

Лабораторне заняття № 8

Комплекси БАР з вуглеводами. Кардіостероїди.

МЕТА ЗАНЯТТЯ: навчитися проводити експрес-аналіз комплексу БАР з вуглеводами у свіжій лікарській рослинній сировині (ЛРС), навчитись проводити якісний та кількісний аналіз ЛРС на вміст кардіостероїдів (серцевих глікозидів), ознайомитися з ЛР, які ростуть на території України.

Частина 1

Тема: Сполуки з глікозидним зв'язком. Полісахариди. Глікозиди

Питання для самопідготовки:

1. Комплекси БАР з вуглеводами. Полісахариди.
2. Глікозиди, визначення та класифікація.
3. Фізико-хімічні властивості глікозидів.
4. Методи якісного та кількісного аналізу глікозидів у рослинній сировині.
5. Розповсюдження в рослинному світі. Біогенез.
6. Біологічна дія, представники. Рослини, які містять ці сполуки. Біологічні властивості та застосування в медицині.
7. Біологічна дія сірковмісних та ціаногенних глікозидів.

Теоретична довідка:

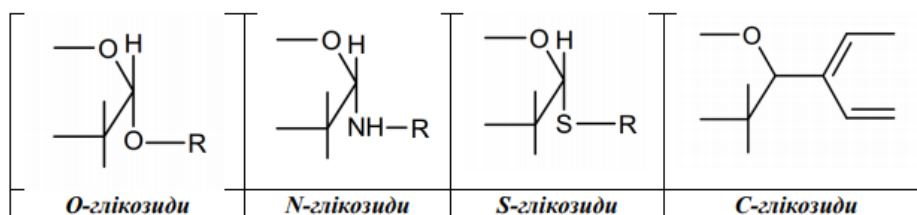
Полісахариди ($C_nH_{2n-2}O_{n-1})_m$ або **глікани** — природні полімерні високомолекулярні вуглеводи, побудовані з моносахаридів, з'єднані глікозидними зв'язками і утворюють лінійні або розгалужені ланцюги. Полісахариди поділяють на гомополісахариди, що побудовані з одного сахару, і гетерополісахариди, до складу яких входять залишки різних моносахаридів (від двох до шести). Найпоширеніші з рослинних полісахаридів: гексози — глюкоза, галактоза, маноза, галактуронова кислота; пентози — арабіноза, ксилоза; поширені також дезоксигексози — рамноза, фруктоза; 2-аміносахари — глюкозамін, галактозамін. Багато поліолів мають замітники неуглеводної природи — залишки сірчаной або фосфорної, органічних кислот, найчастіше оцтової. Полісахариди можуть з'єднуватися ковалентними зв'язками з природними полімерами інших видів. Такі речовини називають змішаними полісахаридами. Крім вуглеводневої частини вони мають білковий або ліпідний компонент, наприклад, нуклеїнові кислоти і глікопротеїни, що містять поліглікозидні та поліпептидні ланцюги, ліпополісахариди, які побудовані з компонентів вуглеводневої і ліпідної природи, тощо. Назва полісахариду походить від назви відповідного моносахариду із зміною суфіксу -оза на -ан. Наприклад, полісахарид, який побудований із залишків D-манози, має назву D-манан; із залишків D-галактози і D-манози, — D-галакто-D-манан. Систематичної хімічної номенклатури полісахаридів досі немає. На цей час більшість притримується класифікації, що базується на хімічному складі і будові полісахаридів. Глікани поділяються на групи відповідно до хімічного складу і будови основного нерозгалуженого, найбільш довгого ланцюга. Якщо макромолекула містить великі ланцюги неуглеводневої будови (білковий, ліпідний та ін.), то відповідні сполуки виділяються в окрему групу (схема). Традиційно біологічно активні поліози класифікують за їх фізичними властивостями на камеді, слизи і пектинові речовини без урахування хімічної структури. Деякі полісахариди, крім того, мають тривіальні назви: гомоглікани — клітковина, крохмаль, амілоза, інулін, хітин; гетероглікани — хондріотин, пектин, гепарин тощо. Поліуронідами називають полісахариди, що побудовані з залишків уронових кислот, геміцелюлозами — полісахариди, що супроводжують целюлозу; мукополісахариди побудовані із залишків аміносахарів і уронових кислот тощо.

З лікувальною метою використовують рослинні полісахариди (крохмаль, інулін, агар, карагінан), витяжки з ЛРС, багаті полісахаридами (слиз кореню алтеї), комплексні препарати з деяких вищих рослин та водоростей (плантаглюцид, мукалтин, ламінарид).

Глікозиди — поширена форма природних органічних сполук, молекули яких складаються з сахарної (глікон) та несахарної (аглікон, або генін) частин, що з'єднані між собою через гетероатом кисню, азоту, сірки чи вуглецю. Назва сполук походить від грецьк. «glykys» — солодкий і «eidos» — вигляд, що вказує на присутність сахару в молекулі глікозиду.

Різноманітність глікозидів залежить від типу зв'язку між агліконом і сахаром, від структури глікону та природи геніну. Все це відображено у системах їх класифікації. Класифікація за типом зв'язку. Напівацетальний (глікозидний) гідроксил циклічної форми моносахариду різко відрізняється від інших гідроксильних груп значною схильністю до реакцій нуклеофільного заміщення. Такі реакції за участю ферментів глікозилтрансфераз призводять до утворення своєрідних простих ефірів, які називаються глікозидами. Якщо протон H^+ аномерного гідроксилу замінюється на фенольний або спиртовий радикал

(R), виникають O-глікозиди. Якщо сахара взаємодіють з амінами, то утворюються N-глікозиди. З меркаптанами отримуємо S-глікозиди (тіоглікозиди, або глікозинолати). У випадку, коли вуглець сахару безпосередньо приєднується до вуглецю аглікону, утворюються C-глікозиди.



Відомі глікозиди, в яких один сахар приєднаний до аглікону глікозидним O-зв'язком, а другий — безпосередньо до вуглецю аглікону. Такі глікозиди називають O-C-глікозидами. Найбільш поширені O-глікозиди. C-глікозиди досліджені тільки для флавоноїдів і ксантонів з рослин, які відносяться до родин Rosaceae, Crassulaceae, Fabaceae, Saxifragaceae.

Класифікація за структурою глікону. До складу глікозидів найчастіше входять D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-арабіноза. Деякі глікозиди містять дезоксисахари, в молекулі яких одна чи декілька гідроксильних груп заміщені атомами водню (наприклад, D-рамноза, L-фукоза, D-дигітоксоза, D-цимароза). Глікозиди можуть містити уранові кислоти, наприклад D-глюкуронову кислоту в глікозидах солодки.

Залежно від кількості залишків моносахаридів існують моно-зиди, або моноглікозиди (один залишок сахару); біозиди, або диглікозиди (два залишки сахару); триозиди, або триглікозиди (три залишки сахару), іолігозиди. Глікозиди з двома залишками моносахаридів, що з'єднані між собою в ланцюг, називають біозидами, а диглікозид має два сахара, що приєднані до молекули аглікону в різних положеннях.

Залежно від конфігурації глікозидного зв'язку розрізняють α - і β -глікозиди. При утворенні глікозидів виникає новий асиметричний глікозидний центр. Його конфігурацію позначають буквами α - і β -. Для прикладу наводимо формули α - і β -ізомерів метил-D-глюкопіранозиду.

Залежно від розміру циклу вуглеводного залишку глікозиди поділяють на фуранозиди і піранозиди.

За назвою моносахаридів, які входять до молекули глікозиду, бувають глюкозиди, галактозиди, галактуронозиди (галактуренова кислота) тощо.

Класифікація за будовою геніну. Залежно від природи аглікону глікозиди поділяються на чотири групи: аліфатичні глікозиди — глікозиди жирних кислот, жирних спиртів і гліцерину; аліциклічні глікозиди — карденоліди та буфадієноліди, тритерпенові та стероїдні сапоніни, моно-, ди- та сесквітерпенові глікозиди, глікоалкалоїди; ароматичні глікозиди — антраглікозиди, фенольні глікозиди, глікозиди кумаринів, флавоноїдів та ряд інших; гетероциклічні глікозиди — нуклеотиди, нуклеозиди та інші.

Навчальні завдання

Сировина для гістохімічного дослідження: картопля, банан, мальва, лілія, льон, мати-й-мачуха, алтея, подорожник, ламінарія, цикорій, оман, ехінацея, кульбаба тощо.

Завдання 1. Гістохімічні реакції на крохмаль.

Зріз лікарської рослинної сировини вміщують в краплину розчину Люголю, накривають покривним склом і спостерігають у мікроскопі. Крохмальні зерна забарвлюються в синій або фіолетовий колір.

Завдання 2. Гістохімічні реакції на інулін.

На поперечний зріз лікарської рослинної сировини наносять 2-3 краплини 20% спиртового розчину α -нафтолу і краплину концентрованої сірчаної кислоти; з'являється фіолетово-рожеве забарвлення; при заміні α -нафтолу на резорцин — червоне, α -тимол — рожево-малинове забарвлення.

Завдання 3. Реакція на слиз.

1. З метиленовим синім.

Зріз вміщують на декілька хвилин в розчин метиленового синього у спирті (1:5000), а потім переносять у гліцерин; слиз забарвлюється в блакитний колір (спостереження ведуть у мікроскопі).

2. Із сульфатом міді та лугом.

Зріз вміщують на 10-15 хвилин у насичений розчин міді сульфату, промивають водою і переносять у 50%-й розчин калію гідроксиду; слиз забарвлюється у блакитний колір (рослини родини мальвових) або в зелений (рослини родини лілійних).

3. З тушию.

Суміш туші і води (1:9) готують у міру потреби. Досліджуваний порошок розмішують в 1-2 краплях цієї суміші; на темно-сірому полі зору між невиразно розрізняваними часточками досліджуваного порошку виділяються білими острівцями скловидні безструктурні грудки слизу, які поступово розбухають і розтікаються внаслідок розчинності слизу у воді (мікрохімічна реакція).

Завдання 4. Реакція на чисту клітковину з хлор-цинк-йодом.

Зріз поміщають на предметне скло в краплю води, розправляють і воду відсмоктують фільтрувальним папером. Краплю реактиву наносять на зріз і накривають покривним склом. У мікроскопі спостерігають синьо-фіолетове або лілове забарвлення оболонок клітин, які побудовані з чистої клітковини (деревина забарвлюється в у жовтий колір).

Завдання 5. Якісне визначення фенолглікозидів в лікарській рослинній сировині.

Сировина: бадан, мучниця (толокнянка), листя брусниці.

Приготування витягу: водний витяг з сировини (1:10).

1 г сировини кип'ятять з 10 мл води 2-3 хвилини, охолоджують, фільтрують.

Реакції:

1. До 1 мл витягу додають кристал сульфату заліза (II). За наявності фенолглікозидів з'являється бузкове забарвлення, яке переходить у фіолетове, далі утворюється темно-фіолетовий осад (арбутин).

2. До 1 мл фільтрату (у фарфоровій чашці) додають 4 мл 10% розчину гідроксиду амонію (аміаку) і нашаровують по стінках 1 мл 10% розчину фосфорномолібдату натрію в 10% хлоридній кислоті. За наявності фенолглікозидів з'являється синє забарвлення, яке переходить в зелене (арбутин).

Зробіть висновки.

Частина 2.

Тема: Кардіостероїди.

Перелік питань для самопідготовки:

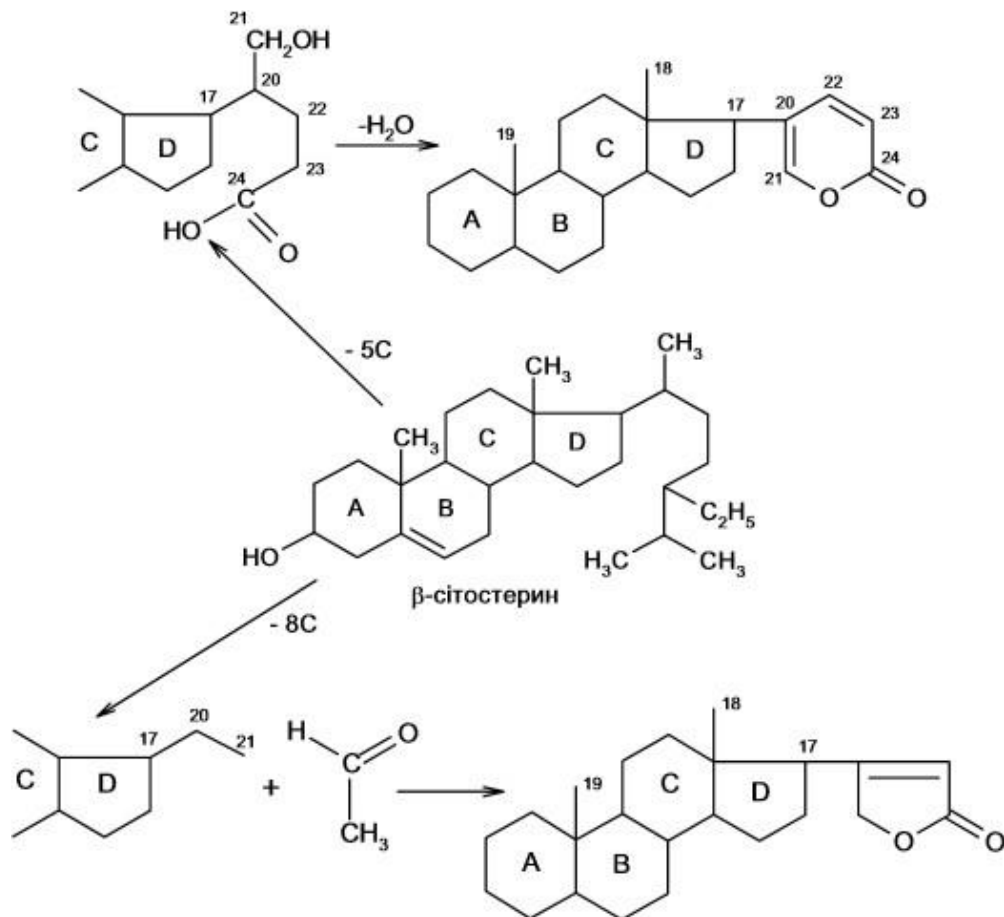
1. **СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ.** Визначення та класифікація, фізико-хімічні властивості.
2. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук у рослинній сировині.
3. Біологічна дія.
4. Біогенез.
5. Представники. Розповсюдження. Рослини, які містять ці сполуки.
6. Біологічні властивості та застосування в медицині.

Навчальні завдання:

ЗАВДАННЯ 1. Виконайте лабораторну роботу (див. додаток): виділення та якісні реакції

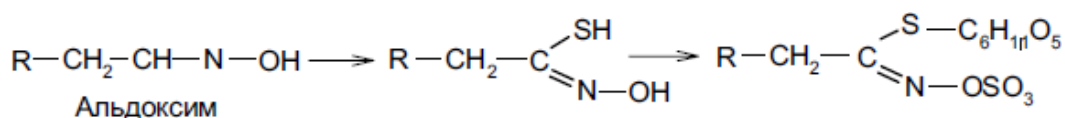
ЗАВДАННЯ 2. Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть загальну схему метаболізму утворення серцевих глікозидів / тіо- /ціаноглікозидів із зазначенням проміжних продуктів.

СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ Вважають, що обидва типи кардіостероїдів утворюються з β -сітостерину за рахунок зміни структури бічного ланцюга у C-17.



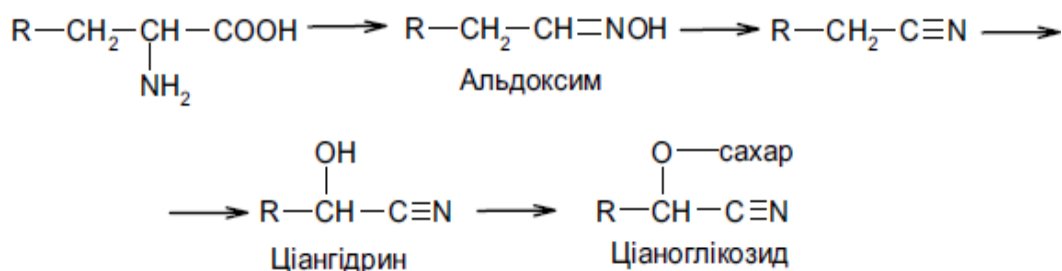
Розгляньте біогенез тіоглікозидів

Вихідними речовинами у біогенезі даних сполук вважають амінокислоти: фенілаланін, триптофан, лейцин, гомометіонін, 2-аміно-4-фенілмасляну кислоту та ін. Перші стадії біосинтезу тіоглікозидів схожі з такими ж у ціаноглікозидів, що є доказом спорідненості між ними. Загальним як для тіо-, так і для ціаноглікозидів є утворення альдоксиму з відповідної амінокислоти.



Розгляньте біогенез ціаноглікозидів

Біосинтетичними попередниками ціаноглікозидів є амінокислоти валін, ізолейцин, фенілаланін, тирозин та ін. Через декарбоксілювання, дегідрування, гідроксилювання, з них утворюються гідроксинітрили (ціангідрини), які в подальшому глікозилуються:



Завдання 3. Проаналізуйте зв'язок між хімічною будовою та фармакологічною дією серцевих глікозидів. Зазначте основні особливості.

Різноманітність дії (терапевтичної і токсичної) стероїдних лактонів зумовлена декількома особливостями їх будови. По-перше значення має природа лактонного кільця у С-17, далі — наявність замісників, подвійних зв'язків, природа вуглеводного компонента, стереохімічні особливості молекули.

У медицині знайшли застосування серцеві глікозиди 12 агліконів. Шість із них (гітоксигенін, дигітоксигенін, дигоксигенін, дигінатигенін, олеандрогенін й периплогенін) у С-10 містять метильний радикал, що зумовлює **кумулятивний ефект**. Два аглікони — строфантидол та убагенін у С-10 мають метоксильну групу; чотири аглікони — альдегідну групу (адонітоксигенін, строфантин, канногенін та геллебрігенін). Глікозиди з карбоксильною групою у С-10 положенні втрачають **кардіотонічну дію**.

Зміна орієнтації лактонного кільця з 17β- на 17α-конфігурацію, відновлення його подвійного зв'язку або утворення ізокарденолідів призводить до різкого **зниження кардіотонічної активності**.

Суттєвий вплив на біологічну активність має конформація стероїдного ядра, кількість, природа та положення замісників у ньому.

Глікозиди з **цис-сполученням кілець А і В активніші**, ніж транс-форми. Гідроксильна група у С-11α і С-12β положеннях **підвищує біологічну активність**, а у С-7β- або С-16β- положеннях — знижує її.

Порівняння ряду глікозидів з однаковим агліконом і різними сахарами доводить, що природа вуглеводного залишку суттєво впливає на біологічну активність. Глікозиди з сахарним залишком **L-ряду значно активніші** за глікозиди із залишком D-ряду. Біологічна активність агліконів буфадієнолідного ряду вища, але дія їх короткочасніша. **Монозиди** буфадієнолідів менш активні, ніж карденолідів, а **біозиди**, навпаки, активніші у буфадієнолідів.

Найбільшу кардіотонічну активність мають серцеві глікозиди, які конформаційно найменш стабільні. Кардіостероїди з трансконфігурацією кілець А/В у 3,3 раза менш активні за глікозиди, що мають цис-конфігурацію. І навпаки, у разі цис-конфігурації С/ D кілець серцевих глікозидів активність їх значно вища, ніж при транс-конфігурації.

Малоактивні карденоліди і буфадієноліди, які у структурі містять карбоксильні групи. Активність кардіостероїдних агліконів залежить від ступеня їх полярності: **чим вищий ступінь полярності, тим вища активність**. Підвищує активність і знижує кумуляцію альдегідна група при С-10.

Завдання 4. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить серцеві глікозиди /глікозиди та узагальніть результати у вигляді таблиці.

Якісний аналіз ЛРС, яка містить серцеві глікозиди

Група реакцій	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)
На стероїдне ядро	Лібермана-Бурхарда		
	з реактивом Чугаєва		
	Розенгейма		
На ненасичене лактонне кільце 5-членне	Кедде		
	Легаля		
	Раймонда		
	Бальє		
На 6-членне лактонне кільце	Тат'є		
На вуглеводний компонент	Келлера-Кіліані		
	Реакція з ксантгідролом		

З реактивом Фелінга		
Реакція Пезеца		
Реакція з нітрофенілгідразином та натрію гідроксидом		

Завдання 5. Проаналізуйте методи кількісного аналізу ЛРС, яка містить серцеві глікозиди. Розгляньте методику в представленому нижче завданні, розрахуйте R_f для типової хроматограми.

Див. метод.вказівки (хід роботи) та презентацію (хроматограми).

Зробіть висновки.

Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Серцеві глікозиди"

Мета роботи: показати на прикладі серцевих глікозидів спільність біогенезу, структурні розбіжності і функціональні особливості цих з'єднань; навчити проводити якісний аналіз серцевих глікозидів у рослинах; розібрати кількісний аналіз серцевих глікозидів у рослинній сировині.

Серцевими глікозидами називають глікозиди, агліконом котрих є похідні циклопентанопергідрофенантрону, які містять в становищі 17 ненасичене п'ятичленне або шестичленне лактонне кільце, що специфічно діють на серцевий м'яз. Серцеві глікозиди до цих пір не мають собі рівних синтетичних замінників; рослини служать єдиним джерелом їх одержання. Дія серцевих глікозидів виявляється у зміні всіх основних функцій серця.

При виділенні серцевих глікозидів використовуються органічні розчинники (етиловий, метиловий спирти), які не викликають гідролізу серцевих глікозидів. Якщо потрібно одержувати не нативні, а вторинні глікозиди, то попередньо проводять ферментативний гідроліз.

Виділення серцевих глікозидів з рослинної сировини можна розділити на такі етапи: 1) екстракція серцевих глікозидів з рослинної сировини; 2) очищення отриманого витягу; 3) розподіл суми серцевих глікозидів; 4) перекристалізація і виділення індивідуальних серцевих глікозидів.

Основне ускладнення при виділенні серцевих глікозидів полягає у тому, що це вкрай лабільні сполуки, а тому найменше порушення в температурному режимі приводить до їх руйнування.

Якісне визначення серцевих глікозидів

Незважаючи на відсутність строго специфічних реакцій, застосування наступного комплексу проб дозволяє зробити висновок про наявність серцевих глікозидів. Якісні реакції проводяться або з індивідуальними речовинами, або з очищеним витягом із рослинної сировини. Для цього декілька крапель витягу випарюють на годинному склі або у випарювальній чашці, а сухий залишок розчиняють у потрібному розчиннику.

Всі реакції на серцеві глікозиди можна розділити на 3 групи: 1) реакції на вуглеводну частину молекули (2-дезоксисахара) реакція Келлер - Кіліані; 2) реакції на стероїдне ядро (реакція Лібермана - Бурхарда; реакція Розенгейма та ін.); 3) Реакції на лактонне ненасичене кільце. Для встановлення наявності п'ятичленного лактонного кільця проводять реакції: Легаля (із нітропрусидом натрію); Раймона (із м-динітробензойною кислотою), Кедде (3,5-динітробензойною кислотою); Бал'є (із пікриною кислотою). Реакції проводяться в лужному середовищі. На шестичленне лактонне кільце не знайдені достатньо

специфічні реактиви. Для виявлення буфадієнолідів на хроматограмах використовують 20 %-ний розчин трихлориду стибію в хлороформі.

Методи виділення і якісного визначення глікозидів серцевої дії в рослинах за методикою ВІЛАРА

Приготування витягу: наважку в 5 г здрібненої сировини поміщають у конічну колбу, заливають 50 мл 80 %-ного етилового спирту і залишають до наступного дня. Спирт відганяють під вакуумом, водяний залишок промивають у ділильній лійці тетрахлоридом вуглеця 5 разів по 10 мл. Серцеві глікозиди екстрагують сумішшю хлороформ - ізопропіловий спирт (3:1) 4 рази по 10 мл. До отриманого витягу додають 2 г безводного Na_2SO_4 , дають постояти 3-5 хвилин, а потім відфільтровують через паперовий фільтр.

Якісні реакції

1. *Реакція Келлер - Кіліані.* Готують два розчини: 1 - льодяна оцтова кислота, що містить сліди $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; 2 - концентрована сірчана кислота також із слідами $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Сухий залишок очищеного витягу розчиняють у розчині 1 і обережно по стінці пробірки вливають розчин 2. При наявності дезоксисахарів верхній прошарок через якийсь час зафарбується у волошково-синій цвіт.
2. *Реакція Лібермана-Бурхарда.* Сухий залишок очищеного витягу розчиняють у льодяній оцтовій кислоті і додають суміш оцтового ангідриду і концентрованої сірчаної кислоти (50:1). При наявності глікозидів на межі шарів через якийсь час виникає коричневе кільце, а верхній шар поступово стає зеленим (стеаринова структура скелету).
3. *Реакція Розенгейма.* Сухий залишок очищеного витягу розчиняють у хлороформі і змішують із 90 %-ним водяним розчином трихлорацетатної кислоти. З'являються кольори, що замінюють один одного від рожевого до лілового й інтенсивно синього.
4. *Реакція Легаля.* Готують два розчини: 1 - 5 %-ний розчин нітропрусиду натрію; 2 - 10 %-ний розчин їдкого натру. Сухий залишок очищеного витягу розчиняють у 0,5 мл 100 %-ного метилового спирту. Отриманий розчин вливають у пробірку і додають 1 - 2 краплі розчину 1. Потім, обережно (не збовтуючи!) по стінці додають 1 - 2 краплі розчину 2. На межі двох розчинів з'являється червоне зафарблення у вигляді кільця.
5. *Реакція Кедде.* До 0,5 мл досліджуваного розчину додають 3 краплі свіжоприготовленого реактиву, що складається з суміші 1 мл 2 %-ного спиртового розчину 3 - 5 %-ної динітробензойної кислоти, 3 мл 40 %-ного розчину їдкого калі і 7 мл води. Поява фіолетового забарвлення свідчить про наявність глікозидів які мають п'ятичленне лактонне кільце.
6. *Реакція Бал'є.* До 0,5 мл досліджуваного розчину додають 0,5 мл свіжоприготовленого реактиву, що складається з суміші 0,5 мл

10 %-ного розчину їдкою натрію і 9,5 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти. Щоб прискорити реакцію, пробірку з випробуваною рідиною і реактивом рекомендується нагріти на киплячій водяній бані протягом 5 хв. Поява жовтогарячого забарвлення протягом 15 - 20 хв. свідчить про наявність серцевих глікозидів (5-членне лактонне кільце).

Методи кількісного визначення серцевих глікозидів

Дотепер не є можливим встановлення вмісту того або іншого серцевого глікозиду у присутності інших, тому що реактиви, запропоновані для кількісного визначення глікозидів, є загальними. Тому дуже перспективним вважається поєднання хроматографії з подальшим використанням фотометрії, потенціометрії, полярографії, флуориметрії й ін.

Кількісне визначення таких лабільних речовин, як серцеві глікозиди, потребує в індивідуального підходу в кожному конкретному випадку.

Методика кількісного визначення ланатозидів А, В, С в листах наперстянки шерстистої (Folium Digitalis lanatae)

Методика заснована на хроматографічному розподілу серцевих глікозидів з послідуєчим наступним спектрофотометричним визначенням.

1/4 хлороформно-ізопропанольного витягу (дивись методику виділення СГ для проведення якісних реакцій) обезводнюють сульфатом натрію і відфільтровують через складчастий фільтр. Фільтрат відганяють під вакуумом на водяній бані при 50⁰С. Сухий залишок розчиняють в 1мл суміші хлороформ - метиловий спирт (1:1). Отриманий розчин хроматографують.

Хроматографування проводять у тонкому шарі сорбенту (талък). На підготовлену хроматографічну пластинку розміром 13 x 18 см намічають стартову лінію на відстані 1,5 см від нижнього краю. На стартову лінію піпеткою з відтягнутим в капіляр носиком наносять дві плями розчину глікозидів по 0,001 мл і пляму - розчин "свідка". Пластинку поміщають в камеру і хроматографують висхідним способом 30-35 хв. Довжина пробігу рухливої фази 12 см. В якості рухливої фази використовується система: хлороформ - етиловий спирт - бензол - формамід (59:10:30:1).

Пластинку висушують на повітрі 5 хв., потім 10 хв. в сушильній шафі при температурі 120⁰ С. Одну половину пластинки обробляють 25%-ним розчином трихлороцтової кислоти в етиловому спирті з додаванням 0,2%-ного розчину хлораміну Т. Після обробки пластинку висушують 10 хв. в сушильній шафі при температурі 120⁰С. Ланатозиди виявляються у вигляді плям сіро-синього кольору. Точні межі встановлюють в ультрафіолетовому світлі.

На другій половині пластинки (неопрацьованої) плями А, В, С ланатозидів відмічають, знімають їх, кількісно переносять на скляний

фільтр № 4 і здійснюють елюювання 20 мл суміші хлороформ - метиловий спирт (1:1). Елюат випарюють досуха на водяній бані під вакуумом при температурі $t=50-60^{\circ}\text{C}$. До сухого залишку добавляють 5 мл ксантгідролового реактиву, нагрівають 5 хв. на киплячій водяній бані, охолоджують 5 хв. у холодній воді та витримують 15 - 20 хв. при кімнатній температурі. З'являється зафарблення від рожевих до малинових кольорів. Забарвлений розчин поміщають в кювету товщиною 1 см і визначають оптичну щільність при 528 - 532 нм на спектрофотометрі на фоні контролю. Контролем служить елюат з чистого сорбенту. Калібрувальний графік будують по ланатозиду С (целаніду), процентний вміст ланатозида в абсолютно сухій сировині розраховується за формулою:

$$x = \frac{1,05aV_1 10}{V_2 m 100000}$$

де a - кількість речовини, знайденої за калібрувальним графіком; V_1 - об'єм екстракту, мл (пікнометр); V_2 - об'єм екстракту, нанесеного на пластинку, мл; m - маса наважки абсолютно сухої сировини, г; 1,05 - поправочний коефіцієнт.

Методика кількісного визначення головних серцевих глікозидів у листах конвалії (Folium Convallariae)

Методика заснована на хроматографічному поділі і наступному спектрофотометричному визначенні серцевих глікозидів.

У круглодонну колбу місткістю 250, мл, поставлену оберненим холодильником, поміщають 50 мл 70 %-ного етилового спирту і нагрівають до кипіння. Потім швидко вносять 5 г здрібнених (сито з діаметром отворів 3 мм) сухих листів ландиша і кип'ятять 30 хв.

Розчин охолоджують і доводять до початкової маси 70 %-ним етиловим спиртом.

Отриманий екстракт фільтрують, відбирають 27,5 мл (що відповідає 2,5 г сировини) і відганяють спирт під вакуумом при $t=55-60^{\circ}\text{C}$. До теплового екстракту добавляють 3 мл розчину основного ацетату свинцю, перемішують 10 хв., потім центрифугують 5 хв. при швидкості 5000 обертів за хвилину. Промивають осад 2 рази, додаючи по 10 мл води і кожний раз центрифугують. З очищеного водного екстракту серцеві глікозиди витягають сумішшю хлороформ - метиловий спирт (4:1).

Екстракт фільтрують через безводний сульфат натрію, промивають фільтр. З екстракту відганяють розчинник у вакуумі на водяній бані до об'єму 3 - 4 мл. Потім розчин глікозидів упарюють до 1 мл, залишок висушують. Сухий залишок розчиняють у 1 мл суміші хлороформ - метиловий спирт (1:1). Хроматографують на папері висхідним засобом у системі етилацетат - вода (2:1) протягом 20 - 24 годин. Проявник — насичений розчин трихлористої сурми в метиловому спирті. Плями глікозидів зафарбовуються в рожево-фіолетовий колір.

Елюювання здійснюють метиловим спиртом. Розчинник відганяють під вакуумом. Залишок розчиняють у метиловому спирті, додають пікрат натрію, відфільтровують і вимірюють оптичну щільність. Контролем є суміш тих же кількостей метилового спирту і пікрата натрію. Вимір оптичної щільності проводять на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda=494$ нм у кюветі товщиною 1 см. За допомогою калібрувального графіка, який побудований за стандартом конваллятоксина, визначають утримання серцевих глікозидів у 1 см³ елюата.

Питання для підготовки:

1. Глікозиди. Загальне поняття. З'єднання, що утворюють глікозиди.
2. Фізико-хімічні властивості глікозидів.
3. Серцеві глікозиди (СГ). Поняття. Класифікація.
4. Методи виділення СГ із рослин. Фізико-хімічні властивості СГ.
5. Якісний аналіз на окремі структурні елементи молекули СГ.
6. Хроматографічний аналіз СГ, їхній генінів. Реакції на цукровий компонент молекули СГ.
7. Будівля аглікона СГ, залежність біологічних властивостей від радикалів-замісників.
8. Будівля цукрового компонента.
9. Біологічний метод кількісного аналізу СГ.
10. Фізико-хімічні методи кількісного аналізу СГ.
11. Локалізація СГ у рослинах.
12. Лікарські рослини, що містять СГ.
13. Особливості заготівлі сировини, що містить СГ. Умови сушіння, збереження.
14. Характеристика СГ групи наперстянки.
15. Характеристика СГ групи строфанта.
16. Переваги і хиби методів кількісного визначення СГ у рослинах — біологічних і фізико-хімічних.
17. На яких властивостях засновані біологічні методи кількісного аналізу СГ.
18. На яких властивостях засновані фізико-хімічні методи їхнього кількісного аналізу.
19. Основні етапи екстрагування СГ із рослин.
20. Комплекс позитивних якісних реакцій, необхідний для ствердження утримання СГ у рослинах.