрофотометрическом определении сердечных гликозидов.



В круглодонную колбу вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 50 мл 70%-ного этилового спирта и нагревают до кипения. Затем быстро вносят 5 г измель-

* Определение оптической плотности окрашенного раствора можно проводить на фотоколориметре ФЭК-56М при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм).

ченных (сито с диаметром отверстий 3 мм) сухих листьев ландыша и кипятят 30 мин.

Раствор охлаждают и доводят до первоначальной массы 70%-ным этиловым спиртом.

Полученный экстракт фильтруют, отбирают 27,5 г (что соответствует 2,5 г сырья) и отгоняют спирт под вакуумом при $t = 55-60^\circ\text{C}$. К теплomu экстракту добавляют 3 мл раствора основного ацетата свинца, перемешивают 10 мин, затем центрифугируют 5 мин при скорости 5000 об/мин. Промывают осадок 2 раза, прибавляя по 10 мл воды с последующим центрифугированием. Из очищенного водного экстракта сердечные гликозиды извлекают смесью хлороформ — метиловый спирт (4 : 1).

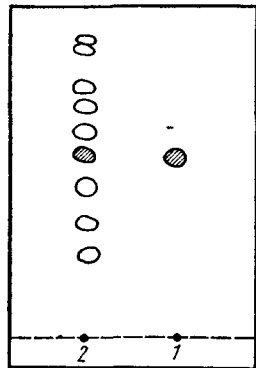


Рис 7 Схема бумажной хроматограммы сердечных гликозидов листьев ландыша:

1 — конваллятоксин; 2 — очищенное извлечение из листьев ландыша

Экстракт фильтруют через безводный сульфат натрия, промывают фильтр. Из экстракта отгоняют растворитель в вакууме на водяной бане до объема 3—4 мл. Затем раствор гликозидов упаривают до 1 мл, остаток высушивают. Сухой остаток растворяют в 1 мл смеси хлороформ — метиловый спирт (1 : 1). Хроматографируют на бумаге восходящим способом в системе этилацетат — вода (2 : 1) в течение 20—24 ч. Происходит разделение конваллятоксина и дезглюкохейротоксина. Если хроматографировать нисходящим способом, то происходит разделение конваллозида, локундьезида и конваллятоксола (рис. 7). Проявитель — насыщенный

раствор треххлористой сурьмы в метиловом спирте. Пятна гликозидов окрашиваются в розово-фиолетовый цвет.

Элюируют метиловым спиртом. Растворитель отгоняют под вакуумом. Остаток растворяют в метиловом спирте, прибавляют пикрат натрия, отфильтровывают и измеряют оптическую плотность. Контролем является смесь тех же количеств метилового спирта и пикрата натрия. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 494 нм в кювете толщиной 1 см.

С помощью градуировочного графика стандартного конваллятоксина определяют содержание гликозидов в 1 мл элюата.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт 95%-ный (этанол); свинца ацетат (основной) раствор; хлороформ; Na_2SO_4 (безвод.); метиловый спирт (метанол); этилацетат; сурьма треххлористая; натрий пикрат; вода дистиллированная.

Колба с нормальным шлифом, круглодонная, вместимостью 250 мл; холодильник обратный стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; цилиндры мерные на 10 мл; пробирки для центрифугирования; воронки делительные вместимостью 100 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см, микропипетка измерительная вместимостью 1 мл; бумага хроматографическая; камера хроматографическая для БХ; весы ручные; спектрофотометры СФ-4А, СФ-16; бани водяные лабораторные; пульверизатор; центрифуга лабораторная.

Вопросы для подготовки

1. Определение сердечных гликозидов
2. Классификации сердечных гликозидов. Укажите, на чем они основаны, и приведите примеры формул к каждой группе.
3. Характеристика сердечных гликозидов группы наперстянки
4. Характеристика сердечных гликозидов группы строфанта.
5. Характеристика сахарного компонента.
6. Зависимость между химическим составом и биологическими свойствами сердечных гликозидов.
7. Семейства, богатые сердечными гликозидами
8. Условия сушки растительного сырья, содержащего сердечные гликозиды.
9. Физико-химические свойства сердечных гликозидов.
10. Реакции на сахарную часть молекулы сердечного гликозида.
11. Реакции на стероидный цикл.
12. Реакции на лактонное ненасыщенное кольцо.
13. Методы количественного определения сердечных гликозидов.
14. Биологические методы определения сердечных гликозидов.
15. Определение 1 ЛЕД
16. Понятие «валор» лекарственного сырья.
17. Основные этапы выделения сердечных гликозидов из растительного сырья.
18. Формулы ланатозидов А, В, С, конваллозида, конваллятоксина.
19. На чем основано количественное определение ланатозидов в листьях наперстянки? Основные этапы.

Литература

- Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: Медицина, 1977, т. I. Лист наперстянки шерстистой. ФС 42-614-72.
- Абубакиров Н. К., Генкина Г. Л. — Узбек. Хим. журн., 1960, № 6, с. 63.
- Гарбузова В. М., Либизов Н. И. — Фармация, 1971, № 4, с. 30.
- Макаревич И. Ф., Кемертелидзе Э. П., Кисличенко С. Г. и др. Карденолиды и буфадиинолиды. — Тбилиси: Мецниереба, 1975.
- Кемертелидзе Э. П. Химическое исследование наперстянки реснитчатой. — Тбилиси; Мецниереба, 1977.

ГЛАВА 4. САПОНИНЫ

Термин «сапонин», или «сапонозид», был впервые предложен в 1819 г. Мэлоном для вещества, выделенного Шрайдером в 1811 г. из мыльнянки. Сапонины представляют собой сложные органические соединения гликозидного характера. Большинство из них вызывают гемолиз эритроцитов крови. Водные растворы сапонинов (или извлечения из растительного сырья) образуют при встряхивании обильную стойкую пену, подобно мыльной, в результате чего эти вещества и получили название сапонинов от латинского слова «*sapo*» — мыло. Сапонины весьма токсичны для холоднокровных животных (рыб, лягушек, червей). Они вызывают гибель (или парализуют) их даже в очень больших разведениях (1 : 1 000 000).

Молекулы сапонинов, как и других гликозидов, состоят из углеводной части и агликона, который называется сапогенином.

Посредством кислотного и ферментативного гидролиза сапонины расщепляются на сахара и агликон (сапогенин). По количеству молекул моносахаридов (пентоз или гексоз) сапонины можно подразделить на монозиды, биозиды, триозиды, тетразиды, пентозиды

и олигозиды — при числе моноз от шести и выше. Сапонины с двумя углеводными цепями при агликоне относятся к дигликозидам.

Так как углеводная часть сапонинов чаще всего состоит из нескольких молекул моносахаридов, то гидролиз в определенных условиях может протекать ступенчато, с постепенным отщеплением сахаров. Образующиеся при этом продукты частичного гидролиза называются просапогенинами.

В состав углеводной части молекулы сапонинов входят следующие сахара: *D*-глюкоза, *D*-галактоза, *L*-рамноза, *L*-арабиноза, *D*-ксилоза, *L*-фруктоза, а также *D*-глюкуроновая и *D*-галактуроновая кислоты. Многие сапонины содержат в углеводной части несколько остатков моносахаридов.

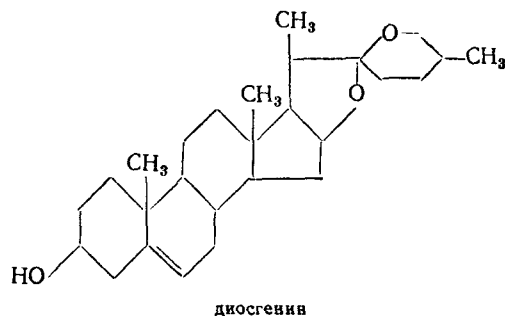
Сапонины стероидной группы менее богаты сахарами, в их состав входят 1—5 сахаров, наиболее богаты сахарами тритерпеновые сапонины (до 10 и более). Углеводная часть чаще всего присоединена к гидроксильной группе при углеродном атоме C_3 кольца А углеродного скелета. Некоторые тритерпеновые гликозиды имеют углеводную цепь при углеродном атоме C_{28} , присоединенную О-ацил-гликозидной связью. Сахарный компонент может быть представлен линейной (как у большинства гликозидов других групп) и разветвленной цепочкой, например у аралозидов В.

§ 1. Классификация

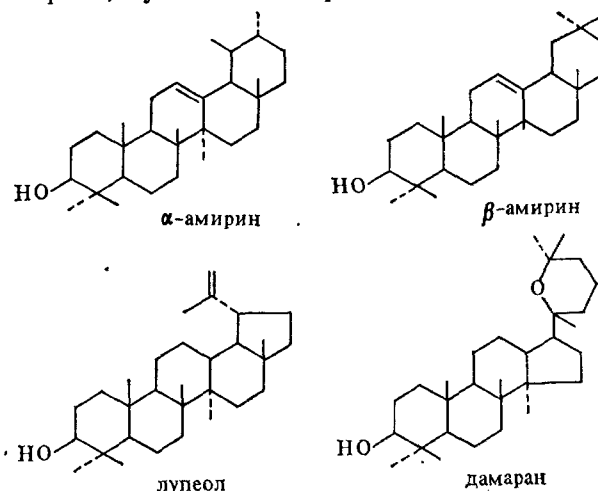
По структуре сапогенина (агликона) сапонины разделяют на две группы, значительно отличающиеся по свойствам: стероидные и тритерпеновые гликозиды. В основе первых лежит ядро циклопентанофенантрена, т. е. они близки по структуре к сердечным гликозидам. При дегидрировании стероидных агликонов селеном образуется 3-метил-1,2-циклопентанофенантрен (углеводород Дильса). Тритерпеновые агликоны в этих условиях образуют сапотален и 1,8-диметилпицен.

Стероидные сапонины часто встречаются в растениях совместно с сердечными гликозидами, например у наперстянки, ландыша и других растений.

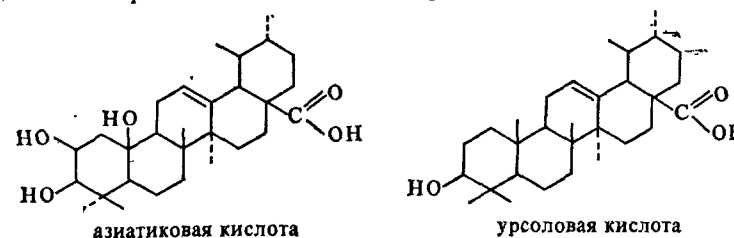
В основе большинства стероидных агликонов лежит спиро-стерол. Наиболее характерным представителем стероидных агликонов является диосгенин, содержащийся в различных видах диоскореи:



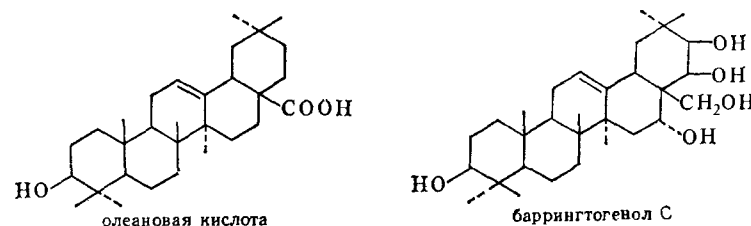
Почти все тритерпеновые сапонины растительного происхождения можно подразделить на четыре группы: производные α -амирина, β -амирина, лупеола и дамарана:



Производные α -амирина: азиатиковая и урсоловая кислоты выделены из растений семейства кутровых и вересковых:



Наиболее широко распространены в природе производные β -амирина, например олеаноловая кислота — агликон сапонинов, выделенных из многих лекарственных растений (аралия, патриния, синюха, календула и др.); баррингтогенол С — агликон сапонинов, выделенных из конского каштана, чая китайского:



Производные лупеола — бетулин и бетуловая кислота — выделены из березы.

К подгруппе дамарана относятся агликоны сапонинов, выделенных из женьшеня.

§ 2. Физико-химические свойства

Физико-химические свойства сапонинов изменяются в широких пределах и зависят от строения сапогенинов и углеводных компонентов. Сапонины представляют собой, как правило, аморфные вещества. В кристаллическом виде получены лишь те представители этого класса соединений, которые имеют в своем составе до 4 моносахаридных остатков.

Сапонины — вещества, обладающие сильной поверхностной активностью, что связано с наличием в одной молекуле гидрофильного и гидрофобного остатка. Сапонины оптически активны.

Как правило, тритерпеновые гликозиды нерастворимы в хлороформе, ацетоне, петролейном эфире. Растворимы в этиловом и метиловом спиртах. Растворимость сапонинов в воде определяется в первую очередь количеством моносахаридов и увеличивается с возрастанием числа последних. Гликозиды с 1—4 моносахаридными остатками обычно плохо растворимы в воде. Прибавление этилового эфира или ацетона к спиртовым растворам сапонинов вызывает их осаждение, что используется в качестве метода очистки. Из водных растворов различные группы тритерпеновых гликозидов могут осаждаться различными солями свинца и гидроксидом бария. На этом была основана первичная классификация сапонинов, сохранявшая свое значение до установления их химической природы.

Важное химическое свойство тритерпеновых сапонинов — это способность образовывать комплексы с фенолами, высшими спиртами и стеринами. Комплекс гликозидов со стеринами распадается при нагревании в ксилоле или пиридине. Это свойство иногда используется для выделения суммы сапонинов из экстрактов растений.

Тритерпеновые гликозиды бывают нейтральными и кислыми, что обусловлено карбоксильной группой в агликоне или присутствием уоновых кислот в углеводной цепи.

Все сапонины неустойчивы по отношению к кислым агентам, под действием которых расщепляются гликозидные связи. Сапонины, для которых характерно наличие О-ацилгликозидных связей, неустойчивы к действию щелочей. Тритерпеновые гликозиды, этерифицированные карбоновыми кислотами, легко омыляются щелочами. Следует отметить, что для многих сапонинов нет строгого доказательства индивидуальности в связи с их способностью образовывать устойчивые комплексы между собой и с другими природными соединениями и поэтому их физико-химические свойства могут изменяться в широких пределах.

§ 3. Методы выделения

Выделение сапонинов из растительного сырья включает следующие стадии: 1) получение экстракта; 2) выделение из него суммы сапонинов и их очистка от сопутствующих веществ; 3) разделение сапонинов на индивидуальные гликозиды.

Обычно суммарный экстракт для выделения сапонинов получают обработкой сырья полярными растворителями: метиловым или этиловым спиртом и водой. Сырье предварительно обрабатывают петролейным эфиром или четыреххлористым углеродом для разрушения комплексов сапонинов со стеринами.

Методы выделения суммы сапонинов из экстракта зависят от их строения. Гликозиды с небольшим числом моносахаридных остатков (3—4) обычно плохо растворимы в воде и выпадают в осадок при разбавлении спиртовых растворов водой. Полярные сапонины плохо растворимы в метиловом и этиловом спиртах и выпадают в осадок при охлаждении или продолжительном стоянии спиртовых растворов, либо при добавлении спирта к водным и водно-спиртовым растворам. Кислые сапонины растворимы в водных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении. Из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины осаждают этиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, а некоторые — бутиловым и изоамиловым спиртами. Из водных растворов сопутствующие малополярные примеси извлекают этиловым эфиром, хлороформом, четыреххлористым углеродом, а тритерпеновые гликозиды — бутиловым или изоамиловым спиртом.

Полученные сапониновые фракции очищают повторным пересаживанием, что, однако, не приводит к полной очистке от полярных сопутствующих веществ: неорганических примесей, моно- и олигосахаридов, гликозидов других классов, органических кислот и др. Ряд методов основан на способности сапонинов образовывать нерастворимые в воде или водном спирте соли с гидроксидом бария или ацетатом свинца и комплексы с холестерином, танинами, белками. Соли затем разлагают угольной или серной кислотами; холестериновые комплексы — извлечением холестерина бензолом, толуолом, этиловым эфиром или пиридином; таниновые — кипячением с водной суспензией оксида цинка; белковые — извлечением гликозидов подходящими органическими растворителями.

Эта группа методов дает более чистую сумму сапонинов, но не является общей методикой и не гарантирует количественного выделения и отсутствия значительного содержания балластных веществ в отдельных случаях.

Сапонины, образующие коллоидные растворы, очищают от примесей, дающих истинные растворы (моносахариды, минеральные вещества), с помощью диализа и электролиза. Хорошие результаты очистки сапониновых фракций от растительных пигментов и восстанавливающих сахаров получены при гelfильтрации на сефадексах У-25, У-50, А-25.

Значительное распространение нашли хроматографические методы очистки суммы сапонинов. Гликозиды, содержащие свободные карбоксильные группы, могут быть отделены от сопутствующих веществ, в том числе и от минеральных примесей, с помощью ионообменной хроматографии. Хроматографическую очистку суммы сапонинов проводят на оксиде алюминия, силикагеле, активированном угле.

В отличие от других классов природных соединений (аминокислот, углеводов и т. п.) для сапонинов нет универсальных систем элюирования. Для нейтральных сапонинов наиболее подходящие системы: *n*-бутиловый спирт — этиловый спирт — вода; *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (в различных соотношениях, верхний слой); хлороформ — метиловый спирт — вода (65 : 35 : 10).

Для обработки хроматограмм можно использовать те же реактивы, что и при проведении цветных реакций на сапонины. Так, для обнаружения стероидных сапонинов хроматограмму сначала опрыскивают 1%-ным спиртовым раствором SbCl_3 , а затем после высушивания H_2SO_4 с уксусным ангидридом образуются желтые пятна.

Для обнаружения тритерпеновых сапонинов применяют раствор 20%-ной H_2SO_4 . После обработки хроматограммы этим раствором с последующим нагреванием в сушильном шкафу при $t = 115\text{—}120^\circ\text{C}$ в течение 15 мин появляются фиолетовые пятна. Используют также насыщенный хлороформный раствор SbCl_3 со следами SbCl_5 , который дает с тритерпеновыми сапонинами розово-фиолетовое окрашивание.

При выяснении структуры сапонинов, как и других гликозидов, определяется строение агликона и углеводной части, а также выясняется место и способ присоединения углеводной составляющей к агликону.

При установлении строения сапонинов помимо традиционных методов (элементарный анализ, определение молекулярной массы) широко используются методы УФ спектроскопии, ИК спектроскопии, ПМР спектроскопии.

ИК спектроскопия при исследовании тритерпенов применяется для обнаружения и характеристики двойных связей, гидроксильных групп, О-ацильных группировок, карбонильных, карбоксильных, геминальных и ангулярных метильных групп. По характерным полосам поглощения CH_3 -групп в области $1245\text{—}1392\text{ см}^{-1}$ отличают тетрациклические тритерпены от пентациклических групп α - и β -амирина, а также последние друг от друга. По ИК спектрам продуктов окисления оксидом рутения (IV) предложен метод доказательства положения изолированной двойной связи в тритерпенах.

Строгое отнесение сапонинов к стероидам может быть сделано на основании ИК спектров и их генинов: наличие полос поглощения при 852 (866), 900 (900), 922 (922), 987 (982) см^{-1} (спирокетальная группировка нормального и *изо*-рядов) позволяет однозначно отнести сапонины к стероидному ряду.

В последнее время при исследовании структур пентациклических тритерпенов получила распространение масс-спектрометрия и методы ПМР спектроскопии.

Систематическое исследование дисперсии оптического вращения оксипроизводных пентациклических тритерпенов позволяет решать вопросы, связанные с доказательством их строения и стереохимии (установление положения карбонильных групп и гидрок-

сильных после перевода в карбонильные, положение двойной связи, конфигурация отдельных асимметрических центров).

Установление строения углеводного остатка тритерпеновых и стероидных сапонинов осуществляется с помощью методов структурной химии олиго- и полисахаридов. Сюда входит: 1) определение качественного и количественного состава моносахаридов; 2) установление последовательности моносахаридных остатков в углеводной цепи; 3) определение положения гликозидных связей в моносахаридных остатках; 4) определение размеров оксидных циклов моносахаридов; 5) установление конфигурации гликозидных центров.

§ 4. Качественное определение

Для обнаружения сапонинов в растительном сырье пользуются реакциями, которые можно разделить на три группы: 1) реакции, основанные на физических свойствах сапонинов; 2) реакции, основанные на химических свойствах сапонинов; 3) реакции, основанные на биологических свойствах сапонинов.

К первой группе реакций относится реакция (проба) на пенообразование. Это не только чувствительная проба, но и довольно характерная, так как других веществ, обладающих такой способностью к пенообразованию, в растениях не встречается.

Ко второй группе качественных реакций относятся реакции осаждения сапонинов и цветные реакции.

Из водных растворов сапонины осаждаются гидроксидами бария и магния, солями меди, ацетатом свинца. Причем тритерпеновые сапонины осаждаются средним ацетатом свинца, а стероидные — основным.

Из спиртовых извлечений (или растворов) стероидные сапонины и тритерпеновые сапонины выпадают в осадок при добавлении спиртового раствора холестерина в виде холестеридов.

Стероидные сапонины, так же как и сердечные гликозиды, дают реакцию Либмана — Бурхарда.

Для качественных реакций готовят водный настой 1 : 10, нагревая измельченное растительное сырье на водяной бане в течение 10 мин. Настой после охлаждения фильтруют и проводят с ним необходимые реакции.

Учитывая, что многие из перечисленных химических реакций могут давать и другие соединения, проводят еще и биологические испытания.

Большинство сапонинов вызывают гемолиз эритроцитов крови. Для проведения этой реакции из растительного сырья готовят настой на изотоническом растворе.

Методики качественных реакций. Качественные реакции. 1. Реакция на пенообразование. Берут две пробирки, в одну приливают 5 мл 0,1 н. HCl , а в другую — 5 мл 0,1 н. NaOH . Затем в обе пробирки добавляют по 2—3 капли извлечения или раствора сапонинов и сильно встряхивают. 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.

2. К 2 мл водного настоя в пробирке прибавляют несколько капель ацетата свинца. Образуется осадок.

3. К 1 мл спиртового раствора сапонинов прибавляют несколько капель 1%-ного спиртового раствора холестерина. Образуется осадок.

4. Реакция Либермана — Бурхарда. Для проведения этой реакции испытуемое вещество растворяют в ледяной уксусной кислоте и добавляют смесь уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (50 : 1). Через некоторое время развивается окраска от розовой до зеленой и синей.

5. Реакция Лафона. К 2 мл водного настоя прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, 1 мл этилового спирта и 1 каплю 10%-ного раствора сернокислого железа. При нагревании появляется сине-зеленое окрашивание.

6. К 2 мл водного настоя прибавляют 1 мл 10%-ного раствора нитрата натрия и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется кроваво-красное окрашивание.

7. Гемолиз эритроцитов. К 1 мл настоя на изотоническом растворе добавляют 1 мл 2%-ной взвеси эритроцитов в изотоническом растворе. Кровь становится прозрачной, ярко-красной (гемолиз).

Методика качественного определения аралозидов в корнях аралии маньчжурской (*Radix Araliae mandshuricae*). 10 г измельченных корней аралии маньчжурской (с погрешностью не более 0,01), проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в шлифовую колбу вместимостью 500 мл, приливают 50 мл хлороформа и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1,5 ч (температура бани 60 °C). Хлороформное извлечение фильтруют через вату и фильтрат отбрасывают. Вату с осадком помещают в колбу с сырьем, снова приливают 50 мл хлороформа, нагревают в течение 1,5 ч. Хлороформное извлечение фильтруют через воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Сырье вместе с фильтром переносят в фарфоровую чашку и оставляют стоять на сутки. Затем сырье переносят обратно в колбу, приливают 100 мл метилового спирта. Колбу с содержимым взвешивают, нагревают на водяной бане с обратным холодильником и поддерживают кипение жидкости в течение 5 ч (кипятят с капиллярами, температура бани 80 °C), по охлаждении колбу с содержимым снова взвешивают, потерю в массе пополняют метиловым спиртом, затем перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (раствор 1). 1 мл раствора 1 разбавляют вдвое метиловым спиртом, получают раствор 2. 0,02 мл раствора 2 наносят микропипеткой на стартовую линию хроматографической пластинки размером 13 × 18 см с закрепленным слоем силикагеля марки КСК. Одновременно на стартовую линию той же пластинки в качестве «свидетеля» наносят 0,01 мл 0,5%-ного раствора сапарала в метиловом спирте. Пла-

стинку сушат в течение 10 мин, затем помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей: безводный хлороформ — метиловый спирт — вода (61 : 32 : 7) и хроматографируют при температуре 20—25 °C. Когда фронт растворителей пройдет 15 см, пластинку вынимают из камеры и влажную опрыскивают 20%-ной H_2SO_4 , затем нагревают в сушильном шкафу при $t = 110$ °C в течение 10 мин. Аралозиды проявляются в виде пятен вишневого цвета. Допускается наличие посторонних пятен — до шести веществ неустановленной природы: пять пятен, находящихся выше пятна аралозида А и одно пятно ниже аралозида А.

Приготовление хроматографической пластинки. 3 г силикагеля смешивают с 0,3 г сульфата кальция, растирают в ступке, постепенно добавляют 10 мл воды, тщательно перемешивают и ровным слоем наносят на стеклянную пластинку размером 13 × 18 см, которую после этого сушат на воздухе в течение суток или в сушильном шкафу при $t = 120—140$ °C в течение 30—40 мин.

Приготовление 20%-ной H_2SO_4 . К 500 мл воды осторожно при постоянном перемешивании приливают 100 мл концентрированной H_2SO_4 . Раствор после охлаждения разбавляют водой до плотности 1,136—1,142.

§ 5. Количественное определение

Для количественного определения сапонинов в растительном сырье применяют методы, основанные на использовании биологических и физических свойств сапонинов, т. е. определении гемолитического, рыбьего индексов и пенного числа, а также химические методы.

Количественное определение сапонинов гемолитическим методом основано на предположении, что гемолитическое действие прямо пропорционально количеству вещества в растворе.

Из настоя растительного сырья на изотоническом растворе готовят ряд разведений различной концентрации, затем к каждому разведению добавляют по 1 мл взвеси эритроцитов (2%-ной свежей дефибринированной бараньей крови в изотоническом растворе) и встряхивают. Через некоторое время наблюдают результаты гемолиза.

Ввиду того, что различные сапонины при одинаковой концентрации имеют разный гемолитический индекс (механизм гемолиза также различен), каждое сырье должно иметь свой стандарт — раствор чистого сапонина.

Предложен видоизмененный метод определения гемолитического индекса, который заключается в измерении диаметра гемолитического пятна, образующегося при соприкосновении кружка фильтровальной бумаги, смоченного раствором сапонина, с желатиновой суспензией эритроцитов. Однако положительный результат гемолитической пробы еще не является доказательством наличия сапонинов, так как другие растительные вещества (некоторые эфирные масла, кислоты, спирты) также дают гемолиз. Надежность пробы повышается, если гемолиз блокируется добавлением холестерина и восстанавливается после разрушения образовавшегося

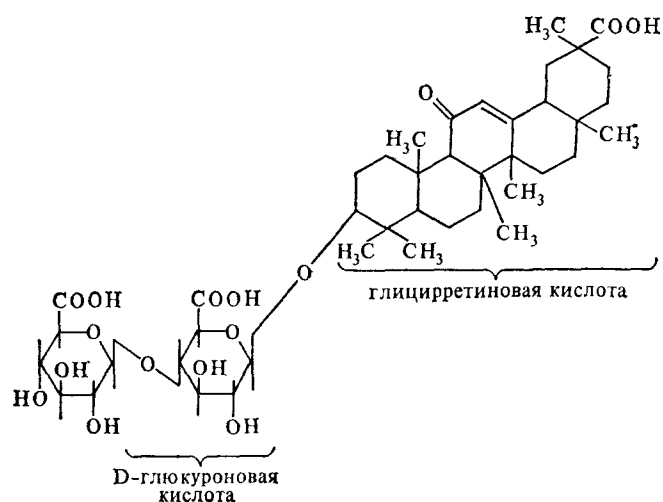
комплекса. Некоторые сапонины (хедерин, примуловые кислоты и др.) не образуют холестерина. Сапонины могут также находиться в растении в виде комплекса со стеролами и не проявлять гемолитической активности до разрушения этого комплекса.

Методы определения сапонинов, основанные на повышенной токсичности этих соединений для холоднокровных животных (рыб, головастиков, жаб, червей), не имеют преимуществ по сравнению с гемолитическим индексом и сохраняют его главный недостаток — невысокую надежность, невозможность строгого отношения исследуемых веществ к классу сапонинов.

Методы количественного определения сапонинов, основанные на биологических и физических свойствах последних, так же как определение поверхностной активности, гемолитического действия и токсичности сапонинов, дают результаты, которые нельзя взаимно сравнивать, так как эти свойства друг от друга не зависят. Установив одно из них, нельзя говорить о степени проявления второго или третьего. Ни один из перечисленных методов не основан на определении абсолютного содержания сапонинов в сырье.

Что касается химических методов определения сапонинов в растительном сырье, то общих методов не существует. Описанные для некоторых сапонинов химические методы большей частью недостоверны для других. Применяются гравиметрические, титриметрические и фотометрические методы. Особенно широко для количественного определения сапонинов используются колориметрические и спектрофотометрические методы анализа. При разработке новых методов количественного определения сапонинов прежде всего учитывается химическая структура того или другого сапонины.

Методика количественного определения глицирризиновой кислоты в корне солодки (*Radix Glycyrrhizae*) (ГФ X, ст. 573, ст. 260):



Метод основан на осаждении глицирризиновой кислоты из ацетонового извлечения 25%-ным раствором аммиака с последующим спектрофотометрическим определением.

Около 2 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (точная навеска), помещают в колбу с нормальным шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 20 мл 3%-ного ацетонового раствора HNO_3 и настаивают в течение 1 ч при частом и сильном взбалтывании. Извлечение отфильтровывают в цилиндр вместимостью 100 мл. Порошок корня в колбе промывают 10 мл ацетона и фильтруют через этот же фильтр. В колбу с сырьем приливают еще 20 мл ацетона, которым одновременно смывают порошок с фильтра, и смесь кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин. Извлечение отфильтровывают через тот же фильтр в тот же цилиндр. Экстракцию горячим ацетоном повторяют таким образом еще 2 раза. Порошок корня промывают ацетоном до тех пор, пока объем жидкости в цилиндре не достигнет 100 мл. Жидкость из цилиндра выливают в стакан вместимостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 40 мл этилового спирта, который затем выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном помешивании добавляют концентрированный раствор аммиака до появления обильного светло-желтого творожистого осадка (рН 8,3—8,6 устанавливают по порозовению влажной фенолфталеиновой бумаги).

Осадок вместе с маточной жидкостью переносят на фильтр, помещенный в воронку Бюхнера, жидкость отсасывают. Стакан и фильтр с осадком промывают 50 мл ацетона в 3—4 приема. Осадок с фильтром переносят в стакан, в котором проводилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл. Фильтр несколько раз промывают небольшими порциями воды, присоединяя их к основному раствору. Доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 30 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б).

Определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, применяя в качестве контрольного раствора воду.

Процентное содержание глицирризиновой кислоты x вычисляют по формуле

$$x = \frac{D_{822} \cdot 250 \cdot 500 \cdot 100}{mV1000 \cdot 11\,000},$$

где D — оптическая плотность раствора Б; m — масса навески сырья, г; V — объем раствора А, использованного для приготовления раствора Б, мл; 822 — молекулярная масса глицирризиновой кислоты; 11 000 — молярный показатель поглощения.

Содержание глицирризиновой кислоты в сырье должно быть не менее 6 %.

Реактивы и оборудование: HNO_3 3%-ный ацетоновый раствор; ацетон; этиловый спирт 95%-ный (этанол); аммиак 25%-ный раствор; вода дистиллированная.

Бумага фенолфталеиновая; колбы плоскодонные с нормальным шлифом вместимостью 150 мл; цилиндры мерные на 50 и 100 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; холодильник (обратный) стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; стаканы стеклянные вместимостью 250 мл; воронки Бюхнера; колбы Бунзена; колбы мерные вместимостью 250 и 500 мл.

Методика количественного определения сапонинов в корневище с корнями диоскореи ниппонской (*Rhizoma cum radicibus Dioscoreae nipponicae*) (ФС 42-1521-80). От аналитической пробы сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 10 мм, отбирают около 20 г и измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют пипеткой 50 мл 95%-ного этилового спирта и вносят остеклованный перемешивающий стержень. Колбу с содержимым взвешивают (с погрешностью до 0,1 г) и нагревают на магнитной мешалке в течение 1 ч с момента закипания растворителя. По окончании указанного времени экстракт охлаждают до комнатной температуры, потерю в массе восполняют 95%-ным этиловым спиртом, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр 30—40 мл раствора. 5 мл фильтрата переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят до метки 95%-ным этиловым спиртом и тщательно перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А пипеткой переносят в стеклянную пробирку с нормальным шлифом и сюда же прибавляют пипеткой 5 мл 1%-ного *n*-диметиламинбензальдегида в 4 н. спиртовом растворе соляной кислоты. Пробирку закрывают стеклянной пробкой, резиновым колпачком, встряхивают для перемешивания жидкости и нагревают в течение 2 ч в ультратермостате при температуре $58 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Раствор охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл 4 н. спиртового раствора соляной кислоты, который также выдерживают в ультратермостате при $58 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Процентное содержание фурастаноловых гликозидов x в пересчете на абсолютно сухую массу вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 0,0101 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - w) K} = \frac{a \cdot 50 \cdot 500}{m(100 - w) K},$$

где a — количество хлорида кобальта, найденного по калибровочному графику, г; 0,0101 — коэффициент пересчета концентрации хлорида кобальта на концентрацию фурастаноловых гликозидов; 50 — исходный объем извлечения, мл; 10 — число разведений; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; K — поправочный коэффициент на титр кислоты.

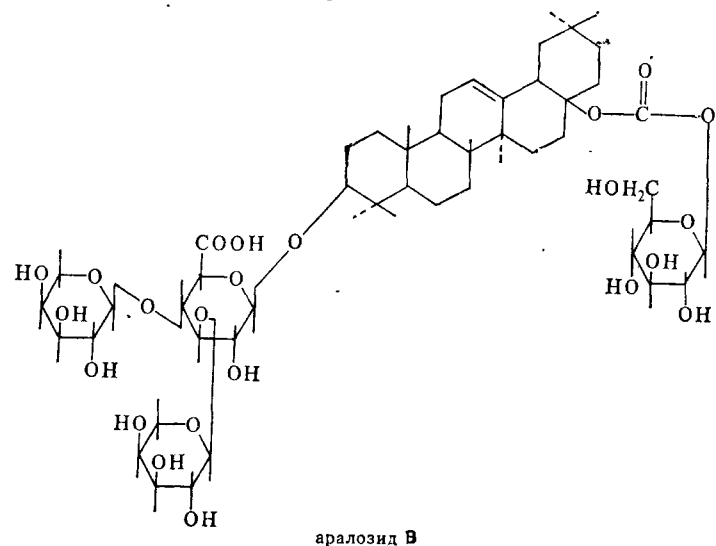
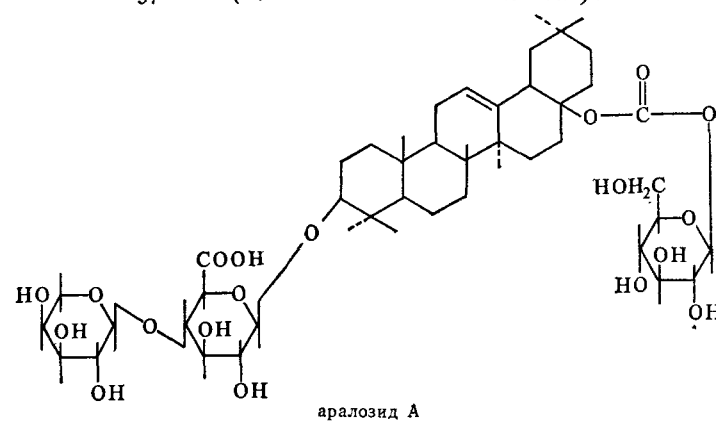
Построение калибровочного графика: 5 г хлорида кобальта помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют дистиллированную воду, 1 каплю концентрированной HCl и доводят объем до метки водой. В мерные колбы вместимостью 25 мл отмеряют бюреткой 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15 мл исходного раствора и объем доводят до метки. Полученные растворы

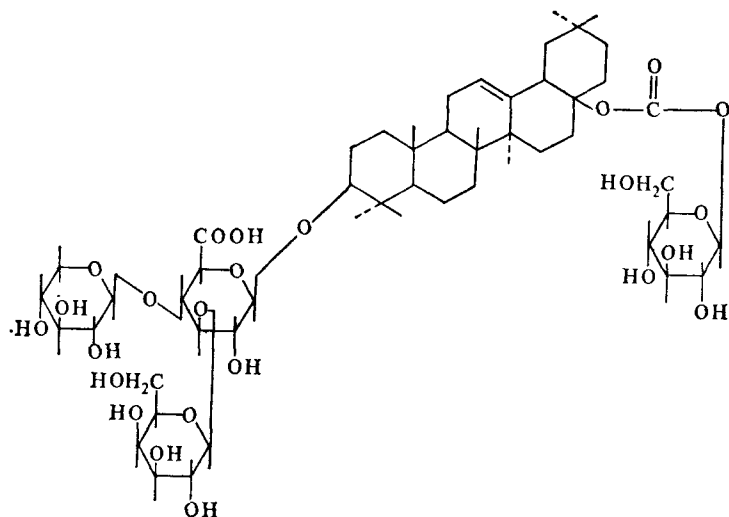
содержат соответственно 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,03 г хлорида кобальта в 1 мл. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, и по полученным данным строят калибровочный график. Для построения графика необходимо по 3 измерения в каждой точке. По оси ординат откладывают значение оптической плотности, а по оси абсцисс — содержание хлорида кобальта в 1 мл в граммах.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт 95%-ный (этанол); *n*-диметиламинбензальдегид 1%-ный раствор в 4 н. спиртовом растворе HCl; кобальт хлорид; HCl (конц.); HCl 1%-ный раствор в этиловом спирте.

Колбы мерные вместимостью 50 и 100 мл; колбы конические вместимостью 100 мл; колбы плоскодонные вместимостью 100 мл; магнитные мешалки; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; пипетки измерительные вместимостью 5 мл; пробирки стеклянные с нормальным шлифом; ультратермостат; спектрофотометр; сита с диаметром отверстий 2 и 10 мм; весы ручные; ступка металлическая с пестиком; мельница; шкаф сушильный лабораторный; бюретки вместимостью 25 мл; бюксы с притертыми крышками; эксикатор.

Методика количественного определения аралозидов в корнях аралии маньчжурской (*Radix Araliae mandshuricae*):





аралозид С

10,0 г (с погрешностью до 0,01) измельченных корней аралии маньчжурской, проходящих сквозь сито № 1, помещают в шлифовую колбу вместимостью 500 мл, приливают 50 мл хлороформа и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 1,5 ч (температура бани 60 °С). Хлороформное извлечение фильтруют через вату и фильтрат отбрасывают. Вату с осадком помещают в колбу с сырьем, снова приливают 50 мл хлороформа, нагревают в течение 1,5 ч. Хлороформное извлечение фильтруют через воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Сырье вместе с фильтром переносят в фарфоровую чашку и оставляют стоять на сутки. Затем сырье переносят обратно в колбу, приливают 100 мл метилового спирта. Колбу с содержимым взвешивают, нагревают на водяной бане с обратным холодильником и поддерживают кипение жидкости в течение 5 ч (кипятят с капиллярами, температура бани 80 °С), по охлаждении колбу с содержимым снова взвешивают, потерю в массе пополняют метиловым спиртом, затем перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 50 мл фильтрата (5 г исходного сырья) помещают в колбу вместимостью 100 мл и метиловый спирт отгоняют на водяной бане с вакуумом. Остаток растворителя в колбе удаляют продуванием воздуха. Сухой остаток растворяют в 20 мл смеси: CH_3COOH (лед.) — HCl (конц.) — H_2O (3,5 : 1 : 5,5) и кипятят в колбе с нормальным шлифом вместимостью 100 мл с обратным холодильником на солевой бане (69 г хлорида кальция на 100 мл воды) при температуре не выше 120 °С в течение 2 ч. По окончании гидролиза из выпавшего осадка проводят извлечение продуктов гидролиза, дважды добавляя по 20 мл бензола через холодильник при взбалтывании и нагревании жидкости до кипения, затем горячий раствор переносят в делительную воронку. После расслоения жидкости бензольное извлечение сливают в колбу

вместимостью 250 мл, а водный слой — обратно в колбу для гидролиза и повторяют исчерпывающее извлечение бензолом 3 раза порциями по 20 мл, каждый раз нагревая жидкость до кипения. К объединенному бензольному извлечению прибавляют 80 мл воды, и жидкость нагревают до кипения, затем ее переносят в делительную воронку и после полного расслоения жидкости отбрасывают водный слой. Бензольное извлечение отмывают от кислоты таким образом 3—4 раза до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге, затем фильтруют в круглодонную колбу для отгонки вместимостью 250 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 5 г свежeproкаленного Na_2SO_4 , промытого 10 мл бензола. Воронку и фильтр промывают 20 мл горячего бензола 3 раза. Бензол отгоняют под вакуумом на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в смеси растворителей: метиловый спирт — хлороформ (1:9), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят этой же смесью растворителей до метки. 10 мл полученного раствора переносят в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мл той же смеси растворителей и 5 г силикагеля марки КСК. Смесью перемешивают встряхиванием, затем количественно переносят на стеклянный фильтр № 4 и продукты гидролиза полностью извлекают смесью растворителей: метиловый спирт — хлороформ (1 : 9) 10 раз порциями по 20 мл, после чего проводят пробу на полноту извлечения. Для этого сухой остаток от нескольких капель фильтрата растворяют в 0,2 мл уксусного ангидрида и прибавляют 1—2 капли концентрированной H_2SO_4 . Если появляется малиновое окрашивание, то силикагель промывают еще.

Объединенный фильтрат отгоняют досуха на водяной бане под вакуумом. Сухой остаток растворяют в 30 мл пропилового спирта при нагревании (температура бани около 50 °С), количественно переносят в стакан для титрования и титруют 0,1 н. NaOH в смеси бензола и метилового спирта потенциометрически. В качестве индикаторного электрода применяют стеклянный электрод, электрода сравнения — насыщенный (в метиловом спирте) каломельный электрод. Параллельно проводят контрольный опыт. 1 мл 0,1 н. NaOH соответствует 0,10422 г аммонийных солей аралозидов А, В, С (считая на аммонийную соль аралозидов усредненной молекулярной массы). Процентное содержание аммонийных солей аралозидов А, В, С x вычисляют по формуле:

$$x = \frac{0,10422 (V - V_1) 50 0 00}{m (100 - w)},$$

где V — объем 0,1 н. NaOH , израсходованного на титрование пробы, мл; V_1 — объем 0,1 н. NaOH , израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %. Содержание аммонийных солей аралозидов А, В, С в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 4,5 %.

Реактивы и оборудование: силикагель марки КСК; хлороформ; метиловый спирт (метанол); H_2SO_4 (конц.); H_2SO_4 20%-ная, H_2SO_4 2 н.; $CaSO_4$ (гипс); сапалал, спиртовой р-р; уксусная кислота (лед.); HCl (конц.); $CaCl_2$; бензол; Na_2SO_4 (безводн.); уксусный ангидрид; пропиловый спирт.

Бумага индикаторная универсальная; колбы шлифовые круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 100 и 250 мл; колбы плоскодонные с нормальным шлифом вместимостью 200 и 500 мл; цилиндры мерные на 50 мл; холодильник (обратный) стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; воронки делительные вместимостью 250 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; колбы плоскодонные вместимостью 100 и 250 мл; колбы мерные вместимостью 25 мл; воронки Бюхнера; колбы Бунзена; чашки фарфоровые; бюксы с притертыми крышками; стекло часовое; фильтр стеклянный № 4; стаканы стеклянные вместимостью 100 и 300 мл; микропипетка измерительная вместимостью 0,2 мл; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13×18 [см]; камера хроматографическая для ТСХ; пульверизатор стеклянный герметически закрытый; бани солевые; шкаф сушильный лабораторный; электрокофемолка бытовая.

Вопросы для подготовки

1. Определение сапонинов.
2. Классификация сапонинов. Примеры формул для каждой группы.
3. Характеристика сахарного компонента.
4. Физические свойства сапонинов.
5. Основные химические свойства сапонинов.
6. Методы обнаружения сапонинов в растительном сырье.
7. Выделение сапонинов из растительного сырья.
8. На чем основано определение глицирризиновой кислоты в корне солодки?
9. На чем основано определение сапонинов в корневищах с корнями диоскореи?
10. Формулы диосгенина, глицирризиновой кислоты, аралозидов А, В, С.

Литература

Машковский М. Д. Лекарственные средства. Т. 1.—М.: Медицина, 1977.
Мальчуковский Л. Б., Либизов Н. И. — Фармация, 1971, № 2, с. 68—71.

ГЛАВА 5. ФЕНОЛОГЛИКОЗИДЫ И ФЛОРОГЛЮЦИДЫ

ФЕНОЛОГЛИКОЗИДЫ (ГЛИКОЗИДЫ ПРОСТЫХ ФЕНОЛОВ)

В группу гликозидов простых фенолов относят такие гликозиды, которые при гидролизе расщепляются на агликоны, содержащие одну или несколько гидроксильных фенольных групп при одном бензольном кольце. Кроме фенольных гидроксильных групп в качестве заместителей в агликонах могут быть оксиметильная, оксиэтильная или карбоксильная группы.

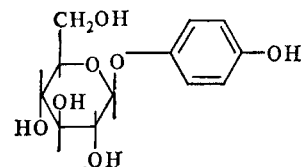
Фенольные гликозиды достаточно широко представлены в растениях различных семейств, например ивовых, камнеломковых, толстянковых, брусничных и др.

Фенольные гликозиды, например арбутин, обладают антимикробной и диуретической активностью. Гликозид салидрозид, впервые изолированный из коры ивы и позднее обнаруженный в корневищах и корнях родиолы розовой, обладает стимулирующим и адаптогенным действием.

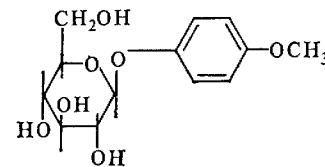
§ 1. Классификация

В зависимости от характера заместителей в бензольном кольце фенологликозиды можно разделить на 3 группы.

К первой группе относится арбутин, содержащийся в листьях толокнянки, брусники и бадана. Наряду с арбутином в этих растениях присутствует метиларбутин. Агликонами этих гликозидов являются соответственно гидрохинон и метилгидрохинон:

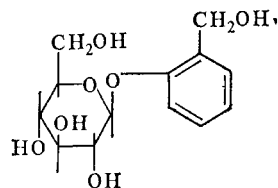


арбутин

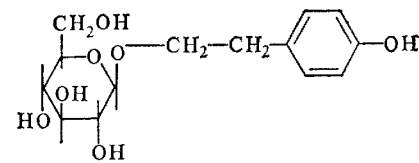


метиларбутин

Вторая группа фенольных гликозидов представлена, например, салидрозидом и салицином. Агликоны этих гликозидов 4-оксифенилэтанол (салициловый спирт). Наряду с фенольными гидроксильными группами эти агликоны имеют спиртовые гидроксильные группы, и гликозидирование их может быть по фенольным и спиртовым группам:

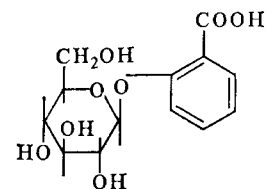


салицин



салидрозид

Представителем третьей группы является гликозид салициловой кислоты, агликон которого содержит карбоксильную группу:



§ 2. Физико-химические свойства

Фенольные гликозиды в индивидуальном состоянии представляют собой белые кристаллические вещества, растворимые в воде, этиловом спирте, ацетоне, нерастворимые в этиловом эфире и хлороформе. Все фенольные гликозиды оптически активны в связи с при-

утствием в их молекуле углеводного компонента (как правило, глюкозы).

Фенольные гликозиды, как и все О-гликозиды, характеризуются способностью к гидролизу при нагревании с минеральными кислотами или при термостатировании с ферментами.

При гидролизе расщепление происходит до углеводного компонента и соответствующего агликона. Подобный гидролиз происходит и в живом организме под действием ферментов; при этом первичными продуктами метаболизма фенольных гликозидов являются агликон и сахар.

§ 3. Методы выделения и идентификация

Фенольные гликозиды извлекают из растительного материала этиловым и метиловым спиртами (96, 70 и 40°). В дальнейшем очистку спиртовых извлечений ведут общепринятым для гликозидов методом.

Выделение индивидуальных соединений проводят, как правило, методом адсорбционной хроматографии на полиамиде, силикагеле, целлюлозе. В качестве элюирующих смесей используются вода и водный спирт, если адсорбентом служит полиамид или целлюлоза, либо различные смеси органических растворителей для всех перечисленных адсорбентов.

Фенольные гликозиды в лекарственном растительном сырье могут быть идентифицированы хроматографией в тонком слое сорбента или на бумаге.

Для хроматографирования в тонком слое сорбента используют следующие растворители: 1) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (1 : 5); 2) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — ксилол (2 : 3 : 4); 3) хлороформ — метиловый спирт (8 : 2). При хроматографировании на бумаге используют 5, 10, 15%-ную уксусную кислоту.

Для индивидуальных веществ определяют температуру плавления, удельное вращение, снимают УФ и ИК спектры. Рассмотрим УФ и ИК спектры на примере арбутина. В связи с наличием в молекуле фенольных гликозидов ароматических С=С-связей фенольные гликозиды имеют максимум поглощения в УФ спектре при 270—280 нм. Максимум поглощения арбутина находится при 287 нм и может быть использован как для качественной характеристики, так и для количественного определения арбутина в растительном материале.

В ИК спектре арбутина имеются характерные полосы при 3400—3400 см⁻¹, обусловленные наличием спиртовых и фенольных гидроксильных групп; полоса 1515, 1460, 1440 см⁻¹ типична для ароматических С=С-связей. Имеется ряд полос в области 800—900 см⁻¹ (область «отпечатка пальцев»). Совпадение спектров исследуемого гликозида со спектром достоверного образца указывает на идентичность соединений. Для идентификации фенольных гли-

козидов широко используются химические превращения (гидролиз, ацетилирование, метилирование и т. д.) и сравнение констант продуктов превращения с литературными данными для предполагаемого гликозида.

§ 4. Качественное определение

Фенольные гликозиды, имеющие свободную гидроксильную группу, дают все реакции, характерные для фенолов, например, с железоаммониевыми квасцами, реакцию диазотирования и др.

В случае если фенольный гидроксил гликозилирован, как у салицина, реакции проводят после предварительного гидролиза гликозида кислотами либо ферментами. Эти же качественные реакции используют для обнаружения фенольных гликозидов на хроматограммах.

В случае хроматографирования в тонком слое силикагеля хроматограммы можно обрабатывать кроме перечисленных реактивов еще и 4%-ной H₂SO₄ в абсолютном этиловом спирте.

При этом фенольные гликозиды в зависимости от строения обнаруживаются в виде желтых, красных, оранжевых или голубых пятен.

При обработке хроматограмм раствором нитрата серебра и щелочью фенольные гликозиды обнаруживаются в виде коричневых пятен с различным оттенком. При обработке хроматограмм реактивом Паули фенольные гликозиды в зависимости от строения проявляются в виде желтых, оранжевых или красных пятен.

Методики обнаружения арбутина в листьях толокнянки и брусники. 1. 0,5 г измельченного сырья кипятят с 10 мл воды 2—3 мин и после охлаждения фильтруют. К 1 мл фильтрата прибавляют кристаллик сульфата закисного железа; жидкость окрашивается сначала в сиреневый, затем темно-фиолетовый цвет, и, наконец, образуется темно-фиолетовый осадок (арбутин).

2. К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 4 мл раствора аммиака и 1 мл 10%-ного раствора натрия фосфорно-молибденовокислого в 10%-ной HCl; появляется синее окрашивание (арбутин).

3. 0,5 г мелкоизмельченного растительного сырья заливают 5 мл этилового спирта и экстрагируют при периодическом встряхивании и слабом нагревании на водяной бане в течение 1 ч. Полученное извлечение с помощью капилляра наносят на бумагу (3—4 прикосновения капилляра) и хроматографируют восходящим

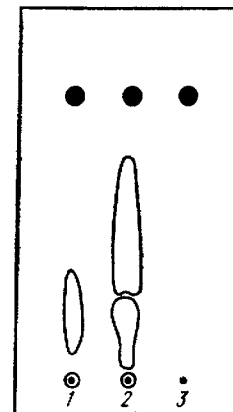


Рис. 8. Схема бумажной хроматограммы (ВХ) фенологликозидов толокнянки и брусники:

1 — извлечение из листьев толокнянки; 2 — извлечение из листьев брусники; 3 — раствор арбутина

способом в 5%-ной уксусной кислоте до прохождения фронта растворителя 15—17 см (хроматограмма проходит в течение 1 ч при использовании бумаги FN-3). Хроматограмму вынимают, высушивают, обрабатывают раствором 10%-ной спиртовой щелочи и затем реактивом Паули. Арбутин имеет самое высокое значение $R_f = 0,75$, отделяется от сопутствующих гликозидов и проявляется в виде ярко-красного пятна (рис. 8). Аналогичные результаты можно получить на пластинке «Силуфол» при хроматографировании в системе хлороформ — этиловый спирт (7 : 3) с последующей обработкой раствором щелочи и реактивом Паули.

Хроматограммы до и после обработки реактивами целесообразно просматривать в УФ свете с целью идентификации сырья по отдельным компонентам.

§ 5. Количественное определение

Нормативно-техническая документация (НТД) предусматривает количественное определение арбутина в листьях толокнянки и брусники. Метод определения основан на иодометрическом титровании гидрохинона, полученного после извлечения и гидролиза арбутина. Разработан спектрофотометрический метод определения салидрозидов в экстракте из корневищ с корнями радиолы розовой, который можно использовать для количественного определения салидрозидов в растительном материале. Исходя из строения фенольных гликозидов и их УФ спектров, возможно количественное хромато-спектрофотометрическое определение всех представителей этой группы.

Методика количественного определения арбутина в листьях толокнянки (*Folium Uvae ursi*) и листьях брусники (*Folium Vitis idaeae*). Около 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного и просеянного через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл воды и кипятят 30 мин. Горячее извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания растительного материала на фильтр. Растительный материал в колбе заливают 25 мл воды и кипятят 20 мин. Горячее извлечение вместе с растительным материалом переносят на фильтр, фильтруют и остаток на фильтре промывают дважды по 10 мл горячей водой. К фильтрату в мерной колбе добавляют 3 мл раствора ацетата свинца, перемешивают и по охлаждению доводят объем до метки. Колбу нагревают на кипящей водяной бане до полного створаживания осадка. Горячую жидкость фильтруют в колбу, охлаждают, добавляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 , колбу взвешивают, соединяют с обратным холодильником и кипятят при слабом кипении 1,5 ч. После охлаждения потерю в массе восстанавливают добавлением воды и жидкость фильтруют, к фильтрату добавляют 0,1 г цинковой пыли и встряхивают 5 мин. Жидкость нейтрализуют по лакмусовой бумажке гидрокарбонатом

натрия, добавляют еще 2 г гидрокарбоната натрия и после его растворения фильтруют в сухую колбу. К 50 мл фильтрата прибавляют 200 мл воды и немедленно титруют из полумикробюретки 0,1 н. раствором иода до синего окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин (индикатор — крахмал).

1 мл 0,1 н. раствора иода соответствует 0,01361 арбутина. Процентное содержание арбутина в растительном материале x в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{V \cdot 0,01361 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{m (100 - w)},$$

где V — объем 0,1 н. раствора иода, израсходованного на титрование, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Содержание арбутина в сырье регламентируется НТД.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); уксусная кислота 5%-ная; NaOH, 10%-ный раствор в метиловом спирте; реактив Паули; свинца ацетат (раствор); H_2SO_4 (конц.); сульфат закисного железа; цинковая пыль; натрия гидрокарбонат; иод 0,1 н. раствор; крахмал.

Бумага хроматографическая; пластинки стеклянные; камера хроматографическая для БХ; колбы конические вместимостью 100 и 500 мл; полумикробюретки; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; бумага фильтровальная.

ФЛОРОГЛЮЦИДЫ

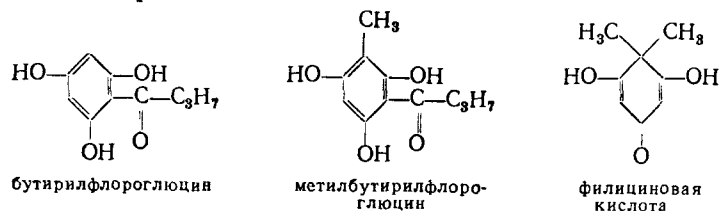
Флороглюциды — одна из групп природных соединений, довольно широко распространенных у представителей рода щитовник. Они представляют большой интерес для практической медицины, имеют еще не совсем изученный химический состав. В настоящее время насчитывается не более 50 природных веществ с установленной структурой.

Эти соединения обладают различным биологическим действием: антигельминтным, желчегонным, противовирусным, противонаρκотическим и др. В качестве официального в СССР и в большинстве фармакопей других стран включено корневище мужского папоротника семейства многожизковых. Некоторые фармакопей зарубежных стран допускают использование корневищ папоротников австрийского, игольчатого, раскидистого.

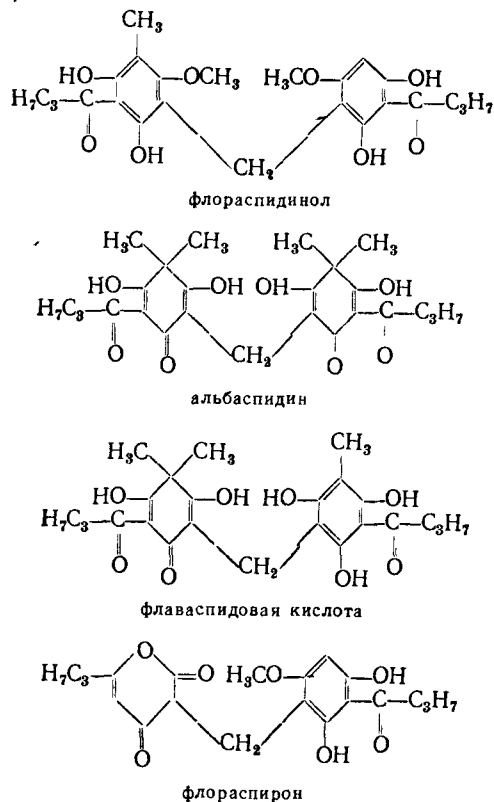
§ 6. Классификация

Флороглюциды являются соединениями, производными флороглюцина или пирона. Они встречаются в виде мономеров или веществ, связанных группой ($-CH_2-$) в димеры, тримеры или тетрамеры. Мономерные соединения в свою очередь подразделяются на: а) бутирилфлороглюцин и его производные; б) метилбутирилфлю-

роглюцин и его метоксилированные производные; в) филициновая кислота и ее производные:

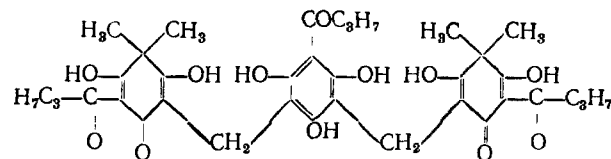


К димерным веществам относятся: а) производные бутирилфлороглюцина и метилбутирилфлороглюцина, например флораспидинол; б) производные ацилфилициновых кислот: альбаспидин и его гомологи; в) производные ацилфилициновых кислот, бутирилфлороглюцина, метилбутирилфлороглюцина, флаваспидовая кислота и ее гомологи, и др., например, флаваспидовая кислота; г) производные 2,3-дигидро-2-окси-6-пропил-γ-пирона (флораспирон и флоропирон):



Из тримерных соединений известно не более 5 веществ с установленной структурой. Так, из папоротника мужского выделена

филиксовая кислота:



К тетрамерным соединениям относят два известных в настоящее время природных вещества, одно из них метилен-бис-норфлаваспидовая кислота.

§ 7. Физико-химические свойства флороглюцидов

Флороглюциды обладают кислотным характером, обусловленным гидроксильными группами, связанными с ароматическим кольцом. Бензольное кольцо, вступая в реакцию с целым рядом реагентов, дает соединения с характерной окраской, что используется для обнаружения флороглюцидов в растениях. Флороглюциновые производные при отсутствии в их структуре пространственных затруднений способны к образованию межмолекулярных и внутримолекулярных связей. Они имеют характерную область поглощения в УФ спектрах (215—240 и 240—380 нм); кристаллизуются в виде веществ желтого, реже белого цвета; нерастворимы в воде, растворимы в органических растворителях (избирательно), хорошо — в щелочах и жирных маслах.

§ 8. Методы выделения и идентификация

Выделение производных флороглюцина из растительного сырья проводят экстракцией различными органическими растворителями: этиловым эфиром, хлороформом, ацетоном, этиловым и метиловым

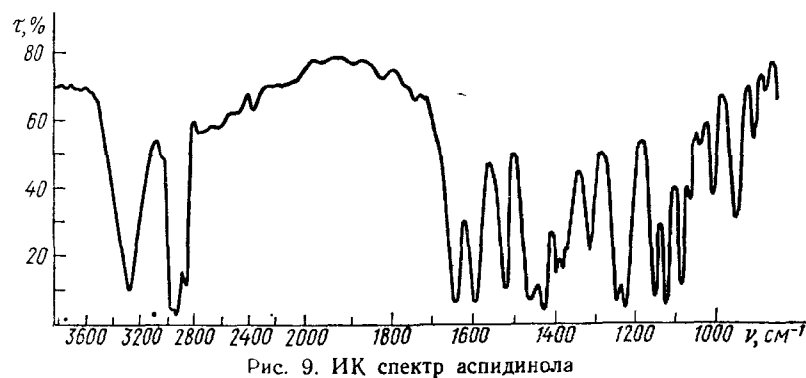


Рис. 9. ИК спектр аспидинола

спиртами. Получаемый после отгонки растворителя густой экстракт обрабатывают водным раствором гидроксида бария, оксида магния и т. д., в результате чего флороглюциды переходят в феноляты.

Водные растворы затем подкисляют концентрированными соляной, серной или уксусной кислотами, при этом в осадок выпадает сумма флороглюцидов, называемая сырым филицином.

Хроматографический метод считается наиболее подходящим для разделения производных флороглюцина и чаще всего используется

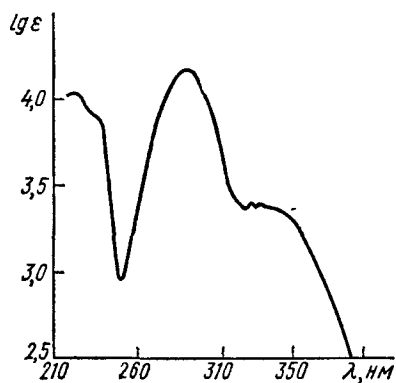


Рис. 10. УФ спектр аспидинола

при изучении этих веществ. Для этих целей применяют бумажную хроматографию, хроматографию в тонком слое сорбента и хроматографический метод разделения на колонках. Адсорбентом служат силикагель, диоксид кремния, полиамид, оксид алюминия. В качестве подвижной фазы используются смеси: петролейный эфир — хлороформ (1 : 1); бензол — хлороформ (1 : 1); циклогексан — хлороформ (1 : 1); гексан — петролейный эфир (1 : 1) с 5 % этилового спирта и др. На хроматограмме для обнаружения производных флороглюцина используют их свойства

флуоресцировать в УФ свете, а также давать окрашенные соединения с диазореактивами. Строение веществ устанавливается на основании элементного анализа, температуры плавления, получения производных, в результате щелочного гидролиза (у ди- и полимеров), УФ, ИК, ПМР и масс-спектроскопии. На рис. 9 и 10 приведены данные спектра УФ и ИК для мономера аспидинола, выделенного из корневищ мужского папоротника.

§ 9. Качественное определение

Получение извлечения: 1 г измельченного сырья помещают в колбу с притертой пробкой, заливают 4-кратным количеством хлороформа (этиловый, метиловый спирт) и оставляют на сутки, периодически взбалтывая. Затем фильтруют через бумажный фильтр (извлечение «А»).

Получение сырого филицина. 10 г измельченных корневищ сырья заливают восьмикратным количеством этилового спирта, взбалтывают в течение 30 мин и оставляют на 3 ч для экстракции. Извлечение фильтруют и упаривают в вакууме при температуре 55—60 °С до густой консистенции. Остаток обрабатывают несколько раз насыщенным раствором гидроксида бария и фильтруют. Фильтрат подкисляют концентрированной HCl до pH 2,0. Выпавший осадок сырого филицина отфильтровывают, промывают дистиллированной водой и высушивают в эксикаторе.

Методики качественных реакций. 1. К 1 мл извлечения добавляют 3—5 капель смеси равных объемов 1%-ного раствора FeCl₃ и K₄Fe(CN)₆. Образуется темно-зеленое окрашивание.

2. К 1 мл извлечения добавляют 2—3 капли реактива Паули по Кутачеку: вишнево-красная окраска переходит в оранжевую.

3. К 1 мл извлечения прибавляют раствор ванилина в концентрированной HCl: появляется красное окрашивание.

4. К 1 мл извлечения добавляют раствор FeCl₃, K₄Fe(CN)₆ (1 : 1) и 10 капель концентрированной HNO₃. Образуется темно-бурое окрашивание.

5. Хроматографическое определение. На пластинку «Силуфол», пропитанную лимонно-фосфатным буфером (pH 6,0), с последующим активированием пластинки при температуре 70—80 °С (1 ч) наносят 1%-ный сырой филицин из мужского папоротника (5—6%-ный раствор из игольчатого папоротника) в хлороформе капилляром в одно касание на стартовую линию хроматографической пластинки, высота жидкости в капилляре 1,5—2 см, диаметр полученного пятна 2—3 мм. Высушенную пластинку помещают в хроматографическую камеру со свежеприготовленной, насыщенной системой *n*-гексан — хлороформ (1 : 1) с 5 % этилового спирта. Время хроматографирования 1 ч. Хроматограмму высушивают на воздухе и просматривают в УФ свете, отмечая зону флуоресценции. Проявляют флороглюциновые производные реактивом Паули по Кутачеку, отмечая цвет пятен (рис. 11).

В мужском папоротнике обнаруживаются не менее 6 пятен, из них идентифицированы флавааспидовая кислота, аспидинол, альбаспидин; в игольчатом папоротнике не менее 8 пятен, для 4 из них установлено строение (флавааспидовая кислота, аспидинол, дезаспидин и аспидин).

Хроматографическое разделение можно проводить в тонком слое силикагеля марки КСК, смешивая 4 г силикагеля с 10 мл лимонно-фосфатного буфера с pH 6,0 и последующим активированием пластинки в течение 1 ч при *t* = 105—110 °С в той же системе.

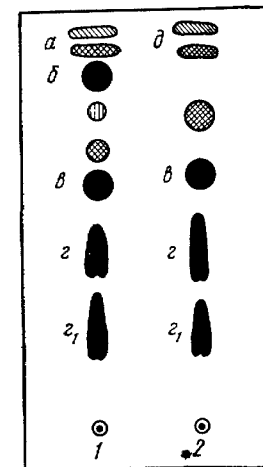


Рис. 11. Схема хроматограммы (ТСХ) флороглюцинов игольчатого и мужского папоротников:

1 — раствор сырого филицина из корневищ игольчатого папоротника; 2 — раствор сырого филицина из корневищ мужского папоротника; а — аспидин, б — дезаспидин, в — аспидинол; г — флавааспидовая кислота (таутомерные формы); д — альбаспидин

§ 10. Количественное определение

Методы количественного определения производных флороглюцина ограничивались в фармакопеех различных стран только определением сырого филицина. В литературе имеются сведения о разработке хроматоспектрофотометрических методов определения флороглюцинов.

роглюцидов в кристаллическом порошке и сырье, в частности для флаваспидовой, ацетилфлаваспидовой кислот, аспидина, аспидинола. Метод основан на способности поглощать фенольные соединения в УФ области при определенных длинах волн, характерных для этого класса соединений.

Методика определения суммы сырого филицина из корневищ мужского папоротника — *Rhizoma Filicis maris (Dryopteris filix mas L.)* (ГФ Х, ст. 584). 50 г порошка корневищ экстрагируют около 2 ч в аппарате Сокслета этиловым эфиром до тех пор, пока эфир не будет стекать бесцветным и 10 мл эфирного извлечения не перестанут оставаться при испарении видимого остатка. Извлечение фильтруют, эфир отгоняют на водяной бане до 30 мл, после чего остаток взбалтывают в делительной воронке с 30 мл насыщенного раствора гидроксида бария в течение 5 мин. После разделения слоев водный слой фильтруют. 24 мл фильтрата (40 г сырья) смешивают с 4 мл концентрированной HCl и последовательно взбалтывают с 30, 20, 15 мл этилового эфира. Объединенные эфирные извлечения обезвоживают 4 г безводного Na₂SO₄ и фильтруют через складчатый фильтр во взвешенную колбу. Сульфат натрия и фильтр промывают этиловым эфиром дважды по 10 мл. Эфир отгоняют на водяной бане, а остаток сушат в течение 1 ч при 100 °С. Процентное содержание филицина x рассчитывают по формуле

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - \omega)},$$

где a — количество сырого филицина, полученного после отгонки этилового эфира, г; m — масса навески сырья, вычисленная по отмеренному объему фильтрата, г; ω — потеря в массе сырья при высушивании.

Содержание сырого филицина в корневищах должно быть не менее 1,8 %.

Реактивы и оборудование: лимонная кислота; натрия фосфат двузамещенный; Ba(OH)₂; стрептоцид белый; NaNO₂; FeCl₃; K₄Fe(CN)₆; ванилин; хлороформ; n -гексан; этиловый спирт (этанол); n -бутанол (бутанол-1); HCl (конц.); этиловый эфир; Na₂SO₄; реактив Паули по Кутачеку [белый стрептоцид (3 г); n -бутанол (14 мл); HCl (конц., 6 мл); вода дистиллированная (200 мл), хранят в темной склянке, в реактив перед употреблением добавляют натрий нитрит кристаллический]; лимонно-фосфатный буфер с pH 6,0 [смесь двух растворов (раствор А — 0,2 М Na₂HPO₄ и раствор В — 0,1 М лимонной кислоты)]. Для получения 20 мл буфера смешивают 12,63 мл раствора А и 7,37 мл раствора В (pH проверяют по универсальному индикатору).

Аппарат Сокслета; силикагель марки КСК; шкаф сушильный лабораторный; колба круглодонная с нормальным шлифом вместимостью 500 мл; бани водяные лабораторные; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5—10 см; холодильник стеклянный лабораторный; фильтры бумажные; пробирки стеклянные; камера хроматографическая для ТСХ; капилляры стеклянные; пластинки «Силуфол»; пластинки стеклянные для ТСХ размером 20 × 20 см; пульверизатор; колбы конические вместимостью 100 мл; весы ручные; весы лабораторные аналитические; ступки фарфоровые с пестиком или кофемолка электрическая бытовая.

Вопросы для подготовки

1. Физико-химические свойства фенольных соединений.
2. Качественные реакции на арбутин и флороглюциды.
3. Хроматографический анализ.
4. Качественные реакции на фенольные соединения.
5. Методы количественного определения флороглюцидов и фенологликозидов в лекарственном сырье.

Литература

Шталь Э. М. Хроматография в тонких слоях. — М.: Мир, 1965.

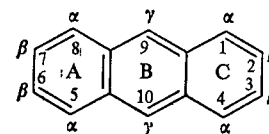
ГЛАВА 6. АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫЕ И ИХ ГЛИКОЗИДЫ

Производные антрацена широко распространены в природе. Они обнаружены в высших растениях, лишайниках, некоторых низших грибах, а также найдены в некоторых насекомых и морских организмах.

Около половины известных антраценпроизводных (примерно 100 соединений) выделено из высших растений. Здесь они наиболее часто встречаются в растениях семейств мареновых, гречишных, крушиновых, бобовых, лилейных, зверобойных, вербеновых и др.

Растения, содержащие антраценпроизводные, издавна находят применение для лечения различных заболеваний кожи, а также в качестве слабительных средств; получены препараты нефролитического действия и антибиотики. Некоторые растения известны как источники природных красителей.

Антраценпроизводными называют группу природных соединений, в основе которых лежит ядро антрацена различной степени окисленности по среднему кольцу (I, кольцо В):

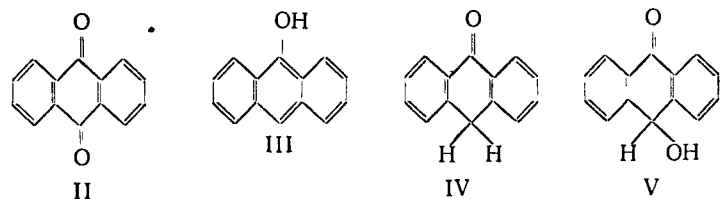


§ 1. Классификация

В зависимости от структуры углеродного скелета природные антраценпроизводные можно разделить на 3 основные группы: 1) соединения, в основе которых лежит 1 ядро антрацена (мономеры); 2) соединения с 2 ядрами антрацена (димеры); 3) конденсированные антраценпроизводные.

1. Первая группа соединений в зависимости от степени окисленности основного ядра в свою очередь подразделяется на 2 подгруппы:

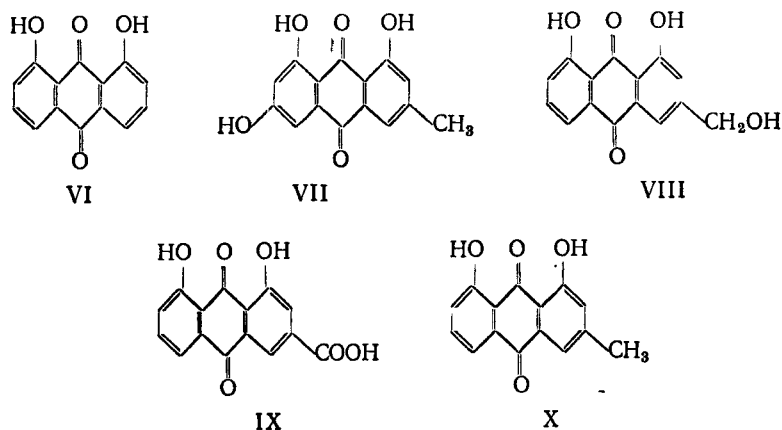
а) окисленные формы — в их основе лежит антрахиноновое ядро (II); б) восстановленные формы — производные антранола (III), антрона (IV), оксиантрона (V):



Большинство природных производных антрацена относится к антрахиноновому типу.

Внутри подгруппы соединения разделяются в зависимости от характера и расположения заместителей. В качестве заместителей антраценпроизводные содержат гидроксильные и метоксильные группы, а также метильную группу, которая может быть окисленной до спиртовой, альдегидной и кислотной.

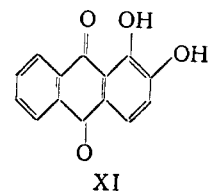
Наиболее известны производные 1,8-диоксиантрахинона, или хризацина (VI). К их числу относятся соединения, названные эмодинами — франгулаэмодин (VII), алоэ-эмодин (VIII) и другие аналогичные им соединения: реин (IX), хризофановая кислота (X):



Указанные соединения и их гликозиды содержатся в коре крушины ольховидной, корне ревеня тангутского, листьях кассии остролистной и узколистной, листьях алоэ, плодах жостера и других видах лекарственного сырья, обуславливая их слабительное действие.

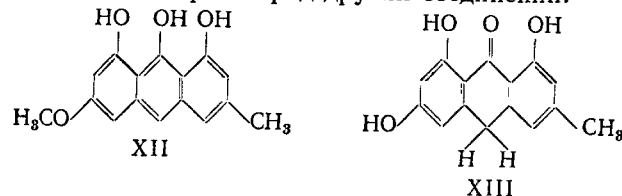
Производные антрахинона, содержащие оксигруппы в α - и β -положениях, — ализарин (XI), лудиин, пурпурин, рубиадин и их гликозиды — обладают нефролитическим действием и с успехом

применяются для лечения почечнокаменной болезни:



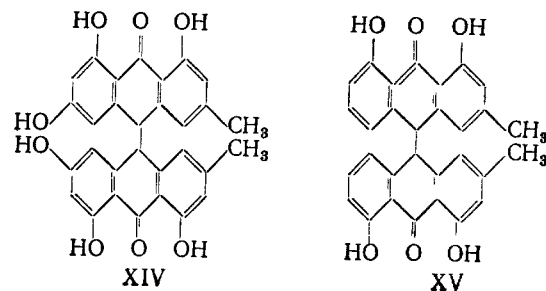
Восстановленные формы антраценпроизводных в своей основе содержат ядро антранола, антрона, оксиантрона. Эти соединения очень лабильны и легко окисляются кислородом воздуха до соответствующих антрахинонов. В связи с этим они изучены меньше.

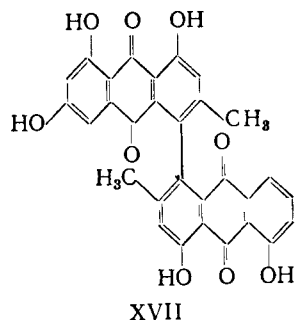
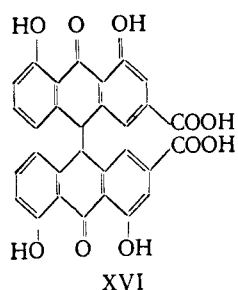
Выделены фисцион-антранол (XII), франгулаэмодин-антрон (XIII), алоэ-эмодин-антрон и ряд других соединений:



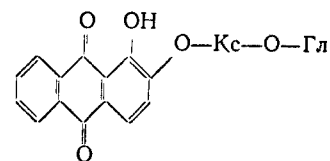
При лечении различных кожных заболеваний (экзема, псориаз и др.) применяется препарат хризаробин, получаемый из южно-американского дерева *Andira araroba*; основной компонент хризаробина — 3-метил-1,8-диоксиантранол. Это соединение может быть получено также восстановлением хризофановой кислоты.

II. Димеры антраценпроизводных обнаружены в высших растениях, лишайниках и несовершенных грибах. В основе соединений этой группы встречаются как окисленные, так и восстановленные формы. Восстановленные формы соединены в димеры, как правило, по среднему кольцу (в γ -положении), антрахиноны могут быть соединены в α - и β -положениях. Молекула димерного соединения может быть симметрична, т. е. состоять из одинаковых остатков, или несимметрична — из разных. В высших растениях чаще встречаются димеры восстановленных форм: эмодиндиантрон (XIV), хризофанолдиантрон (XV), пальмидин В и др., выделенные из различных видов рода жостер; сеннидин А (XVI) и др. — из видов кассии. В кассии содержатся также и димеры антрахинона — вассианин (XVII), кассиамин:

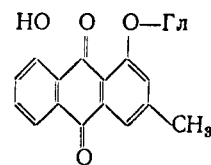




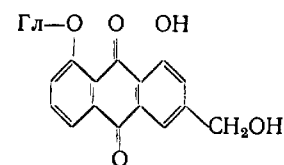
видов алоэ:



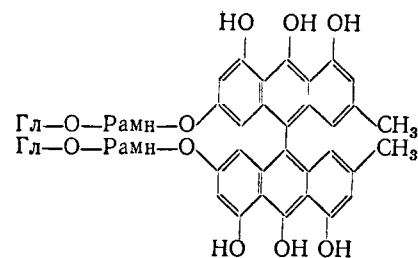
XIX



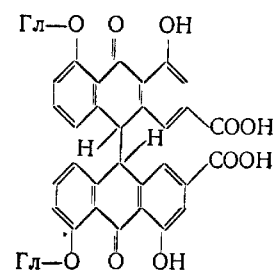
XX



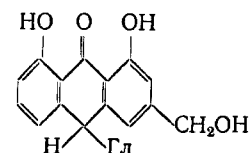
XXI



XXII



XXIII



XXIV

§ 2. Физико-химические свойства

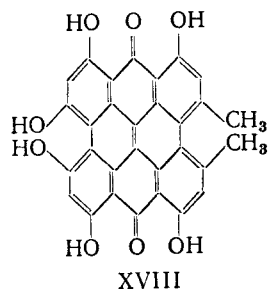
Антраценпроизводные — кристаллические вещества желтого, оранжевого или красного цвета. Свободные агликоны хорошо растворяются в этиловом эфире, хлороформе, бензоле и других органических растворителях; в воде не растворяются, но хорошо растворимы в водных растворах щелочей за счет образования фенолятов.

В форме гликозидов антраценпроизводные хорошо растворяются в воде, еще лучше — в щелочи, хуже — этаноле и метаноле; нерастворимы в органических растворителях — бензоле, этиловом эфире, хлороформе и др.

При нагревании до 210 °С антраценпроизводные сублимируются.

Димеры антрахинона наиболее широко распространены в несовершенных грибах (различные плесени родов *Penicillium*, *Aspergillus*).

III. Конденсированные антраценпроизводные выделены из различных видов зверобоя — гиперин (XVIII) и др., из гречихи — фагопирин:



XVIII

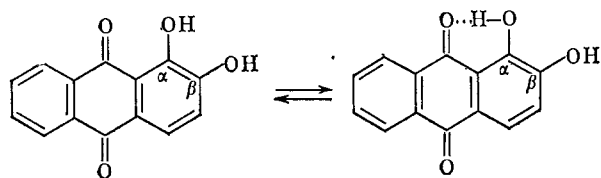
Препарат зверобоя — новоиманин, содержащий конденсированные антраценпроизводные, обладает высокой антибактериальной активностью.

Антраценпроизводные в растениях встречаются как в свободном виде, так и в виде гликозидов, которые называются антрагликозидами. В качестве агликонов в составе антрагликозидов встречаются все группы антраценпроизводных, за исключением диантрахинонов. Сахарный компонент может быть представлен глюкозой, рамнозой, ксилозой, арабинозой. Большинство антрагликозидов — О-гликозиды; при этом сахарный компонент может быть присоединен к агликону в α- и β-положениях. Наиболее известные антрагликозиды лекарственных растений: руберитриновая кислота (XIX), лусидинпримверозид, выделенные из марены красильной; хризифанеин (XX), глюко-алоэ-эмодин (XXI), глюкорейн — из видов ревеня, щавеля и др.; франгуларозид (XXII) — из крушины; сеннозиды А и В (XXIII) — из кассии и т. д. Обнаружены также С-гликозиды [барбалоин (XXIV) и др.], выделенные из

Большинство антраценпроизводных флуоресцирует при возбуждении УФ и сине-фиолетовым светом. При этом характер флуоресценции зависит как от степени окисленности основного ядра, так и от числа и расположения заместителей: антрахиноны характеризуются, как правило, оранжевой, розовой, красной и огненно-красной флуоресценцией; антроны и антранолы — желтой, голубой, фиолетовой.

§ 3. Методы выделения и идентификация

Для выделения антрагликозидов растительный материал экстрагуют водой, спиртами (этиловым, метиловым) или водно-спиртовыми смесями. Агликоны лучше растворимы в органических растворителях, но растворимость их избирательная. Для получения агликонов гликозиды в растительном материале подвергают гидролизу, нагревая с кислотой, или энзиматическому расщеплению, после чего извлекают свободные агликоны этиловым эфиром, бензолом или хлороформом. Антрахиноны, имеющие в качестве заместителя карбоксильную группу, растворяются в водных растворах карбонатов и гидрокарбонатов щелочных металлов и их гидроксидов с образованием солей. Антрахиноны с гидроксильной группой в β -положении взаимодействуют с гидрокарбонатами, а с водными растворами карбонатов и гидроксидов щелочных металлов дают феноляты. Вещества, содержащие α -гидроксил, образуют феноляты только в растворах щелочей. Различие свойств оксигрупп в α - и β -положениях объясняется тем, что α -гидроксилы образуют внутримолекулярную водородную связь с соседней карбонильной группой и поэтому обладают меньшей реакционной способностью:



На различии свойств антраценпроизводных в зависимости от характера и расположения заместителей основаны все классические методы разделения этих соединений. Основным методом разделения антраценпроизводных является хроматографический. В качестве сорбента при этом наиболее успешно применяется полиамид; хорошие результаты дает также силикагель. Растворителями при разделении антрагликозидов служат главным образом водно-спиртовые смеси, а при разделении агликонов — бензол, толуол, хлороформ.

Идентификация проводится с помощью химических и физических методов, которые дополняют друг друга. Из физических методов наиболее полную информацию дают спектральные, которые позволяют установить класс соединений, а также наличие и характер заместителей.

УФ спектроскопия широко используется в структурных исследованиях антраценпроизводных. В УФ области эти соединения имеют несколько максимумов поглощения выше 200 нм. Каждый тип замещения характеризуется определенным набором спектральных характеристик, что используется при установлении структуры новых соединений этой группы (рис. 12).

ИК спектроскопия нашла наиболее широкое применение при изучении структуры антраценпроизводных, так как ИК спектры этих соединений специфичны и могут быть использованы для идентификации. Наличие ароматических колец в антрахиноне обуславливает появление интенсивной полосы в области $1578\text{--}1596\text{ см}^{-1}$ (рис. 13). Производные антрахинона, не имеющие α -гидроксильных групп, дают одну сильную полосу в области $1678\text{--}1653\text{ см}^{-1}$, обусловленную карбонильными группами хиноидного кольца. α -Гидроксилы характеризуются широкой полосой с центром 2900 см^{-1} , что объясняется образованием внутримолекулярной водородной связи между α -гидроксильными и хиноидным карбонилем. β -Гидроксильные группы могут быть определены по появлению полосы в области $3400\text{--}3150\text{ см}^{-1}$,

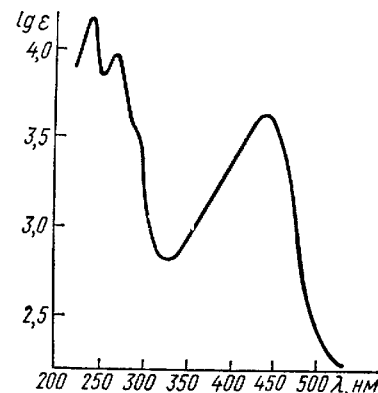


Рис. 12. УФ спектр реина

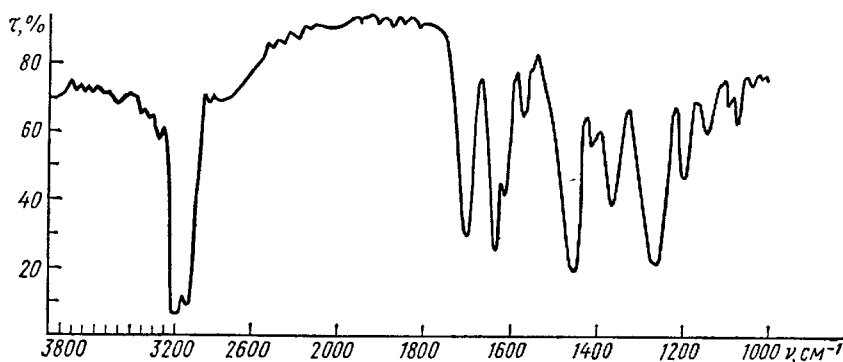


Рис. 13. ИК спектр реина

что типично для оксигрупп, способных образовывать межмолекулярные водородные связи. У производных антрона свободная карбонильная группа хиноидного кольца поглощает в области 1654 см^{-1} . Таким образом, при изучении структуры антраценпроизводных с помощью инфракрасной спектроскопии используют главным образом частоту поглощения отдельных групп и заместителей соединения.

ЯМР спектроскопия также находит применение для изучения структуры антраценпроизводных. Характер спектра ядерного магнитного резонанса в основном определяется числом и положением ароматических протонов, а также положением и строением водород-содержащих заместителей.

§ 4. Качественное определение

Методики качественных реакций. 1. Реакция со щелочью. 0,2 г измельченного растительного материала кипятят в течение 2 мин с 5 мл 10%-ного NaOH. После остывания смесь разбавляют 5 мл воды и фильтруют. 3 мл фильтрата помещают в пробирку, добавляют 3 мл 10%-ной HCl и 10 мл бензола. Осторожно перемешивают и после расслоения жидкости сливают бензольный слой, фильтруя его через небольшой комочек ваты. Фильтрат встряхивают с 3 мл 10%-ного раствора аммиака.

При наличии антраценпроизводных аммиачный слой принимает вишнево-красное (1,8-диоксиантрахиноны), пурпурное (1,4-диоксиантрахиноны) или фиолетовое (1,2-диоксиантрахиноны) окрашивание.

Сущность реакции в следующем: при кипячении растительного материала со щелочью происходит гидролиз антрагликозидов с образованием свободных агликонов. Одновременно антрон- и антранолпроизводные окисляются до антрахинонов. Образовавшиеся оксиантрахиноны за счет фенольных гидроксильных групп дают феноляты, растворимые в воде. При подкислении водно-щелочного извлечения диссоциация фенольных гидроксильных групп подавляется и соединения становятся липофильными, в результате чего при встряхивании с бензолом они из водного слоя переходят в бензол; бензольный слой при этом принимает желтую окраску оксиантрахинонов. При встряхивании бензольного слоя с раствором аммиака вновь происходит образование фенолятов антрахинонов и они переходят в аммиачный слой. Феноляты оксиантрахинонов имеют яркий вишнево-красный, пурпурный или фиолетовый цвет в зависимости от положения оксигрупп.

2. Сублимация антраценпроизводных. На дно сухой пробирки помещают 0,2 г измельченного растительного материала и осторожно нагревают, держа пробирку почти горизонтально. Температура сублимации 210 °C, время сублимации 10 мин.

Сублимат конденсируется на холодных участках пробирки в виде желтых капелек или желтых игольчатых кристаллов. После остывания пробирки к сублимату прибавляют 1 каплю 5%-ного NaOH в этиловом спирте; появляется яркое красное или фиолетовое окрашивание в зависимости от состава антраценпроизводных (образование фенолятов). Сущность реакции: содержащиеся в растительном материале антрагликозиды при высокой температуре расщепляются с образованием свободных агликонов; одновременно производные антрона и антранола окисляются до антрахинонов, которые возгоняются.

№ п/п рисунков	№ пятна	Хроматограмма после проявления КОН		Название вещества
		цвет пятна в видимом свете	флуоресценция в УФ свете	
Рис. 14	1	Бесцветный	Светло-зеленая	Франгулаэмодин
	2	»	Слабо-фиолетовая	
	3	»	Ярко-фиолетовая	
	4	Слабо-желтый	Слабо-оранжевая	
	5	Красный	Оранжево-красная	
	6	Светло-желтый	Светло-голубая	
	7	Слабо-желтый	Ярко-фиолетовая	
	8	Темно-желтый	Темно-коричневая	
	9	Серо-коричневый	Темно-серая	
	10	Красный	Фиолетово-красная	
Рис. 15	1	Бесцветный	Слабо-оранжевая	Антрагликозиды » Франгулаэмодин
	2	»	»	
	3	Слабо-желтый	Слабо-темно-фиолетовая	
	4	»	Светло-зеленая	
	5	Слабо-красный	Фиолетовая	
	6	Красный	Оранжево-красная	
	7	Слабо-красный	Фиолетово-красная	
	8	Слабо-желтый	Слабо-оранжевая	
	9	Темно-желтый	Темно-коричневая	
	10	Красный	Фиолетово-красная	
Рис. 16	1	Розоватый	Оранжево-красная	Глюкофрангулин Франгулин Франгулаэмодин
	2	Слегка сероватый	Светло-зеленая	
	3Г	Красный	Ярко-оранжевая	
	4	»	Красно-оранжевая	
	5	Бесцветный	Светло-зеленая	
	6	Розовый	Розовая	
	7	Оранжевый	Оранжево-красная	
	8	Красный	Фиолетово-красная	
Рис. 17	1	Ярко-желтый	Темно-желтая	Франгулин Франгулаэмодин Хлорофилл
	2	»	»	
	3	Бесцветный	Светло-зеленая	
	4	Слабо-желтый	Красная	
	5	»	Розовая	
	6	Слабо-оранжевый	Оранжево-красная	
	7	Слабо-желтый	Желтая	
	8	Красный	Фиолетово-красная	
	9	Слабо-зеленый	Розовая	
Рис. 18	1	Оранжевый	Оранжевая	Луцидинпримверозид Руберитриновая кислота
	2	Красный	Огненно-красная	

№ п/п рисунков	№ пятна	Хроматограмма после проявления КОН		Название вещества
		цвет пятна в видимом свете	флуоресценция в УФ свете	
Рис. 19	3	Слабо-желтый	Слабо-оранжевая	Ализарин
	4	»	»	
	5	Бесцветный	Слабо-розовая	
	6	»	»	
	7	»	Слабо-фиолетовая	
	8	Пурпурно-фиолетовый	Темно-коричневая	
Рис. 19	1	Бесцветный	Фиолетовая	Реин
	2	Слабо-желтый	Желто-зеленая	
	3	Ярко-желтый	»	
	4	Слабо-оранжевый	Красная	
	5	Очень слабо-оранжевый	Розовая	
	6	Бесцветный	Голубая	
	7	Слабо-фиолетово-красный	Красно-фиолетовая	
	8	Зеленовато-серый	Желтая	
	9	Зеленый	Красная	
				Хлорофилл

Методики хроматографического определения. При анализе лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, используется хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента.

При исследовании состава антрагликозидов готовят водные извлечения; при анализе состава агликонов сырье экстрагируют бензолом, этиловым или метиловым спиртом, которые при нагревании более или менее удовлетворительно экстрагируют как свободные антраценпроизводные, так и их гликозидные формы.

0,3 г измельченного растительного материала нагревают с 3 мл этилового спирта в течение 5 мин, доводя до слабого кипения. После остывания фильтруют. 0,1 мл фильтрата наносят на линию старта и хроматографируют в системе этилацетат — метиловый спирт — вода (100 : 17 : 13) на пластинках «Силуфол». Время хроматографирования 30—40 мин. Хроматограмму высушивают на воздухе, обрабатывают 5%-ным NaOH в этиловом спирте и рассматривают при дневном свете и УФ свете до и после обработки. Одновременно хроматографируют стандарт «свидетель», нанося его раствор рядом с исследуемым извлечением. По величине R_f , характеру окраски и флуоресценции пятен идентифицируют антраценпроизводные исследуемого сырья (рис. 14—19). В табл. 1 даны пояснения к рисункам.

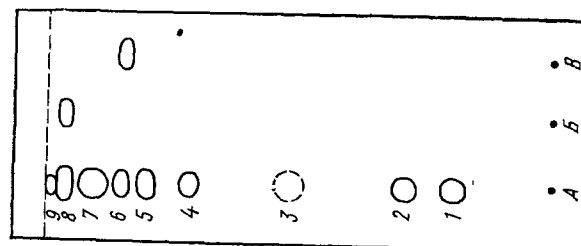


Рис. 17. Схема хроматограммы антраценпроизводных жостера слабительного:
А — этанольное извлечение плодов жостера слабительного; Б — франгулаэмодин; В — франгулин

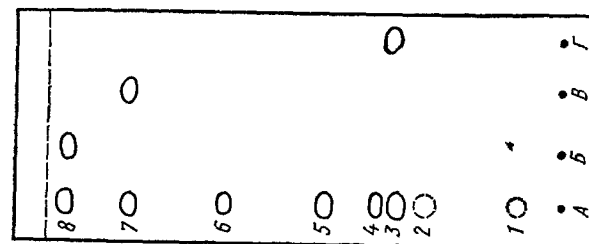


Рис. 16. Схема хроматограммы антраценпроизводных крушины ольховидной:
А — этанольное извлечение коры крушины ольховидной; Б — франгулаэмодин; В — франгулин; Г — глюкофрангулин

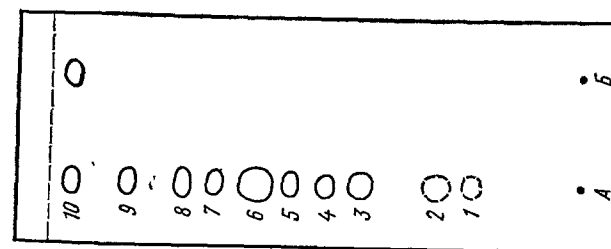


Рис. 15. Схема хроматограммы антраценпроизводных ревеня тангутского:
А — этанольное извлечение корней и корневищ ревеня тангутского; Б — франгулаэмодин

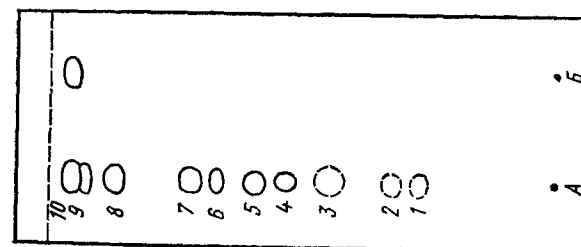


Рис. 14. Схема хроматограммы антраценпроизводных шафеля конского:
А — этанольное извлечение корней шафеля конского; Б — франгулаэмодин-стандарт

№ п/п рисунков	№ пятна	Хроматограмма после проявления КОН		Название вещества
		цвет пятна в видимом свете	флуоресценция в УФ свете	
Рис. 19	3	Слабо-желтый	Слабо-оранжевая	Ализарин
	4	»	»	
	5	Бесцветный	Слабо-розовая	
	6	»	»	
	7	»	Слабо-фиолетовая	
	8	Пурпурно-фиолетовый	Темно-коричневая	
Рис. 19	1	Бесцветный	Фиолетовая	Рейн
	2	Слабо-желтый	Желто-зеленая	
	3	Ярко-желтый	»	
	4	Слабо-оранжевый	Красная	
	5	Очень слабо-оранжевый	Розовая	
	6	Бесцветный	Голубая	
	7	Слабо-фиолетово-красный	Красно-фиолетовая	
	8	Зеленовато-серый	Желтая	
	9	Зеленый	Красная	
				Хлорофилл

Методики хроматографического определения. При анализе лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, используется хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента.

При исследовании состава антрагликозидов готовят водные извлечения; при анализе состава агликонов сырье экстрагируют бензолом, этиловым или метиловым спиртом, которые при нагревании более или менее удовлетворительно экстрагируют как свободные антраценпроизводные, так и их гликозидные формы.

0,3 г измельченного растительного материала нагревают с 3 мл этилового спирта в течение 5 мин, доводя до слабого кипения. После остывания фильтруют. 0,1 мл фильтрата наносят на линию старта и хроматографируют в системе этилацетат — метиловый спирт — вода (100 : 17 : 13) на пластинках «Силуфол». Время хроматографирования 30—40 мин. Хроматограмму высушивают на воздухе, обрабатывают 5%-ным NaOH в этиловом спирте и рассматривают при дневном свете и УФ свете до и после обработки. Одновременно хроматографируют стандарт «свидетель», нанося его раствор рядом с исследуемым извлечением. По величине R_f , характеру окраски и флуоресценции пятен идентифицируют антраценпроизводные исследуемого сырья (рис. 14—19). В табл. 1 даны пояснения к рисункам.

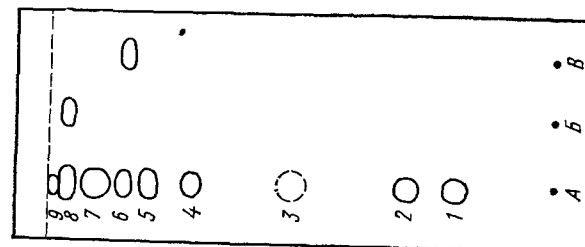


Рис. 17. Схема хроматограммы антраценпроизводных жостера слабительного:

А — этанольное извлечение плодов жостера слабительного; Б — франгулаэмодин; В — франгулин

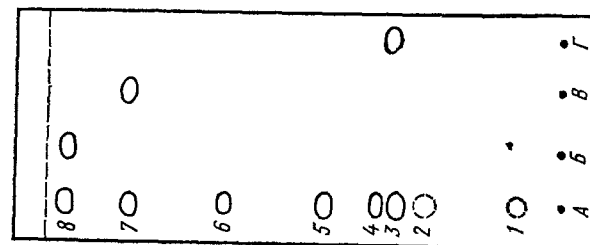


Рис. 16. Схема хроматограммы антраценпроизводных крушины ольховидной:

А — этанольное извлечение коры крушины ольховидной; Б — франгулаэмодин; В — франгулин; Г — глюкофрангулин

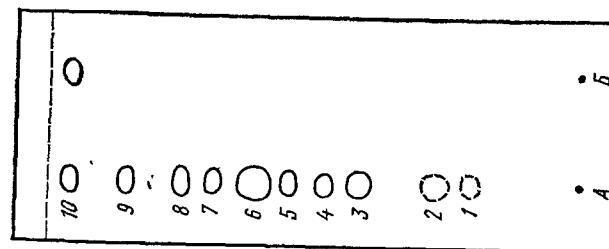


Рис. 15. Схема хроматограммы антраценпроизводных ревеня тангутского:

А — этанольное извлечение корней и корневищ ревеня тангутского; Б — франгулаэмодин

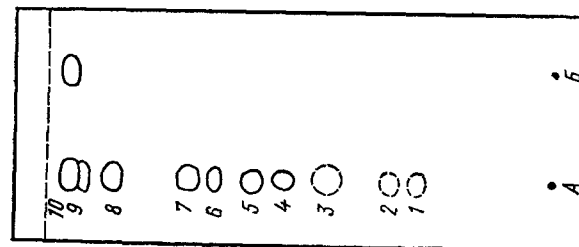


Рис. 14. Схема хроматограммы антраценпроизводных шафеля конского:

А — этанольное извлечение корней шафеля конского; Б — франгулаэмодин-стандарт

при исследовании антрагликозидов хроматографирование ведут в системе этилацетат — муравьиная кислота — вода (10 : 2 : 3); из свободных антраценпроизводных ведут в толуоле (хроматография на бумаге).

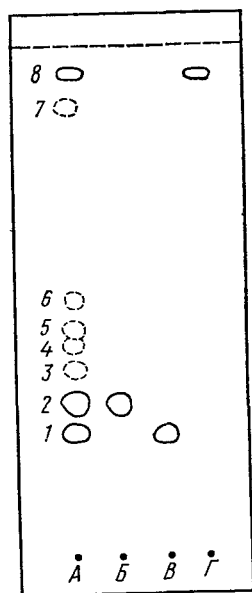


Рис. 18. Схема хроматограммы антраценпроизводных марены красильной:

А — этанольное извлечение корней и корневищ марены красильной; Б — руберитриновая кислота; В — лугдинпримверозид; Г — аливарин

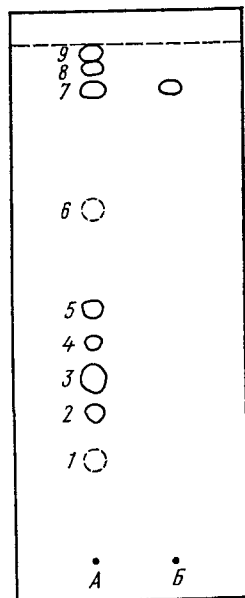


Рис. 19. Схема хроматограммы антраценпроизводных кассии остролистной:

А — этанольное извлечение из листьев кассии остролистной; Б — реин

§ 5. Количественное определение

Большинство методов количественного определения антраценпроизводных предусматривает определение суммы свободных антрахинонов после предварительного гидролиза антрагликозидов.

В настоящее время наиболее широко применяется колориметрический метод, предложенный Аутергофом, в различных модификациях. Метод принят ГФ X для определения антраценпроизводных лекарственном растительном сырье. Метод ГФ X с некоторыми изменениями (в целях безопасности работы этиловый эфир заменяют хлороформом) приводится ниже.

Методика количественного определения суммы антраценпроизводных (свободных и связанных в виде гликозидов). 0,05 г (точная масса) порошка исследуемого сырья помещают в круглодонную

колбу с нормальным шлифом вместимостью 100 мл, соединяют с обратным холодильником и подвергают гидролизу путем кипячения в течение 15 мин с 7,5 мл ледяной уксусной кислоты (при исследовании коры крушины ольховидной, корня ревеня) или с 7,5 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл концентрированной HCl (при исследовании листьев сенны, корневища и корня марены). Во время нагревания колбу слегка покачивают, чтобы не допустить пригорания растительного материала. После остывания в колбу, не снимая холодильника, прибавляют 30 мл хлороформа и кипятят на водяной бане в течение 15 мин для экстрагирования свободных антраценпроизводных. После остывания (колбу вместе с холодильником снять с водяной бани) хлороформное извлечение фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 300 мл. Колбу дважды ополаскивают хлороформом (по 10 мл) и, пропуская через эту же вату, выливают в делительную воронку; вату дважды промывают хлороформом (по 5 мл).

К хлороформному извлечению в делительной воронке прибавляют 40 мл воды и, слегка покачивая воронку, добиваются перемешивания слоев жидкости, чтобы отмыть избыток кислоты. После полного расслоения нижний, хлороформный, слой сливают в коническую колбу вместимостью 250 мл, а водный слой отбрасывают. Из колбы хлороформное извлечение вновь переносят в делительную воронку и приливают туда щелочно-аммиачного раствора (5%-ного NaOH, содержащего 2%-ный аммиак), предварительно ополоснув им колбу. Покачивая делительную воронку в виде «8», добиваются тщательного перемешивания слоев жидкости, чтобы извлечь антраценпроизводные щелочно-аммиачным раствором из хлороформа. Через 5 мин делительную воронку оставляют в покое, и после полного расслоения жидкости сливают нижний, хлороформный, слой в коническую колбу; красный или фиолетовый, прозрачный водно-щелочной слой сливают в мерную колбу вместимостью 250 мл. Хлороформный слой вновь переносят в делительную воронку, приливают туда 20 мл щелочно-аммиачного раствора, предварительно ополоснув им колбу, и вновь извлекают антраценпроизводные, как описано выше, до тех пор, пока водно-щелочной слой перестанет окрашиваться.

Собранные водно-щелочные извлечения доводят в мерной колбе до метки щелочно-аммиачным раствором и перемешивают. 25 мл полученного окрашенного раствора помещают в круглодонную колбу с нормальным шлифом, соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После остывания измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром ($\lambda = 525$ нм) в кювете толщиной слоя 10 мм (нулевую точку устанавливают по дистиллированной воде). При получении слишком интенсивной окраски раствор перед колориметрированием разбавляют щелочно-аммиачным раствором.

Концентрацию антраценпроизводных в колориметрическом растворе, выраженную в истизине, определяют по калибровочному

афику, построенному по хлориду кобальта ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Для этого готовят от 0,2 до 3,0%-ные растворы хлорида кобальта (10—растворов равномерно возрастающей концентрации) и измеряют оптическую плотность на этом же фотоэлектроколориметре (калибровочный график студенты получают готовым). По оси ординат кладывают значение оптической плотности, а оси абсцисс — концентрацию антраценпроизводных в миллиграммах на 100 мл, исходя из того, что 1%-ный хлорид кобальта по оптической плотности соответствует 0,36 мг истизина в 100 мл щелочно-аммиачного раствора. Приготовление эталонных растворов и определение их оптической плотности производят не менее 3 раз.

Процентное содержание антраценпроизводных в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{aVK}{m10(100 - \omega)},$$

где a — концентрация антраценпроизводных в мг на 100 мл, найденная по калибровочному графику; V — первоначальный объем щелочного извлечения, мл; m — масса навески сырья, г; ω — потеря в массе сырья при высушивании, %; K — коэффициент разбавления раствора перед колориметрированием.

Методика количественного определения антрагликозидов. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 150 мл, приливают 100 мл воды, перемешивают 10 мин, нагревают с обратным холодильником в кипящей водяной бане в течение 15 мин при периодическом перемешивании (покачивании). После охлаждения под струей воды смесь перемешивают, дают постоять 10 мин и фильтруют через бумажный складчатый фильтр. 5 мл полученного извлечения помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 2,5 мл 50%-ной H_2SO_4 и нагревают в кипящей водяной бане при периодическом перемешивании в течение 30 мин. После охлаждения раствор переносят в делительную воронку вместимостью 300 мл, а колбу ополаскивают 10 мл воды и 60 мл хлороформа. Промывные воды и хлороформ присоединяют к основному извлечению в делительной воронке и взбалтывают в течение 5 мин. После отстаивания хлороформный слой отделяют, а извлечение взбалтывают с новой порцией (30 мл) хлороформа. К объединенному хлороформному извлечению прибавляют 50 мл щелочно-аммиачного раствора и осторожно взбалтывают в течение 5 мин. После отстаивания прозрачный водный слой сливают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят щелочно-аммиачным раствором до метки и перемешивают. 25 мл полученного раствора помещают в коническую колбу с обратным холодильником и нагревают в кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения жидкость количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем щелочно-аммиачным раствором до метки.

Оптическую плотность раствора измеряют с помощью спектрофотометра при $\lambda = 525$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор.

Концентрацию производных антрацена в растворе, выраженную в хризофановой кислоте, определяют по калибровочному графику, построенному по растворам хлорида кобальта. Процентное содержание антраценпроизводных (в пересчете на антрагликозиды) x вычисляют по формуле

$$x = \frac{a100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1,59}{1000 \cdot 1000m25 \cdot 25(100 - \omega)} = \frac{a8 \cdot 1,59}{m(100 - \omega)},$$

где a — концентрация антраценпроизводных испытуемого раствора, найденная по калибровочному графику, мг/л; m — масса навески сырья, г; ω — потеря в массе сырья при высушивании, %; 1,59 — отношение средней массы антрагликозидов к средней массе агликонов.

Для определения отдельных соединений антраценпроизводных пользуются хроматоспектрофотометрическими методами. Из растительного материала антраценпроизводные экстрагируют в виде гликозидов или свободных агликонов и разделяют с помощью хроматографии на бумаге или в тонком слое силикагеля. Для разделения антраценпроизводных, извлекаемых метиловым спиртом (антрагликозиды и свободные агликоны), предложен метод тонкослойной хроматографии на силикагеле марки КСК в системе растворителей бензол — метиловый спирт (4 : 1). Пятна антраценпроизводных на хроматограмме отмечают в УФ свете и собирают каждое пятно на стеклянный фильтр № 4. Фильтр промывают 0,5 н. NaOH, количественно переносят в мерные колбы емкостью 50 мл и доводят объем до метки 0,5 н. NaOH. Через 20 мин определяют оптическую плотность растворов по максимуму поглощения в УФ области.

Реактивы и оборудование: хлороформ; толуол; метиловый спирт (метанол); этиловый спирт (этанол); этилацетат; бензол; муравьиная кислота; уксусная кислота (лед.); HCl (конц. и 10%-ная); H_2SO_4 (50%-ная); NaOH (0,5 н. и 10%-ный); NaOH (5%-ный в этиловом спирте); аммиак (10%-ный); щелочно-аммиачный раствор (NaOH 5%-ный, содержащий 2%-ный аммиак); кобальта хлорид; магния ацетат (1%-ный раствор в этиловом спирте).

Пластины «Силуфол».

Хроматографическая бумага «С»; фотоэлектроколориметр; спектрофотометр; УФ лампа; колбы конические вместимостью 50, 100, 250 мл; колбы круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 50, 100 мл; колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250 мл; воронки делительные вместимостью 100, 250, 300 мл, холодильники (обратные) стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; камеры хроматографические для ТСХ; камеры хроматографические для БХ; пробирки стеклянные; штативы для делительных воронок; фильтры стеклянные № 4, воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; штативы лабораторные, плитки электрические; бани водяные лабораторные; весы лабораторные аналитические.

Вопросы для подготовки

1. Какие природные вещества называют антраценпроизводными?
2. Что лежит в основе классификации антраценпроизводных, на какие группы их разделяют?
3. В каком виде антраценпроизводные находятся в растении?
4. Какими реакциями можно открыть антраценпроизводные в растительном сырье?
5. Что происходит с антраценпроизводными и их гликозидами при нагревании растительного сырья?

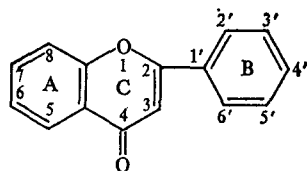
6. Чем обусловлена растворимость свободных антраценпроизводных в водных растворах щелочи?
7. Какое свойство антраценпроизводных можно использовать для установления их локализации в тканях растения?
8. Какими физико-химическими свойствами характеризуются свободные антраценпроизводные и их гликозиды?
9. В чем сущность метода количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье?
10. Какие реакции можно использовать для проявления антраценпроизводных на хроматограммах?

Литература

- Георгиевский В. П., Казаринов Н. А., Каррыев М. О. Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения. — Ашхабад: Ылым, 1976.
- Смолянская П. Г., Стуккей К. Л., Александров С. В. — Фармация. 1967, 1, с. 38.
- Хайс И. М., Мацек И. К. Хроматография на бумаге. — М.: Мир, 1962.
- Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. — М.: Мир, 1965.

ГЛАВА 7. ФЛАВОНОИДЫ

Флавоноиды представлены многочисленной группой природных биологически активных соединений — производных бензо-γ-пирона, основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из $C_6-C_3-C_6$ -углеродных единиц:



Под термином флавоноиды объединены различные соединения, генетически связанные друг с другом и обладающие различным фармакологическим действием.

Свое название они получили от латинского слова «flavus» — желтый, поскольку первые выделенные из растений флавоноиды имели желтую окраску.

Флавоноиды широко распространены в высших растениях, значительно реже встречаются в микроорганизмах и насекомых.

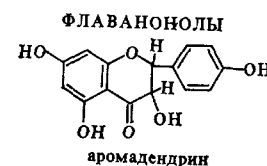
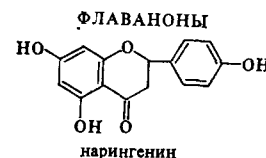
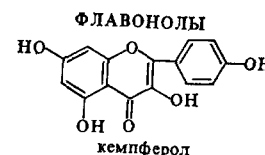
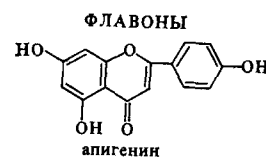
Около 40 % флавоноидов приходится на группу производных флавонола, несколько меньше группа производных флавана, значительно реже встречаются флаваноны, халконы, ауроны.

Наиболее богаты флавоноидами растения семейства бобовых, астровых (сложноцветных), сельдерейных (зонтичных), яснотковых (губоцветных), розоцветных, гречишных, березовых, рутовых и др. В растениях флавоноиды локализируются главным образом в цветках, листьях и плодах, реже — в корнях и стеблях; содержа-

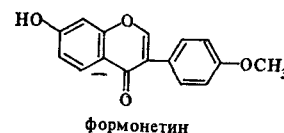
ние их в растениях колеблется от 0,5 до 30 %. Как правило, флавоноиды в растениях содержатся в клеточном соке. Максимальное содержание флавоноидов наблюдается в надземных частях растений в период бутонизации и цветения.

§ 1. Классификация

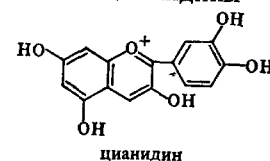
В зависимости от степени окисления и гидроксирования скелета $C_6-C_3-C_6$ флавоноиды подразделяются на несколько групп: флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванолы, изофлавоны, антоцианы, халконы, катехины, ауроны и др.:



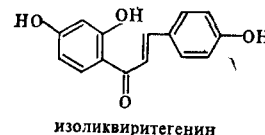
ИЗОФЛАВОНЫ



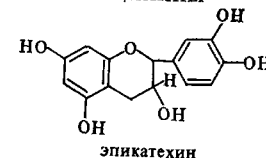
АНТОЦИАНИДИНЫ



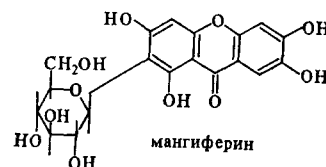
ХАЛКОНЫ



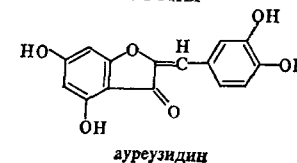
КАТЕХИНЫ



КСАНТОНЫ



АУРОНЫ



(2-C-β-D-глюкопиранозил-1,3,6,7-тетраоксиксантон)

В растениях флавоноиды встречаются как в свободном виде, так и в виде гликозидов. В качестве сахаров в флавоноидных гликозидах встречаются *D*-глюкоза, *D*-галактоза, *D*-ксилоза, *D*-манноза, *L*-арабиноза, *L*-рамноза; из урсонических кислот обычно встречается *O*-глюкуроновая кислота.

В настоящее время все известные флавоноидные гликозиды разделяются на 3 группы.

Первая (основная) группа представлена *O*-гликозидами, в которых сахара связаны с агликоном полуацетальной связью через атом кислорода. *O*-гликозиды в зависимости от количества сахаров, положения и порядка присоединения, делятся на монозиды, биозиды, триозиды и т.д. Монозиды относятся к более простым соединениям; биозиды при одном и том же наборе сахаров могут различаться последовательностью и порядком присоединения сахаров, величиной оксидных циклов и конфигурацией гликозидных связей. Например, известна группа рамногликозидов, в которых рамноза связана с глюкозой по 2,4- или 6-углеродному атому. Далее, усложняясь, биозиды переходят в триозиды и олигозиды, у которых сахара могут сочетаться в прямые и разветвленные цепи. Сахара могут быть, кроме того, у двух атомов углерода (дигликозиды).

Вторую группу представляют *C*-гликозиды, или гликофлавоноиды, которые можно подразделить на *C*-моногликозиды, *C*-дигликозиды, *C*-*O*-дигликозиды, *C*-*O*-биозиды. В гликофлавоноидах углеводные заместители связаны с агликоном через углеродный атом в 6- или 8-положениях.

К третьей группе флавоноидных гликозидов относятся так называемые комплексные соединения. Они представляют собой ацилированные гликозиды и в зависимости от положения ацильного заместителя делятся на гликозиды депсидного типа и гликозиды со сложноэфирной связью в сахарных заместителях. В депсидах агликоны обычно связаны с ароматическими кислотами, но известны и сложные эфиры с алифатическими кислотами. Из кислот, выделенных из комплексных гликозидов, идентифицированы бензойная, *p*-оксибензойная, протокатеховая, *p*-оксикоричная, кофейная, феруловая, синаповая, уксусная, пропионовая и др.

§ 2. Физико-химические свойства

В чистом виде флавоноиды представляют собой кристаллические соединения с определенной температурой плавления, желтые (флавоны, флавонолы, халконы и др.), бесцветные (изофлавоны, катехины, флаваноны, флаванонолы), а также окрашенные в красный или синий цвет (антоцианы) в зависимости от pH среды. В кислой среде они имеют оттенки красного или розового цветов; в щелочной — синего.

Агликоны флавоноидов растворяются в этиловом эфире, ацетоне, спиртах, практически нерастворимы в воде. Гликозиды флавоноидов, содержащие более трех остатков сахара, растворяются в воде, но нерастворимы в эфире и хлороформе.

Агликоны и гликозиды флавоноидов лишены запаха; некоторые из них обладают горьким вкусом. Например, все известные флавонон-7- β -неогеспериозиды — горькие вещества. Самыми горькими веществами являются нарингин и понцирин, они примерно в 5 раз более горькие, чем гидрохлорид хинина, причем их горький вкус обусловлен строением углеводного компонента неогеспериозы (2-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-*D*-глюкопираноза).

Флавоноидные гликозиды обладают оптической активностью. Одна из характерных особенностей флавоноидных гликозидов — способность к кислотному и ферментативному гидролизу. Скорость гидролиза и условия его проведения различны для различных групп флавоноидов. Так, флавонол-3-гликозиды легко гидролизуются при нагревании со слабыми минеральными кислотами (0,1—1 %), а флавонон-7-гликозиды гидролизуются лишь при нагревании с 5—10 % минеральными кислотами в течение нескольких часов. Флавоноидные *C*-гликозиды не гидролизуются ферментами и разбавленными кислотами, их гидролиз осуществляют смесью Килиани (смесь концентрированной HCl и уксусной кислот).

§ 3. Методы выделения и идентификация

Для выделения флавоноидов проводят экстракцию растительного материала, как правило, одним из низших спиртов. Спиртовое извлечение упаривают, к остатку добавляют горячую воду и после охлаждения удаляют неполярные соединения (хлорофилл, жирные масла, эфирные масла и др.) из водной фазы хлороформом или четыреххлористым углеродом. Флавоноиды из водной фазы извлекают последовательно этиловым эфиром (агликоны), этилацетатом (в основном монозиды) и бутанолом (биозиды, триозиды и т.д.).

Для разделения компонентов каждой фракции используют колоночную хроматографию на силикагеле, полиамидном сорбенте или целлюлозе. Элюирование веществ проводят смесью хлороформа с метиловым спиртом с возрастающей концентрацией метилового спирта, спирто-водными смесями с возрастающей концентрацией спирта, если сорбентом служит полиамид, или 5—30 %-ной уксусной кислотой в случае целлюлозы.

Для выделения отдельных флавоноидов существуют специфические методы. Так, для выделения рутина из бутонов софоры японской экстракцию проводят горячей водой. При охлаждении водных извлечений рутин выпадает в осадок, его отфильтровывают и очищают перекристаллизацией из спирта.

Для идентификации флавоноидов используют их физико-химические свойства: 1) определение температуры плавления; 2) определение удельного вращения ($[\alpha]_D$ гликозидов); 3) сравнение УФ, ИК, масс-, ПМР спектров со спектрами известных образцов.

УФ спектр флавоноидов характеризуется наличием, как правило, двух максимумов поглощения. Положение максимумов и их интенсивность характерны для различных групп флавоноидов. Флавоноловые гликозиды производные кверцетина (например, ру-

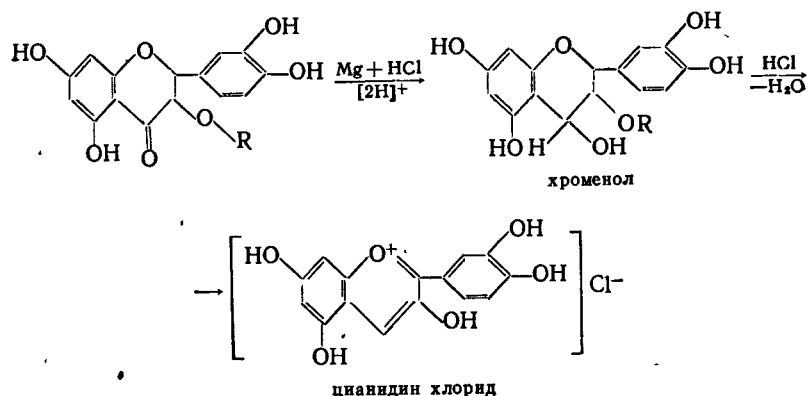
гин) имеют 2 максимума поглощения при 258 и 361 нм и «плечо» 266 нм. Для целей идентификации вещества используются положения максимумов и «плеча», величина $E_{1\%}^{1\text{см}}$. Эта величина для рутина равна 325,5, в случае моногликозида кверцитрина она лежит в пределах 350, в то время как у агликаона (кверцетина) составляет 718. УФ спектроскопия успешно используется для установления свободных ОН-групп в молекуле флавоноида путем добавления различных реактивов (ацетата натрия, метилата натрия, борной кислоты с ацетатом натрия, хлористого алюминия и т. д.). При добавлении этих реактивов происходит смещение максимумов поглощения, характерное для гидроксильных групп в различных положениях.

В ИК спектре флавоноидов имеются полосы поглощения, характерные для различных группировок. Так, рутин имеет широкую полосу 3200—3500 см^{-1} , обусловленную фенольными и спиртовыми гидроксильными группами: полоса 1660 см^{-1} принадлежит карбонильной группе; ароматические $\text{C}=\text{C}$ -связи дают ряд полос 1610, 1580, 1510, 1460 см^{-1} . Важной для идентификации флавоноидов является так называемая область «отпечатка пальцев» 800—1200 см^{-1} . Совпадение полос указанных группировок и области «отпечатка пальцев» служит надежным признаком идентичности веществ.

§ 4. Качественное определение

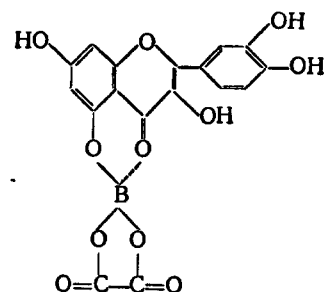
Общие реакции, специфичные для всех групп флавоноидов, отсутствуют. Наиболее часто используются следующие реакции.

1. Цианидиновая реакция или проба *Chinoda*. Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием в присутствии соляной кислоты дают красное или оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов:

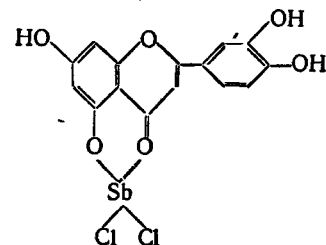


Халконы и ауроны цианидиновой реакции не дают, но при добавлении концентрированной HCl (без магния) образуют красное окрашивание за счет образования оксониевых солей.

2. Борно-лимонная реакция. 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной (или щавелевой), образуя ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией (образование батохромного комплекса):



3. Реакция с треххлористой сурьмой. 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, взаимодействуя с треххлористой сурьмой, образуют комплексные соединения, окрашенные в желтый или красный цвет:



4. С раствором аммиака флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванолы дают желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное; халконы и ауроны 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.

5. Катехины с 1%-ным ванилином в концентрированной HCl образуют красно-малиновое окрашивание (производные флороглюцина и резорцина).

6. Флавоны, халконы, ауроны, содержащие свободные ортогидроксильные группировки в кольце В, при обработке спиртовых растворов средним уксуснокислым свинцом образуют осадки, окрашенные в ярко-желтый и красный цвета. Антоцианы образуют осадки, окрашенные как в красный, так и в синий цвета.

7. С целью обнаружения флавоноидов в растительном материале

широко используется хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента. Обнаружение компонентов на хроматограмме осуществляется просматриванием их в УФ свете. При этом флавоны, флавонол-3-гликозиды, флаваноны, халконы обнаруживаются в виде коричневых пятен; флавонолы и их 7-гликозиды — в виде желтых или желто-зеленых пятен; ксантоны в виде оранжевых пятен. Изофлавоны при этом не проявляются. После просматривания в УФ свете хроматограммы можно обработать одним из реактивов (5%-ным спиртовым раствором $AlCl_3$ с последующим нагреванием при 105 °C в течение 3—5 мин; 5%-ной $SbCl_5$ в четыреххлористом углероде; 2%-ным спиртовым раствором щелочи), что позволяет получить зоны с более яркой флуоресценцией в УФ свете.

Методики качественного определения. Приготовление извлечения из растительного сырья: 1 г измельченного сырья (трава гречихи, бутоны софоры японской, цветки пижмы, копеечника желтеющего и др.) помещают в колбу вместимостью 25 мл и заливают 10 мл этилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на водяной бане в течение 10 мин с момента закипания спирта в колбе. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

Качественные реакции. 1. Цианидиновая проба (проба *Chinoda*). К 2 мл извлечения добавляют 5—7 капель концентрированной HCl и 10—15 мг металлического Mg или Zn , через 3—5 мин наблюдается красное, оранжевое, розовое окрашивание. Для ускорения реакции и усиления окраски рекомендуется подогреть реакционную смесь (2—3 мин) на кипящей водяной бане.

2. Реакция с раствором основного ацетата свинца. К 1 мл извлечения добавляют 3—5 капель 2%-ного основного ацетата свинца. Появление желто-оранжевого окрашивания свидетельствует о наличии флавоноидов.

Хроматографическое определение. На круглый диск хроматографической бумаги на расстоянии 0,5 см от центра наносят исследуемые извлечения травы гречихи, бутонов софоры, травы копеечника желтеющего и в качестве «свидетелей» — спиртовые растворы рутина и кверцетина. Диаметр пятна не должен превышать 5 мм. В центр диска вводят фитиль из хроматографической бумаги. Хроматографирование проводят в чашках Петри, в качестве растворителя используют 15%-ную уксусную кислоту. Экспозиция 20—25 мин. Хроматограммы высушивают до испарения растворителя и просматривают в УФ свете. Отмечают зоны: рутина (коричневая), хлорофилла (красная), кверцетина (желтая), ксантонов (оранжевая). Обработывают хроматограмму парами аммиака, отмечают переход окраски в желто-зеленую или опрыскивают 1%-ным спиртовым раствором хлорида алюминия или хлорокиси циркония. После высушивания хроматограммы повторно просматривают в УФ свете. Образуются ярко флуоресцирующие желто-зеленые комплексы с Al (III) или Zr (III).

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); HCl (конц.); Mg (металл.); свинца ацетат основной (2%-ный раствор); уксусная кислота

(15%-ная); $AlCl_3$ (10%-ный раствор в этиловом спирте); рутин; кверцетин.

Бумага хроматографическая; бумага фильтровальная; колбы с нормальным шлифом вместимостью 25 мл; колбы конические вместимостью 25 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; пробирки стеклянные; капилляры стеклянные; чашки Петри; УФ лампа.

§ 5. Количественное определение

В последние годы все большее распространение получают различные физико-химические методы анализа, которые имеют ряд существенных преимуществ в сравнении, например, с гравиметрическими и титрометрическими методами, а именно быстрота и точность определения, обнаружение даже незначительных количеств и, что особенно важно, возможность выделения отдельных флавоноидов из растительного сырья. К таким методам относятся фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, денситометрия с использованием хроматографии на бумаге и в тонком (закрепленном и незакрепленном) слое сорбента. Хроматография используется как для очистки, так и разделения суммы флавоноидов на отдельные компоненты.

Особенно ценным считается хроматоденситометрический метод, сущность которого заключается в выделении и разделении флавоноидов с непосредственной количественной денситометрической оценкой окрашенной зоны на хроматограмме. Метод имеет преимущества в быстроте проведения анализа и точности определения, так как в данном случае исключается стадия элюирования.

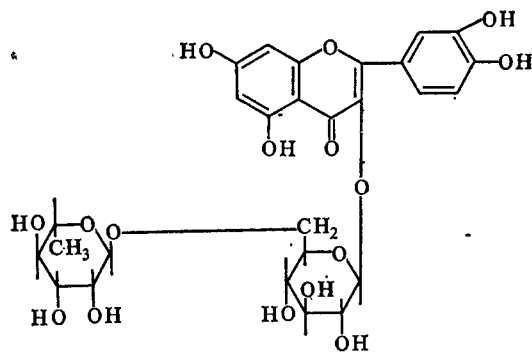
Фотоколориметрический метод основан на цветных реакциях флавоноидов с солями различных металлов (алюминия, циркония, титана, хрома, сурьмы), с лимонно-борным реактивом и на реакции восстановления цинком или магнием в кислой среде. Известна цветная реакция флавоноидов с азотнокислым и уксуснокислым уранилом, позволяющая количественно определять рутин в смеси с кверцетином.

Учитывая проявление флавоноидными соединениями слабо выраженных кислотных свойств (что обусловлено наличием в молекуле фенольных гидроксильных групп), для анализа может быть применен метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях: диметилформамиде, диметилсульфоксиде, а также ацетоне.

Сравнительно редко для количественного определения флавоноидов применяют полярографию и метод амперометрического титрования.

Методика количественного определения рутина в траве гречихи (*Herba Fagopyri*). Рутин широко распространен в природе. Основными источниками его получения являются бутоны софоры японской (*Sophora japonica* L. сем. бобовых — *Fabaceae* (*Leguminosae*)) и трава гречихи (*Fagopyrum sagittatum* Gilib, сем. гречишных — *Polygonaceae*). Определение содержания рутина в сырье проводят

спектрофотометрическим методом:



рутин-3-рутинозид кверцетина

1 г (точная навеска) измельченной травы гречиши (размер частиц 1 мм) помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл 95%-ного этилового спирта. Содержимое колбы взвешивают. Затем к колбе присоединяют обратный (шариковый) холодильник и проводят экстракцию на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч. После этого колбу охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и доводят до первоначальной массы спиртом. Этанольный экстракт фильтруют через бумажный фильтр. 20 мл полученного экстракта упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 5 мл этилового спирта, фильтруют через бумажный фильтр.

0,03—0,05 мл полученного экстракта наносят на линию старта стеклянной пластинки 9×15 см с закрепленным слоем силикагеля марки ЛС 5/40 (Чехословакия) в виде полос — три полосы исследуемого раствора и одну полосу «свидетеля». Пластику сушат на воздухе в течение 10 мин и хроматографируют в системе *n*-бутанол—ледяная уксусная кислота — вода (4 : 1 : 2). После того как фронт растворителя пройдет 11—12 см, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе до исчезновения запаха растворителей. В УФ свете отмечают пятна рутина, флуоресцирующие темно-коричневым светом ($R_f \approx 0,68$). Отмеченные зоны силикагеля с рутином и зону холостого опыта количественно переносят в колбы вместимостью 25 мл и элюируют 10 мл смеси диоксан — вода 1 : 1 при встряхивании в течение 1 ч. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Оптическую плотность полученных элюатов измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 363 нм на фоне элюата холостого опыта.

Процентное содержание рутина в сырье в пересчете на абсолютное сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{K_1 V_1 V_3 D_{363} 100}{V_2 D_1^{1\%} m (100 - w) \cdot 0,667 l},$$

где K_1 — коэффициент элюирования (1,195); V_1 — объем этанольного экстракта после растворения сухого остатка, мл; V_2 — объем

этанольного экстракта, взятый для нанесения на хроматограмму, мл; V_3 — объем элюата; D_{363} — оптическая плотность раствора при $\lambda = 363$ нм; $D_1^{1\%}$ — удельный показатель поглощения рутина при $\lambda = 363$ нм (268,4); m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; 0,667 — коэффициент пересчета на 20 мл экстракта; l — толщина слоя, см.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); бутиловый спирт (*n*-бутанол); уксусная кислота (лед.); диоксан; силикагель марки ЛС 5/40; рутин.

Бумага фильтровальная; колбы круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; колбы мерные вместимостью 20 мл; колбы плоскодонные вместимостью 50 мл; холодильники (обратные) стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; пластинки стеклянные для ТСХ размером 9×15 см; фильтры стеклянные № 4; пипетки измерительные вместимостью 1 мл; бюксы с притертыми крышками; сита с диаметром отверстий 1 мм; весы ручные; весы лабораторные аналитические; шкаф сушильный лабораторный; эксикатор; спектрофотометр СФ-4А.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях пижмы обыкновенной (*Flores Tanacetii*). 1 г (точная навеска) измельченных соцветий пижмы помещают в пакетик из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Сокслета (вместимостью 100 мл) хлороформом в течение 3 ч. Хлороформное извлечение отбрасывают, а пакетик с навеской высушивают и экстрагируют в круглодонной колбе с обратным холодильником на водяной бане 30 мл метилового спирта в течение 3 ч, периодически перемешивая. Берут 20 мл извлечения и метиловый спирт отгоняют досуха. Сухой остаток растворяют в 20 мл дистиллированной воды, количественно переносят в делительную воронку вместимостью 50 мл и очищают дважды по 15 мл четыреххлористым углеродом.

Очищенный водный экстракт пятикратно обрабатывают 20 мл этилацетата, дожидаясь каждый раз полного расслаивания фаз. Объединенный этилацетатный экстракт упаривают в вакууме досуха и сушат остаток в течение 1 ч в сушильном шкафу при $t = 65^\circ\text{C}$. Высушенный остаток растворяют в небольшом объеме этилового спирта и переносят количественно в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем до метки этиловым спиртом (раствор А). 0,5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем доводят этиловым спиртом до метки (раствор Б).

Определяют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при $\lambda = 330$ нм.

Процентное содержание суммы флавоноидов x вычисляют по формуле

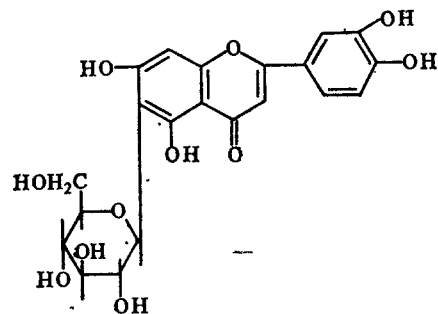
$$x = \frac{25DK100}{E_1^{1\%} m (100 - w) l},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора; 25 — объем раствора А, мл; K — коэффициент разведения раствора А, равный 100; $E_1^{1\%}$ — удельный показатель поглощения, равный 560,8; m — навеска сырья в расчете на взятый аликвот, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; l — толщина слоя, см.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); метиловый спирт (метанол); хлороформ; четыреххлористый углерод; этилацетат; вода.

Бумага фильтровальная; аппарат Сокслета; колбы плоскодонные вместимостью 200 мл; колбы круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; мерные бюксы вместимостью 25 и 50 мл; пипетки измерительные вместимостью 20 мл; цилиндры мерные на 50 и 100 мл; воронки делительные вместимостью 20 мл; бюксы с притертыми крышками; весы ручные; весы лабораторные аналитические; эксикатор; установка для отгонки растворителей; шкаф сушильный лабораторный; спектрофотометр СФ-4А.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве леспедецы копеечниковой (*Herba Lespedezae hedysaroidis*). В основу разработанного метода количественного определения суммы флавоноидов в надземной части леспедецы копеечниковой (*Lespedeza lysazoides* сем. бобовых — Fabaceae (Leguminosae)) положено выделение суммы флавоноидов и определение оптической плотности раствора в этиловом спирте при длинноволновом максимуме поглощения (353 нм) с последующим расчетом процентного содержания удельному показателю поглощения чистого гомоориентина:



гомеооринтин
(лютеолин-6-С-β-D-гликопиранозид)

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья (размер частиц — 2 мм) экстрагируют этиловым спиртом в аппарате Сокслета в течение 4 ч. Извлечение упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 10 мл горячего 10%-ного NaCl, раствор охлаждают, фильтруют через вату в колонку полиамидного сорбента (диаметр колонки 2,5 см, количество полиамида 1,5 г). Колбу повторно промывают 5 мл 10%-ного NaCl и раствор фильтруют в колонку с полиамидом.

Сумма флавоноидов адсорбируется в верхнем слое полиамида, колонку с полиамидом промывают 30 мл воды. Элюирование суммы флавоноидов с сорбента проводят 50 мл этилового спирта. Когда сумма флавоноидов подходит к нижней части сорбента (в УФ свет характерное свечение), раствор собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Раствор доводят спиртом до метки и тщательно перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем доводят до метки этиловым спиртом. Полученный раствор после тщательного перемешивания спектро-

фотометрируют при $\lambda = 353$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Процентное содержание суммы флавоноидов x в абсолютно сухом сырье в пересчете на гомеооринтин рассчитывают по формуле

$$x = \frac{50 \cdot 50 \cdot 1,01 DK 100}{381,4 m (100 - w)} = \frac{662 DK}{m (100 - w)},$$

где m — масса навески сырья, г; D — оптическая плотность исследуемого раствора при $\lambda_{\text{max}} = 353$ нм; 50 — объем раствора А, мл; 50 — число разведения; 381,4 — удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) гомеоориентина при $\lambda_{\text{max}} = 353$ нм; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; K — инструментальная поправка; 1,01 — поправочный коэффициент при элюировании суммы флавоноидов с полиамидного сорбента.

Величину инструментальной поправки (K) на используемые кюветы и спектрофотометр определяют следующим образом. Точную навеску дихромата калия (ДК), высушенного до постоянной массы 50 мг (квалификация «ХЧ», ГОСТ 4220—75), растворяют в 1 л 0,005 М H_2SO_4 и определяют оптическую плотность D раствора при $\lambda = 353$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Вычисляют экспериментальную величину удельного показателя поглощения дихромата калия ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) по формуле

$$(E_{1\text{см}}^{1\%})_{\text{ДК}} = \frac{10VD353}{m},$$

где m — масса навески дихромата калия, г; V — объем раствора, л. Величину K вычисляют по формуле

$$K = \frac{65,38}{(E_{1\text{см}}^{1\%})_{\text{ДК}}},$$

где 65,38 — значение удельного показателя поглощения раствора дихромата калия при $\lambda = 358$ нм, полученное на приборе, на котором разработана методика.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); NaCl 10%-ный; H_2SO_4 ; калия дихромат.

Аппарат Сокслета; колонки стеклянные диаметром 2,5 см; колбы мерные вместимостью 50 мл; пипетки измерительные вместимостью 1 и 10 мл; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл; весы ручные; весы лабораторные аналитические; сита с размером отверстий 1—2 мм; бюксы с притертой крышкой; эксикатор; шкаф сушильный лабораторный; спектрофотометр СФ-4А.

Вопросы для подготовки

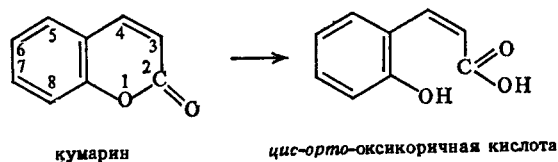
1. Что такое флавоноиды?
2. Классификация флавоноидов. Формулы.
3. Распространение флавоноидов в растительном мире.
4. Локализация флавоноидов в растениях.
5. Физико-химические свойства флавоноидов.
6. Методы выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья.
7. Качественные реакции на флавоноиды.
8. Хроматографический анализ.
9. Методы количественного определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье.

Литература

- Янулис В. П., Глызин В. И. Тезисы докл. II съезда фармацевтов Литовской ССР. Каунас, 1977, с. 11.
Адиходжаева К. Б., Баяновский А. И., Глызин В. И., Смирнова Л. П. Ж. — Фармация, 1977, № 3, с. 24.

ГЛАВА 8. КУМАРИНЫ

Кумарины — природные соединения, в основе которых лежит бензо- α -пирон (лактон *цис-орто-оксикоричной* кислоты):



Кумарины широко распространены в растительном мире, особенно среди представителей семейств сельдерейных (зонтичных), бобовых, рутовых. В природе чаще всего встречаются наиболее простые производные кумарина и фурукумарина. Основное количество представителей соединений этой группы найдено в свободном состоянии и лишь незначительное число в виде гликозидов.

Кумарины локализуются в различных органах растений, чаще всего в корнях, коре, плодах. Содержание кумаринов в разных растениях колеблется от 0,2 до 10 %, причем часто можно встретить 5—10 кумаринов различной структуры в одном растении.

Кумарины обладают антикоагулянтными свойствами. Дикумарол был предложен как препарат для профилактики и лечения тромбозов и тромбфлебитов. На основе дикумарола получены синтетические препараты, обладающие более высокими антикоагулянтными свойствами.

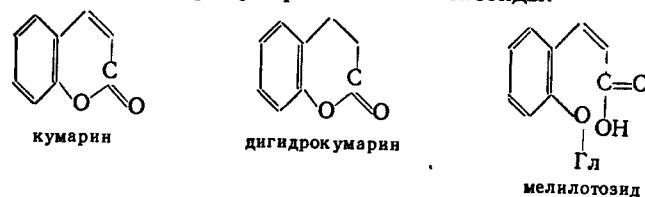
Некоторые кумарины обладают фотодинамической активностью, т. е. способны повышать чувствительность кожи к ультрафиолетовым лучам, и поэтому находят применение в терапии витилиго такие препараты, как аммифуриин из плодов амми большой, бероксан из плодов пастернака посевного, псорален из плодов псоралеи косянковой и др.

Многие кумарины обладают спазмолитической активностью; коронарорасширяющее действие оказывают виснадин и дигидросамидин из корней вздутоплодника сибирского, атамантин из корней и плодов горчичника горного, птериксин из порезника густоцветного и др. Некоторым кумаринам свойственна антимикробная активность (остхол из жгун-корня); ряд кумаринов обладает эстрогенной активностью (кумestролы клевера). Таким образом, кумарины характеризуются разнообразным действием на организм человека, однако широкого использования в медицине они не получили из-за отсутствия оптимальных лекарственных форм, создание которых затруднено плохой растворимостью кумаринов в воде.

§ 1. Классификация

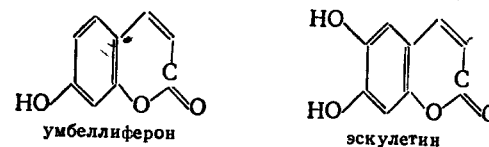
Все известные кумарины в зависимости от их химической структуры делят на следующие группы.

1. Кумарин, дигидрокумарин и их гликозиды:



Все эти соединения обнаружены в траве донника лекарственного.

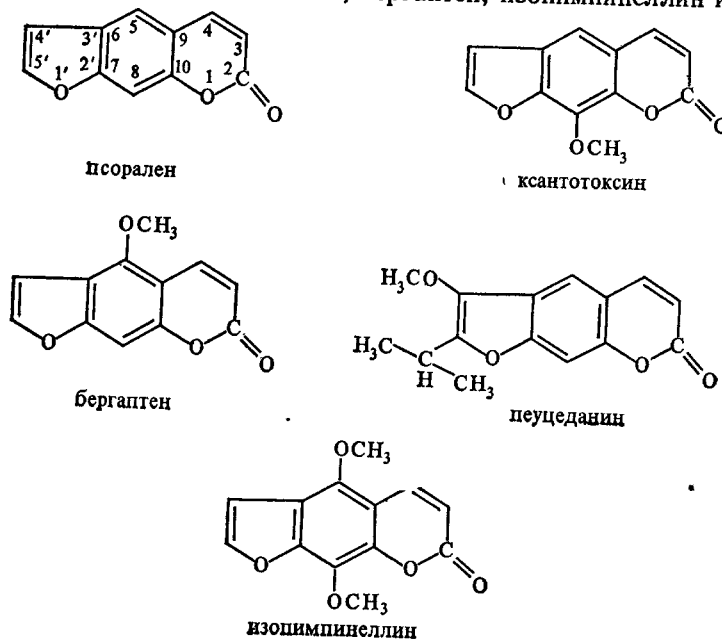
2. Окси-, метокси- (алкокси-) и метилendioксикумарины: а) с гидроксильными или алкоксильными группами в бензольном кольце (умбеллиферон, эскулетин, остхол и др.):



Эти соединения широко распространены в растениях семейства сельдерейных (зонтичных), рутовых;

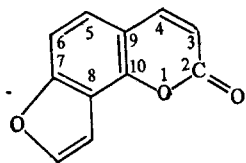
б) с гидроксильными или алкоксильными группами в пирановом кольце (феруленол). Феруленол обнаружен в различных видах ферул сем. сельдерейных (зонтичных).

3. Фурукумарины, содержащие заместители в бензольном и фурановом кольце: а) производные псоралена, т. е. фурукумарины, фурановое ядро которых сконденсировано с кумарином в 6,7-положении (псорален, ксантотоксин, бергаптен, изопимпинеллин и др.):

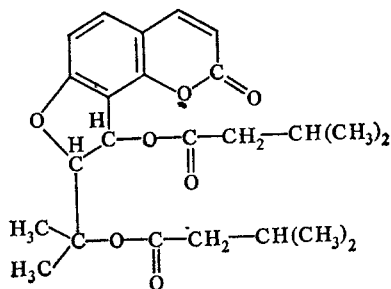


Псорален выделен из плодов и корней псоралеи костянковой и других видов сем. бобовых: ксантотоксин, бергаптен, изопимпинеллин выделены из плодов амми большой и пастернака посевного сем. сельдерейных (зонтичных); пеucedанин — из корней горчичника Мориссона и других видов сем. сельдерейных (зонтичных);

б) производные ангелицина, т. е. фурукумарина, фурановое ядро которого сконденсировано с кумарином в 7,8-положении (ангелицин, атамантин и др.):



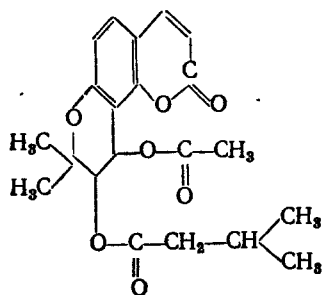
ангелицин
(изопсорален)



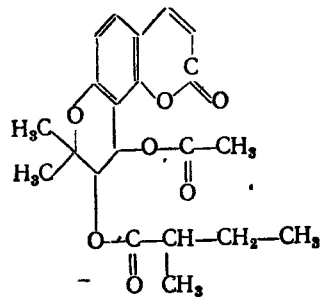
атамантин

Все эти соединения широко распространены в растениях сем. сельдерейных (зонтичных).

4. Пиранокумарины, содержащие ядро пирана, сконденсированное с кумарином в 5,6; 6,7; 7,8-положениях и имеющие заместитель в пирановом, бензольном или пирановом кольце (дигидросамидин, виснадин, ксантилиггин, птериксин и др.):



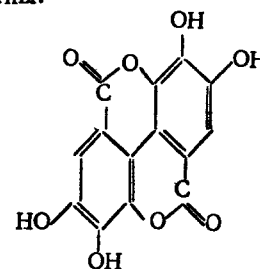
дигидросамидин



виснадин

Дигидросамидин и виснадин выделены из корней и плодов вздутого плодика сибирского сем. сельдерейных (зонтичных).

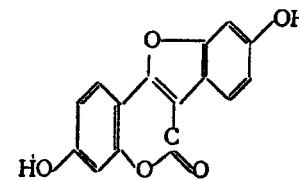
5. 3,4-бензокумарины:



эллаговая кислота

Эллаговая кислота обнаружена в растениях сем. сумаховых, розоцветных и др.

6. Кумарины, содержащие систему бензофурана, сконденсированную с кумарином в 3,4-положениях:



куместрол

Куместролы выделены из различных видов клевера сем. бобовых.

7. Некоторые другие более сложные соединения, в состав которых входит кумариновая система.

§ 2. Физико-химические свойства

Выделенные в индивидуальном состоянии кумарины — кристаллические вещества, бесцветные или слегка желтоватые. Кумарины хорошо растворимы в органических растворителях: хлороформе, этиловом эфире, этиловом спирте, жирах и жирных маслах. В воде кумарины, в большинстве случаев, нерастворимы; гликозиды растворяются, как правило, в воде и практически нерастворимы в органических растворителях. Кумарины хорошо растворяются в водных растворителях щелочей (особенно при нагревании) за счет образования солей оксикоричных кислот. При нагревании до 100 °C кумарины возгоняются в виде игольчатых кристаллов.

Многие кумарины проявляют очень характерную флуоресценцию при УФ возбуждении в нейтральных спиртовых растворах, в растворах щелочей и концентрированной серной кислоте в видимой области спектра. Особенно этим отличаются производные умбеллиферона, проявляя ярко-голубую флуоресценцию. В щелочной среде флуоресценция наиболее интенсивная, при подкислении флуоресценция становится менее интенсивной и характер флуоресценции меняется.

В электронных спектрах поглощения кумаринов наблюдаются характеристические частоты. В области выше 200 нм имеется две

полосы поглощения — соответственно 210—270 и 290—350 нм (рис. 20). Характеристичность этих спектров поглощения обусловлена хромофором, включающим в себя сопряженные между собой α -пироновое и бензольное кольцо.

Кумарины имеют характерные спектры поглощения в инфракрасной области. В кумаринах, как и в α -пиронах, полосы валентных колебаний карбонильной группы лежат в области 1750—1700 см^{-1} , кроме того, кумарины дают сильные полосы поглощения в области 1620—1470 см^{-1} , обусловленные колебаниями ароматических двойных связей (рис. 21).

Наряду с УФ и ИК спектроскопией огромное значение за последние годы приобрели ЯМР спектры высокого разрешения. ЯМР спектроскопия, как и другие физические методы исследования, используется в структурно-химических целях и базируется на корреляциях между спектрами и строением, установленными на соединениях с известной структурой. Анализ спектров позволяет определить тип замещения кумаринового ядра.

Масс-спектры возникают вследствие диссоциативной ионизации при бомбардировке молекул электронами. При бомбардировке химических соединений электронами с энергией, достаточной для ионизации этих соединений, т. е. лишь немного превышающей иониза-

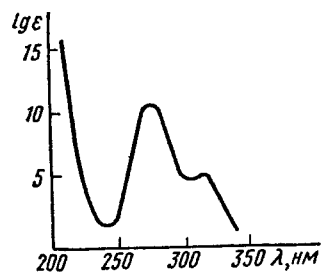


Рис. 20. УФ спектр кумарина

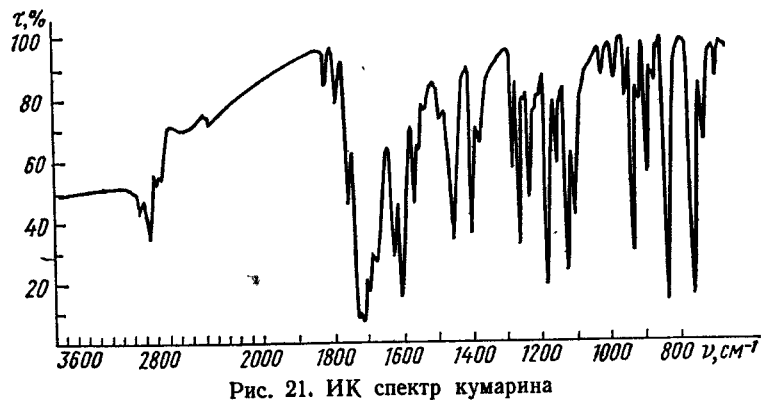
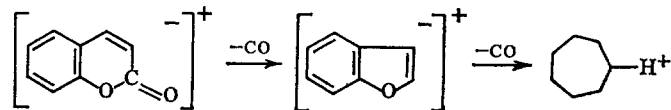


Рис. 21. ИК спектр кумарина

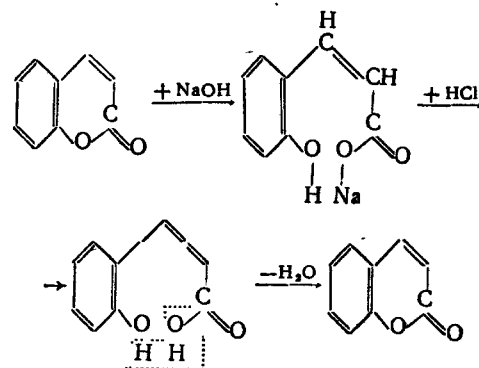
ционный потенциал, в спектрах наблюдаются молекулярные ионы. С увеличением энергии электронов возрастает степень ионизации и молекулярные ионы, приобретая избыток энергии, могут образовывать осколочные ионы. Метод масс-спектропии применяется для количественного и качественного анализа и установления строения органических соединений. Установлено, что не у всех кумариновых соединений хорошо проявляется молекулярный ион. Мас-

спектры кумаринов характеризуются интенсивным пиком молекулярного иона (M^+), а также пиками $M^+ = 28$ и $M^+ = 2 \cdot 28$, отвечающими однократной и двукратной потере CO.

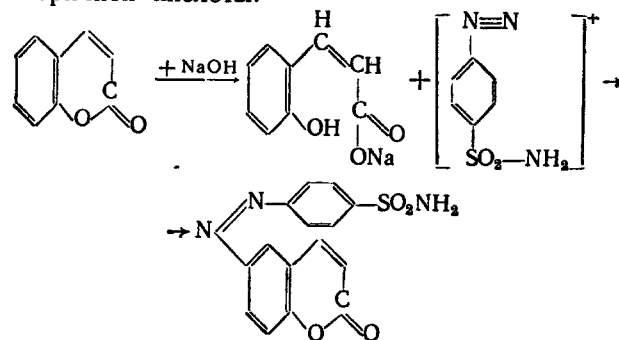
Фрагментация кумарина под действием электронного удара может быть представлена следующей схемой:



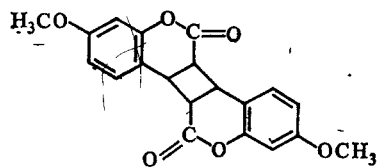
В циклической системе кумарина, состоящей из бензольного и гетероциклического α -пиронового цикла, заложены возможности для разнообразных химических реакций. Одним из самых характерных свойств кумаринов как лактонов является их специфическое отношение к щелочи (с кислотами и аммиаком кумарины не взаимодействуют). При действии горячей разбавленной щелочи кумарины медленно гидролизуются, при этом образуются желтые растворы солей кумаровой кислоты (*цис*-, *орто*-оксикоричной). При подкислении щелочных растворов или при насыщении их CO_2 регенерируются кумарины в неизменном состоянии:



При взаимодействии солей диазония с кумаринами в слабощелочной среде группа ArNa вступает в 6-положение кумариновой системы, т. е. в *пара*-положение к фенольному гидроксигруппе *цис*-, *орто*-оксикоричной кислоты:



Некоторые кумарины димеризуются под действием ультрафиолетового света, образуя циклобутановые структуры по следующему типу:



§ 3. Методы выделения

Для выделения кумаринов из растительного сырья обычно применяются различные растворители: метиловый и этиловый спирт, бензол, хлороформ, этиловый и петролейный эфиры.

Наиболее исчерпывающая экстракция кумаринов как свободных, так и связанных (гликозидов) достигается этиловым спиртом. Получаемый после отгонки спирта густой экстракт чаще всего последовательно обрабатывается растворителями: хлороформом, этиловым эфиром и др.

В некоторых случаях целесообразно растительный материал предварительно обрабатывать петролейным эфиром, а затем исчерпывающе экстрагировать хлороформом, этиловым, метиловым спиртом.

С целью отделения кумаринов от сопутствующих веществ часто сконцентрированный экстракт из растительного сырья обрабатывают 0,5 %-ным водным раствором КОН для удаления кислых и фенольных компонентов. Затем экстракт обрабатывается 5 %-ным водно-спиртовым раствором КОН в течение 1/2—1 ч. При этом кумарины образуют соли кумариновых кислот. Одновременно происходят и другие реакции, а именно: омыление жиров и других сложных эфиров. Индифферентные составные части экстракта (стерины, спирты, углеводороды и др.) удаляются обработкой этиловым эфиром щелочного раствора, разбавленного предварительно 6—8-кратным количеством воды. Водно-щелочной раствор подкисляется разбавленной HCl. При этом освобождаются органические кислоты, а присутствующие кумариновые кислоты переходят с отщеплением элементов воды в кумарины. Смесь кислот и кумаринов извлекается этиловым эфиром (многократное повторное встряхивание). Кислые составные части из лактонной фракции можно удалить добавлением по каплям 0,5 %-ной водной щелочи в раствор, в который они переходят, в то время как нейтральные кумарины как более устойчивые по отношению к разбавленной щелочи остаются в этиловом эфире.

При описанном методе выделения суммы кумаринов трудно избежать некоторого расщепления кумаринов, поэтому как для очистки кумаринов от сопутствующих веществ, так и для выделения индивидуальных соединений широкое использование получили хроматографические методы. В качестве сорбента при хроматографии

кумаринов чаще всего используются оксид алюминия и силикагель. Кумарины хорошо элюируются с колонки смесью петролейного эфира с хлороформом, бензолом, смесью бензола с этилацетатом, смесью бензола с метиловым спиртом (в различных соотношениях) и др. Эфирные масла, глицериды, стероиды и тритерпены обычно появляются в первых фракциях элюата, затем следуют кумарины. Кумарины на колонке и в элюатах обнаруживаются по флуоресценции в УФ свете. Проведение хроматографического разделения кумаринов на колонке облегчается применением бумажной и тонкослойной хроматографии для качественного анализа элюатов. Методы бумажной и тонкослойной хроматографии позволяют быстро устанавливать однородность элюата, обнаружив даже незначительные количества примесей.

§ 4. Качественное определение

Для обнаружения кумаринов в растительном сырье используют их лактонные свойства, способность флуоресцировать при УФ освещении и давать окрашенные растворы с диазосоединениями, микро-сублимацию и хроматографический анализ спиртовых или хлороформных экстрактов сырья.

Ввиду плохой растворимости кумаринов в водных и лучшей в неполярных фазах разделение их осуществляется путем распределительной хроматографии на импрегнированной бумаге. В качестве подвижной фазы используют бензин, петролейный эфир ($t_{кип} = 60—100\text{ }^{\circ}\text{C}$), смесь петролейный эфир — бензол — метиловый спирт (5 : 4 : 1), в качестве неподвижной фазы — 20 %-ный водный раствор этиленгликоля или пропиленгликоля, 10 %-ный формамид в метиловом спирте. Как правило, неподвижной фазой предварительно пропитывается хроматографическая бумага. Хроматографирование осуществляется нисходящим способом в течение 1,5—2 ч. Хроматограммы после высушивания просматривают в УФ свете. Кумарины в зависимости от структуры имеют голубую, синюю, фиолетовую, зеленую, желтую флуоресценцию, флуоресцирующие пятна кумаринов отмечают и хроматограммы обрабатывают щелочью. После этого их высушивают в сушильном шкафу при $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и вновь просматривают под УФ лампой; как правило, флуоресценция усиливается. Затем хроматограмму обрабатывают диазотированным сульфаниламидом, от действия которого кумарины в зависимости от структуры окрашиваются в оранжевый, красно-оранжевый, фиолетовый цвета. В некоторых случаях после просматривания хроматограммы в УФ свете ее обрабатывают реактивом Драгендорфа или иодом. Кумарины проявляются в виде пятен, окрашенных в коричневый цвет.

Помимо бумажной хроматографии широко используется метод тонкослойной хроматографии. Хроматография проводится в тонком слое оксида алюминия или силикагеля. Хорошее разделение кумаринов в тонком слое было достигнуто при применении следующих

систем растворителей: этилацетат — бензол (1 : 2); хлороформ — петролейный эфир (1 : 2).

Проявление кумаринов на хроматограммах проводится точно так же, как в случае проявления бумажных хроматограмм.

Методики качественного анализа. Приготовление извлечения из астильного сырья. 2 г измельченного сырья (плоды амми большой, пастернака посевного, псоралеи костянковой, корней горчичника и порезника густоцветного и др.) заливают 20 мл этилового спирта и кипятят в течение 15 мин с обратным холодильником. После охлаждения фильтруют.

Качественные реакции. 1. К 3—5 мл спиртового извлечения прибавляют 10 капель 10 %-ного КОН в метиловом

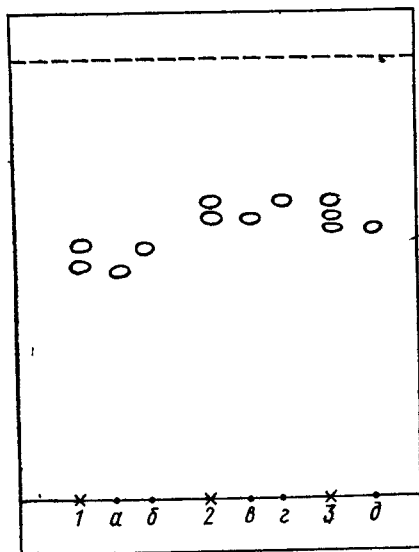


Рис. 22. Схема хроматограммы (ТСХ) кумаринов плодов псоралеи костянковой (1), амми большой (2) и пастернака посевного (3):

а — псорален; б — ангелицин; в — изопимпинеллин; г — бергаптен; д — ксантоксин

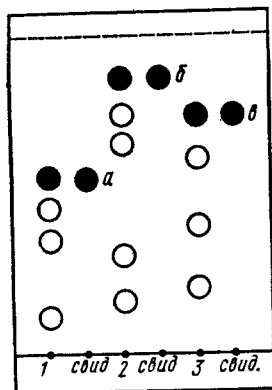


Рис. 23. Схема хроматограммы (ТСХ) кумаринов корней горчичника Морисона (1), порезника густоцветкового (2), вздутоплодника сибирского (3):

а — пеоуеданин; б — птериксин; в — диэтиросамидин

спирте и нагревают в течение 5 мин на водяной бане (при наличии кумаринов раствор желтеет), затем прибавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива Паули по Кутачеку. При наличии кумаринов раствор приобретает окрашивание от коричневого до вишневого.

2. К 3—5 мл спиртового извлечения добавляют 10 капель 10 %-ного КОН в метиловом спирте; раствор нагревают на водяной бане. Затем добавляют 5—10 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают, после чего раствор нейтрализуют 10 %-ной НСl до кислой реакции. Если при этом наблюдается помутнение или вы

падение осадка, то это указывает на вероятное присутствие кумаринов в сырье (лактонная проба).

Хроматографическое определение. 3а. Из оставшейся части спиртового извлечения берут 0, 01 мл и наносят на пластинку «Силуфол» или силикагеля (закрепленный слой) и хроматографируют в системе *n*-гексан — бензол — метиловый спирт (5 : 4 : 1) до тех пор, пока линия фронта не достигнет расстояния 10 см от линии старта. После этого хроматограмму высушивают на воздухе в течение 10 мин, опрыскивают 10 %-ным КОН в метаноле и высушивают в сушильном шкафу при $t = 110—120^\circ\text{C}$ в течение 2—3 мин. Затем опрыскивают свежеприготовленным реактивом Паули по Кутачеку. При наличии кумаринов в сырье на хроматограмме проявляются яркие пятна от кирпично-красного до сине-фиолетового окрашивания в зависимости от структуры кумаринов (рис. 22, 23).

3б. 0,01 мл спиртового извлечения наносят на полосу хроматографической бумаги марки «Б» размером 14 × 65 см, предварительно импрегнированной 10 %-ным формамидом в метиловом спирте, и хроматографируют нисходящим методом в смеси растворителей петролейный эфир — бензол — метиловый спирт (5 : 4 : 1) в течение 3—4 ч. Хроматограмму высушивают на воздухе в течение 10 мин, опрыскивают 10 %-ным КОН в метиловом спирте и высушивают в сушильном шкафу при $t = 110—120^\circ\text{C}$ в течение 2—3 мин, затем опрыскивают диазореактивом Паули по Кутачеку. При наличии кумаринов в сырье на хроматограмме появляются яркие пятна от кирпично-красного до сине-фиолетового окрашивания.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); КОН, 10 %-ный раствор в метиловом спирте; НСl 10 %-ная; CaSO_4 ; *n*-гексан; бензол; метиловый спирт (метанол), 10 %-ный раствор в метиловом спирте; петролейный эфир ($t_{\text{кип}} = 60—100^\circ\text{C}$)

Бумага хроматографическая марки Б; пластинка «Силуфол»; силикагель марки КСК; камеры хроматографические для ТСХ и БХ; колбы с нормальным шлифом вместимостью 50 мл; холодильники (обратные) стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; пробирки стеклянные; шкаф сушильный лабораторный; микропипетки измерительные вместимостью 0,2 мл; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13 × 18 см; цилиндры мерные на 250 мл.

§ 5. Количественное определение

При количественном определении кумаринов учитывается то или иное специфическое свойство кумарина. Способность лактонного кольца кумарина к обратимому размыканию и замыканию в зависимости от рН среды используется в гравиметрическом методе определения суммы кумаринов в растительном сырье. Специфическое отношение кумаринов к щелочи лежит в основе метода нейтрализации (обратное титрование), которое применяется как для определения суммы кумаринов, так и для индивидуальных компонентов. Способность кумаринов давать устойчивые красно-оранжевые и красно-пурпурные растворы с диазотированным сульфаниламидом в щелочной среде используется в колориметрических ме-

тодах количественного определения суммы кумаринов и индивидуальных компонентов. Флуоресценция при УФ возбуждении в видимой области лежит в основе флуориметрических методов количественного определения кумаринов.

Для количественного определения кумарина применяются спектрофотометрические методы, где учитывается изменение оптической плотности растворов кумаринов при длине волны максимума поглощения в УФ области спектра того или иного кумарина в зависимости от его концентрации на основе удельных показателей поглощения. Колориметрическим, флуориметрическим и спектрофотометрическим методам чаще всего предшествует хроматографическое разделение кумаринов на бумаге и в тонком слое сорбента, поэтому эти методы называются хромато-оптическими методами.

Количественное определение кумаринов проводят также полярографическим методом.

Многообразие методов количественного определения в сырье позволяет провести правильный выбор метода для анализа растительного сырья, учитывая структуру природных кумаринов.

Методика количественного определения кумаринов в плодах амми большой *Fructus Ammi maidis* (ФС 42-540-72). Зрелые плоды амми большой (*Ammi majus* L.) семейства сельдерейных (зонтичных) *Apiaceae* (*Umbelliferae*) используются в качестве лекарственного сырья для получения препарата «Аммифурин», который представляет собой сумму фурукумаринов — изопимпинеллина и бергаптена. Количественное определение этих соединений проводят хроматоспектрофотометрическим методом.

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с размером отверстий 0,16 мм, извлекают 120 мл хлороформа в аппарате Сокслета в течение 2 ч (12—15 сливов). Хлороформное извлечение отфильтровывают и упаривают в вакууме досуха. Сухой остаток растворяют при слабом нагревании в хлороформе и количественно переносят в калиброванный пикнометр вместимостью 5 мл. 0,02 мл полученного раствора наносят микропипеткой на старт хроматограммы. Хроматограмму затем импрегнируют 10 %-ным формамидом в метиловом спирте, подсушивают на воздухе в течение 4 мин и ведут хроматографирование восходящим способом в системе *n*-гептан — бензол (4 : 1) при $t = 19-20^\circ\text{C}$ в течение 5—6 ч на бумаге марки «С». Затем хроматограмму сушат в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 40—50 °C и просматривают в УФ свете. Пятна бергаптена с $R_f = 0,63$ и изопимпинеллина с $R_f = 0,53$ обводят карандашом и вырезают. Вырезанные участки бумаги помещают соответственно в колбочки со шлифом вместимостью 10—15 мл, заливают 5 мл 95 %-ного спирта и оставляют стоять на 10—12 ч, затем нагревают на водяной бане при $t \approx 40^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. Элюат отфильтровывают и спектрофотометрируют в кювете с толщиной слоя 1 см на фоне элюата чистого кусочка той же хроматограммы. Оптическую плотность раствора измеряют при следующих длинах волн: изопимпинеллина — 313 нм, бергаптена — 311 нм. Процентное содержание изопимпинеллина

и бергаптена x вычисляют по формуле

$$x = \frac{V_1 V_3 D_2 1,045 \cdot 100}{V_2 m E_{1\text{см}}^1 (100 - w)},$$

где V_1 — объем извлечения, мл; V_2 — объем извлечения, нанесенного на хроматограмму, мл; V_3 — объем элюата, мл; m — масса навески сырья, г; $E_{1\text{см}}^1$ — удельный показатель поглощения: изопимпинеллина-518, бергаптена-651; D_2 — оптическая плотность элюата; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Содержание изопимпинеллина в сырье должно быть не менее 0,3 %, бергаптена — не менее 0,15 % в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Реактивы и оборудование: хлороформ; метиловый спирт (метанол); формамид; *n*-гептан; бензол; этиловый спирт (этанол).

Бумага хроматографическая марки «С»; бюксы с притертыми крышками; пикнометры вместимостью 5 мл; микропипетки измерительные вместимостью 0,2 мл; колбы с нормальным шлифом вместимостью 10—15 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; весы лабораторные аналитические; набор сит; аппарат Сокслета; камеры хроматографические для ТСХ; шкаф сушильный лабораторный; УФ лампа; бани водяные лабораторные; спектрофотометры СФ-4А, СФ-16.

Методики количественного определения кумаринов в корнях горичника *Radix Peucedani* (ФС 42-538-72). Корни горичника Морисона (*Peucedanum morisonii* Bess.) и горичника русского (*P. ruthenicum* M. B.) семейства сельдерейных (зонтичных) *Apiaceae* (*Umbelliferae*) используются в качестве лекарственного сырья для получения препарата «Пеуцеданин».

Количественное определение пеуцеданина в корнях горичника проводят методом нейтрализации.

Около 15 г (с погрешностью не более 0,01 г) измельченного сырья (сито с размером отверстий 1 мм) помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 150 мл 95 %-ного этилового спирта и оставляют при периодическом встряхивании на сутки. 100 мл спиртового извлечения, соответствующее навеске сырья 10 г, отфильтровывают и отгоняют досуха в присутствии 1 г CaCO_3 .

Остаток в колбе извлекают порциями этилового эфира по 25 мл 4—5 раз при слабом нагревании с обратным холодильником. Эфирные извлечения сливают в делительную воронку вместимостью 250 мл и обрабатывают 5 %-ным КОН 3 раза по 5 мин порциями по 25 мл. Объединенные эфирные извлечения промывают один раз 25 мл воды, сушат безводным сульфатом натрия, отфильтровывают и отгоняют досуха. Остаток растворяют в 20 мл 95 %-ного этилового спирта (на холоду, при интенсивном перемешивании), добавляют 20 мл 0,1 н. раствора NaOH и смесь оставляют при комнатной температуре на 20 мин. К щелочному раствору добавляют 5—6 капель 0,1 %-ного спиртового раствора тимолового синего, 10 мл хлороформа. Смесь взбалтывают, дают отделиться хлороформному слою (2—3 мин) и избыток щелочи оттитровывают 0,1 н. H_2SO_4 (до желтого окрашивания). 1 мл 0,1 н. NaOH соответствует 0,0258 г пеуцеданина.

Процентное содержание псудоданина x вычисляют по формуле

$$x = \frac{V_0,0258 \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - w)},$$

где V — количество 0,1 н. NaOH, пошедшего на титрование, мл; m — масса навески сырья, соответствующая объему спиртового извлечения, взятого для анализа, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Содержание псудоданина в абсолютно сухом сырье должно быть не менее 1,5 %.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); CaCO_3 ; этиловый эфир; KOH; Na_2SO_4 (безводн.); NaOH, 0,1 н.; тимолового синего, 0,1%-ный раствор в этиловом спирте; хлороформ; H_2SO_4 .

Набор сит; колбы с нормальным шлифом вместимостью 15, 20, 250 мл; аппарат вибрационный; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; колбы конические вместимостью 250 мл; холодильники (обратные) стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; бани водяные лабораторные; воронки делительные вместимостью 250 мл; бюретки вместимостью 25 мл; капельницы стеклянные; цилиндры мерные на 250 мл.

Методика количественного определения кумаринов в плодах пастернака *Fructus Pastinacae sativae* (МРТУ 42 № 3043-71). Плоды пастернака посевного (*Pastinaca sativa* L) семейства сельдерейных (зонтичных) [Apiaceae (Umbelliferae)] используются в качестве сырья для получения препаратов «Бероксан» (смесь бергаптена и ксантотоксина) и «Пастинацин» (смесь ксантотоксина, изопимпеллина, бергаптена).

«Бергаптен» и «Пастинацин» стандартизуются по ксантотоксину.

Количественное определение ксантотоксина проводится полярографическим методом.

Около 2 г (точная навеска) измельченных плодов (сито с размером отверстий 0,5 мм) извлекают 100 мл 95 %-ного этилового спирта при нагревании на кипящей водяной бане в колбе с обратным холодильником в течение 2 ч. Спиртовое извлечение помещают в колбу для отгонки. Операцию извлечения повторяют еще с 50 мл 95 %-ного этилового спирта при нагревании в течение 10 мин.

Из объединенных спиртовых извлечений отгоняют спирт, а остаток переносят количественно в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора 95 %-ным этиловым спиртом до метки.

0,2—0,4 мл (точный объем) полученного извлечения доводят до 5 мл 95 %-ным этиловым спиртом, добавляют 3 мл 5 %-ного тетраэтиламмонийиодида в 50 %-ном этиловом спирте, пропускают водород 5—10 мин и полярографируют при катодной поляризации в интервале 1,00—1,6 В (относительно внутреннего анода).

Параллельно полярографируют стандартный спиртовой раствор, содержащий 0,0001 г ксантотоксина в 1 мл раствора.

Процентное содержание суммы фурукумаринов x в пересчете на ксантотоксин вычисляют по формуле

$$x = \frac{AH_x V_2 100}{HV_1 m},$$

где A — содержание ксантотоксина в стандартном растворе, г; H — высота волны стандартного раствора, мм; H_x — высота волны исследуемого раствора, мм; V_2 — объем извлечения, полученного из навески плодов, мл; V_1 — объем извлечения, взятого для полярографирования, мл; m — навеска абсолютно сухого сырья, г.

Процентное содержание суммы фурукумаринов в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 1 %.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); тетраэтиламмоний иодид; ксантотоксин (ст. р-р).

Бюксы с притертыми крышками; колбы с нормальным шлифом вместимостью 25, 50 мл; колбы мерные вместимостью 10 мл; холодильники обратные стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; весы лабораторные аналитические; набор сит; бани водяные лабораторные; полярограф.

Методика количественного определения кумаринов в плодах псоралеи костянковой (*Fructus Psoraleae*) (МРТУ 42 № 3856-70). Плоды псоралеи костянковой семейства бобовых (*Psoralea drupacea* Bег.) [Fabaceae (Leguminosae)] используются в качестве лекарственного сырья для получения препарата «Псорален», представляющего собой смесь псоралена и ангелицина.

Количественное определение псоралена и ангелицина в плодах псоралеи костянковой проводится хроматоколориметрическим методом.

10 г (точная навеска) измельченных на кофейной мельнице и просеянных сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм плодов вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, заливают 25 мл 80 %-ного этилового спирта и взбалтывают 2 ч на вибрационном аппарате. Извлечение доводят тем же спиртом до метки, хорошо перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр № 1.

Полоску хроматографической бумаги марки «Б» размером 18 × 52 см предварительно импрегнируют 15 мл 10 %-ного формамида в метиловом спирте. На стартовую линию, отстоящую на 10 см от верхнего края узкой стороны листа бумаги, отступая по 4,5 см с обеих боковых сторон бумаги, микропипеткой сплошной линией наносят 1 мл извлечения. Бумагу слегка подсушивают и помещают в камеру для хроматографирования. Система растворителей: гексан — бензол — метиловый спирт (5 : 4 : 1, по объему). Способ хроматографирования нисходящий. Хроматографирование ведут 2,5—3 ч, т. е. до тех пор, пока фронт растворителя не достигнет линии, на 2—3 см отстоящей от нижнего края бумаги. Высушенную хроматограмму просматривают на химископе УЧ-1 и пятна фурукумаринов обводят карандашом. Первое от старта пятно соответствует псоралену ($R_f \approx 0,67$), второе — изопсоралену ($R_f \approx 0,71$). Участки бумаги с пятнами фурукумаринов режут на мелкие кусочки, вносят в две колбы с притертой пробкой и приливают по 40 мл 95 %-ного этилового спирта. Элюирование проводят при комнатной температуре на вибрационном аппарате в течение 2 ч. Элюат фильтруют через стеклянный фильтр № 1. В колбу вместимостью 25 мл к 5 мл элюата приливают 3 мл 0,05 н. NaOH и 2 мл диазореактива (ГФ X, с. 370). Одновременно в другой колбе

смешивают 10 мл 95 %-ного этилового спирта, 6 мл 0,05 н. NaOH и 4 мл диазореактива — готовят раствор для контрольных кювет. Содержимое колб перемешивают спустя 1 ч, переливают в кюветы с толщиной слоя 0,5 см и определяют оптическую плотность окрашенных растворов по шкале правого барабана фотоколориметра ФЭК-М. Псорален определяют с зеленым (область максимального пропускания 500—530 нм), изопсорален с синим светофильтром (область максимального пропускания 480—500 нм), измерение повторяют и вычисляют среднюю величину оптической плотности (D).

Стандартные растворы готовят из стандартных образцов псоралена и изопсоралена в концентрации 0,0025—0,0030 мг/мл на 95 %-ном этиловом спирте. Одновременно с колориметрированием элюатов берут по 5 мл раствора стандартного образца каждого фурукумарина и способом, описанным выше, определяют их оптическую плотность.

Процентное содержание отдельных фурукумаринов x в сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{50 \cdot 40 D_1 A 100}{10 \cdot 1,0 D_2 (100 - \omega)},$$

где 50 — общий объем извлечения, мл; 40 — объем спирта, использованного для элюирования отдельных фурукумаринов с бумаги, мл; D_1 — оптическая плотность элюата; D_2 — оптическая плотность раствора стандартного образца; A — концентрация стандартного раствора, мг/мл; 1,0 — количество извлечения, нанесенного на хроматографическую бумагу, мл; ω — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Сумма псоралена и изопсоралена в пересчете на абсолютно сухую массу должна быть не менее 0,9 %.

Стандартные образцы псоралена и изопсоралена готовят и распределяет институт химии растительных веществ АН УзССР.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); формамид; метиловый спирт (метанол); n -гексан; бензол; NaOH, 0,05 н; диазореактив (ГФ X); изопсоралена и псоралена стандартный раствор (0,0025—0,0030 мг/мл в 95 %-ном этиловом спирте).

Бумага хроматографическая марки «Б»; бюксы с притертыми крышками; набор сит; кофемолка; колбы с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; стеклянные шарики; вибрационный аппарат, термостат; мерные колбы вместимостью 50 мл; фильтры стеклянные № 1; микропипетки измерительные вместимостью 1 мл; камеры хроматографические для БХ; химископ 4П-1; колбы конические вместимостью 25 мл; фотоэлектроколориметр ФЭК-М.

Методика количественного определения кумаринов в листьях инжира *Folium Ficus carica* (ВФС42-878-79). Листья культивируемого кустарника или дерева смоковницы обыкновенной (инжира) (*Ficus carica* L) семейства тутовых (*Moraceae*) используются в качестве лекарственного сырья для получения препарата «Псоберан», представляющего собой смесь псоралена и бергаптена. Количественное определение псоралена и бергаптена проводится хроматоспектрофотометрическим методом.

Около 5 г (с погрешностью до 0,01 г) листьев инжира, измельченных и просеянных сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, по-

мещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл; заливают 50 мл 60 %-ного водного ацетона и интенсивно встряхивают в течение 3 ч на вибрационном аппарате и настаивают 15 ч. Извлечение отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр.

Стеклянную пластинку размером 13 × 18 см с незакрепленным слоем нейтрального оксида алюминия (II) делят на 4 части. На стартовую линию двух частей наносят в виде полосы по 0,1 мл полученного извлечения: на третью — 25 мл раствора стандартного образца псоралена (раствор А); четвертая часть служит фоном (контрольная проба) при спектрофотометрировании. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 10 мин, а затем помещают в камеру с этиловым эфиром и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителя дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до исчезновения запаха этилового эфира (1—2 ч) и просматривают в УФ свете при $\lambda = 254$ нм. Псоберан проявляется в виде голубого пятна на уровне пятна стандартного образца псоралена. Отмеченную зону сорбента с псобераном переносят в колбу со шлифом вместимостью 50—100 мл, заливают 20 мл 95 %-ного этилового спирта, закрывают пробкой и элюируют в термостате при $t = 40—50$ °C в течение 3 ч.

После охлаждения элюат отфильтровывают через воронку со стеклянным фильтром № 4 (элюат должен быть прозрачным) и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длинах волн 246, 268 и 298 нм в кювете с толщиной слоя 1 см по отношению к элюату (95 %-ный этиловый спирт) с равным по площади оксидом алюминия, хроматографированного в тех же условиях без вещества (контрольная проба).

Параллельно при тех же длинах волн измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца псоралена.

Процентное содержание псоберана x в пересчете на абсолютно сухую массу вычисляют по формуле

$$x = \frac{D_1 A V V_2 100 \cdot 100}{D_0 m V_1 (100 - \omega)},$$

где D_1 — оптическая плотность испытуемого раствора при $\lambda = 298$ нм; D_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца псоралена при $\lambda = 298$ нм; A — концентрация раствора стандартного образца псоралена, г/мл; m — масса навески, г; V — общий объем извлечения, мл; V_1 — объем извлечения, нанесенного на хроматограмму, мл; V_2 — объем элюата, мл; ω — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Процентное содержание псоралена x в пересчете на абсолютно сухую массу вычисляют по формуле

$$x = \frac{(D_1^{246} - D_1^{268}) A V V_2 100 \cdot 100}{(D^{246} - D^{268}) m V_1 (100 - \omega)},$$

где D_1^{246} и D_1^{268} — оптическая плотность испытуемого раствора

при длинах волн 246 и 268 нм; D^{246} и D^{268} — оптическая плотность раствора стандартного образца псоралена при длинах волн 246 и 268 нм; A — концентрация раствора стандартного образца псоралена, г/мл; m — масса навески сырья, г; V — общий объем извлечения, мл; V_1 — объем извлечения, нанесенного на хроматограмму, мл; V_2 — объем элюата, мл; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Содержание псоралена не менее 0,7 %. Содержание псоралена не менее 0,42 %.

Приготовление стандартного образца псоралена. 0,05 г (точная навеска) стандартного образца псоралена (ВФС 42-532-76) растворяют при энергичном встряхивании в 95%-ном этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 200 мл и доводят объем раствора тем же спиртом до метки (раствор А). 0,6 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 95%-ным этиловым спиртом до метки (раствор В). Раствор хранят в темноте в колбе с притертой пробкой. Срок хранения 6 мес. 1 мл раствора стандартного образца содержит 0,000006 г псоралена.

Приготовление 60%-ного водного раствора ацетона. Смешивают 600 мл ацетона и 400 мл воды.

Реактивы и оборудование: ацетон; $Al(OH)_3$; псорален; этиловый эфир; этиловый спирт (этанол).

Колбы с притертой пробкой вместимостью 250 мл, с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13×18 см; фильтры стеклянные № 4; бумага фильтровальная; термостат; спектрофотометры СФ-4А, СФ-6; УФ-лампа; колбы мерные вместимостью 25, 250 мл; камера хроматографическая для ТСХ; весы лабораторные аналитические.

Вопросы для подготовки

1. Современное определение кумаринов.
2. Классификация кумаринов.
3. Химические свойства кумаринов.
4. Физические свойства кумаринов.
5. Как обнаружить кумарины в лекарственном растительном сырье?
6. Как выделить кумарины из лекарственного растительного сырья?
7. Как разделить сумму кумаринов на отдельные компоненты?
8. Какие свойства кумаринов лежат в основе методов количественного определения кумаринов в лекарственном растительном сырье: а) метода нейтрализации; б) хромато-колориметрического метода; в) хромато-спектрофотометрического метода; г) полярографического метода; д) хромато-флуориметрического метода?

Литература

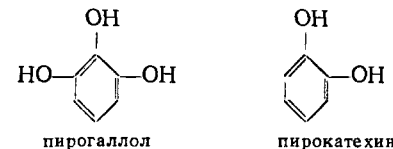
- Терпеноиды и кумарины/Под ред. Г. В. Пигулевского. — М.—Л.: Наука, 1965.
- Кузнецова Г. А. Природные кумарины и фурукумарины. — М.: Наука, 1967.
- Георгиевский В. П., Казаринов Н. А., Каррыев Л. О. Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения. — Ашхабад: Ылым, 1976.
- Кемертелидзе Э. П., Георгиевский В. П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения — Тбилиси: Мецниереба, 1977.
- Плод аммиа большой. ФС 42-540-72.
- Корень горичника. ФС 42-538-72.
- Плод пастернака. МРТУ 42 № 3043-71.
- Плод псорален костянковой. МРТУ 42 № 3856-70.
- Лист инжира. ВФС 42-878-79.

Дубильными веществами называют растительные полифенольные соединения различной молекулярной массы, способные дубить кожу. В настоящее время из растений выделены также многочисленные низкомолекулярные полиоксифенольные соединения, не обладающие дубящим действием, но являющиеся биогенетическими предшественниками дубильных веществ.

Термин «дубильные вещества» был впервые использован в 1796 г. французским исследователем Сегеном для обозначения присутствующих в экстрактах некоторых растений веществ, способных осуществлять процесс дубления. Практические вопросы кожевенной промышленности в середине прошлого века положили начало изучению химии дубильных веществ.

§ 1. Классификация

По классификации Г. Проктера (1894) дубильные вещества в зависимости от природы продуктов их разложения при температуре $180-200^\circ\text{C}$ (без доступа воздуха) разделяются на две основные группы: 1) пирогалловые (дают при разложении пирогаллол); 2) пирокатехиновые (образуется пирокатехин):



В результате дальнейшего исследования химизма танидов К. Фрейденберг уточнил классификацию Проктера и рекомендовал обозначить первую группу (пирогалловые дубильные вещества) как гидролизуемые дубильные вещества, а вторую (пирокатехиновые дубильные вещества) — конденсированные.

Большинство дубильных веществ растений невозможно однозначно отнести к типу гидролизуемых или конденсированных, поскольку эти группы во многих случаях недостаточно резко разграничены. В растениях часто содержится смесь дубильных веществ обеих групп.

В настоящее время наиболее часто пользуются классификацией Фрейденберга:

I. Гидролизуемые дубильные вещества: а) галлотанины — эфиры галловой кислоты и сахаров; б) несакхаридные эфиры фенолкарбоновых кислот; в) эллаготанины — эфиры эллаговой кислоты и сахаров.

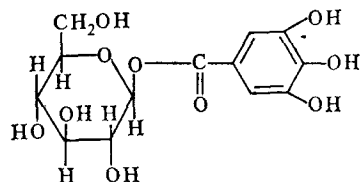
II. Конденсированные дубильные вещества: а) производные флаванолов — 3; б) производные флавандиола — 3, 4; в) производные оксистерильбенов.

Гидролизуемые дубильные вещества. Представляют собой сложные эфиры сахаридов и фенолкарбоновых кислот, которые в услови-

ях кислотного или ферментативного гидролиза распадаются на простейшие составные части. Дубильные вещества группы галлотанинов наряду с сахаридом образуют галловую кислоту, а эллаготанины — гексаоксидифеновую кислоту, или такую кислоту, которая может образоваться из галловой кислоты простыми химическими превращениями (окисление, восстановление).

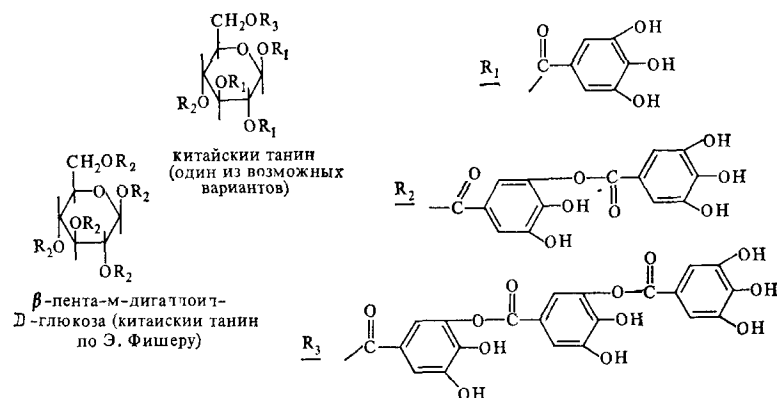
Галлотанины — эфиры галловой кислоты, наиболее важные в группе гидролизуемых дубильных веществ. Встречаются моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и полигаллоилльные эфиры.

Представителем моногаллоилльных эфиров является β -D-глюкогаллин, выделенный из корня китайского ревеня и обнаруженный также в других растениях:



Важнейшие источники галлотанинов: галлы — наросты на листьях сумаха полукрылатого (китайский танин), ветках дуба лузитанского (турецкий танин); листья сумаха дубильного и скумпии кожаной и др.

Изучение структуры китайского танина проводилось на протяжении многих лет. Э. Фишер предложил для него строение β -пента-м-дигаллоил-D-глюкозы. Все гидроксильные группы глюкозы этерифицированы м-дигалловой кислотой. Фишер допускал, что китайский танин содержит не только остатки дигаллоил, но и три-, и тетрагаллоила. П. Каррер (1923) первый обнаружил, что китайский танин представляет собой гетерогенную смесь веществ различного строения:



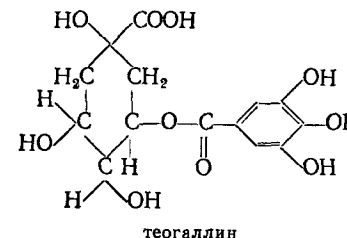
Для турецкого танина многие исследователи принимали строение β -пента-D-галлоил-O-глюкозы. Фишер и Фрейденберг доказали

наличие в турецком танине небольшого количества эллаговой кислоты. Позднее Фрейденберг суммировал все представления о строении турецкого танина и предположил, что в среднем одна из пяти гидроксильных групп глюкозы свободна, другая — этерифицирована м-дигалловой, а остальные — галловой кислотой.

Доказана идентичность строения китайского танина и танина сумаха, которые представляют собой окта- или нонагаллоилглюкозу в отличие от турецкого танина, являющегося гекса- или гептагаллоилглюкозой.

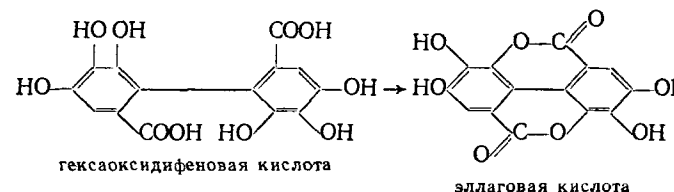
Танин (галлотанин) используется как вяжущее средство при ожогах и желудочно-кишечных заболеваниях, а также для мягкого дубления.

Несахаридные эфиры галловой кислоты. Помимо эфиров галловой кислоты, с сахарами выделены и идентифицированы ее эфиры с хинной и оксикоричной кислотами и с флаванами. В зеленом чае обнаружен аморфный полиоксифенол, названный теогаллином, и имеющий строение 3-O-галлоилхинной кислоты:



Таратанин, выделенный из спиртового экстракта дубильных веществ *Caesalpinia spinosa*, представляет собой галлотанин, в состав которого входит не сахарид, а хинная кислота. Эфиры хинной, п-кумароилхинной, хлорогеновой, шикимовой, оксикоричной и кофейной кислот очень широко распространены в растительном мире.

Эллаговые дубильные вещества. Значительно сложнее по строению, чем галловые. Их сырьевыми источниками служат тропические растения — плоды термаллии хебула, цезальпинии дубильной и другие, а также корка гранатника. Эллаговая кислота обнаружена в гидролизатах экстрактов двудольных растений (примерно 75 семейств), что свидетельствует о широком распространении эллаговых дубильных веществ. В растениях содержится гексаоксидифеновая кислота (продукт окисления галловой кислоты), которая переходит в эллаговую кислоту:

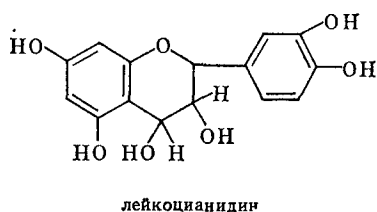
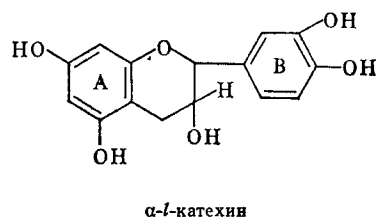


Кроме эллаговой кислоты при расщеплении эллаготанинов образуются и другие соединения, как, например, бревифолинкарбоновая (выделена из альгарбиллы), хебуловая кислоты и др.



Конденсированные дубильные вещества. Не расщепляются при действии минеральных кислот, а образуют красно-коричневые продукты конденсации, называемые флабофенами. Кроме того, из растений выделен также ряд мономерных полиоксифенолов биогенетических предшественников конденсированных дубильных веществ. Такие соединения катехинового типа выделены, например, из листьев чая китайского и некоторых других растений.

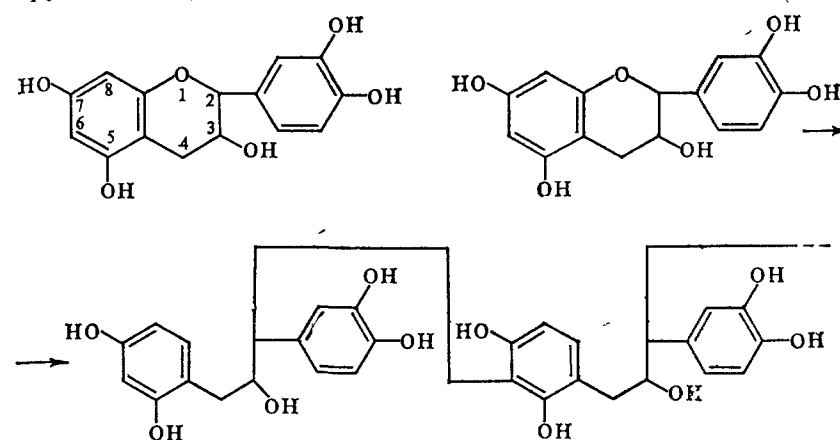
Конденсированные дубильные вещества — производные, главным образом катехинов и лейкоантоцианидинов; значительно реже в их образовании принимают участие стильбены и, возможно, флаванолы:



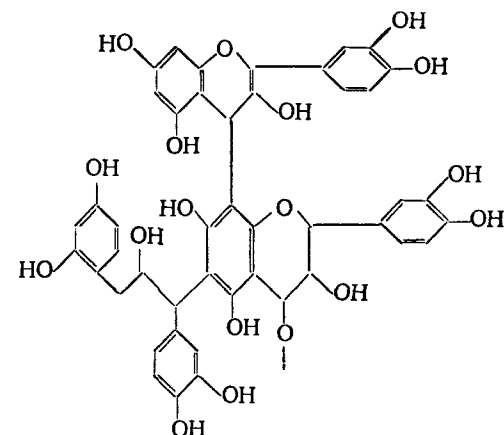
Одно из первых химических исследований конденсированных дубильных веществ было проведено И. Берцелиусом в 1827 г. Систематические исследования химии конденсированных дубильных веществ были начаты лишь в 20-е годы нашего столетия Фрейденбергом с сотр. Несмотря на успехи органической химии и химии полимеров, строение конденсированных дубильных веществ до сих пор во многом остается неясным.

На основании модельных опытов Фрейденберг пришел к выводу, что образование конденсированных дубильных веществ происходит в результате окислительной конденсации катехинов. При этом пирановое ядро катехиновой молекулы разрывается и C₂-атом соединяется углерод-углеродной связью с C₆-атомом

другой молекулы:



Исследования последнего десятилетия показали, что многие конденсированные дубильные вещества представляют собой смешанные полимеры, построенные на основе катехина и лейкоантоцианидина:



К числу растений, содержащих конденсированные дубильные вещества, относятся: зверобой, черника, чай китайский.

Чаще всего в растениях встречается смесь гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ с преобладанием соединений той или иной группы (дуб черешчатый, змеевик, кровохлебка, бадан толстолистный, лапчатка прямостоячая и др.).

§ 2. Физико-химические свойства

Дубильные вещества (таниды) имеют среднюю молекулярную массу порядка 1000—5000 (до 20 000) и представляют собой, как правило, аморфные соединения, образующие при растворении в воде

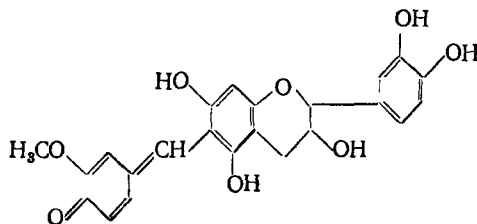
коллоидные растворы. Из органических растворителей таниды растворимы в ацетоне, этиловом спирте, смеси этилового спирта и этилового эфира, отчасти в этиловом эфире, этилацетате, пиридине; нерастворимы в хлороформе, петролейном эфире, бензоле и сероуглероде. Многие дубильные вещества оптически активны; обладают вяжущим вкусом, легко окисляются на воздухе, приобретая более или менее темную окраску.

Катехины — бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде и органических растворителях (спирты, ацетон и т. д.). Они легко окисляются при нагревании и на свету. Окисление катехинов особенно быстро протекает в щелочной среде, а также при действии окислительных ферментов (полифенолоксидаза, пероксидаза).

Молекула катехина содержит два асимметричных атома углерода (C_2 и C_3), и поэтому каждый из катехинов может быть представлен четырьмя изомерами и двумя рацематами. В зависимости от конфигурации кольца В и гидроксильной группы у C_3 -атома различают ($\pm$)-катехины и ($\pm$)-эпикатехины. В растениях катехины встречаются в изомерных формах, соответствующих (+)-катехину и (—)-эпикатехину. Для УФ спектра катехинов характерен основной максимум поглощения в области 270—280 нм.

Лейкоантоцианиды — бесцветные аморфные вещества, окисляющиеся легче, чем катехины. Они растворимы в воде, этаноле, ацетоне, хуже в этилацетате, нерастворимы в этиловом эфире. Лейкоантоцианидины содержат три асимметричных атома углерода (C_2 , C_3 , C_4), и поэтому каждый из лейкоантоцианидинов может быть представлен восемью изомерами и четырьмя рацематами. В УФ спектре лейкоантоцианидинов имеется максимум поглощения в области 270—280 нм. При нагревании с разбавленными кислотами лейкоантоцианидины превращаются в ярко окрашенные антоцианы.

Дубильные вещества, как и другие фенольные соединения, образуют окрашенные комплексы с солями тяжелых металлов. Конденсированные дубильные вещества дают с раствором железомонокислотных квасцов черно-зеленую окраску, гидролизуемые — черносинюю. Дубильным веществам свойственна также реакция сочетания с диазониевыми соединениями, при этом образуются окрашенные продукты. Для них характерна реакция с ванилином (в присутствии концентрированной HCl или 70 %-ной H_2SO_4 развивается яркая красная окраска). Катехины образуют при этой реакции окрашенный продукт следующего строения:



Свободная эллаговая кислота дает красно-фиолетовую окраску при добавлении нескольких кристаллов нитрита натрия и трех-четырех капель уксусной кислоты. Для обнаружения связанной эллаговой кислоты (или гексаоксидифеновой) уксусную кислоту заменяют 0,1 н. серной или соляной кислотой (кармино-красная окраска, переходящая в синюю).

§ 3. Методы выделения и идентификация

Дубильные вещества — это смесь различных полифенолов, имеющих нередко сложную структуру, и очень лабильных, поэтому выделение и анализ индивидуальных компонентов представляет собой большие трудности.

При выделении из растительного материала получают фракции дубильных веществ. Для этого используют экстракцию растительного материала органическими растворителями: обрабатывают сырье петролейным эфиром, бензолом или смесью бензол — хлороформ (1 : 1) для удаления основной массы хлорофилла, терпеноидов и липидов, затем экстрагируют этиловым эфиром, который извлекает некоторые фенольные соединения, в том числе оксикоричные кислоты и катехины; после этого проводят экстракцию этилацетатом, в результате которой в экстракт переходят лейкоантоцианы, димерные проантоцианидины, эфиры оксикоричных кислот и др. В завершение растительный материал экстрагируют метиловым или этиловым спиртом, при этом в раствор переходят многие дубильные вещества и другие фенольные соединения.

Для получения суммы дубильных веществ используются и другие способы: растительное сырье вначале экстрагируют горячей водой, а затем охлажденный водный экстракт обрабатывают последовательно вышеперечисленными растворителями.

Широко распространено выделение фенольных соединений, в том числе и некоторых компонентов дубильных веществ, осаждением из водных или спирто-водных растворов солями свинца. Полученные осадки затем обрабатывают разбавленной серной кислотой.

Суммарные извлечения дубильных веществ разделяют на индивидуальные компоненты с помощью хроматографических методов.

Для выделения индивидуальных компонентов дубильных веществ (катехинов, лейкоантоцианидинов и др.) используют различные виды хроматографии: 1) адсорбционную хроматографию на колонках целлюлозы, полиамида (иногда вместо полиамида используют гольевой порошок); 2) ионообменную — на колонках катионита Дауэкс-50 В в H^+ -форме; 3) распределительную хроматографию на колонках силикагеля; 4) противоточное распределение; 5) гельфильтрацию на колонках Сефадекса Г-50, Г-100 и др.

Идентификация индивидуальных компонентов дубильных веществ основана на хроматографических методах (хроматография на бумаге и тонкослойная), спектральных исследованиях, качественных реакциях и изучении продуктов расщепления.

Хроматограммы дубильных веществ просматривают в УФ свете и отмечают характер флуоресценции зон адсорбции. Некоторые производные катехинов имеют слабую голубую флуоресценцию, усиливающуюся после обработки хроматограмм парами аммиака. Чаще всего для обнаружения катехинов и лейкоантоцианидинов и их производных на хроматограммах используют 1 %-ный ванилин в концентрированной HCl. Лейкоантоцианидины можно отличить от катехинов при выдерживании хроматограммы в парах соляной кислоты с последующим нагреванием при 105 °С в течение 2 мин, при этом лейкоантоцианидины переходят в антоцианидины (розовый, красно-фиолетовый цвет), а катехины остаются бесцветными или желтеют.

Для более детальной идентификации веществ используют также методы УФ, ИК и ПМР спектроскопии.

Для изучения структуры дубильных веществ широко применяют гидролиз (в частности, ферментативный с помощью танназы), щелочное расщепление с последующим анализом полученных продуктов.

§ 4. Качественное определение

Дубильные вещества в растительном сырье определяют качественными реакциями, которые можно подразделить на две группы: реакции осаждения и цветные реакции. Для проведения качественных реакций из растительного сырья готовят водное извлечение.

Методики качественного определения. Приготовление извлечения. 1 г измельченного растительного сырья заливают 100 мл воды. Нагревают на водяной бане 20—30 мин, процеживают через вату и полученное извлечение используют для проведения качественных реакций.

1. Качественные реакции извлечения. К 2—3 мл извлечения добавляют по каплям 1 %-ный раствор желатин. Появляется муть, исчезающая при добавлении избытка желатин.

2. К 2—3 мл извлечения прибавляют несколько капель 1 %-ного хлорида хинина (антипирина). Появляется аморфный осадок.

3. При добавлении к 2—3 мл извлечения 4—5 капель раствора железоммониевых квасцов в случае гидролизуемых дубильных веществ появляется черно-синее окрашивание или осадок, а конденсированных — черно-зеленое окрашивание или осадок (эта реакция используется для открытия дубильных веществ в растительном материале).

4. К 10 мл извлечения прибавляют 5 мл смеси (2 мл HCl, разведенной в соотношении 1 : 1, и 3 мл 40 %-ного раствора формальдегида). Полученную смесь кипятят 30 мин в колбе, снабженной обратным холодильником. При наличии конденсированных дубильных веществ они выпадают в осадок. Осадок отфильтровывают. К 2 мл фильтрата добавляют 10 капель 1 %-ных железоммониевых квасцов и около 0,2 г кристаллического ацетата свинца, раствор

перемешивают. В случае наличия гидролизуемых дубильных веществ появляется синее или фиолетовое окрашивание (в нейтральной среде).

5. К 2—3 мл извлечения прибавляют по каплям бромную воду (5 г брома в 1 л воды) до того момента, когда в жидкости станет ощущаться запах брома. При наличии конденсированных дубильных веществ сразу образуется осадок.

6. К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 10 %-ной уксусной кислоты и 1 мл 10 %-ной средней соли ацетата свинца — гидролизуемые дубильные вещества образуют осадок. При наличии конденсированных дубильных веществ фильтрат окрасится в черно-зеленый цвет от прибавления 5 капель 1 %-ных железоммониевых квасцов и 0,1 г ацетата свинца.

7. К 2 мл извлечения прибавляют несколько кристаллов NaNO_2 и 2 капли 0,1 н. HCl. При наличии гидролизуемых дубильных веществ появляется коричневое окрашивание.

Хроматографическое определение (катехинов листа чая ТСХ). 0,1 г измельченного сырья (лист чая) заливают 2 мл 95 %-ного этилового спирта и нагревают на водяной бане до кипения, охлаждают, фильтруют.

Полученный этанольный экстракт наносят с помощью капилляра на стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол» (высота столбика жидкости в капилляре 1,5—2 см; диаметр пятна на стартовой линии не более 5 мм). Рядом с исследуемым экстрактом на стартовую линию наносят в качестве «свидетеля» раствор очищенной суммы катехинов листа чая. После высушивания пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (40 : 12 : 28). Хроматографирование проводят в течение 1,5 ч (пробег фронта растворителя 10—12 см). Затем хроматограмму высушивают на воздухе и обрабатывают раствором 1 %-ного ванилина в концентрированной HCl. Катехины проявляются в виде красно-оранжевых пятен (рис. 24).

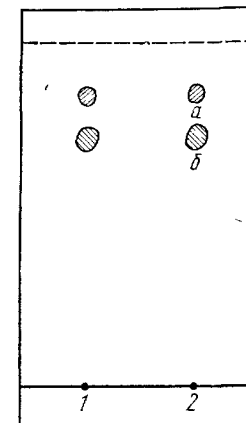


Рис. 24. Схема хроматограммы (ТСХ) катехинов листьев чая китайского:

1 — извлечение из листьев чая; 2 — очищенная сумма катехинов; а — (+) катехины; б — (+) эпикатехин

§ 5. Количественное определение

В литературе описано около 100 различных способов количественного определения дубильных веществ, которые можно подразделить на следующие основные группы.

1. Гравиметрические — основаны на количественном осаждении дубильных веществ желатиной, ионами тяжелых металлов или адсорбцией гольевым порошком.

2. Титрометрические — на окислительных реакциях, прежде всего с применением перманганата калия (метод ГФ Х).

3. Фотоколориметрические — на реакциях с солями окисного железа, фосфорновольфрамовой кислотой, с реактивом Фолина — Дениса и др.

4. Методы нефелометрические, хроматоспектрофотометрические в основном используются в исследованиях.

В СССР и за рубежом стандартным для технических целей является гравиметрический метод с применением гольевого порошка [весовой единый метод (ВЕМ)].

В ГФ Х входит титрометрический метод Левенталя в модификации А. Л. Курсанова, основанный на способности дубильных веществ быстро окисляться перманганатом калия.

Для количественного определения танина в листьях скумпии и сумаха предложен метод осаждения дубильных веществ сульфатом цинка с последующим комплексонометрическим титрованием.

Для количественного определения катехинов в листе чая М. Н. Запрометовым разработан фотоколориметрический метод с использованием бумажной хроматографии для разделения катехинов и реакции катехинов с 1 %-ным ванилином в концентрированной HCl, в результате которой образуется окрашенный раствор.

Методика количественного определения дубильных веществ (ГФ Х). Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл кипящей воды и нагревают на водяной бане в течение 30 мин при частом перемешивании. Жидкость отстаивают в течение нескольких минут и осторожно процеживают через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на вату. Сырье в колбе повторно извлекают кипящей водой, как указано выше, процеживая жидкость в ту же мерную колбу. Извлечение повторяют несколько раз до отрицательной реакции на дубильные вещества (проба с раствором железоммониевых квасцов). Жидкость в мерной колбе охлаждают и объем извлечения доводят водой до метки. 25 мл полученной жидкости помещают в коническую колбу вместимостью 1 л, добавляют 750 мл воды и 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании 0,1 н. перманганатом калия до золотисто-желтого окрашивания.

1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин. Параллельно проводят контрольный опыт, титруя 25 мл индигосульфокислоты в 750 мл воды.

Процентное содержание дубильных веществ определяют по формуле

$$x = \frac{(V_1 - V_2) KDV100 \cdot 100}{mV_3 (100 - w)},$$

где V_1 — объем 0,1 н. $KMnO_4$, пошедшего на титрование, мл; V_2 — объем 0,1 н. $KMnO_4$, пошедшего на контрольный опыт, мл; K —

поправка на титр (по щавелевой кислоте); D — коэффициент пересчета на танин: для гидролизующих дубильных веществ равен 0,004157, для конденсированных — 0,00582; V — общий объем экстракта, мл; m — масса навески сырья, г; V_3 — объем экстракта, взятый для титрования, мл.

Методика количественного определения танина в листьях скумпии и сумаха. Около 1 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с размером отверстий 1 мм, взвешивают с точностью до 0,0002 г, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 150—250 мл, прибавляют 30 %-ного этилового спирта, колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически смывая частицы сырья со стенок встряхиванием смеси. Затем смесь отстаивают 10—15 мин и жидкость сливают через стеклянный фильтр (ПОР-160) в мерную колбу вместимостью 200 мл. Извлечение повторяют еще раз указанным способом, предварительно смыв частицы сырья с фильтра 30 %-ным этиловым спиртом. После охлаждения полученного извлечения доводят объем раствора 30 %-ным этиловым спиртом до метки. Отбирают из мерной колбы 10 мл извлечения, помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 25—50 мл, прибавляют 10 мл реактива осаждения (см. ГОСТ 4564—79). Смесь перемешивают палочкой, палочку промывают 5 мл дистиллированной воды, которую присоединяют к основной смеси. Через 30 мин смесь центрифугируют в течение 5—10 мин с частотой вращения 5—6 тыс. об/мин, жидкость с осадка сливают, а осадок в пробирке взмучивают в 20 мл 0,25 %-ного аммиака той же палочкой, которую затем промывают 5 мл раствора аммиака указанной концентрации, присоединяя его к центрифугируемой смеси. После центрифугирования промывную жидкость сливают и отбрасывают. Осадок в пробирке растворяют в 3 мл 30 %-ной уксусной кислоты. Раствор количественно переносят в колбу вместимостью 250 мл с помощью 80—100 мл дистиллированной воды. Жидкость нейтрализуют 25 мл 5 %-ного гидрокарбоната натрия, прибавляют 0,5 мл ксиленолового оранжевого и титруют 0,01 М раствором трилона Б до изменения красно-фиолетовой окраски раствора в желтую.

1 мл 0,01 М раствора трилона Б соответствует 0,0013 г танина.

Процентное содержание танина x в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{VK0,00130 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{m10 (100 - w)},$$

где V — расход трилона Б, мл; K — поправка к титру 0,01 М раствора трилона Б; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Реактивы и оборудование: калий перманганат 0,1 н.; индигосульфокислота; этиловый эфир; желатина 1 %-ная; квасцы железоммониевые [аммоний железо (III) сульфат], 1 %-ный раствор; HCl (конц., 0,1 н.); формальдегид 40 %-ный; свинца ацетат (кристал., 10 %-ный); бромная вода; уксусная кислота 10 и 30 %-ная; NaCl, HCl, 0,1 н.; ванилин 1 %-ный в конц. HCl; *n*-бутанол; уксусная кислота (лед.); NaOH (1 %-ный); оксид цинка; цинк (метал.); этило-

вый спирт 30%-ный (этанол); аммония хлорид; аммиак водный (конц., 0,25%-ный); H_2SO_4 (16%-ная); натрия ацетат; натрия гидрокарбонат 5%-ный; вода (дистил.); трилон Б (0,01 М); ксиленоловый оранжевый 0,1%-ный; сумма катехинов листа чая.

Колбы плоскодонные вместимостью 100 мл; колбы плоскодонные конические вместимостью 100, 150, 250, 500, 1000 мл; холодильник (обратный) стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; колбы мерные вместимостью 200 и 250 мл; микробюретки и пипетки измерительные вместимостью 10, 25 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; палочки стеклянные; пробирки стеклянные вместимостью 10 мл; пробирки центрифужные вместимостью 25—50 мл; цилиндры мерные емкостью 1000 мл, 100, 25 и др.; камеры хроматографические для ТСХ; сито с диаметром отверстий 1 мм; кофемолка; весы лабораторные аналитические; весы ручные; центрифуга лабораторная на 5—6 тыс. об/мин; капилляры стеклянные; вата гигроскопическая; пульверизатор; фотоэлектроколориметр ФЭК-56М, пластинки «Силуфол»; баня водяная лабораторная; фильтр стеклянный ПОР 160.

Вопросы для подготовки

1. Определение дубильных веществ.
2. Классификация дубильных веществ.
3. Физические и химические свойства.
4. Локализация дубильных веществ.
5. Методы выделения дубильных веществ из растительного сырья, очистка.
6. Качественные реакции на дубильные вещества.
7. Хроматографический анализ.
8. Методы количественного определения дубильных веществ в растительном сырье.

Литература

- Запрометов М. Н. Физиология растений, т. 5, 3, 1958, с. 408—416.
Биохимия растений: Пер. с англ./Под ред. Кретовича В. А. — М.: Мир, 1968, с. 329—348.
Лист скумпии. ГОСТ 4564—79.
Лист сумаха. ГОСТ 4565—79.
Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. — М.: Мир, 1977, с. 60—86.

ГЛАВА 10. АЛКАЛОИДЫ

Алкалоидами называют группу азотсодержащих органических соединений основного характера, имеющих обычно довольно сложный состав и часто обладающих сильным специфическим физиологическим действием.

Название «алкалоид» происходит от двух слов: арабского «алкали» (*alcali*) — щелочь и греческого «ейдос» (*eidos*) — подобный.

Содержание алкалоидов в растениях невелико и колеблется от тысячных долей процента до нескольких процентов. И только весьма редко некоторые растения содержат около десяти процентов алкалоидов, а иногда значительно больше. Например, в коре хинного дерева содержание алкалоидов достигает 15—20 %. В лекарственном сырье общее содержание алкалоидов (суммы алкалоидов) чаще всего колеблется в пределах 0,1—2 %.

Алкалоиды у некоторых растений содержатся в значительном количестве во всех его частях (красавка обыкновенная, красавка кавказская), но у большинства растений они преобладают или содержатся только в каком-либо одном органе или части растения. У одних растений наибольшее количество алкалоидов накапливается в листьях (чай китайский, белена черная, секурингеа полукустарниковая); у других — в плодах или семенах (дурман индийский, мордовник шароголовый, мордовник обыкновенный, чилибуха); у третьих — в подземных органах (раувольфия змеиная, безвременник великолепный, скополия карниолийская) или в коре (цинхона красносочковая, цинхона Ледгера).

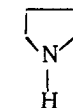
Большинство растений содержит несколько алкалоидов. У ряда растений обнаружено 20—35 алкалоидов (мак снотворный, спорынья, цинхона (хинное дерево) и др.), а у некоторых — около 50 алкалоидов (раувольфия змеиная, барвинок прямой). Чаще всего у одного растения количественно преобладает один или 2—3 алкалоида, содержание же других — значительно меньше. Алкалоиды одного растения, как правило, имеют довольно близкое строение и образуют группу «родственных» алкалоидов.

§ 1. Классификация

Все алкалоиды, как уже отмечалось, содержат в своем составе азот, причем подавляющее большинство алкалоидов — гетероциклические соединения (с азотом в цикле). Небольшое число алкалоидов — ациклические соединения или содержат азот в боковой цепи.

В основу современной классификации алкалоидов положена классификация, предложенная акад. А. П. Ореховым, который разделил алкалоиды на группы в зависимости от строения основного углеродно-азотного цикла или положения азота в молекуле алкалоида.

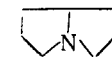
1. Алкалоиды — производные пирролидина:



пирролидин

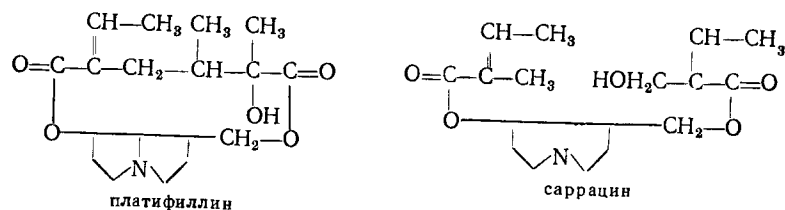
1. Простые производные пирролидина. К алкалоидам этой подгруппы относятся, например, гигрин, кускгигрин (содержатся в листьях кокаинового куста сем. эритроксилановых, в корнях скополии дурмановидной сем. пасленовых); карпайн (в листьях и семенах дынного дерева сем. кариковых) и др.

2. Производные пирролизидина (конденсированная бициклическая система, состоящая из двух циклов пирролидина):

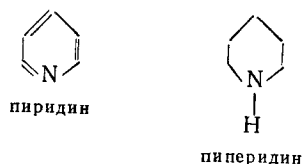


пирролизидин

Алкалоиды производные пирролизидина встречаются в растениях семейства астровых (сложноцветных), бурачниковых, бобовых. Наиболее известны алкалоиды платифиллин, который выделен из крестовника плосколистного, а также саррацин — из крестовника ромбического:

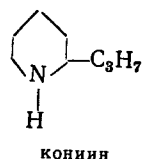


II. Алкалоиды — производные пиридина и пиперидина:



Алкалоиды этой группы встречаются в большом числе лекарственных растений. Они имеют различную степень сложности и подразделяются на несколько групп.

1. Простые производные пиридина и пиперидина. Как пример можно отметить конинин, который содержится в болиголове пятнистом сем. сельдерейных (зонтичных); лобелин, выделенный из лобелии сем. лобелиевых:

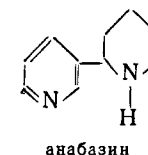


2. Производные бициклической неконденсированной системы, состоящей из циклов пиридина и пирролизидина. К этой подгруппе относится никотин, который обнаружен во многих растениях, например в табаке и махорке сем. пасленовых; в некоторых видах хвоща сем. хвощевых и плауна сем. плауновых:

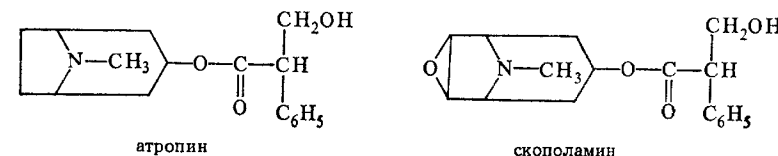


3. Производные бициклической неконденсированной системы, состоящей из циклов пиридина и пиперидина. Сюда относится,

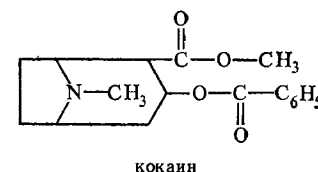
например, анабазин, который содержится в анабазисе (ежевник безлистный) сем. маревых.



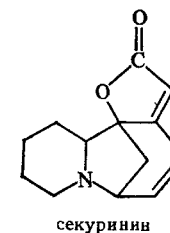
4. Производные бициклической конденсированной системы пиперидина и пирролизидина. а. Тропановые алкалоиды. Широко известны алкалоиды атропин, гиосциамин, скополамин:



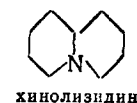
Источниками этих алкалоидов являются некоторые растения семейства пасленовых: красавка обыкновенная, красавка кавказская, скополия карниольская, дурман индийский и др. К этой подгруппе относится алкалоид кокаин, который найден в листьях кокаинового куста:



б. Производным бициклической конденсированной системы пиперидина и пирролизидина является секуринин, который содержится в секуринеге полкустарниковой сем. молочайных:

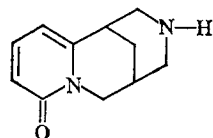


5. Производные бициклической конденсированной системы, состоящей из двух циклов пиперидина или пиридина и пиперидина (хинолизидина):

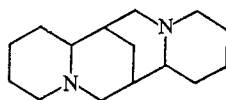


К этой подгруппе относятся цитизин, пахикарпин и многие другие, так называемые лупиновые или хинолизидиновые алкалоиды.

Алкалоиды этой подгруппы широко распространены в растениях сем. бобовых. Цитизин содержится в термопсисе ланцетовидном, термопсисе очередноцветковом; пахикарпин — в софоре толстоплодной, термопсисе ланцетовидном:

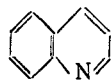


цитизин



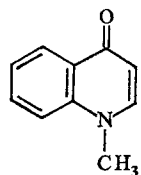
пахикарпин

III. Алкалоиды — производные хинолина:

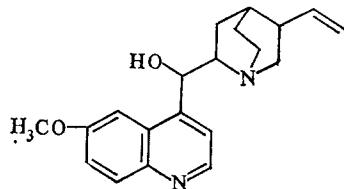


хинолин

К этой группе относятся алкалоиды хинного дерева (цинхона краснокочевая) сем. мареновых: хинин, хинидин, цинхонин и др.; эхинопсин, который выделен из плодов мордовника обыкновенного и мордовника шароголового сем. астровых (сложноцветных):

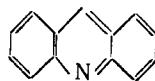


эхинопсин



хинин

IV. Алкалоиды — производные акридина:



акридин

Алкалоиды — производные акридина встречаются довольно редко. К этой группе относятся в основном алкалоиды некоторых тропических растений сем. рутовых.

V. Алкалоиды — производные изохинолина:

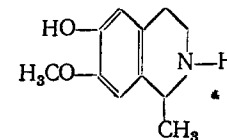


изохинолин

Алкалоиды этой группы широко распространены в природе. Они имеют разнообразное строение и степень сложности.

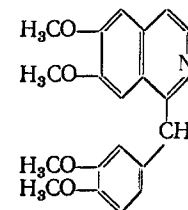
Отметим 5 подгрупп, алкалоиды которых чаще всего встречаются в лекарственных растениях.

1. Простые производные изохинолина. К простым производным изохинолина принадлежат, например, сальсолин, сальсолидин — алкалоиды солянки Рихтера сем. маревых:



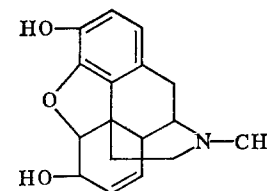
сальсолин

2. Производные бензилизохинолина. Некоторые алкалоиды мака снотворного сем. маковых, например папаверин, наркотин, являются производными бензилизохинолина:



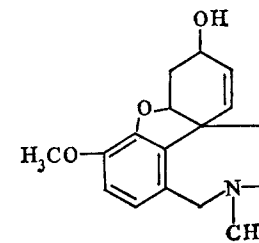
папаверин

3. Производные фенантренизохинолина. К этой подгруппе относятся морфин, кодеин, тебаин и др. (содержатся в маке снотворном):



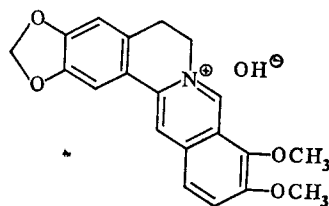
морфин

4. Производные фенантридинизохинолина. Фенантридиновые алкалоиды, например галантамин, найдены в подснежнике Воронова, в унгернии Виктора сем. амариллисовых:



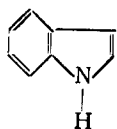
галантамин

5. Производные диизохинолина. В эту подгруппу входят, например, алкалоиды типа берберина. Берберин встречается в растениях довольно часто, например в барбарисе обыкновенном, барбарисе амурском сем. барбарисовых; в бархате амурском сем. рутовых и др.:



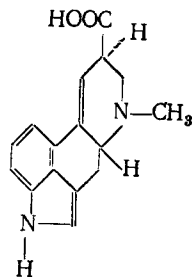
берберин

VI. Алкалоиды — производные индола:



индол

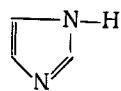
Многие индольные алкалоиды имеют сложное строение. Довольно большое число лекарственных растений содержат алкалоиды этой группы, например спорынья сем. спорыньевых. В склероциях спорыньи находится значительное число алкалоидов производных лизергиновой и изолизергиновой кислот: эргометрин, эрготамин, эргокрестин и др.:



лизергиновая кислота

Алкалоиды этой группы содержатся также в ряде растений сем. кутровых (раувольфия змеиная и другие виды; барвинок прямой, барвинок малый и другие виды), а также в чилибухе сем. логаниевых и других растениях.

VII. Алкалоиды — производные имидазола:

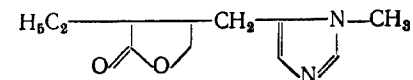


имидазол

Эта

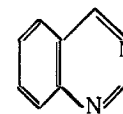
группа небольшая; основным представителем является пилокар-

пин, который найден в пилокарпусе хаборанди и других видах пилокарпуса сем. рутовых:



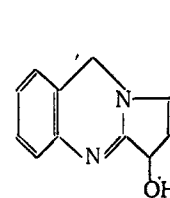
пилокарпин

VIII. Алкалоиды — производные хиназолина:

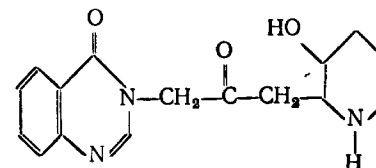


хиназолин

К этой группе относятся фебрифугин и изофебрифугин, содержащиеся в дихрое противохолерной сем. камнеломковых; пеганин — в гармале обыкновенной сем. парнолистниковых:

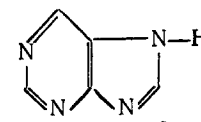


пеганин



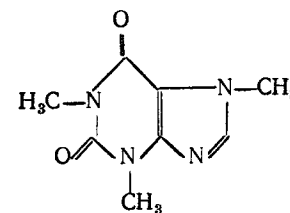
фебрифугин

IX. Алкалоиды — производные пурина:



пурин

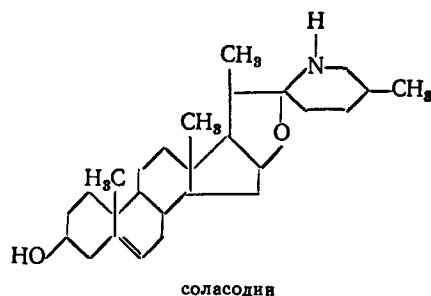
Производными пурина являются кофеин, теобромин, теофиллин; они найдены в чае китайском сем. чайных; в шоколадном дереве и в стеркулии платановидной сем. стеркулиевых:



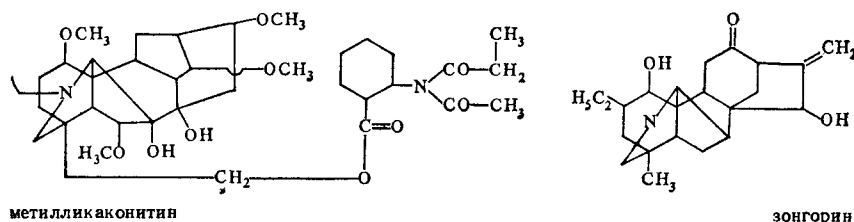
кофеин

X. Алкалоиды — производные цикlopentanпергидрофенантрена (стероидные алкалоиды). Алкалоиды этой группы обнаружены в ряде растений сем. пасленовых: паслен дольчатый (соласонин и

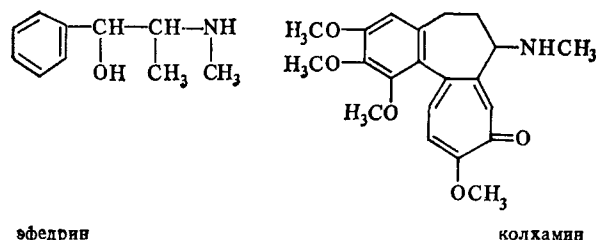
соламаргин — агликон соласодина), картофель (соланин и чаконин — агликон соланидина) и другие, а также в растениях сем. спаржевых (лилейных) — чемерица Лобеля и др.:



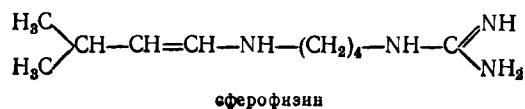
XI. Алкалоиды дитерпеновые. Дитерпеновые алкалоиды обнаружены в различных видах живокости (метилликаконитин, элатин, дельсемин и др.) и аконита (аконитин, зонгорин и др.):



XII. Алкалоиды с азотом в боковой цепи и ациклические алкалоиды. К алкалоидам с азотом в боковой цепи относятся, например, эфедрин, который содержится в эфедре хвощевой сем. эфедровых; колхицин и колхамин — в безвременнике великолепном сем. спаржевых (лилейных):



К ациклическим алкалоидам относится, например, сферофизин, выделенный из сферофизы соланцевой сем. бобовых:



§ 2. Физико-химические свойства

В состав большинства алкалоидов входят углерод, водород, азот и кислород. Кроме того, некоторые алкалоиды содержат в своем составе еще и серу (алкалоиды кубышки желтой). Алкалоиды, в состав которых входит кислород, обычно кристаллические вещества. Некоторые алкалоиды не содержат кислорода и представляют собой чаще всего летучие маслянистые жидкости. Большинство алкалоидов оптически активные вещества, без запаха, горького вкуса, с четкой температурой плавления или кипения.

Значительное большинство алкалоидов — бесцветные вещества, но известно небольшое число окрашенных алкалоидов, такие, как, например, берберин, серпентин, хелеритрин, имеющие желтую окраску; сангвинарин — оранжевую.

Ряд алкалоидов в УФ свете имеют характерное свечение. Основные (щелочные) свойства у различных алкалоидов выражены в разной степени. В природе чаще всего встречаются алкалоиды, которые по своему строению относятся к третичным аминам, реже — к вторичным, а также алкалоиды, которые являются четвертичными аммонийными основаниями.

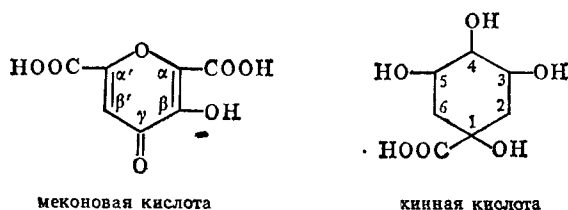
Константы диссоциации известных алкалоидов колеблются в очень больших пределах: от $1 \cdot 10^{-1}$ до $1 \cdot 10^{-12}$ и более. В соответствии с этим алкалоиды образуют соли различной прочности. Алкалоиды с очень малой величиной диссоциации, например кофеин, колхицин, прочных солей не образуют.

Соли алкалоидов, как правило, хорошо растворимы в воде и этиловом спирте (особенно в разбавленном при нагревании). Плохо или совсем нерастворимы в большинстве органических растворителей (хлороформ, этиловый эфир, дихлорэтан и др.). Но известны соли некоторых алкалоидов, плохо растворимые в воде (сульфат хинина, сульфат таспина), а также соли алкалоидов, которые растворяются в органических растворителях. Например, гидробромид скополамина растворяется в хлороформе.

Основания алкалоидов в большинстве своем хорошо растворимы в органических растворителях и нерастворимы или плохо растворимы в воде. Однако имеются алкалоиды, которые хорошо растворимы не только в органических растворителях, но и в воде. Например, цитизин, метилцитизин, кофеин и некоторые другие.

В растениях алкалоиды находятся чаще всего в виде солей и растворены в клеточном соке. Алкалоиды связаны с широко распространенными в растительном мире органическими кислотами: щавелевой (HOOC—COOH), яблочной [$\text{HOOC—CH}_2\text{—CH(OH)—COOH}$], лимонной [$\text{HOOC—CH}_2\text{—C(OH)(COOH)—CH}_2\text{—COOH}$], винной [$\text{HOOC—CH(OH)—CH(OH)—COOH}$] и др. В некоторых же растениях алкалоиды связаны еще со специфическими органическими кислотами, характерными для растений определенного семейства или даже отдельного растения. Так, например, меконовая (β -окси- γ -пирон- α , α' -дикарбоновая) кислота характерна для мака снотворного; хинная (циклогексан-1,3,4,5-тетраоксикарбоновая) — для

хинного дерева:



Иногда алкалоиды связаны с неорганическими кислотами: серной, фосфорной (мак снотворный).

§ 3. Методы выделения

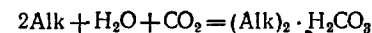
В большинстве случаев процесс выделения (получения) алкалоидов из растительного сырья подразделяют на 3 основные стадии: 1) извлечение алкалоидов из растительного сырья; 2) очистка полученных извлечений; 3) разделение суммы алкалоидов и очистка алкалоидов.

Извлечение алкалоидов из растительного сырья. Из растительного сырья алкалоиды могут быть извлечены в виде свободных оснований и в виде солей.

Извлечение алкалоидов в виде оснований. Алкалоиды в растительном сырье обычно содержатся в виде солей, поэтому до извлечения необходимо перевести соли алкалоидов в свободные основания, что достигается обработкой сырья различными щелочами (NH_4OH , NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и др.). При подборе щелочи учитывают свойства алкалоидов. Сильные щелочи, например NaOH , используют при выделении сильных оснований алкалоидов и алкалоидов, находящихся в растительном сырье в виде прочных соединений с дубильными веществами (кора хинного дерева, кора гранатового дерева), но не применяют при выделении алкалоидов, имеющих в молекуле фенольные гидроксилы. Такие алкалоиды, как, например, морфин, сальсолин, некоторые алкалоиды спорыньи, вследствие образования фенолятов органическим растворителем не извлекаются, так как феноляты, как правило, хорошо растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях. Для перевода их солей в основания используют обычно аммиак. При выделении алкалоидов, имеющих сложноэфирную группировку (атропин, гиосциамин, скополамин и др.) также используют аммиак и другие слабые щелочи, так как сильные щелочи могут вызывать разложение алкалоидов. Не следует применять NaOH и при выделении алкалоидов из семян, содержащих жирные масла, так как едкие щелочи вызывают омыление жиров. Мыла же способствуют образованию эмульсий.

При применении карбоната натрия следует полностью (путем встряхивания) удалять углекислоту, которая может, взаимодействуя с алкалоидами, давать соли, что создает опасность неполного

извлечения алкалоидов:



Извлечение свободных оснований алкалоидов из растительного сырья проводится различными органическими растворителями. Для более полного извлечения следует подобрать растворитель, обладающий хорошей растворяющей способностью по отношению к извлекаемым алкалоидам. Чаще всего применяются дихлорэтан, хлороформ, этиловый эфир, бензол и др. Вместе с алкалоидами в извлечение переходят сопутствующие вещества: смолы, жирные масла, хлорофилл и другие пигменты, от которых алкалоиды необходимо отделить.

Извлечение алкалоидов в виде солей. Соли алкалоидов в большинстве своем хорошо растворимы в воде и спиртах (этиловый, метиловый). Поэтому при извлечении алкалоидов из растительного сырья в виде солей применяют один из названных растворителей, содержащий 1—2 % какой-либо кислоты. Обычно для подкисления используют серную, соляную, винную, уксусную или другую кислоту, дающую с алкалоидами хорошо растворимые в воде или спирте соли.

Извлечение проходит быстро и достаточно полно, но вместе с алкалоидами извлекается большое количество сопутствующих веществ (дубильные вещества, слизи, сапонины, белки и др.).

Очистка извлечений. Очистка извлечений, основанная на различной растворимости свободных оснований алкалоидов и их солей.

1. Извлечение алкалоидов из растительного сырья, полученное щелочной (после подщелачивания) экстракцией органическим растворителем (несмешивающимся с водой), обрабатывают 1—5%-ной кислотой. Основания алкалоидов с кислотой образуют соответствующие соли, которые, растворяясь в воде, переходят в водный слой, а основная масса сопутствующих веществ остается в органическом растворителе. К водному раствору солей алкалоидов добавляют щелочь для перевода солей алкалоидов в основания. Если содержание алкалоидов высокое, основания алкалоидов выпадают в осадок, который можно собрать на фильтре. Но чаще водные извлечения после подщелачивания обрабатывают несмешивающимся с водой органическим растворителем. Алкалоиды в виде оснований переходят в органический растворитель. Если требуется, эти операции повторяют два раза или более, с тем чтобы как можно полнее отделить алкалоиды от сопутствующих веществ.

Органический растворитель отгоняют. Остаток, полученный после отгонки растворителя, представляет смесь (сумму) алкалоидов.

2. Извлечение алкалоидов из растительного сырья, полученное экстракцией 1—2%-ным раствором кислоты, подщелачивают и после этого основания алкалоидов извлекают органическим растворителем. Если алкалоиды извлекали спиртом (этиловый, метиловый), то спирт отгоняют, а полученный остаток растворяют в воде. При этом соли алкалоидов растворяются в воде, а та часть сопутствующих

веществ, которая в воде не растворилась, отделяется фильтрованием. Водный раствор солей алкалоидов подвергают дальнейшей очистке, как было уже указано.

Очистка извлечений хроматографическим методом (на колонке). Адсорбционная хроматография основана на избирательной адсорбции одного или нескольких веществ из растворов или из парогазообразной смеси твердыми веществами — сорбентами (адсорбентами). Хроматографический метод очистки и разделения алкалоидов применим как к водным растворам солей алкалоидов, так и к растворам оснований алкалоидов в органических растворителях. Адсорбционные процессы, применяемые в химико-фармацевтической промышленности, делят на две группы: 1) процессы очистки, при которых поглощаются примеси (сопутствующие вещества), а алкалоиды остаются в растворе; 2) процессы очистки, при которых поглощаются алкалоиды, а сопутствующие вещества остаются в растворе.

Различают два вида адсорбции: молекулярную и ионообменную. В первом случае происходит переход молекулы растворенного вещества из подвижной фазы в неподвижную — твердую. Адсорбция осуществляется на поверхности твердого сорбента без химической реакции.

Во втором случае происходит обмен ионов растворенного вещества с ионами сорбента.

Таким образом, ионообменная хроматография является методом, при котором для очистки (разделения) используется процесс обмена ионов между растворенным веществом и ионообменными сорбентами. По природе ионообменные сорбенты делятся на минеральные и органические, а по характеру обмениваемых ионов — на аниониты и катиониты.

В качестве ионитов обычно используют ионообменные высокомолекулярные соединения — ионообменные смолы кислого или основного характера, нерастворимые в воде и органических растворителях. Полученные извлечения пропускают через колонку, заполненную сорбентом. Сорбент и условия адсорбции должны быть выбраны такие, чтобы адсорбция извлекаемого вещества (или веществ) была избирательной и максимальной. Десорбция (элюирование) алкалоидов проводится подходящим растворителем, обеспечивающим максимальное элюирование.

Разделение суммы алкалоидов. В растительном сырье обычно содержится не один, а несколько алкалоидов, и в большинстве случаев при обработке растительного сырья в извлечение переходят все или большинство алкалоидов (сумма). Отделить один «нужный» алкалоид от остальных, а тем более разделить сумму алкалоидов на индивидуальные соединения очень сложно. Так как большинство алкалоидов обладает различными физическими и химическими свойствами, предложить единую схему разделения трудно. Описано большое число методов и их различных модификаций, позволяющих разделить сумму алкалоидов на отдельные алкалоиды. Отметим только основные принципы разделения суммы алкалоидов.

Разделение суммы алкалоидов на основании их различной растворимости в органических растворителях.

1. В некоторых случаях частичное разделение происходит уже при обработке органическим растворителем первоначального воднокислотного извлечения после подщелачивания. При его обработке, например, этиловым эфиром в органический растворитель могут перейти не все, а только часть алкалоидов. Оставшиеся в первоначальном растворе алкалоиды можно извлечь, используя для этого другие органические растворители (хлороформ, дихлорэтан и др.). Иногда таким способом можно достигнуть хороших результатов. Но чаще у алкалоидов одного растения различие в растворимости бывает выражено не очень резко и поэтому достигается только частичное разделение. В таких случаях требуется или повторное проведение этой операции, или применение другого способа разделения.

2. При последовательной обработке остатка (суммы алкалоидов), полученного после отгонки растворителя, различными органическими растворителями (петролейный эфир, бензол, хлороформ и др.) в некоторых случаях можно достигнуть частичного разделения суммы алкалоидов.

Разделение суммы алкалоидов по различной силе основности.

1. Если к водному раствору суммы солей алкалоидов с различными выраженными основными свойствами прибавить щелочь в недостаточном количестве для перевода всех солей алкалоидов в основания, то в первую очередь в реакцию вступят соли алкалоидов со слабо выраженными основными свойствами, а более сильные основания останутся в виде солей. При обработке такого раствора органическим растворителем образовавшиеся свободные основания алкалоидов перейдут в органический растворитель, а соли более сильных оснований алкалоидов останутся в водном слое. После этого к водному раствору вторично добавляют определенное (недостаточное) количество щелочи и затем этот раствор вновь обрабатывают органическим растворителем. Вытесненные из солей более сильные основания алкалоидов перейдут в новую порцию органического растворителя. К оставшемуся водному слою еще добавляют щелочь и т. д. до полного перевода солей алкалоидов в свободные основания.

Таким образом, более слабые основания алкалоидов будут в первых фракциях органического растворителя, а более сильные — в последних.

2. Если к раствору суммы свободных оснований алкалоидов в органическом растворителе прибавить недостаточное количество кислоты, то в первую очередь в реакцию с кислотой вступят алкалоиды с сильно выраженными основными свойствами, тогда как более слабые основания останутся в свободном состоянии. Таким образом, при дробном извлечении алкалоидов из раствора их в органическом растворителе небольшими порциями кислоты, так же как и при дробном подщелачивании, можно получить ряд фракций, в которых алкалоиды распределяются по «силе основности» — в пер-

вых фракциях будут находиться сильные основания алкалоидов, в последующих — более слабые.

Разделение по этому принципу не бывает полным и требует повторной обработки обогащенных фракций.

Разделение суммы алкалоидов путем получения солей или других производных. Этот метод основан на том, что в некоторых случаях при обработке суммы алкалоидов каким-либо реактивом в реакцию вступают не все алкалоиды смеси, а часть или один из алкалоидов. Например, так можно разделить фенольные и нефенольные алкалоиды (эметин и цефаэлин). Можно разделить довольно сложную смесь алкалоидов путем получения различных солей алкалоидов (гидрохлориды, гидробромиды, оксалаты, иодиды, пикраты и др.) и дальнейшей перекристаллизацией их.

Разделение суммы алкалоидов хроматографическим методом. Этот метод используется как для очистки, так и разделения алкалоидов. Разделение алкалоидов основано на том, что они обычно имеют различную адсорбционную способность. Например, хроматографическим методом из сложной смеси алкалоидов мака можно выделить морфин, из суммы алкалоидов эфедры — эфедрин.

Через колонку, заполненную соответствующим сорбентом, пропускают раствор или извлечение, содержащее несколько алкалоидов. Десорбцию (элюирование) проводят подходящим растворителем или смесью растворителей. При этом получают несколько фракций, содержащих индивидуальные алкалоиды или менее сложную смесь алкалоидов. Если необходимо, отдельные фракции подвергают повторному хроматографированию (см. с. 134).

Разделение суммы алкалоидов по различной температуре кипения. В случае присутствия в смеси летучих алкалоидов разделить их можно путем фракционной перегонки. Так, например, конииин и конгидрин (алкалоиды болиголова пятнистого) сильно отличаются по температуре кипения. Перегонку обычно проводят при пониженном давлении.

§ 4. Качественное определение и идентификация

Для обнаружения алкалоидов в растительном сырье чаще всего используют общие (осадочные) реакции и хроматографию. Кроме того, учитывают еще некоторые свойства алкалоидов: их растворимость в кислотах и выпадение в осадок после подщелачивания, щелочную реакцию спиртовых растворов оснований алкалоидов и др. С целью идентификации алкалоидов проводят специфические (цветные) реакции, микрокристаллоскопические реакции и хроматографический, спектроскопический, люминесцентный анализы и т. д.

Общие реакции на алкалоиды (реакции осаждения). Реакции осаждения позволяют установить наличие алкалоидов даже при незначительном их содержании. Основаны они на том, что алкалоиды при взаимодействии с некоторыми веществами образуют нерастворимые в воде соединения. Это главным образом соли тяжелых металлов, комплексные иодиды, комплексные кислоты и некоторые

органические соединения кислотного характера. Для проведения качественных реакций из растительного сырья обычно готовят кислотное извлечение. При добавлении соответствующих реактивов в присутствии алкалоидов тотчас или через некоторое время образуется осадок. Обилие осадка зависит как от количественного содержания алкалоидов, так и от чувствительности их к реактиву. Однако следует учитывать, что с общими реактивами образуют осадки еще и некоторые другие органические соединения, которые могут содержаться в неочищенных извлечениях (холин, бетаин, белки, продукты их разложения и др.). Поэтому, чтобы получить более достоверные результаты, общие реакции проводят еще и с очищенными извлечениями.

Ввиду того, что чувствительность различных алкалоидов к «осадочным реактивам» неодинакова, реакции обычно проводят не с одним каким-либо реактивом, а с несколькими (5—7) различными реактивами. Наиболее часто используются следующие реактивы: Майера (раствор дихлорида ртути и иодида калия), Вагнера и Бушарда (растворы иода в растворе иодида калия), Драгендорфа (раствор нитрата висмута основного и иодида калия с добавлением уксусной кислоты), Марме (раствор иодида кадмия в растворе иодида калия); раствор танина, растворы кремневольфрамовой, фосфорномолибденовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой кислот и др.

Специфические реакции на алкалоиды. Если необходимо установить присутствие определенного алкалоида или определенной группы алкалоидов в растительном сырье, проводят специфические реакции (цветные) и микрокристаллоскопические реакции.

Специфические реакции проводят с индивидуальными алкалоидами или с очищенной суммой алкалоидов.

Алкалоиды из растительного сырья извлекают 1—5%-ным раствором какой-либо кислоты (соляная, серная или другая). Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака или другой щелочи и затем алкалоиды извлекают органическими растворителями (хлороформом, дихлорэтаном, этиловым эфиром и т. д.). Органический растворитель отгоняют или выпаривают в фарфоровой чашке и с остатком проводят соответствующие реакции. В качестве специфических реактивов на алкалоиды при проведении реакций окрашивания довольно часто используют концентрированную H_2SO_4 и HNO_3 , а также концентрированную H_2SO_4 , содержащую формалин (реактив Марки), концентрированную H_2SO_4 с молибдатом аммония (реактив Фреде) и др. При проведении микрокристаллоскопических реакций — пикриновую, пикролоновую и стифниновую кислоты, роданидные и иодидные комплексы металлов и др.

Специфические реакции на индивидуальные алкалоиды подробно описаны в руководствах по фармацевтической и токсикологической химии.

Хроматографический анализ. Хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента является ведущим аналитическим методом в фитохимическом анализе.

При проведении фитохимического анализа вообще и, в частности, анализа растительного сырья, содержащего алкалоиды, эти методы могут быть использованы как для обнаружения и идентификации алкалоидов, так и для контроля степени очистки и разделения суммы алкалоидов.

Хроматография на бумаге. Существует большое число различных методов «бумажной хроматографии» (БХ). Наиболее простыми и часто применяемыми являются методы восходящей, нисходящей и радиальной хроматографии. При восходящей и нисходящей хроматографии на стартовую линию полосы хроматографической бумаги наносят капилляром или специальной пипеткой исследуемое извлечение и раствор «свидетеля». Объемы испытуемого извлечения и раствора «свидетеля», наносимые на хроматограмму, зависят от концентрации извлечения и раствора, а также чувствительности алкалоидов к реактиву.

Способ закрепления подготовленной хроматограммы в хроматографической камере зависит от метода хроматографирования. Система растворителей должна обеспечивать максимальное разделение алкалоидов, содержащихся в извлечении. При соприкосновении хроматограммы с жидкостью растворитель начинает медленно распространяться вдоль бумаги. Когда растворитель проходит через участок, где нанесена сумма алкалоидов, происходит растворение веществ, и они перемещаются вместе с жидкостью. На каждом участке хроматограммы происходит многократное перераспределение вещества между подвижной и неподвижной фазой, и поэтому скорость перемещения веществ по бумаге различна и зависит от его коэффициента распределения. Расстояние между стартовой линией и фронтом растворителя может быть различным (20—40 см) и зависит от разницы между R_f веществ, содержащихся в извлечении. Чем меньше разница между R_f , тем больше должно быть расстояние от стартовой линии до фронта растворителя. Экспозиция обычно от 3 до 20 ч, что определяется маркой хроматографической бумаги, системой растворителей и др. Чаще всего используют следующие системы растворителей: 1) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : 4); 2) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 2 : 5); 3) *n*-бутанол — соляная кислота — вода (100 : 4 : вода до насыщения); 4) этилацетат — уксусная кислота — вода (11 : 21 : 85); 5) *n*-бутанол — пиридин — вода (10 : 2 : 5) и др.

Для обнаружения алкалоидов высушенную хроматограмму обрабатывают каким-либо реактивом, дающим с алкалоидами окрашенные соединения. Чаще всего для этого используют реактив Драгендорфа. При обработке хроматограммы этим реактивом появляются оранжевые или оранжево-красные пятна (алкалоиды) на желтом фоне. Можно для обнаружения алкалоидов использовать пары иода (образуются бурные пятна). Для обнаружения стероидных алкалоидов можно использовать насыщенный хлороформный раствор треххлористой сурьмы с последующим нагреванием при 105 °С. Появляется кирпично-красное окрашивание.

Хроматография в тонком слое сорбента. Тонкослойная хроматография (ТСХ) может быть использована для идентификации и при количественном определении алкалоидов в растительном сырье. Хроматографирование проводят на пластинках с закрепленным и незакрепленным слоем сорбента. В качестве сорбента используют «оксид алюминия для тонкослойной хроматографии», силикагель марки КСК и др.

Для приготовления пластинок с закрепленным слоем сорбента в качестве фиксатора применяют $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$; основой служат стеклянные пластинки размером 12—20 × 8—15 см.

Извлечение и раствор «свидетеля» наносят капилляром или специальной пипеткой на стартовую линию, которая отстоит от нижнего края пластинки на 1,5—2 см. Для разделения обычно применяют способ восходящей хроматографии. Край пластинки погружают в жидкость, которую наливают в хроматографическую камеру. Слой жидкости должен быть около 5 мм. Пластинку с закрепленным слоем помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя, вертикально, с незакрепленным слоем — под углом 15—20°. Экспозиция от 30 мин до 1,5 ч.

Чаще всего используют следующие системы растворителей: 1) хлороформ — ацетон — диэтиламин (5 : 4 : 1); 2) хлороформ — диэтиламин (9 : 1); 3) *n*-бутанол — метиловый спирт — диэтиламин (17 : 1 : 2); 4) хлороформ — метиловый спирт — уксусная кислота (18 : 1 : 1); 5) бензол — метиловый спирт (19 : 1); 6) хлороформ — этиловый спирт (9 : 1); 7) ацетон — раствор аммиака (95 : 5); 8) хлороформ — этиловый спирт (8 : 2).

После высушивания ТС хроматограммы обрабатывают теми же реактивами, что и хроматограммы на бумаге.

Спектральный анализ. С целью идентификации алкалоидов кроме качественных реакций и хроматографического анализа определяют температуру плавления, удельное вращение, брутто формулу, молекулярную массу, получают ряд производных, определяют их константы. Кроме того, для идентификации алкалоидов широко используют УФ, ИК, ПМР, масс-спектры. При этом нет необходимости снимать одновременно спектры исследуемого вещества и известного образца, поскольку последний можно взять из литературы.

УФ, ИК, ПМР, масс-спектры особенно широко используются при установлении структуры алкалоидов, так как интерпретация спектров позволяет установить наличие или отсутствие сопряженных двойных связей и различных функциональных групп (карбонильной, N-метильной, гидроксильной и др.), ароматического цикла и др. Так, например, в ИК спектре атропина (рис. 25) полосы поглощения при 1740 см^{-1} указывают на наличие карбонила сложноэфирной связи; 2940 см^{-1} — спиртового гидроксильного. В УФ спектре атропина (рис. 26) отмечаются $\lambda_{\text{max}} = 252, 258, 262 \text{ нм}$, характерные для сопряженных двойных связей в ароматическом цикле.

Полосы поглощения при 3220—3480 см^{-1} в ИК спектре морфина (рис. 27) типичны для фенольного и спиртового гидроксильных. В УФ

спектре морфина (рис. 28) $\lambda_{\text{max}} = 284$ нм указывает на присутствие ароматического цикла.

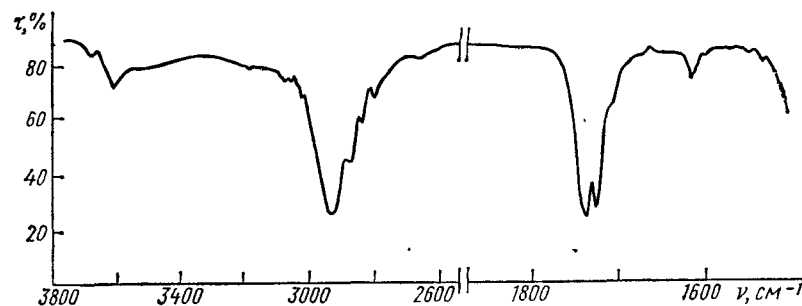


Рис. 25. ИК спектр атропина

Методики качественного анализа. Приготовление извлечения из растительного сырья. а) 1 г измельченного растительного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 25 мл 1%-ной HCl и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (извлечение А).

б) 2 г измельченного растительного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, добавляют 1 мл 10%-ного раствора аммиака и 20 мл хлороформа и оставляют на 1 ч при периодическом перемешивании. Хлороформное извлечение отфильтровывают через вату в делительную воронку вместимостью 100 мл и алкалоиды извлекают 15 мл 1%-ной HCl (извлечение Б).

Качественные реакции (общие реакции, реакции осаждения). Извлечение А или Б разливают в пробирки по 1 мл и в каждую пробирку осторожно, по каплям, добавляют соответствующий реактив на алкалоиды. При наличии алкалоидов тотчас или через некоторое время должен образоваться осадок.

Интенсивность осадка зависит как от количественного содержания алкалоидов, так и от чувствительности алкалоида к реактиву.

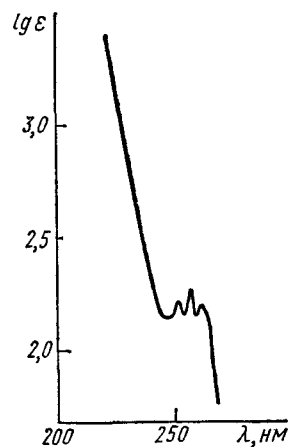


Рис. 26. УФ спектр атропина

1. Реактив Майера. С большинством алкалоидов в слабнокислых и нейтральных растворах этот реактив образует белый или желтоватый осадок. Чувствительность алкалоидов к этому реактиву весьма различна: стрихнин и бруцин осаждаются в разведении 1 : 150 000, морфин — 1 : 25 000, а кофеин, колхицин реактив Майера не осаждают.

2. Реактивы Вагнера и Бушарда. С большинством алкалоидов в слабнокислых растворах эти реактивы образуют бурые осадки.

3. Реактив Драгендорфа. Многие алкалоиды в кислых растворах дают оранжево-красные или кирпично-красные осадки.

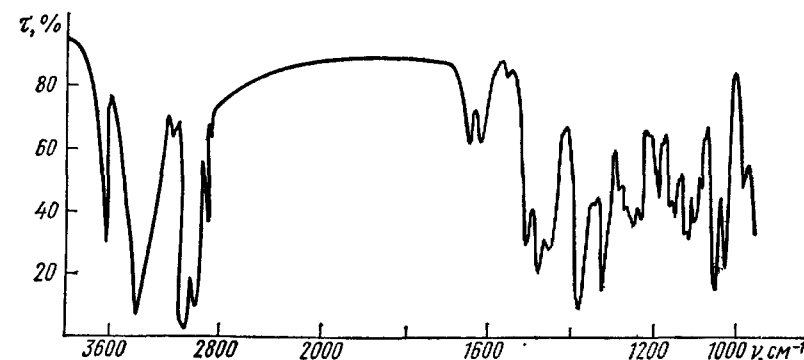


Рис. 27. ИК спектр морфина

4. Реактив Марме. С алкалоидами реактив Марме дает белые или желтоватые осадки, часто растворимые в избытке реактива. Чувствительность некоторых алкалоидов к этому реактиву невелика. Атропин, колхицин, вератрин и некоторые другие алкалоиды осаждаются из сравнительно концентрированных растворов, а кофеин этим реактивом совсем не осаждается.

5. Раствор танина. В подкисленных растворах алкалоиды дают с танином беловатые или желтоватые аморфные осадки.

6. Раствор кремневольфрамовой кислоты. Большинство алкалоидов весьма чувствительны к этому реактиву и в слабнокислых растворах образуют беловатые осадки.

7. Раствор фосформолибденовой кислоты. Это один из наиболее чувствительных реактивов. С алкалоидами он образует желтоватые осадки, которые приобретают через некоторое время синее или зеленое окрашивание вследствие восстановления молибденовой кислоты.

8. Раствор фосфоровольфрамовой кислоты. Фосфоровольфрамовая кислота со многими алкалоидами дает беловатые осадки.

9. Раствор пикриновой кислоты. Пикриновая кислота образует с рядом алкалоидов осадки (пикраты) желтого цвета. Некоторые алкалоиды пикриновой кислотой не осаждаются (кофеин, морфин,

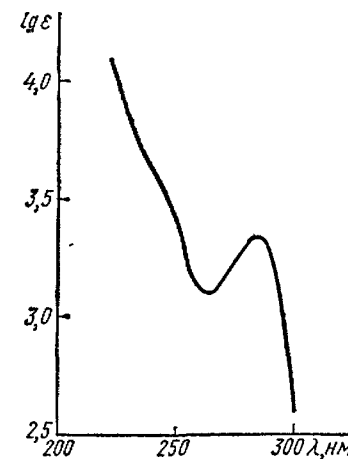


Рис. 28. УФ спектр морфина

аконитин, теобромин), другие же осаждаются только из концентрированных растворов (например, атропин).

10. Раствор пикролоновой кислоты. Со многими алкалоидами пикролоновая кислота дает желтые осадки (пикрлонаты).

Приготовление реактивов. 1. Реактив Майера: 1,358 г дихлорида ртути растворяют в 60 мл воды, приливают раствор 5 г иодида калия в 10 мл воды и общий объем доводят водой до 100 мл.

2. Реактив Вагнера: 1,27 г иода растворяют в 100 мл раствора 2 г иодида калия в воде.

3. Реактив Бушарда: 1 г иода растворяют в 50 мл раствора 2 г иодида калия в воде.

4. Реактив Драгендорфа: раствор 1 — 0,85 г нитрата висмута основного растворяют в 40 мл воды и добавляют 10 мл уксусной кислоты; раствор 2 — 20 г иодида калия растворяют в 50 мл воды. Смешивают равные объемы растворов 1 и 2. К 10 мл полученной смеси добавляют 100 мл воды и 20 мл уксусной кислоты.

5. Реактив Марме: 10 г CdI_2 растворяют в 100 мл 20%-ного горячего водного раствора KI .

6. Раствор танина: 10 г танина растворяют в 90 мл воды и добавляют 10 мл этилового спирта.

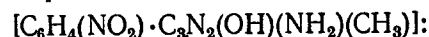
7. Раствор кремневольфрамовой кислоты ($\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$): 1 г кремневольфрамовой кислоты растворяют в воде и объем доводят водой до 100 мл.

8. Раствор фосфорномолибденовой кислоты [$\text{H}_7\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$]: 1 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в воде и объем доводят водой до 100 мл.

10. Раствор фосфорновольфрамовой кислоты ($\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 12\text{WO}_3 \times 42\text{H}_2\text{O}$): 1 г фосфорновольфрамовой кислоты растворяют в воде и объем доводят водой до 100 мл.

10. Раствор пикриновой кислоты [$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})(\text{NO}_2)_3$]: 1,23 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл воды.

11. Раствор пикролоновой кислоты



1 г пикролоновой кислоты растворяют в воде и объем доводят водой до 100 мл.

Хроматографический анализ. Приготовление извлечения из растительного сырья. 1 г измельченного растительного сырья (трава термопсиса ланцетовидного, семена термопсиса ланцетовидного, листья красавки, листья дурмана обыкновенного, семена дурмана индийского и др.) помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 25 мл 1%-ной HCl и оставляют на 1 ч при периодическом перемешивании или нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 100 мл. Фильтрат подщелачивают концентрированным раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину, и алкалоиды извлекают 5 мл хлороформа (извлечение В).

1. Хроматография на бумаге (трава термопсиса ланцетовидного, семена термопсиса ланцетовидного). На полоску хроматографической бумаги (длина 30—40 см, ширина 12 см) на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 2—3 см от нижнего края, капилляром или специальной пипеткой наносят около 0,1 мл извлечения В из травы термопсиса и из семян термопсиса, растворы цитизина, метилцитизина и пахикарпина. Расстояние от бокового края полоски хроматографической бумаги и между пятнами — 2 см. Диаметр пятен не должен превышать 5 мм.

Полоску хроматографической бумаги с нанесенными на нее растворами (после высушивания) помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно (за сутки) налита разделительная система: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : 4).

Нижний край хроматограммы погружают в жидкость примерно на 3—5 мм (экспозиция — 14—15 ч).

После высушивания хроматограмму обрабатывают (опрыскивают из пульверизатора) реактивом Драгендорфа. На желтом фоне проявляются оранжевые или оранжево-красные пятна (алкалоиды) (рис. 29).

2. Хроматография в тонком слое сорбента (трава термопсиса ланцетовидного, семена термопсиса ланцетовидного). На стеклянную пластинку (размер 12 × 9 см) с закрепленным слоем силикагеля марки КСК на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 1,5 см от нижнего края, наносят капилляром или специальной пипеткой около 0,1 мл извлечения В из травы термопсиса, семян термопсиса, растворы цитизина, метилцитизина, пахикарпина. Расстояние от бокового края и между пятнами около 1,5 см. Диаметр пятен не должен превышать 5 мм. После высушивания пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно налита разделительная система: хлороформ — ацетон — диэтиламин (5 : 4 : 1). Экспозиция 30—40 мин. После тщательного высушивания хроматограмму обрабатывают (опрыскивают из пульверизатора) реактивом Драгендорфа. На желтом фоне появляются оранжевые пятна (алкалоиды) (рис. 30).

3. Хроматография в тонком слое сорбента (листья красавки, семена дурмана индийского). На стеклянную пластинку (размер 12 × 9 см) с закрепленным слоем силикагеля марки КСК на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 1,5 см от нижнего края, наносят капилляром или специальной пипеткой около 0,1 мл извле-

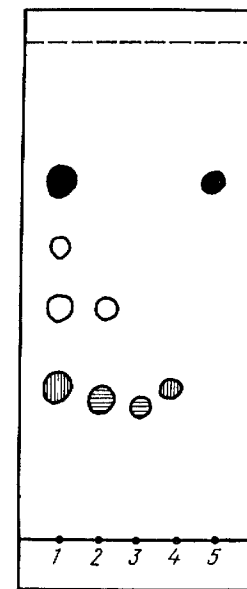


Рис. 29. Схема хроматограммы (БХ) алкалоидов травы и семян термопсиса ланцетовидного.

1 — извлечение В из травы термопсиса; 2 — извлечение В из семян термопсиса; 3 — цитизин; 4 — метилцитизин; 5 — пахикарпин

чения В из листьев красавки, семян дурмана индийского, растворы гиосциамин, скополамина и атропина. Расстояние от бокового края и между пятнами около 1,5 см. Диаметр пятен не должен превышать 5 мм. После высушивания пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно налита разделительная система: хлороформ — ацетон — диэтиламин (5 : 4 : 1) — система I или ацетон — раствор аммиака (95 : 5) — система II.

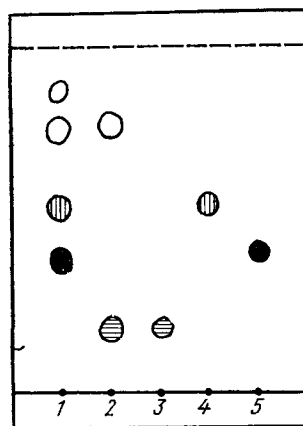


Рис. 30. Схема хроматограммы (ТСХ) алкалоидов травы термопсиса и семян ланцетовидного:

1 — извлечение В из травы термопсиса; 2 — извлечение В из семян термопсиса; 3 — цитизин; 4 — метилцитизин; 5 — пахикарпин

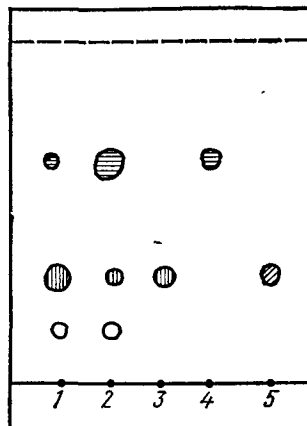


Рис. 31. Схема хроматограммы (ТСХ) листьев красавки и семян дурмана индийского (система I):

1 — извлечение В из листьев красавки; 2 — извлечение В из семян дурмана индийского; 3 — гиосциамин; 4 — скополамин; 5 — атропин

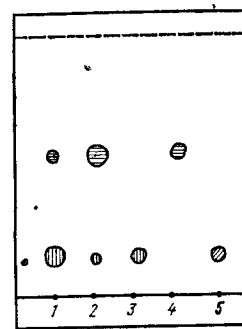


Рис. 32. Схема хроматограммы (ТСХ) листьев красавки и семян дурмана индийского (система II):

1 — извлечение В из листьев красавки; 2 — извлечение В из семян дурмана индийского; 3 — гиосциамин; 4 — скополамин; 5 — атропин

Толщина слоя жидкости около 5 мм. Экспозиция 30—40 мин. После тщательного высушивания хроматограмму обрабатывают (опрыскивают из пульверизатора) реактивом Драгендорфа. На желтом фоне появляются оранжевые пятна (алкалоиды), рис. 31 и 32.

Реактивы и оборудование: HCl 1%-ная; аммиак, конц. р-р; CH_3COOH ; *n*-бутанол; хлороформ; ацетон; диэтиламин; кремневольфрамовая кислота; фосфорновольфрамовая кислота; фосфомолибденовая кислота; пикриновая кислота; пикролоновая кислота; танин; реактивы Майера, Бушарда, Вагнера, Марме, Драгендорфа; силикагель марки КСК; CaSO_4 ; цитизин; метилцитизин; пахикарпин; гиосциамин; скополамин; атропин.

Фенолфталеиновая бумага; бумага хроматографическая марки «С»; бумага фильтровальная; воронки делительные вместимостью 100 мл; колбы плоскодонные вместимостью 100 мл; цилиндры мерные на 10, 50 и 100 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; пробирки стеклянные; камеры хроматографические для ТСХ и БХ; пластинки стеклянные для ТСХ размером 12 × 9 см; капилляры стеклянные; весы ручные; штативы для делительных воронок; штативы для пробирок; бани водяные лабораторные; пульверизатор.

§ 5. Количественное определение

Весь процесс количественного определения алкалоидов в растительном сырье можно разделить на три основных этапа (стадии): 1) извлечение алкалоидов из растительного сырья; 2) очистка полученных извлечений и, если требуется по методике, разделение смеси алкалоидов на индивидуальные соединения; 3) определение содержания алкалоидов.

Извлечение алкалоидов. При количественном определении алкалоиды из растительного сырья, так же как и при их выделении (получении), извлекают или в виде оснований, или солей.

1. Извлечение алкалоидов в виде оснований. При извлечении алкалоидов в виде оснований соли алкалоидов, в виде которых они содержатся в растениях, переводят в основания. Это достигается обработкой сырья различными щелочами. При количественном определении алкалоидов в растительном сырье чаще всего используют растворы аммиака и едкого натра, а также карбонат натрия и гидроксид кальция. Выбор щелочи зависит от свойств и строения алкалоидов. Извлечение свободных оснований алкалоидов проводится органическими растворителями, не смешивающимися с водой, обычно хлороформом, этиловым эфиром или дихлорэтаном.

2. Извлечение алкалоидов в виде солей. Соли алкалоидов в большинстве своем хорошо растворяются в воде и спиртах (этиловый, метиловый). Обычно алкалоиды экстрагируют 1—2%-ной серной, соляной, винной, уксусной кислотой или подкисленным спиртом.

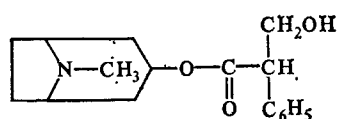
Очистка извлечения. Для очистки извлечений чаще всего проводится повторное переводение солей алкалоидов в водный раствор и свободных оснований в органический растворитель (см. с. 133). Кроме того, для очистки извлечений, а также для разделения алкалоидов широко используется хроматографический метод (колоночная хроматография, хроматография в тонком слое сорбента и на бумаге).

Определение содержания алкалоидов. Количественное содержание алкалоидов можно определить: гравиметрическим, титриметрическим, колориметрическим, полярометрическим, полярографическим, спектрофотометрическим, денситометрическим или другими методами.

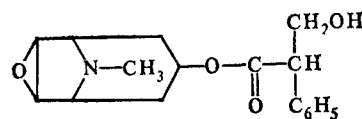
Методика количественного определения алкалоидов в листьях красавки (*Folium Belladonnae*), траве красавки (*Herba Belladonnae*), корнях красавки (*Radix Belladonnae*), листьях белены (*Folium Hyoscyami*) и листьях дурмана (*Folium Stramonii*).

В листьях, траве и корнях красавки (*Atropa belladonna* L.), листьях белены (*Hyoscyamus niger* L.) и дурмана обыкновенного (*Datura stramonium* L.) сем. пасленовых (*Solanaceae*) содержатся алкалоиды производные тропана. В этих видах растительного сырья преобладает гиосциамин, переходящий под влиянием щелочей в оптически неактивный атропин. Кроме того, в значительно меньшем количестве содержится скополамин и другие близкие по

строению алкалоиды:



гиосциамин



скополамин

По данной методике определяется содержание суммы алкалоидов. Определение проводится титрометрическим методом (обратное титрование).

10 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 7 мл концентрированного раствора аммиака, 150 мл этилового эфира * и в течение 1 ч смесь часто и энергично взбалтывают, эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до просветления эфирного слоя, после чего отмеривают с помощью мерного цилиндра 90 мл эфирного извлечения в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают этиловым эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к отмеренному эфирному извлечению.

Из эфирного извлечения алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл 1%-ной HCl до полного их извлечения (проба с реактивом Майера или раствором кремневольфрамовой кислоты), каждый раз фильтруя через смоченный водой фильтр (диаметром 5 см) во вторую делительную воронку такой же вместимости. Фильтр дважды промывают 1%-ной HCl по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают 10%-ным раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин.

Каждую порцию хлороформного извлечения фильтруют через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4—5 г свежепрокаленного безводного сульфата натрия, смоченного хлороформом. Фильтрование проводят в колбу для отгонки вместимостью 100 мл. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл. Хлороформ отгоняют на водяной бане до 1—2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя.

Сухой остаток растворяют в 15 мл 0,02 н. HCl при подогревании на водяной бане и оттитровывают избыток последней 0,02 н. NaOH до появления желтой окраски (индикатор — метиловый красный).

* На лабораторных занятиях в целях безопасности работы этиловый эфир заменяется хлороформом.

1 мл 0,02 н. HCl соответствует 0,005780 г алкалоидов (считая на гиосциамин). Процентное содержание в пересчете на абсолютно сухое сырье x вычисляют по формуле

$$x = \frac{(15 - V) 0,005780 \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - w)},$$

где V — объем 0,02 н. NaOH, пошедшего на титрование, мл; m — масса навески сырья, соответствующая объему эфирного извлечения, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Реактивы и оборудование: аммиак (конц., 10%-ный р-р); HCl (1%-ная, 0,02 н.); NaOH (0,02 н.); хлороформ; эфир этиловый; Na_2SO_4 (безводн.); реактив Майера; кремневольфрамовая кислота; фенолфталеин; метиловый красный;

Бумага лакмусовая синяя; бумага фильтровальная; вата гигроскопическая; колбы с притертой пробкой вместимостью 150 мл; колбы конические с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; колбы конические вместимостью 100 мл; воронки делительные вместимостью 200 мл; цилиндры мерные на 10, 20 и 100 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; стекла часовые; палочки стеклянные; бюксы с притертой крышкой; бюретки вместимостью 25 мл; капельницы стеклянные лабораторные; установка для отгонки хлороформа; шкаф сушильный лабораторный; весы ручные; весы лабораторные аналитические; эксикатор; штативы для делительных воронок; штативы лабораторные; бани водяные лабораторные; сито с диаметром отверстий 1 мм.

Методика количественного определения скополамина в семенах дурмана индийского (*Semen Daturae innoxiae*) (ФС 42-1005-75). Плоды и семена дурмана индийского (*Datura innoxia* Mill.) сем. пасленовых (*Solanaceae*) содержат тропановые алкалоиды (скополамин, гиосциамин, норгиосциамин и др.). Больше количество приходится на долю скополамина.

Определение содержания скополамина в растительном сырье проводится гравиметрическим методом.

100 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, взвешенного с погрешностью не более 0,01 г, помещают в колбу вместимостью 1 л, заливают 800 мл дихлорэтана и 50 мл раствора аммиака, встряхивают в течение 20 мин и оставляют до следующего дня. Затем содержимое колбы вновь взбалтывают в течение 20 мин и после отстаивания дихлорэтановое извлечение фильтруют, точно измеряют его объем, переносят в делительную воронку вместимостью 1 л, алкалоиды извлекают 10%-ной уксусной кислотой 6 раз по 20 мл до полного извлечения (проба с кремневольфрамовой кислотой).

Полученное уксуснокислое извлечение промывают 2—3 раза хлороформом порциями по 20 мл, затем уксуснокислое извлечение подщелачивают карбонатом калия по фенолфталеиновой бумаге и алкалоиды извлекают этиловым эфиром 5—6 раз порциями по 30 мл (проба с кремневольфрамовой кислотой). Эфирные извлечения фильтруют через бумажный фильтр с 3—4 г безводного Na_2SO_4 в предварительно взвешенную (с погрешностью не более 0,0001 г) круглодонную колбу вместимостью 200 мл, фильтр с Na_2SO_4 промывают 30 мл сухого этилового эфира, который присоединяют к основному эфирному извлечению, эфир отгоняют досуха на водя-

ной бане. Остаток растворяют в 15—20 мл хлороформа, приливают 20—25 мл 1%-ной пикриновой кислоты в хлороформе, 2—3 мл воды и 20 мл бензола. Содержимое колбы перемешивают стеклянной палочкой в течение 45 мин и оставляют на 24 ч.

Выпавший осадок пикрата скополамина отфильтровывают на предварительно взвешенном стеклянном фильтре № 3. Фильтр с осадком и колбу с пикратом скополамина, оставшимся на стенках, сушат в сушильном шкафу при 100—105 °С в течение 3 ч до постоянной массы и после охлаждения взвешивают. Масса пикрата скополамина, находящегося в колбе и собранного на стеклянном фильтре, составляет общее количество выделенного пикрата скополамина. 1 г пикрата скополамина содержит 0,559 г скополамина-основания.

Процентное содержание скополамина-основания x на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

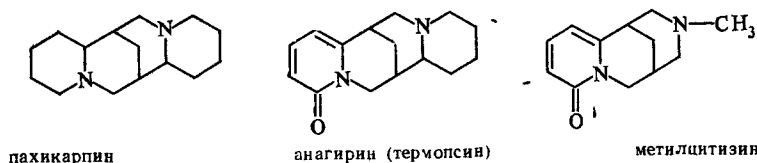
$$x = \frac{0,559a \cdot 100}{m(100 - w)},$$

где m — масса навески сырья, соответствующая объему дихлорэтанового извлечения, взятого для анализа, г; a — количество пикрата скополамина, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; 0,559 — коэффициент пересчета пикрата скополамина на скополамин-основание.

Реактивы и оборудование: аммиак 10%-ный; CH_3COOH 10%-ная; K_2CO_3 ; Na_2SO_4 ; пикриновая кислота; кремневольфрамовая кислота; дихлорэтан; этиловый эфир; бензол; хлороформ; фенолфталеин

Бумага фильтровальная; колбы с притертой пробкой вместимостью 1 л; колбы конические вместимостью 1 л; колбы круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 200 мл; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл; фильтры стеклянные № 3, воронки делительные вместимостью 200 и 1000 мл, воронки стеклянные для фильтрования диаметром 7 см; бюксы с притертыми крышками; эксикатор; палочки стеклянные; сито с диаметром отверстий 1 мм; установка для отгонки эфира; бани водяные лабораторные; весы ручные; весы лабораторные аналитические; штативы для делительных воронок; шкаф сушильный лабораторный.

Методика количественного определения алкалоидов в траве термопсиса (*Herba Thermopsidis*) (ГФ X, ст. 327). В траве термопсиса (*Thermopsis lanceolata* R. Br.) сем. бобовых — Fabaceae (Leguminosae) содержатся алкалоиды — производные хинолизидина (термопсин, гомотермопсин, пахикарпин, анагирин, метилцитизин и др.):



По данной методике определяется сумма алкалоидов титрометрическим методом (прямое титрование).

Около 10 г (точная навеска) травы термопсиса, измельченной и просеянной сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в колбу вместимостью 400—500 мл, приливают 200 мл хлороформа, подщелачивают 10%-ным раствором аммиака до ясно щелочной

реакции по фенолфталеину, взбалтывают на вибрационном аппарате в течение 1,5 ч. Хлороформное извлечение процеживают через вату в мерный цилиндр. Точно отмеренный объем хлороформного извлечения, соответствующий определенной навеске сырья, переносят в колбу и хлороформ отгоняют до объема 5 мл. Остаток переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, колбу дважды промывают 5 мл хлороформа, который присоединяют к основному хлороформному раствору. Хлороформный раствор взбалтывают с 1%-ной HCl по 10 мл, затем по 5 мл до полного извлечения алкалоидов (проба с реактивом Майера или с раствором кремневольфрамовой кислоты). Объединенные солянокислые извлечения подщелачивают 10%-ным NaOH по фенолфталеину и трижды извлекают хлороформом порциями по 15, 10 и 5 мл. Хлороформные извлечения фильтруют через фильтр, в который помещают 2 г безводного Na_2SO_4 . Фильтр с Na_2SO_4 трижды промывают хлороформом порциями по 10 мл, которые присоединяют к основному фильтрату. Хлороформ отгоняют на водяной бане до 2—3 мл и его остаток удаляют продуванием воздуха. Полученный в колбе остаток растворяют в 5 мл этилового спирта и прибавляют 15 мл воды, 2 капли раствора метилового красного и 1 каплю метиленового синего и титруют 0,1 н. HCl до появления сине-фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 н. HCl соответствует 0,0244 г алкалоидов термопсиса:

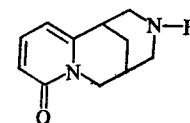
$$x = \frac{0,0244V \cdot 100 \cdot 100 \cdot 200}{V_1 m (100 - w)},$$

где V — объем 0,1 н. HCl , израсходованный на титрование, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; V_1 — объем хлороформного извлечения, взятого для анализа, мл.

Реактивы и оборудование: NH_4OH 10%-ный; хлороформ; этиловый спирт (этанол); HCl , 0,1 н., 1%-ная; NaOH ; фенолфталеин; Na_2SO_4 (безвод.); метиленовый синий; метиловый красный; реактив Майера; кремневольфрамовая кислота.

Колбы с притертой пробкой вместимостью 500 мл; колбы конические с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; колбы конические вместимостью 100 мл; воронки делительные вместимостью 100 мл; цилиндры мерные на 10, 25 и 200 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; бюретки вместимостью 25 мл; капельницы стеклянные лабораторные; установка для отгонки хлороформа; бюксы с притертой крышкой; штативы для делительных воронок; штативы лабораторные; шкаф сушильный лабораторный; эксикатор; весы аналитические лабораторные; весы ручные; сито с диаметром отверстий 1 мм.

Методика количественного определения цитизина в траве термопсиса очередноцветкового (*Herba Thermopsidis alterniflorae* ФС 42-1281-79). Травя термопсиса очередноцветкового (*Thermopsis alterniflora* Rgl. et Schmath.), сем. бобовых — Fabaceae (Leguminosae) содержит алкалоиды производные хинолизидина; основным является цитизин:



Трава термопсиса очередноцветкового наряду с семенами термопсиса ланцетовидного служит промышленным источником получения цитизина. Определение содержания цитизина в траве термопсиса очередноцветкового проводят хроматоспектрофотометрическим методом.

Около 10 г (с погрешностью до 0,01 г) сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, приливают 100 мл хлороформа, подщелачивают 5 мл концентрированного раствора NH_4OH , закрывают пробкой и встряхивают на вибрационном аппарате в течение 2 ч или оставляют при комнатной температуре на 12—15 ч, после чего встряхивают полчаса.

Хлороформное извлечение фильтруют через вату в мерный цилиндр; 50 мл фильтрата переносят в коническую колбу вместимостью 100 мл и хлороформ отгоняют до объема 1—2 мл. Остатки хлороформа удаляют продуванием воздуха. К остатку пипеткой приливают 2 мл 0,1 н. раствора NaOH и растирают стеклянной палочкой до полного удаления комочков, затем прибавляют 8 мл воды и перемешивают. К содержимому приливают пипеткой 10 мл 0,2 н. HCl , перемешивают 5—6 мин и фильтруют через тройной бумажный складчатый фильтр диаметром 7 см.

По 0,04 мл фильтрата (70—90 мкг) наносят калиброванной микропипеткой на линию старта (на 4 средние полосы) хроматографической пластинки; первую полосу оставляют контрольной; на шестую полосу наносят в качестве «свидетеля» 0,04 мл (80 мкг) 0,2%-ного спиртового раствора цитизина-основания.

Растворы наносят полосами длиной 1—1,2 см каждая. Во время нанесения проб пластинку подсушивают теплым воздухом. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, затем помещают в предварительно насыщенную (не менее 2 ч) вертикальную камеру со смесью растворителей: 95%-ный этиловый спирт — хлороформ — концентрированный раствор аммиака (40 : 80 : 0,05) и хроматографируют восходящим методом при комнатной температуре.

Через 1,5—2 ч, когда фронт растворителей пройдет около 16 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 3 мин и просматривают в УФ свете при длине волны 360 нм. Отмечают участки с пятнами на уровне «свидетеля». Цитизин просматривается на синем фоне пластинки в виде фиолетовых пятен. Для проверки полосу со «свидетелем» и одну полосу с испытуемым раствором проявляют реактивом Драгендорфа.

Участки сорбента с пятнами, находящимися на уровне проявленного пятна цитизина (испытуемого раствора и пятна «свидетеля»), и такой же участок сорбента с контрольной полосы количественно переносят в колбы со шлифом, заливают 10 мл 95%-ного этилового спирта и встряхивают на вибрационном аппарате в течение 1 ч. Затем растворы переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют 15 мин при скорости вращения 4000 об/мин или фильтруют через двойной бумажный складчатый фильтр.

Оптическую плотность полученного элюата измеряют на спектрофотометре СФ-4А или СФ-16 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 311 нм, используя в качестве раствора сравнения элюат с контрольной полосы.

Процентное содержание цитизина x в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{100 \cdot 20 \cdot 10D \cdot 1,11 \cdot 100K}{m50 \cdot V \cdot 434 (100 - w)} = \frac{D \cdot 111 \cdot 400K}{mV \cdot 434 (100 - w)},$$

где 100 — объем хлороформа, взятого для извлечения суммы алкалоидов из сырья, мл; 50 — объем хлороформного извлечения, взятого для анализа, мл; 20 — объем солянокислого раствора суммы алкалоидов, мл; V — объем солянокислого раствора суммы алкалоидов, нанесенного на хроматограмму, мл; 10 — объем элюата, мл; 434 — удельный показатель поглощения цитизина $E_{1\text{см}}^{1\%}$ при длине волны 311 нм, полученный на приборе, использованном при разработке метода; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; D — оптическая плотность элюата при длине волны 311 нм; 1,11 — поправочный коэффициент на неполное элюирование цитизина с хроматограммы; K — инструментальная поправка на используемые кюветы и спектрофотометр.

Приготовление сорбента. 2 кг силикагеля марки КСК (ГОСТ 3966—76) измельчают на шаровой мельнице и переносят в бутылку вместимостью 10 л, заливают 6 л 2 н. HCl , перемешивают и оставляют на 15—20 ч, после чего HCl сливают сифоном и силикагель промывают дистиллированной водой декантацией с отстаиванием в течение 7 ч до отрицательной реакции промывной воды на хлориды (проба с AgNO_3). Затем силикагель заливают таким же количеством воды, тщательно перемешивают и через 20 мин быстро сливают суспензию в низкий кристаллизатор. Осевшие крупные частицы отбрасывают, суспензию после отстаивания переносят на воронку Бюхнера с тройным бумажным фильтром и промывают 3—4 раза 95%-ным этиловым спиртом. Силикагель сушат на воздухе в течение 4—5 ч, хранят в стеклянной банке с притертой пробкой.

Приготовление хроматографических пластинок. 0,3 г CaSO_4 тщательно растирают в фарфоровой ступке, прибавляют 2,7 г силикагеля КСК и перемешивают. Прибавляют 5 мл 0,1 н. NaOH , перемешивают пестиком 30—40 с, затем добавляют еще 5 мл NaOH , продолжая размешивать 30—40 с. Гомогенную массу, не содержащую пузырьков воздуха, наносят ровным слоем на пластинку размером 13×18 см и оставляют на 17—20 ч в строго горизонтальном положении на воздухе. Высушенную пластинку делят на 6 продольных полос шириной 2 см каждая (толщина разделительных линий 1—2 мм).

Приготовление 0,2%-ного спиртового раствора цитизина. 0,1 г (точная навеска) цитизина-основания (ст. 199 ГФ Х) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 95%-ном этиловом спирте, доводят спиртом до метки и тщательно размешивают.

Определение инструментальной поправки «К» на используемый спектрофотометр и кюветы. Инструментальная поправка устанавливается по дихромату калия на спектрофотометре и в кюветах, которые будут использованы при проведении анализа. Кюветы должны быть постоянными — одна для контроля, другая для используемого раствора.

10 мг (точная навеска) высушенного до постоянной массы при 105 °С дихромата калия растворяют в 100 мл 0,005 М H_2SO_4 . Полученный исходный раствор разбавляют 0,005 М H_2SO_4 в соотношениях 1:1, 1:2; 1:3, 1:4; 1:5. Оптическую плотность полученных растворов определяют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 311 нм. В качестве раствора сравнения используют 0,005 М H_2SO_4 . Удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) дихромата ка-

лия вычисляют по формуле

$$E_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{10VnD}{m},$$

где m — масса навески дихромата калия, мг; V — объем раствора, мл; n — число разведения, D — оптическая плотность дихромата калия

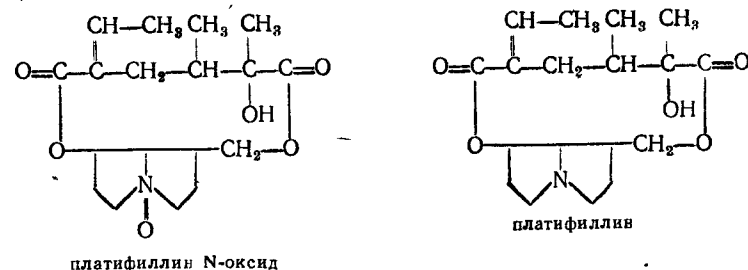
Инструментальная поправка K вычисляется по формуле $K = 50,62/E_{1\text{ см}}^{1\%}$, где 50,62 — значение удельного показателя поглощения дихромата калия при длине волны 311 нм, полученное по прибору, на котором проводился анализ количественного определения цитизина при разработке метода (СФ-4А); $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения дихромата калия при длине волны 311 нм по прибору, на котором проводят анализ количественного определения цитизина.

Содержание цитизина в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 0,6 %.

Реактивы и оборудование: хлороформ, аммиак (конц. р-р); NaOH (0,1 н.); HCl (0,1 н.; 2 н.); этиловый спирт 95%-ный (этанол); реактив Драгендорфа; силикагель марки КСК; CaSO₄; H₂SO₄, 0,005 М; вода дистиллированная; AgNO₃; цитизин; калия дихромат.

Бумага фильтровальная; колбы плоскодонные с притертой пробкой вместимостью 250 мл; колбы конические с нормальным шлифом вместимостью 100 мл; цилиндры мерные на 10 и 100 мл; установка для отгонки хлороформа; пипетки измерительные вместимостью 1 и 2 мл; бюксы с притертой крышкой; вибрационный аппарат; ступки фарфоровые с пестиком; палочки стеклянные; вата гигроскопическая; колба Бунзена; воронки Бюхнера; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 и 10 см; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13 × 18 см; камера хроматографическая для ТСХ; весы лабораторные аналитические; весы ручные; сита с диаметром отверстий 1 мм; шкаф сушильный лабораторный; УФ лампа; центрифуга лабораторная; спектрофотометры СФ-4А, СФ-16; бани водяные лабораторные; штативы для делительных воронок.

Методика количественного определения платифиллина в траве крестовника плосколистного (*Herba Senecionis platyphylloides*). Крестовник плосколистный (*Senecio platyphylloides* Somm. et. Lev) сем. астровых — *Asteraceae* (сложноцветных — *Compositae*) содержит алкалоиды — производные пирролизидина (платифиллин, сенецифиллин). В растительном сырье они содержатся в основном в виде N-оксидов:



По данной методике проводится определение платифиллина в восстановленной форме хроматофотоелектроколориметрическим методом.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц 2 мм, берут навеску сырья массой 20 г (с погрешностью не более 0,01 г), помещают в колбу вместимостью 1 л, заливают 500 мл 5%-ной H₂SO₄; сюда же добавляют 4 г цинковой пыли, смесь перемешивают, встряхивают, закрывают ватным тампоном, оставляют

стоять в течение 6 ч при периодическом встряхивании и затем кислотное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

100 мл фильтрата помещают в делительную воронку, подщелачивают концентрированным раствором аммиака (по фенолфталеину) и алкалоиды исчерпывающе извлекают этиловым эфиром порциями 70, 30, 30 мл и т. д. (пробы на полноту извлечения с 1%-ным раствором кремневольфрамовой кислоты). Эфирные извлечения объединяют, сушат безводным Na₂SO₄, отфильтровывают и отгоняют досуха на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 5 мл хлороформа. 0,05 мл полученного раствора наносят на линию старта стеклянной пластинки размером 6 × 18 см с закрепленным слоем силикагеля марки КСК. Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 5—10 мин, а затем помещают в хроматографическую камеру с метиловым спиртом и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, сушат сначала на воздухе в течение 5 мин, затем в сушильном шкафу 30 мин при температуре 50 °С, охлаждают на воздухе и опрыскивают реактивом Драгендорфа. При этом на пластинке должно появиться пятно платифиллина (R_f около 0,36) и выше — пятно сенецифиллина (R_f около 0,50). Проявленное пятно платифиллина обводят препаровальной иглой. Отмеченный участок счищают в делительную воронку вместимостью 50 мл, в которую затем прибавляют 15 мл 1%-ной HCl и встряхивают в течение 3 мин. При этом образовавшийся на адсорбенте комплекс алкалоида с реактивом Драгендорфа разрушается. Затем в воронку прибавляют 0,2 мл 1%-ного раствора тропеолина 000 — II и 10 мл хлороформа, вновь встряхивают в течение 3 мин и окрашенный хлороформный слой, содержащий соединение алкалоида с тропеолином, фильтруют через бумажный фильтр, предварительно смоченный хлороформом, в мерную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию хлороформом повторяют еще два раза, объем раствора в колбе доводят до метки хлороформом, перемешивают и интенсивность окраски раствора определяют при помощи фотоэлектроколориметра ФЭК-56М со светофильтром № 5 ($\lambda = 490$ нм) на фоне хлороформа в кювете с толщиной слоя 10 или 50 мм в зависимости от интенсивности окраски раствора. Количество платифиллина в пятне хроматограммы в мкг находят по калибровочному графику. Процентное содержание платифиллина в виде основания в абсолютно сухом сырье x вычисляют по формуле

$$x = \frac{aV100 \cdot 5 \cdot 100}{V_1 m \cdot 1\,000\,000(100 - w)},$$

где a — содержание алкалоидов в пятне хроматограммы, найденное по калибровочному графику, мкг; V — объем хлороформного раствора, полученного при растворении сухого остатка, мл; V_1 — объем хлороформного раствора, нанесенного на хроматограмму, мл; m — масса навески сырья, г; w — потеря массы сырья при высушивании, %.

Содержание платифиллина-основания должно быть не менее 0,3 %.

При необходимости после хроматографического разделения и проявления алкалоидов аналогичным способом можно определить сенецифиллин, пользуясь тем же калибровочным графиком.

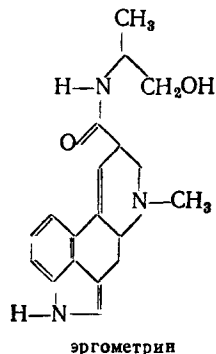
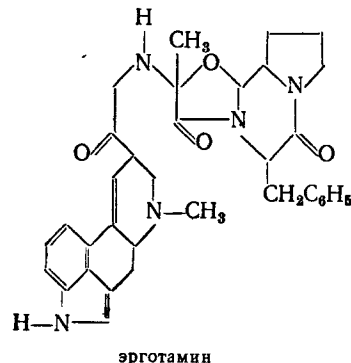
Построение калибровочного графика. 0,2890 г (точная навеска) гидротартрата платифиллина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл дистиллированной воды, объем раствора доводят до метки 95%-ным этиловым спиртом и перемешивают. Получают таким образом 0,2%-ный исходный раствор платифиллина-основания. Для построения калибровочного графика, рассчитанного на работу в кювете с толщиной слоя раствора 50 мм, наносят на стартовую линию хроматограммы в разные точки (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07 мл) исходного раствора, что соответствует 20, 40, 60, 80, 100, 120 и 140 мкг платифиллина-основания, и далее анализируют, как описано выше. Для кюветы с толщиной слоя раствора 10 мм берут 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мл исходного раствора, что соответствует 100, 200, 300, 400 и 500 мкг платифиллина-основания, и далее анализируют, как описано выше.

При построении калибровочного графика на оси абсцисс откладывают количество мкг вещества, содержащегося в пятне хроматограммы, а на оси ординат — оптические плотности соответствующих колориметрируемых растворов.

Приготовление пластинок для хроматограммы. Смешивают 95 г порошка силикагеля с 5 г CaSO_4 ; к 1,5 г этой смеси добавляют 4 мл 0,1 н. раствора NaOH и размешивают до консистенции «жидкой сметаны». Полученную смесь наливают ровным слоем на стеклянную пластинку 6×18 см. Пластинку с сорбентом сушат на воздухе в течение 18 ч.

Реактивы и оборудование: H_2SO_4 5%-ная; HCl 1%-ная; аммиак (конц. р-р); цинк металлический (цинковая пыль); этиловый эфир; этиловый спирт; хлороформ; фенолфталеин; кремневольфрамовая кислота; Na_2SO_4 (безводн.); CaSO_4 ; тропеолин ОО-И; реактив Драгендорфа; платифиллин гидротартрат; вода дистиллированная; силикагель марки КСК; бумага фильтровальная; вата гигроскопическая; колбы вместимостью 100, 200 и 1000 мл; колбы мерные вместимостью 50 мл; воронки делительные вместимостью 250—300 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 и 10 см; цилиндры мерные на 10, 100 и 500 мл; пластинки стеклянные для ТСХ размером 6×18 см; камеры хроматографические для ТСХ; микропипетки измерительные вместимостью 0,2 мл; бюксы с притертой крышкой; эксикатор; бани водяные лабораторные; весы ручные; весы лабораторные аналитические; сито с диаметром отверстий 2 мм; ступка фарфоровая с пестиком; электрокофемолка бытовая; фотоэлектроколориметр ФЭК-56 М; шкаф сушильный лабораторный; штативы лабораторные.

Методика количественного определения алкалоидов в рожках спорыньи эрготамина *штамма* (*Cornu Secalis cornuti stamm Ergotamini*) (ФС 42-1432-80). Рожки спорыньи, паразитирующей на ржи, содержат индолные алкалоиды — производные лизергиновой и изомерной ей изолизергиновой кислот. Основными являются эргометрин, эрготамин, эргокрисин, эргокриптин, эргокорнин и др.:



Количественное определение алкалоидов проводится колориметрическим методом. 3 г (с погрешностью не более 0,01 г) свежемолотого порошка спорыньи, просеянного сквозь сито с размером отверстий 0,315 мм, обезжиривают в аппарате Сокслета в течение 8 ч петролевым эфиром (температура кипения 40—60 °С). Обезжиренный порошок высушивают при температуре не выше 30 °С и переносят количественно в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, приливают 30 мл этилового эфира и оставляют на 10 мин. Затем прибавляют 0,13 г свежепрокаленного оксида магния, тщательно растертого с 6 мл воды; смесь непрерывно встряхивают в течение 2 ч, затем прибавляют 6 г безводного Na_2SO_4 , сильно встряхивают в течение 5 мин, дают отстояться и быстро процеживают через вату. 15 мл фильтрата (1,5 г спорыньи) помещают в делительную воронку и извлекают 4 раза по 20 мл 2%-ным раствором винной кислоты; колбу с объединенными виннокислыми извлечениями помещают на водяную баню и нагревают до 40—50 °С для удаления остатков эфира.

Охлажденный раствор процеживают через вату в мерную колбу вместимостью 200 мл, колбу и воронку с ватой тщательно промывают 2%-ным раствором винной кислоты и доводят объем раствора до метки той же кислотой (раствор А). К 2 мл раствора А прибавляют 4 мл реактива ван-Урка, перемешивают и оставляют раствор на свету на 30 мин, после чего колориметрируют на ФЭК-М с зеленым светофильтром (длина волны 530—540 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Процентное содержание эргоалкалоидов в сырье x вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{1,5 (100 - w)},$$

где a — количество эргоалкалоидов в 1 мл раствора А, г, найденное по калибровочному графику; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовят серию разведений эрготамина тартрата-стандарта (ФС 42-1070-76) в 2%-ной винной кислоте разбавлением исходного раствора эрготамина тартрата-стандарта. Для этого сначала готовят исходный раствор: точную навеску 0,0113 г эрготамина тартрата-стандарта (0,0100 г основания) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 2%-ной винной кислоте и доводят этой же кислотой до метки. Полученный раствор содержит 0,0001 г эрготамина-основания в 1 мл (исходный раствор). В пробирках вместимостью 10 мл готовят следующий ряд разбавлений раствора (см. табл. на стр. 156).

К полученным растворам прибавляют 4 мл раствора ван-Урка, тщательно перемешивают и оставляют раствор на свету на 30 мин, после чего колориметрируют в тех же условиях, что и в основном опыте. Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс количество граммов эрготамина-основания, а на оси ординат —

Количество исходного рас- твора, мл	Количество 2 % ного рас- твора винной кислоты, мл	Количество эрготамин-а- основания в 1 мл, г	Количество исходного рас- твора, мл	Количество 2 %-ного рас- твора винной кислоты, мл	Количество эрготамин-а- основания в 1 мл, г
0,10	1,90	0,000005	0,60	1,40	0,00003
0,20	1,80	0,00001	0,70	1,30	0,000035
0,30	1,70	0,000015	0,80	1,20	0,00004
0,40	1,60	0,00002	0,90	1,10	0,000045
0,50	1,50	0,000025	1,00	1,00	0,00005

соответствующее значение оптической плотности колориметрируемых растворов.

Для определения содержания эрготаминна на стартовую линию хроматографической бумаги марки «С» (55 × 16 см) узкой полоской наносят из микропипетки 0,4 мл эфирного извлечения (0,04 г спорыньи). Бумагу импрегнируют 50%-ным спиртовым раствором формамида, рН которого 7,05—7,20, оставляя стартовую линию в 2 см сухой; тщательно отжимают избыток формамида между листами фильтровальной бумаги, стартовую линию опрыскивают из пульверизатора тем же раствором формамида. В течение 10 мин полосу бумаги высушивают на воздухе в темном месте.

Хроматографирование проводится в затемненной камере нисходящим методом, в системе бензол — петролейный эфир ($t_{\text{кип}} = 70\text{—}100^\circ\text{C}$) (6 : 1) до продвижения фронта 40—45 см, после чего бумагу высушивают и просматривают в ультрафиолетовом свете, отмечают светящуюся полосу эрготаминна. Эту полосу вырезают по всей ширине бумаги — с одного конца вырезают зубчики, другим концом помещают в кювету с 1%-ной винной кислотой, которая находится в камере, насыщенной водой, и алкалоиды элюируют 1%-ной винной кислотой, элюат собирают в пробирку с делениями. За 18 ч собирают 3—6 мл элюата, доводят водой до 8 мл, тщательно перемешивают. К 2 мл полученного раствора прибавляют 4 мл реактива ван-Урка и через 30 мин колориметрируют в тех же условиях, что и при определении суммы алкалоидов.

По калибровочному графику находят содержание эрготаминна в 1 мл испытуемого раствора. Процентное содержание x вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{a \cdot 100 \cdot 100}{0,04 (100 - w)},$$

где a — количество эрготаминна в 1 мл испытуемого раствора, г, найденное по калибровочному графику; w — потеря в массе сырья при высушивании, %. Содержание эрготаминна в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 0,2 %.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика точную навеску 0,0113 г эрготаминна тартрата-стандарта (0,0100 г эрготаминна-основания) растворяют в 10 мл метилового спирта. На стартовую линию хроматографической бумаги марки «С» (55 × 16 см) узкой

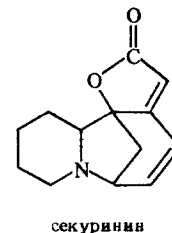
полоской наносят из микропипетки на первый лист 0,05 мл, на второй — 0,1, на третий — 0,15, на четвертый — 0,2 мл этого раствора (50, 100, 150, 200 мкг), далее поступают, как описано выше.

При количественном определении алкалоидов в рожках спорыньи на лабораторных занятиях указанную навеску сырья (3 г) предварительно обезжиривают; калибровочный график студенту дается готовый.

Реактивы и оборудование: петролейный эфир ($t_{\text{кип}} = 40\text{—}60$ и $70\text{—}100^\circ\text{C}$); этиловый эфир; бензол; этиловый спирт (этанол); MgO , Na_2SO_4 (безводн.); винная кислота; эрготамин тартрат; формамид (50%-ный раствор в этиловом спирте); реактив ван-Урка (H_2SO_4 конц., FeCl_3 , n -диметиламинобензальдегид).

Бумага хроматографическая; бумага фильтровальная; колбы с притертой пробкой вместимостью 100 мл; колбы конические вместимостью 100 мл; воронки стеклянные для фильтрации диаметром 5 см; воронки делительные вместимостью 100 мл; стаканы химические вместимостью 200 мл; колбы мерные вместимостью 100 и 200 мл; пипетки измерительные вместимостью 2 и 5 мл; цилиндры мерные на 10 и 100 мл; бюксы с притертой крышкой; пробирки вместимостью 10 мл; камера хроматографическая для БХ; эксикатор; пульверизатор; штативы для делительных воронок; бани водяные лабораторные; аппарат Сокслета; шкаф сушильный лабораторный; УФ лампа; весы ручные; весы лабораторные аналитические; сито с размером отверстий 0,315 мм; фотоэлектроколориметр ФЭК-М.

Методика количественного определения секуринина в побегах секуринеги (*Cornus Securinegae*) (ФС 42-109). Побеги секуринеги полкустарниковой *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd. сем. молочайных — *Euphorbiaceae* содержат алкалоиды — производные конденсированной бициклической системы пиперидина и пирролидина:



Количественное определение секуринина в сырье проводится полярометрическим методом. 100 г воздушно-сухого сырья, измельченного до величины частиц 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 2000 мл и заливают 1000 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы взбалтывают 5 мин и оставляют до следующего дня. После этого повторно взбалтывают 5 мин и водную вытяжку отфильтровывают.

600 мл водного фильтрата помещают в делительную воронку вместимостью 1000 мл, подщелачивают концентрированным раствором аммиака (проба с фенолфталеиновой бумагой) и алкалоиды исчерпывающе извлекают хлороформом 3—4 раза порциями 100, 50 и 50 мл до полного извлечения (проба с раствором кремневольфрамной кислоты).

Из объединенного хлороформного извлечения алкалоиды извлекают 10%-ной H_2SO_4 2—3 раза по 50 мл в делительной воронке

вместимостью 500 мл. Объединенный сернокислый раствор вновь подщелачивают концентрированным раствором аммиака (проба с фенолфталеиновой бумагой) и алкалоиды исчерпывающе извлекают этиловым эфиром 4—5 раз по 30—50 мл (проба с раствором кремневольфрамовой кислоты). Объединенные эфирные извлечения сушат безводным Na_2SO_4 (10—15 г) и фильтруют через бумажный фильтр в сухую колбу. Промывают сульфат натрия небольшими порциями этилового эфира до отсутствия алкалоидов и фильтруют через тот же фильтр. Эфир отгоняют на водяной бане досуха. Остаток эфира удаляют струей воздуха.

Сухой остаток в колбе растворяют в 5 мл 95%-ного этилового спирта и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят до метки этиловым спиртом, тщательно перемешивают и определяют угол вращения в трубке длиной 0,5—2,0 дм (поляриметр марки СМ).

1. Для приготовления 10%-ной H_2SO_4 берут 1 часть конц. H_2SO_4 и 9,5 частей H_2O .

2. При отгонке эфира следует избегать перегрева кристаллизующихся алкалоидов. Выделенные алкалоиды необходимо сразу же растворить в 95%-ном этиловом спирте, не оставляя на следующий день.

Процентное содержание секуринина x вычисляют по формуле

$$x = \frac{\alpha V V_1 100 \cdot 100}{V_2 m 1080 (100 - w)},$$

где α — измеренный угол вращения, градусы; V — объем растворителя, взятого для извлечения алкалоидов, мл; V_1 — объем извлечения, взятого для анализа, мл; V_2 — объем этилового спирта, взятого для растворения алкалоидов, мл; m — масса навески сырья, г; l — толщина слоя жидкости (длина трубки), дм; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; 1080 — удельное вращение чистого секуринина.

Содержание секуринина должно быть не менее 0,1 % на абсолютно сухое сырье.

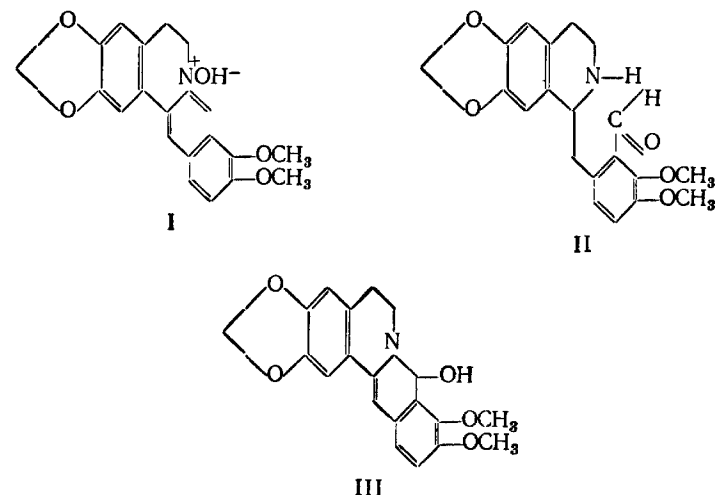
Реактивы и оборудование: аммиак (конц. р-р); H_2SO_4 1%-ная; кремневольфрамовая кислота; этиловый эфир; этиловый спирт (этанол); вода дистиллированная; хлороформ; Na_2SO_4 (безвод.); фенолфталеиновая бумага.

Бумага фильтровальная; колбы конические вместимостью 250 и 2000 мл; цилиндры мерные на 10, 100 и 1000 мл; колбы мерные вместимостью 25 мл; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 и 10 см; воронки делительные вместимостью 500 и 1000 мл; установка для отгонки этилового эфира; поляриметр; штативы для делительных воронок; весы лабораторные аналитические; весы ручные; бюксы с притертой крышкой, эксикатор; сушильный шкаф лабораторный.

Методики количественного определения берберина в корнях барбариса обыкновенного (*Radix Berberidis vulgaris*).

Корни барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris* L.) сем. барбарисовых — *Berberidaceae* содержат алкалоиды производные изохинолина: берберин, ятропорицин, пальматин и др. Считают, что берберин может быть как в форме четвертичного аммонийного

основания (I), так и в альдегидной (II) или карбинольной форме (III):



Количественное определение берберина спектрофотометрическим методом (ФС 42-1152-78). Количественное определение берберина в корнях барбариса по данной методике основано на селективном извлечении берберина в его карбинольной форме и отделении от алкалоидов фенольной природы на стадии экстракции сырья.

В УФ спектре бисульфата берберина в 2%-ной H_2SO_4 имеется ряд интенсивных полос поглощения. Для количественного определения в данном методе используется наиболее длинноволновая полоса поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 420$ нм).

Для определения содержания берберина от средней пробы цельного сырья отделяют не менее 1 кг, который измельчают до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, тщательно перемешивают, отбирают не менее 250 г сырья, которые измельчают до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. Затем отбирают 25 г сырья и доводят его измельчение до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм.

0,5 г (с погрешностью не более 0,0001 г) сырья помещают в коническую плоскодонную колбу вместимостью 100 мл (с притертой пробкой), прибавляют 0,5 мл 25%-ного NaOH , тщательно перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной увлажненной массы, закрывают пробкой и оставляют при комнатной температуре на 2 ч. Затем в колбу прибавляют 50 мл этилового эфира, закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью не более 0,01 г). Содержимое колбы осторожно перемешивают круговыми движениями в течение 10 мин, взвешивают и потерю массы пополняют этиловым эфиром. Содержимое колбы вновь осторожно перемешивают, дают отстояться, затем берут осторожно, не взмучивая сырье, пипеткой 15 мл эфирного извлечения, помещают

в делительную воронку вместимостью 100 мл и проводят извлечение алкалоидов 2 %-ной H_2SO_4 порциями 20, 10 и 10 мл (до отрицательной реакции с кремневольфрамовой кислотой). Объединенные кислотные извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки 2 %-ной H_2SO_4 . После тщательного перемешивания раствор спектрофотометрируют при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Процентное содержание берберина бисульфата x в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{50 \cdot 50 \cdot 100D}{15 \cdot 128m(100 - w)},$$

где 50 — объем эфирного извлечения, мл; 50 — объем сернокислого извлечения, мл; 15 — объем эфирного извлечения, взятого для анализа, мл; 128 — удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ берберина бисульфата при длине волны 420 нм; D — оптическая плотность сернокислого извлечения; m — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Реактивы и оборудование: NaOH; этиловый эфир; H_2SO_4 2 %-ная; кремневольфрамовая кислота

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 100 мл; колбы мерные вместимостью 50 мл; воронки делительные вместимостью 100 мл; пипетки измерительные 1 и 15 мл; цилиндры мерные на 10 и 50 мл; бюксы с притертой крышкой; эксикатор; штативы для делительных воронок; шкаф сушильный лабораторный; весы лабораторные аналитические, технические, ручные; сита с диаметром отверстий 1, 3 и 7 мм, спектрофотометр СФ-4А.

Количественное определение берберина спектрофотометрическим методом с применением хроматографии в тонком слое сорбента. Метод основан на разделении алкалоидов в тонком слое сорбента и определении содержания берберина спектрофотометрическим методом.

Точная навеска (0,5—1 г) измельченных корней барбариса, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, приливают 10 мл 95 %-ного этилового спирта и нагревают с обратным холодильником на водяной бане, поддерживая слабое кипение этилового спирта в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры отмеряют микропипеткой 0,2 мл извлечения (надосадочной жидкости) и наносят на стартовую линию хроматографической пластинки с закрепленным слоем силикагеля сплошной полосой длиной 5—7 см на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки. Для определения зоны берберина в правой части пластинки на стартовую линию наносят раствор берберина бисульфата (3—5 капилляров) в виде пятна (диаметр пятна 0,5—0,7 мм).

После высушивания пластинку помещают в хроматографическую камеру. Для проявления используется система: раствор аммиака концентрированный — хлороформ — этиловый спирт (1 : 3 : 3). Система растворителей используется для хроматографирования одно-

кратно. Толщина слоя растворителей в хроматографической камере около 5 мм; экспозиция при комнатной температуре 30—40 мин.

Хроматограмму после высушивания просматривают в УФ свете, отмечают на хроматограмме зону, соответствующую берберину, и соскабливают этот участок сорбента скальпелем в колбу вместимостью 25 мл. Берберин 4 раза элюируют 0,1 н. H_2SO_4 при нагревании в течение 1 мин на водяной бане. Кислоту отмеряют с помощью бюретки: первый раз 4 мл, а затем три раза по 2 мл. Полноту элюирования определяют по отсутствию флюоресценции силикагеля в УФ свете. Элюат каждый раз сливают декантацией в другую колбу вместимостью 25 мл. Для удаления следов силикагеля объединенный элюат центрифугируют в течение 5 мин (1000 об/мин). Оптическую плотность элюата измеряют на спектрофотометре СФ-4А на фоне контроля при длине волны 345 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Контролем служит элюат чистого силикагеля с той же пластинки, снятый с площади, равной площади пятна берберина. Процентное содержание берберина в образце x рассчитывают на абсолютно сухую массу сырья в пересчете на бисульфат берберина:

$$x = \frac{VV_2 100D}{V_1 646m(100 - w)},$$

где V — объем этилового спирта, взятого для извлечения, мл; V_1 — объем извлечения, нанесенного на хроматограмму, мл; V_2 — объем элюата берберина, мл; D — оптическая плотность элюата; w — потеря в массе сырья при высушивании, %; m — масса навески сырья, г; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ (646) — удельный показатель поглощения берберина бисульфата.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол); $CaSO_4$; аммиак (конц.); H_2SO_4 (0,1 н.); хлороформ; силикагель марки КСК.

Колбы с нормальным шлифом вместимостью 50 мл; холодильники обратные стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; микропипетки измерительные вместимостью 0,2 мл; капилляры стеклянные; бюретки вместимостью 10, 25 мл; колбы конические вместимостью 25 мл; бани водяные лабораторные; цилиндры мерные на 10 и 100 мл; бюксы с притертой крышкой; камера хроматографическая для ТСХ; пластинки стеклянные для ТСХ размером 13 × 18 см; штативы лабораторные; центрифуга лабораторная; УФ лампа; шкаф сушильный лабораторный; сито с диаметром отверстий 1 мм; весы ручные; весы лабораторные аналитические, спектрофотометр СФ-4А

Вопросы для подготовки

1. Какие природные вещества называют алкалоидами (определение)?
2. Классификация алкалоидов (примеры алкалоидов каждой группы, их формулы и растения, содержащие эти алкалоиды).
3. Физико-химические свойства алкалоидов.
4. В каком виде (форме) алкалоиды находятся в растительном сырье?
5. Локализация алкалоидов
6. Качественные реакции на алкалоиды
7. Хроматографический анализ.
8. Извлечения алкалоидов из растительного сырья и очистка извлечений.
9. Разделение суммы алкалоидов.

10. Какие свойства алкалоидов лежат в основе методов количественного определения алкалоидов в растительном сырье?

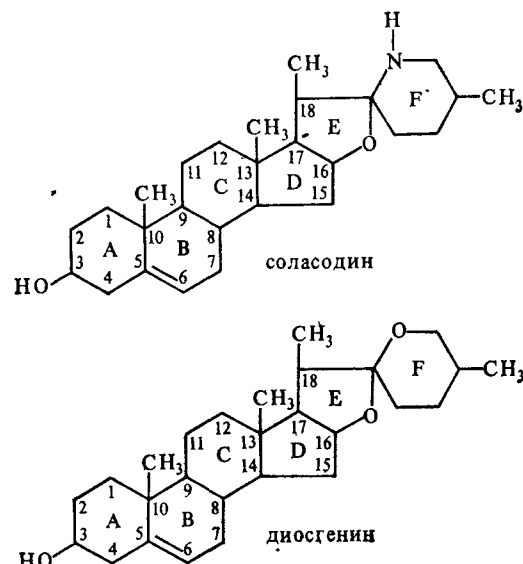
11. Сущность методов количественного определения алкалоидов в лекарственном растительном сырье (формулы и лекарственные растения, содержащие эти алкалоиды).

Литература

- Семя дурмана индийского. ФС 42-1005-75.
Трава термописа очередноцветкового. ФС 42-1281-79.
Рожки спорыньи эрготаминового штамма. ФС 42-1432-80.
Побеги секуринеги. ФС 42-100-81.
Корень барбариса обыкновенного. ФС 42-1152-78.
Орехов А. П. Химия алкалоидов. — М.: Изд-во АН СССР, 1955.
Юнусов С. Ю. Алкалоиды. — Ташкент: Изд-во ФАН, 1968.
Садыков А. С., Асламов Х. А., Кушмурадов Ю. К. Алкалоиды хинолизидинового ряда. — М.: Наука, 1975.
Орехов А. П. Химия алкалоидов растений СССР. — М.: Наука, 1965.
Цеско А. И. Фармакологическое изучение барбариса: Автореферат кандидатской диссертации. М., 1973.
Биохимия растений/Под ред. Кретовича В. А. — М.: Мир, 1968.
Кретович В. А. Биохимия растений. — М.: Высшая школа, 1980.
Хроматография в тонких слоях/Под ред. Шталя Э. — М.: Мир, 1965.
Menske RHT. The alkaloids Chemistry and Physiology, v. IX, London, 1967.

ГЛАВА 11. ГЛИКОАЛКАЛОИДЫ

Гликоалкалоиды, или стероидные алкалоиды, — это производные цикlopentanопергидрофенантрена с гетероциклическим атомом азота, сочетающие в себе свойства стероидных сапонинов и алкалоидов. Строение их очень сходно со строением стероидных сапонинов:

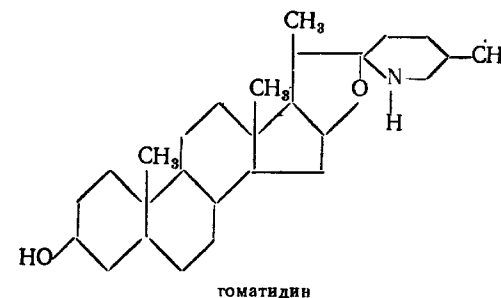


В нашей стране гликоалкалоиды используются для получения гормональных препаратов типа кортизона.

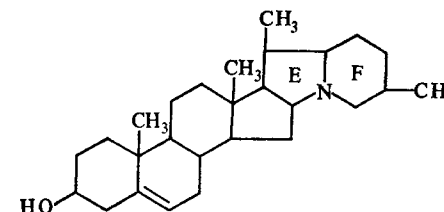
Строение агликона и сахарного компонента. В основе структуры стероидных алкалоидов лежит скелет цикlopentanопергидрофенантрена, связанный с гетероциклической системой. В 3-м положении находится группа OH, через которую происходит присоединение углеводной части молекулы. В положениях 10, 13, 18 имеются метильные группы ($-\text{CH}_3$). У большинства гликоалкалоидов в кольце В в положении 5, 6 содержится двойная связь. Углеводная часть молекулы стероидных алкалоидов представлена, как и у сапонинов, сахарами: *D*-глюкозой, *D*-галактозой, *L*-рамнозой, *L*-арабинозой, *D*-ксилозой, *L*-фруктозой и кислотами *D*-глюкуроновой и *D*-галактуроновой.

§ 1. Классификация

Стероидные алкалоиды можно разделить на две группы. Первая группа — азотсодержащие аналоги сапонинов; они чаще всего встречаются в представителях рода паслен. Как и производные спиростана, гликоалкалоиды этой группы образуют нормальные (соласодин) и изо-ряды соединений (томатидин):

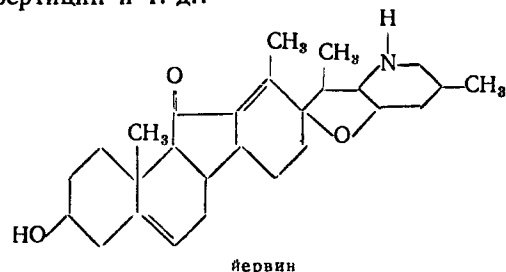


Вторая группа — азотсодержащие стероиды, в которых кольца Е и F сконденсированы. Эти соединения чаще всего встречаются в представителях родов паслен и чемерица. Представителем этой группы является соланидин:



Эта группа в свою очередь подразделяется на две подгруппы: 1) йервератровые стероидные гликоалкалоиды, молекула которых содержит до 3 атомов кислорода; к типичным представителям дан-

ной подгруппы относятся йервин, рубийервин, изорубийервин, верамарин, вертицин и т. д.:



2) цеведратовые стероидные алкалоиды, в молекуле которых более 3 атомов кислорода. Основные гликоалкалоиды этой подгруппы — сабин, верацевин, гермин.

§ 2. Физико-химические свойства

Стероидные алкалоиды, в основном, кристаллические вещества, хорошо кристаллизующиеся из 80%-ного этилового спирта. Встречаются аморфные гликоалкалоиды, как, например, соланокапсидин.

Гликоалкалоиды — оптически активные соединения, имеющие определенный угол вращения. Они почти не растворяются в воде, этиловом эфире, хлороформе, растворяются в горячем этиловом спирте.

В результате наличия атома азота в агликоне стероидные алкалоиды обладают основными свойствами и могут образовывать соли. Соли большинства гликоалкалоидов — аморфные вещества, кроме кристаллического хлоргидрата соланина, температура плавления которого 212 °С (с разложением). Как и соли других алкалоидов, соли гликоалкалоидов растворимы в воде.

Стероидные алкалоиды подвергаются ферментативному и кислотному гидролизам. Щелочной гидролиз проводится редко, так как некоторые гликоалкалоиды устойчивы к щелочам. Например, соланин устойчив по отношению к щелочи, но при нагревании его с разбавленной HCl происходит расщепление на соланидин (агликон) и три молекулы сахаров: *D*-глюкозу, *D*-галактозу, *L*-рамнозу.

§ 3. Методы выделения

Одним из распространенных методов выделения гликоалкалоидов является кислая экстракция разбавленными кислотами с последующим осаждением аммиаком. Используются разведенная серная кислота, 0,5—2%-ный раствор азотной и ортофосфорной кислот, 2%-ный раствор холодной метафосфорной кислоты, 5%-ная уксусная кислота и др. Недостаток кислотной экстракции — плохая фильтрация рыхлых осадка «сырых» гликоалкалоидов, что частично можно избежать, применяя для подщелачивания не раствор аммиака, а известковое молоко.

Экстракция подкисленными спиртами приводит к загрязнению экстрактов большим количеством сопутствующих веществ, которые затрудняют дальнейшее проведение анализа и препаративного выделения гликоалкалоидов и их агликонов.

При разделении гликоалкалоидов методом колоночной хроматографии в качестве сорбента применяют нейтральный оксид алюминия (II) и (III) степени активности по Брокману, а элюирование проводят смесью бензола с хлороформом.

Свободные агликоны хорошо разделяются на неактивном нейтральном оксиде алюминия, элюирование проводится смесью этилацетата и гексана в соотношении 7 : 3 по объему.

Для идентификации и установления строения гликоалкалоидов широко используются методы УФ, ИК, ПМР спектроскопии.

§ 4. Качественное определение

Для обнаружения стероидных алкалоидов и их агликонов в растительном сырье применяются реакции осаждения и окрашивания, а также хроматографические методы анализа (тонкослойная, бумажная хроматография).

Гликоалкалоиды осаждаются холестерином, дигитонином; дают реакции окрашивания с *n*-оксibenзальдегидом, анисовым альдегидом, резорцином, формальдегидом. Наиболее часто используется реакция Альберта (формальдегид в сильноокислой среде) — в присутствии гликоалкалоидов появляется малиново-красное окрашивание.

При обнаружении стероидных алкалоидов методом бумажной хроматографии используются различные смеси растворителей: метилэтилкетон, насыщенный водой; *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 2 : 5); *n*-бутанол — пиридин — вода (10 : 2 : 5) и др. Для обработки хроматограмм чаще всего применяются реактив Драгендорфа (оранжевые пятна) или концентрированный хлороформный раствор треххлористой сурьмы с последующим непродолжительным нагреванием при 105 °С (кирпично-красное окрашивание).

При применении тонкослойной хроматографии в качестве сорбентов используют силикагель. Системы растворителей также весьма разнообразны: *n*-бутанол — метиловый спирт — диэтиламин (17 : 1 : 2); хлороформ — метиловый спирт — уксусная кислота (18 : 1 : 1); хлороформ — 25%-ный раствор аммиака (1000 : 1); гексан — ацетон (4 : 1) и др. Хроматограммы обрабатываются парами йода.

Методика качественных реакций. Приготовление извлечения: измельченное растительное сырье заливают 5%-ным раствором уксусной кислоты в соотношении 1 : 10, взбалтывают на вибраторе 40 мин, затем отфильтровывают через бумажный фильтр. К 1 мл извлечения прибавляют несколько капель 1%-ного раствора холестерина в этиловом спирте. Образуется осадок.

§ 5. Количественное определение

Существующие методы количественного определения стероидных алкалоидов можно разделить на следующие группы.

1. *Титрометрические методы.* Гликоалкалоиды хорошо оттитровываются соляной кислотой с диметилвым желтым, а также потенциометрически с сурьмяным или стеклянным электродами. Недостаток титрометрических методов — длительность промывания технических гликоалкалоидов от аммиака.

2. *Методы бромирования.* Гликоалкалоиды, имеющие двойную связь в положении 5, 6, могут количественно бромироваться пиридинсульфатбромидом. Этот метод пригоден только для анализа препаратов соласодина, а не растительного сырья и полупродуктов его производства.

3. *«Сахарные» методы.* После проведения кислого гидролиза гликоалкалоидов и осаждения агликонов проводят титрование отщепившихся сахаров 0,1 н. перманганатом калия. Недостаток «сахарных» методов является то, что некоторые сахара могут выпадать в осадок вместе с «сырыми» гликоалкалоидами и, таким образом, завышать результаты анализа.

4. *Гравиметрические методы.* Эти методы разработаны в основном для препаративных целей и часто комбинируются с колоночной хроматографией. Если метод не комбинируется с предварительным разделением на колонке, то определяется сумма гликоалкалоидов или их агликонов. Схема метода сводится к следующему: гликоалкалоиды экстрагируют из растительного сырья разбавленным раствором H_2SO_4 с последующим осаждением их раствором аммиака. Полученный осадок гликоалкалоидов обрабатывают кипящим этиловым спиртом и гидролизуют разбавленным раствором HCl при кипячении. После подщелачивания агликоны исчерпывающе экстрагируют бензолом. Растворитель отгоняют, остаток высушивают при 120 °С до постоянной массы и взвешивают.

5. *Колориметрические методы.* Хотя стероидные алкалоиды дают реакции окрашивания со многими альдегидами, для количественного определения применяется лишь реакция с формальдегидом в сильноокислой среде (малиново-красное окрашивание), так как окрашивание с другими альдегидами не подчиняется закону Ламберта — Бера.

Методика количественного определения соласодина в траве паслена дольчатого (Herba Solani laciniati) (ОСТ 64-4-118—74). Методика основана на осаждении гликоалкалоидов аммиаком из уксуснокислого извлечения с последующим потенциометрическим титрованием HCl .

30 г (с точностью до 0,01 г) измельченного сырья (сито № 3) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 1,0—1,5 л и заливают 600 мл 5%-ной уксусной кислоты. Колбу с содержимым помещают на нагретую водяную баню и поддерживают внутри колбы температуру 50—60 °С в течение 4 ч при периодическом помешивании. Во избежание испарения колбу закрывают корковой

пробкой, в которую вставляют термометр. Затем уксуснокислое извлечение фильтруют через воронку Бюхнера или складчатый фильтр.

200 мл прозрачного фильтрата помещают в стеклянный стакан вместимостью 400 мл, прибавляют 60 мл 25%-ного раствора аммиака и нагревают на водяной бане до температуры внутри стакана 60—65 °С. Охлаждают на льду в течение 2—3 ч и выпавшие технические гликоалкалоиды отфильтровывают с помощью воронки Бюхнера через двойной бумажный фильтр при слабом отсасывании или через складчатый фильтр. Остатки гликоалкалоидов из стакана количественно переносят на фильтр, смывая стакан маточником или 1%-ным раствором аммиака. Жидкости с фильтра дают полностью стечь, после чего фильтр с гликоалкалоидами высушивают в сушильном шкафу при 80—90 °С (в развернутом виде на чашке Петри). Сухой фильтр с гликоалкалоидами помещают в колбу № 1 вместимостью 250 мл, приливают 100 мл этилового спирта и гликоалкалоиды экстрагируют при нагревании на водяной бане с обратным холодильником в течение 30—40 мин. Затем колбу снимают, этанольный раствор, декантируя, фильтруют через воронку с ватным тампоном в колбу № 2 вместимостью 250 мл. Этиловый спирт отгоняют на водяной бане досуха. В колбу № 1 добавляют этиловый спирт примерно до 100 мл и вновь экстрагируют 30—40 мин. Экстрагирование проводят 3—4 раза, собирая фильтраты в колбу № 2, и отгоняют каждый раз этиловый спирт досуха.

Полноту извлечения гликоалкалоидов устанавливают с помощью раствора формальдегида в серной кислоте или паров иода.

После отгонки четвертой порции остатки этилового спирта выдувают воздухом (при нагревании на водяной бане, под тягой). К сухому остатку примешивают 5—10 мл 1%-ной уксусной кислоты и растворяют гликоалкалоиды при слабом нагревании на водяной бане.

К уксуснокислому раствору гликоалкалоидов приливают 5—10 мл 25%-ного раствора аммиака и нагревают на водяной бане до 60—65 °С. Выпавшие гликоалкалоиды охлаждают в течение 1 ч на льду, жидкость с гликоалкалоидов фильтруют декантацией через складчатый фильтр, промывая гликоалкалоиды небольшими порциями 1%-ного аммиака. (Осадок гликоалкалоидов для лучшей промывки нужно оставлять в колбе).

Промывание проводят до тех пор, пока фильтрат не станет бесцветным. Фильтр и колбу с осадком высушивают досуха в сушильном шкафу при температуре 80—90 °С. Высушенный фильтр с осадком помещают в колбу № 2 и гликоалкалоиды растворяют при нагревании на водяной бане в 100 мл 95%-ного этилового спирта, прибавляя его небольшими порциями в колбу, и переносят раствор в стакан для потенциометрического титрования. Полученный раствор титруют потенциометрически 0,1 н. HCl . В начале титрования прибавляют по 0,5—1 мл 0,1 н. HCl , а когда разность потенциалов достигнет заметной величины — по 0,05 мл.

1 мл 0,1 н. HCl соответствует 0,04137 г соласодина. Процентное содержание соласодина в пересчете на абсолютно сухую массу сырья x вычисляют по формуле

$$x = \frac{V \cdot 0,04137 \cdot 600 \cdot 100 \cdot 100}{m (100 - w) 200},$$

где V — объем 0,1 н. HCl, израсходованный на титрование, мл; m — масса навески воздушно-сухого сырья, г; w — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Содержание соласодина в траве паслена дольчатого должно быть не менее 0,8 %.

1. Раствор формалина в H_2SO_4 готовят смешением 10 мл концентрированной H_2SO_4 с 0,2 мл формалина. Срок хранения не более 1 мес.

2. 2—3 капли последнего этанольного экстракта наносят на фильтровальную бумагу, высушивают и помещают в камеру с парами воды (не должно быть желтого пятна).

Реактивы и оборудование: уксусная кислота 5 и 1%-ная; аммиака раствор 1 и 25%-ный; этиловый спирт (этанол) 95%-ный; H_2SO_4 (конц.); формальдегид; иод; HCl (0,1 н.).

Колбы плоскодонные вместимостью 1,0—1,5 л; стаканы стеклянные вместимостью 500 мл; воронки Бюхнера; колбы Бунзена; чашки Петри; колбы круглодонные с нормальным шлифом вместимостью 250 мл; холодильники обратные стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; установка для отгонки растворителей; стаканы для потенциметрического титрования; бани водяные лабораторные; термометр ртутный стеклянный лабораторный; фильтры бумажные; шкаф сушильный лабораторный; медицинская резиновая груша

Методика определения содержания соласодина в траве паслена дольчатого экспресс-методом. Экспресс-метод предназначен для быстрой оценки образцов паслена для отбора селекционных образцов с содержанием соласодина выше заданного значения. Метод имеет ориентировочное значение. В дальнейшем количественными методами устанавливается точное содержание соласодина. Предварительная оценка проводится при хроматографическом разделении по размеру пятна и интенсивности окраски после проявления.

0,5 г измельченных листьев паслена (сито № 2) помещают в колбу вместимостью 25 мл, заливают 10 мл этилового спирта и экстрагируют с обратным холодильником в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Содержимое колбы фильтруют в горячем виде через стеклянную воронку с плотным тампоном ваты в коническую колбу вместимостью 50 мл. Осадок на фильтре промывают 15 мл этилового спирта (дробно). Фильтрат количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем экстракта доводят спиртом до 25 мл, раствор перемешивают. Отбирают пипеткой из колбы 1 мл раствора и из бюретки добавляют к данной пробе 3 мл этилового спирта (рабочий раствор). Пипеткой наносят 0,005 мл рабочего раствора на пластинку «Силуфол» на расстоянии 1 см от края пластинки. На одну пластинку можно наносить несколько проб. Расстояние между точками нанесения 12—15 мм. Диаметр пятна на старте не должен превышать 5 мм. В качестве контроля используют рабочий раствор из листьев паслена дольчатого, содержащих точно определенное количество соласодина.

Пластинку закрепляют вертикально в камере, погружая нижний край пластинки в растворитель не более чем на 1—2 мм. В качестве подвижной фазы используют систему хлороформ — метиловый спирт — вода (61 : 32 : 7). Для лучшего насыщения с 3 сторон камеры помещают фильтровальную бумагу. Когда растворитель поднимается до верхнего края пластинки, ее вынимают и сушат в течение 5 мин в сушильном шкафу при 100 °С. Пластинку охлаждают на воздухе в течение 2—3 мин, равномерно опрыскивают 20%-ной H_2SO_4 в этиловом спирте. Пластинку высушивают в течение 2—3 мин на воздухе и помещают в открытый сушильный шкаф при 100 °С на 2—3 мин до появления малиновых пятен. Хроматограмму закрывают стеклом и визуально сравнивают размер и интенсивность окраски пятен анализируемых и контрольных образцов. Через 20—30 мин, когда пятна начинают исчезать, хроматограмму просматривают повторно (рис. 33). Контрольный экстракт, из которого готовят рабочий раствор, можно хранить в плотно закрытой колбе в холодильнике 1 мес (если не образуется осадок).

Реактивы и оборудование: этиловый спирт (этанол) 95%-ный; метиловый спирт (метанол); хлороформ; H_2SO_4 (конц.); вода дистиллированная

Пластинки «Силуфол»; колбы плоскодонные с нормальным шлифом вместимостью 25 мл; холодильники обратные стеклянные лабораторные с нормальным шлифом; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; колбы конические вместимостью 25 и 50 мл; колбы мерные вместимостью 25 мл; микропипетка измерительная вместимостью 0,01 мл; пульверизатор стеклянный герметический; камера хроматографическая для ТСХ; шкаф сушильный лабораторный; бани водяные лабораторные; плитка электрическая бытовая; бюретки вместимостью 10 мл; вата гигроскопическая.

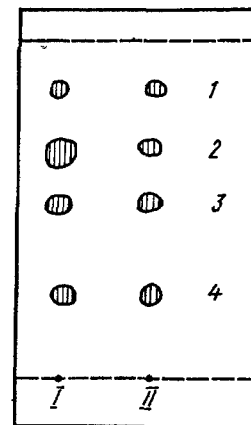


Рис. 33. Схема (ТСХ) стероидных соединений листьев паслена дольчатого:

I — рабочий раствор из листьев анализируемого образца паслена дольчатого; II — «контроль» — рабочий раствор из листьев паслена дольчатого, содержащего определенное количество соласодина; 1 — диосгенин; 2 — соласодин; 3 — глицоалкалоиды

Вопросы для подготовки

1. Определение гликоалкалоидов (стероидных алкалоидов).
2. На какие группы делятся гликоалкалоиды? Примеры формул для каждой группы:
3. Физические свойства гликоалкалоидов.
4. Химические свойства гликоалкалоидов.
5. Методы обнаружения гликоалкалоидов в растительном сырье.
6. Способы выделения гликоалкалоидов из растительного сырья.
7. Методы количественного определения гликоалкалоидов в растительном сырье
8. Ориентировочное определение соласодина в листьях паслена дольчатого.
9. Формула соласодина. Основные этапы количественного определения соласодина в траве паслена дольчатого по ОСТ 64-4-118—74.

Литература

- Трава паслена дольчатого резаная. ОСТ 64-4-118—74.
Азаркова А. Ф., Коган Л. М. Экспресс-метод оценки селекционных образцов паслена дольчатого на содержание соласодина. — Хим.-фарм. журнал, 1976, № 1, с. 104—106.
Прашурович А. К., Борискова Е. И., Субботина А. П. — В сб.: Результаты научных исследований по стероидсодержащим и другим лекарственным растениям, 1975, 7, — М: ВИЛР, с. 62—65.

ГЛАВА 12. ЭКСТРАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ВЛАГА, ЗОЛА

§ 1. Определение экстрактивных веществ

Экстрактивными веществами лекарственного растительного сырья условно называют комплекс органических и неорганических веществ, извлекаемых из растительного сырья соответствующим растворителем и определяемых количественно в виде сухого остатка.

Содержание экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье — важный числовой показатель, определяющий его доброкачественность, особенно для тех видов сырья, у которых количественное определение действующих веществ не проводится.

В зависимости от химического состава лекарственного растительного сырья и используемого растворителя в извлечение переходят те или иные действующие и сопутствующие вещества.

Растворитель, который следует брать при определении экстрактивных веществ, указан в соответствующей НТД на данный вид сырья. Обычно это тот же растворитель, который применяют при приготовлении настойки или экстракта из этого сырья. Чаще всего это этиловый спирт (40 или 70%-ный) или вода.

Методика количественного определения экстрактивных веществ. 1 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу, приливают 50 мл растворителя, указанного в НТД на данный вид сырья. Колбу закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают до кипения и поддерживают слабое кипение жидкости в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе дополняют тем же растворителем. Содержимое тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150—200 мл. 25 мл фильтрата переносят в фарфоровую чашку диаметром 7—9 см, предварительно высушенную при 100—105 °С до постоянной массы и взвешенную на аналитических весах, выпаривают на водяной бане досуха, сушат при температуре 100—105 °С в течение 3 ч, затем охлаждают в эксикаторе и быстро взвешивают.

Процентное содержание экстрактивных веществ x в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле

$$x = \frac{m \cdot 200 \cdot 100}{m_1 (100 - w)},$$

где m — масса сухого остатка в чашке, г; m_1 — масса сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Реактивы и оборудование растворители (этиловый спирт различной концентрации или др. см. НТД), CaCl_2 (плавлен).

Эксикатор; колбы конические вместимостью 150—200 мл; колбы конические с нормальным шлифом вместимостью 250 мл; холодильник обратный стеклянный лабораторный с нормальным шлифом; воронки стеклянные для фильтрации диаметром 5 см; бумага фильтровальная; чашки фарфоровые диаметром 7—9 см; весы лабораторные аналитические; весы ручные; бани водяные лабораторные; шкаф сушильный лабораторный; пипетки измерительные вместимостью 25 мл; сита с диаметром отверстий 1 мм; бюксы с притертой крышкой; штативы лабораторные; ступка фарфоровая с пестиком; электрокофемолка бытовая.

§ 2. Определение влаги в лекарственном растительном сырье

Под влагой сырья понимают потерю в массе сырья за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую обнаруживают при высушивании сырья до постоянной массы.

Содержание влаги в лекарственном растительном сырье служит одним из числовых показателей, характеризующих его доброкачественность. Лекарственное растительное сырье не должно содержать влаги выше допустимых норм, так как при повышенной влажности при хранении создаются условия, способствующие снижению его качества.

Для большинства видов лекарственного растительного сырья допустимый предел влажности обычно 12—15 %.

Методика определения влажности лекарственного растительного сырья.

3—5 г (с погрешностью не более 0,1 г) сырья, измельченного до размера частиц около 10 мм, помещают в предварительно высушенный и взвешенный бюкс. Бюкс с навеской (вместе со снятой крышкой) ставят в нагретый до 100—105 °С сушильный шкаф. При этом температура в шкафу падает. Время, в течение которого сырье должно сушиться, отсчитывают с момента, когда температура в шкафу вновь достигнет 100—105 °С.

Первое взвешивание для листьев, трав и цветков проводят через 2 ч; для корней, корневищ, кор, плодов, семян и других видов сырья — через 3 ч. Сырье высушивают до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает 0,01 г.

Определение влаги сырья для пересчета содержания действующих веществ в абсолютно сухом сырье проводят в навесках 1—2 г (точная навеска), взятых из аналитических проб, предназначенных для определения содержания золы и действующих веществ выше описанным методом, но при разнице между взвешиваниями, не превышающей 0,0005 г.

Процентное содержание влаги в сырье x вычисляют по формуле

$$x = \frac{(m - m_1) 100}{m},$$

где m — масса навески сырья до высушивания, г; m_1 — масса навески сырья после высушивания, г.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0,5 %.

Реактивы и оборудование: CaCl_2 (плавлен.); эксикатор, бюксы с притертой крышкой, щипцы тигельные; весы ручные; весы лабораторные аналитические; шкаф сушильный лабораторный, ножницы.

§ 3. Определение золы в лекарственном растительном сырье

Золой растительного сырья называют остаток неорганических веществ, получаемый после сжигания сырья и последующего прокаливания остатка до постоянной массы.

Зола растений (общая зола) состоит из смеси различных неорганических веществ, находящихся в самом растении (свойственных растению), и минеральных примесей (земля, песок, камешки, пыль), которые могут попасть в сырье при сборе и сушке.

Количество золы в растительном сырье колеблется в определенных пределах и зависит как от специфики самого сырья, так и способа его сбора и условий сушки. Значительные отклонения от указанных в НТД норм обычно свидетельствуют о загрязнении сырья минеральной примесью или о несвоевременном сборе сырья и др.

В золе чаще всего содержатся следующие элементы: K, Na, Mg, Ca, Fe, C, Si, P, реже и в меньшем количестве Cu, Mn, Al и др.

Эти элементы находятся в золе в виде оксидов или солей угольной, фосфорной, серной и других кислот.

При определении содержания золы необходимо помнить, что результаты зависят от длительности и температурного режима всего процесса озоления. Первое, на что следует обратить внимание, — это полнота сжигания. При быстром сжигании и высокой температуре может произойти сплавление частичек золы: сплавленные частички захватывают и покрывают собой несгоревшие еще частички сырья, в результате чего озоление проходит не полностью. На результат анализа влияют также длительность и температура прокаливания остатка, полученного после сгорания сырья. При нарушении температурного режима возможны изменения состава золы. Для того чтобы провести полное озоление растительного сырья, его следует проводить вначале при небольшом пламени горелки. После прекращения выделения газов температуру можно немного повысить, крышку тигля открыть. Затем тигель с обуглившимся сырьем переносят в муфельную печь.

В растительном сырье проводится определение золы общей и золы, нерастворимой в 10%-ной HCl , которая представляет собой остаток после обработки общей золы HCl и состоит в основном из силикатов, являющихся для некоторых объектов естественной составной частью, но чаще результатом загрязнения сырья песком,

землей и камешками. Таким образом, повышенное содержание нерастворимой в соляной кислоте части золы указывает на значительное содержание в растительном сырье минеральной примеси.

Методика определения содержания золы. 1—3 г (при определении только общей золы) и 5 г (при определении общей золы и золы, нерастворимой в 10%-ной HCl) измельченного сырья (точная навеска), проходящего сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в предварительно прокаленный до постоянной массы фарфоровый тигель и равномерно распределяют по дну тигля. Навеску сырья в тигле осторожно обугливают над слабым пламенем газовой горелки, стараясь, чтобы конец пламени не касался дна тигля, или на электроплитке. В этом случае на нее помещают асбестовую сетку, на которую устанавливают тигли с навесками.

После полного обугливания сырья тигли переносят в муфельную печь для сжигания угля и полного прокаливания остатка. Прокаливание ведут при красном калении (550—650 °C) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания несколько остывшие, но еще горячие тигли ставят в эксикатор, охлаждают и взвешивают. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями не превышает 0,0005 г.

Если после охлаждения остаток еще содержит частицы угля, то добавляют несколько капель пероксида водорода, концентрированной HNO_3 или 10%-ного нитрата аммония, выпаривают под тягой на водяной бане и вновь прокаливают до тех пор, пока остаток не станет белым или примет равномерную окраску.

Для определения содержания золы, нерастворимой в 10%-ной HCl , в тигель с общей золой приливают 10 мл 10%-ной HCl , тигли покрывают часовыми стеклами и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем снимают их и после остывания содержимое фильтруют через беззольный фильтр; тигель, часовое стекло и фильтр промывают дистиллированной водой до прекращения появления муты в промывных водах от капли 2%-ного AgNO_3 . Тигли и фильтры высушивают, фильтры осторожно сжигают в тиглях, после чего прокаливают до постоянной массы.

Процентное содержание общей золы x_1 в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{m_1 \cdot 100 \cdot 100}{m_2 (10 - w)},$$

где m_1 — масса золы, г; m_2 — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Процентное содержание золы, нерастворимой в 10%-ной HCl x_2 , в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле

$$x_2 = \frac{(m_1 - m) \cdot 100 \cdot 100}{m_2 (100 - w)},$$

где m_1 — масса золы, г; m — масса золы фильтра (если зола последнего более 0,002 г); m_2 — масса навески сырья, г; w — потеря в массе сырья при высушивании, %.

Реактивы и оборудование: HCl 10%-ная; H₂O₂, HNO₃, AgNO₃, NH₄NO₃; вода дистиллированная; CaCl₂ (плавлен.).

Фильтры беззольные; тигли фарфоровые; эксикатор; печь муфельная; электроплитка бытовая; баня водяная лабораторная; щипцы тигельные; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 5 см; весы ручные; весы лабораторные аналитические; стекла часовые; сита с диаметром отверстий 1 и 2 мм.

Вопросы для подготовки

1. Что такое экстрактивные вещества растительного сырья?
2. Какие растворители используются при определении содержания экстрактивных веществ?
3. Сущность методики определения содержания экстрактивных веществ в растительном сырье.
4. В каких видах лекарственного растительного сырья чаще всего определяют содержание экстрактивных веществ?
5. Что такое влага лекарственного растительного сырья?
6. В каких случаях и с какой точностью определяют содержание влаги (потеря в массе сырья при высушивании)?
7. Сущность методики определения влажности лекарственного растительного сырья.
8. Влияние на качество сырья отклонений содержания влаги от нормы, указанной в соответствующей НТД.
9. Что такое зола растительного сырья?
10. Что такое зола, нерастворимая в 10%-ной HCl?
11. Сущность методики определения общей золы и золы, нерастворимой в 10%-ной HCl.
12. От чего зависит содержание золы в растительном сырье?

Литература

Государственный стандарт Союза ССР. Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб. ГОСТ 24027.0—80. — М.: Изд-во стандартов, 1980.

Государственный стандарт Союза ССР. Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла. ГОСТ 24027.2—80. — М.: Изд-во стандартов, 1980.

ОБЩАЯ ЛИТЕРАТУРА

Муравьева Д. А. Фармакогнозия. — М.: Медицина, 1978.

Государственная фармакопея СССР. X-е изд. — М.: Медицина, 1968.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение. Подготовка растительного сырья для анализа	5
Глава 1. Витамины	5
§ 1. Классификация	6
§ 2. Физико-химические свойства	7
§ 3. Качественное определение	8
§ 4. Количественное определение	9
Вопросы для подготовки	12
Литература	12
Глава 2. Эфирные масла	12
§ 1. Классификация	13
§ 2. Физико-химические свойства	16
§ 3. Методы получения	17
§ 4. Анализ растительного сырья	18
§ 5. Анализ эфирного масла	20
Вопросы для подготовки	27
Литература	27
Глава 3. Сердечные гликозиды	27
§ 1. Классификация	29
§ 2. Физико-химические свойства	30
§ 3. Методы выделения	31
§ 4. Качественное определение	32
§ 5. Количественное определение	33
Вопросы для подготовки	41
Литература	41
Глава 4. Сапонины	41
§ 1. Классификация	42
§ 2. Физико-химические свойства	44
§ 3. Методы выделения	44
§ 4. Качественное определение	47
§ 5. Количественное определение	49
Вопросы для подготовки	56
Литература	56
Глава 5. Фенологликозиды и флороглюциды	56
Фенологликозиды (гликозиды простых фенолов)	56
§ 1. Классификация	57
§ 2. Физико-химические свойства	57
§ 3. Методы выделения и идентификация	58
§ 4. Качественное определение	59
§ 5. Количественное определение	60
Флороглюциды	61
§ 6. Классификация	61
§ 7. Физико-химические свойства флороглюцидов	63
§ 8. Методы выделения и идентификация	63
§ 9. Качественное определение	64
§ 10. Количественное определение	65
Вопросы для подготовки	67
Литература	67
Глава 6. Антраценпроизводные и их гликозиды	67
§ 1. Классификация	67
§ 2. Физико-химические свойства	71
§ 3. Методы выделения и идентификация	72

§ 4. Качественное определение	74
§ 5. Количественное определение	78
Вопросы для подготовки	81
Литература	82
<i>Глава 7. Флавоноиды</i>	<i>82</i>
§ 1. Классификация	83
§ 2. Физико-химические свойства	84
§ 3. Методы выделения и идентификация	85
§ 4. Качественное определение	86
§ 5. Количественное определение	89
Вопросы для подготовки	93
Литература	93
<i>Глава 8. Кумарины</i>	<i>94</i>
§ 1. Классификация	94
§ 2. Физико-химические свойства	97
§ 3. Методы выделения	100
§ 4. Качественное определение	101
§ 5. Количественное определение	103
Вопросы для подготовки	110
Литература	110
<i>Глава 9. Дубильные вещества</i>	<i>111</i>
§ 1. Классификация	111
§ 2. Физико-химические свойства	115
§ 3. Методы выделения и идентификация	117
§ 4. Качественное определение	118
§ 5. Количественное определение	119
Вопросы для подготовки	122
Литература	122
<i>Глава 10. Алкалоиды</i>	<i>122</i>
§ 1. Классификация	123
§ 2. Физико-химические свойства	131
§ 3. Методы выделения	132
§ 4. Качественное определение и идентификация	136
§ 5. Количественное определение	145
Вопросы для подготовки	161
Литература	162
<i>Глава 11. Гликоалкалоиды</i>	<i>162</i>
§ 1. Классификация	163
§ 2. Физико-химические свойства	164
§ 3. Методы выделения	164
§ 4. Качественное определение	165
§ 5. Количественное определение	166
Вопросы для подготовки	169
Литература	170
<i>Глава 12. Экстрактивные вещества, влага, зола</i>	<i>170</i>
§ 1. Определение экстрактивных веществ	170
§ 2. Определение влаги в лекарственном растительном сырье	171
§ 3. Определение золы в лекарственном растительном сырье	172
Вопросы для подготовки	174
Литература	174
Общая литература	174