

Біохімія лікарських рослин

Лабораторне заняття № 2

Тема: Азотовмісні речовини рослинного походження

Перелік питань для самопідготовки:

1. Поняття про алкалоїди. Історія розвитку вчення про алкалоїди. Праці вітчизняних вчених по вивченню алкалоїдів.
2. Сучасна класифікація алкалоїдів. Формули основних гетероциклів.
3. Фізико – хімічні властивості алкалоїдів.
4. Виділення алкалоїдів з ЛРС. Класичні методи виділення алкалоїдів з ЛРС (Стас – Отто, Орехова – Фроме, Юрошевського).
5. Методи знаходження та ідентифікації алкалоїдів в ЛРС:
 - a. загальні якісні реакції на алкалоїди (склад реактивів, характер осадів);
 - b. специфічні якісні реакції на алкалоїди;
 - c. експрес-метод виявлення алкалоїдів, переваги та недоліки;
 - d. хроматографічний аналіз алкалоїдів (види хроматографії, системи розчинників, проявники).
6. Методи кількісного визначення алкалоїдів:
7. Поширення алкалоїдів в рослинному світі, локалізація за органами і тканинами.
8. Роль алкалоїдів в життєдіяльності рослинного організму. Вплив онтогенетичних факторів та умов навколошнього середовища на накопичення алкалоїдів у рослинах.
9. Біогенез алкалоїдів.
10. Шляхи використання лікарської рослинної сировини, яка містить алкалоїди.

Навчальні завдання:

ЗАВДАННЯ 1. Виконати лабораторну роботу: провести виділення алкалоїдів з ЛРС експрес-методом та виконати якісні реакції (див. метод. вказівки).

ЗАВДАННЯ 2. Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть загальну схему метаболізму утворення алкалоїдів із зазначенням проміжних продуктів.

Алкалоїди є продуктами азотистого обміну у рослинах і згруповани є формальним хімічним принципом — наявності в молекулі атома азоту. Попередниками істинних алкалоїдів іprotoалкалоїдів є амінокислоти. У ролі прекурсорів виступають також антранілова та нікотинова кислоти, мультикарбонові одиниці (наприклад, ацетат) тощо. Вивчені шляхи біосинтезу протеїногенних амінокислот із пірувату $\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$ (лізин, аланін), оксалоацетату (аспарагінова кислота), 2-оксоглутамінату (орнітин). Амінокислоти також утворюються у циклі Кальвіна або з шикімової кислоти. Між цими групами існують обмінні зв'язки.

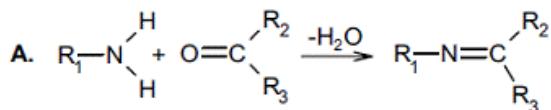
Загальним для більшості алкалоїдів є наявність гетероциклів (піролідин, піперидин, піридин) чи поєднання цих простих гетероциклів з карбо- або іншими гетероциклами з утворенням складніших поліцикліческих структур. Таким чином, основу будови алкалоїдів складає відносно невелика кількість структурних елементів, що синтезуються із загальних первинних прекурсорів.

Походження алкалоїдів має деякі універсальні риси, що експериментально доведено за допомогою специфічних міченіх попередників, які вводили безпосередньо у рослину. Початковими реакціями біосинтезу у більшості випадків є декарбоксилювання, окислювальне дезамінування або переамінування амінокислот чи відповідних їм амінів. Далі звичайно йде пряме трансметилювання отриманих проміжних сполук, після чого відбувається циклізація аліфатичних ланцюгів попередників у різні гетеро- і карбоциклічні структури.

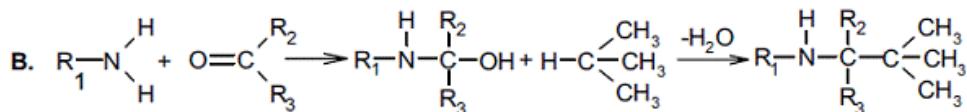
Універсальне значення мають реакції, які ведуть до утворення N-гетероцикліческих структур, вони пов'язані з утворенням C–N-зв'язку. До цього призводять різні реакції, серед яких найважливішими є реакція утворення азометинів (шифових основ) і реакція типу конденсації Манніха.

Азометини можуть утворюватися спонтанно або ферментативно із сполук, що мають аміно- і карбонільні групи.

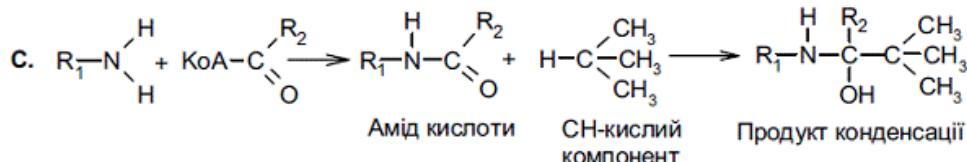
Реакції утворення С—N-зв'язку



Азометин (шифрова основа)



N-гідроксиметильне похідне



Амід кислоти СН-кислий компонент Продукт конденсації

Аміни, які беруть участь в утворенні шифрових основ (А), звичайно синтезуються при декарбоксилуванні амінокислот. Карбонільні сполуки в багатьох випадках синтезуються внаслідок переамінування та окислюваного дезамінування. При конденсації Манніха утворення С—N-зв'язку з тих самих функціональних груп А. проходить крізь проміжне створення N-гідроксиметильного похідного або кислого аміну в залежності від того, що використовують як карбонільну сполуку: альдегід (В) чи ацетилКоА (С).

Процеси циклізації аліфатичних ланцюгів у гетероциклі на наступних етапах доповнюються процесами конденсації: окремі кільця поєднуються й утворюють складніші, іноді поліцикличні, структури. Бувають випадки коли утворення нових алкалоїдів поєднується з розщепленням (або розмиканням) раніше сформованих цикліческих структур внаслідок розриву С—С-, С—N- чи С—О-зв'язків. Ускладнення скелета досягається внутрішньомолекулярними перегрупуваннями з розривом старих і утворенням нових С—С- і С—N-зв'язків.

Обмежені варіанти циклізації і перегрупувань при біосинтезі алкалоїдів у більшості випадків поєднуються з включенням функціональних груп і замісників на різних етапах метаболізму, що веде до виникнення у природі різноманітних структурних типів алкалоїдів.

Завдання 3. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить алкалоїди та узагальніть результати у вигляді таблиці.

Якісний аналіз ЛРС, яка містить алкалоїди

Методика. На предметне скло наносять краплю отриманого фільтрату та краплю реактиву. Перемішують їх за допомогою скляної палички.

№	Назва реакції		Результат реакції (забарвлення/осад)
	реактив	склад реактиву	
Загальноосадові реакції			
1	З реактивом Вагнера-Бушарда	розчин йоду у розчині калію йодиду	
2	З реактивом Майера	суміш розчинів ртуті дихлориду та калію йодиду	
3	З реактивом Драгендорфа	розчин нітрату вісмуту основний, калію йодиду та оцтової кислоти	
4	З реактивом Шейблера	1% водний розчин кислоти фосфорно-вольфрамової	
5	З реактивом Бергтрана	1 % водний розчин кислоти кремневольфрамової	

6	З реактивом Зонненштейна	(1% водний розчин кислоти фосфорномолібденової	
7	З реактивом Хагера	1 % водний розчин кислоти пікринової	
8	З 1 % водним розчином таніну		
Кольорові реакції			
1	З концентрованою сульфатною кислотою		
2	З концентрованою нітратною кислотою		
3	З реактивом Ердмана	суміш концентрованих сульфатної та нітратної кислот	
4	З реактивом Фреде	розвин амонію молібдату у концентрованій сульфатній кислоті	
5	З реактивом Маркі	розвин формальдегіду в концентрованій сульфатній кислоті	
6	З реактивом Манделіна	Розвин амонію ванадату в H_2SO_4 конц. кислоті	
7	З 1 % водним розчином натрія нітропрусиду		
8	Талайохінна проба на алкалоїди хінного дерева	З бромною водою та аміаком	Смарагдово-зелене забарвлення (утворення талайохіну)
9	З мінеральними кислотами		Колхіцин дає жовте забарвлення
10	Реакція Віталі-Морена		
11	Мурексидна проба		
12	З ваніліном		
13	З хлоридом заліза		
14	З нітропрусидом натрію		

Завдання 4. Проаналізуйте методи кількісного аналізу ЛРС, яка містить алкалоїди.

4.1. Проаналізуйте методи кількісного визначення вмісту алкалоїдів, назвіть основні із них.

Занесіть схему визначення суми тропанових алкалоїдів до протоколів, проаналізуйте доцільність кожного етапу кількісного аналізу.

Методику количественного определения суммы тропановых алкалоидов по ГФ XI издания методом обратного титрования можно представить на примере ЛРС красавки следующим образом:



4.2.) Розгляньте методику в представленаому нижче завданні, розрахуйте R_f для типової хроматограмми.

Задание 5. Проведите хроматографический анализ листьев красавки по методике PhEur. Зарисуйте схему хроматограммы и рассчитайте величину R_f алкалоидов в экстракте и достоверных образцов. Сравните полученные вами результаты с типовой хроматограммой на цв. вкл. XII, рис. 2.

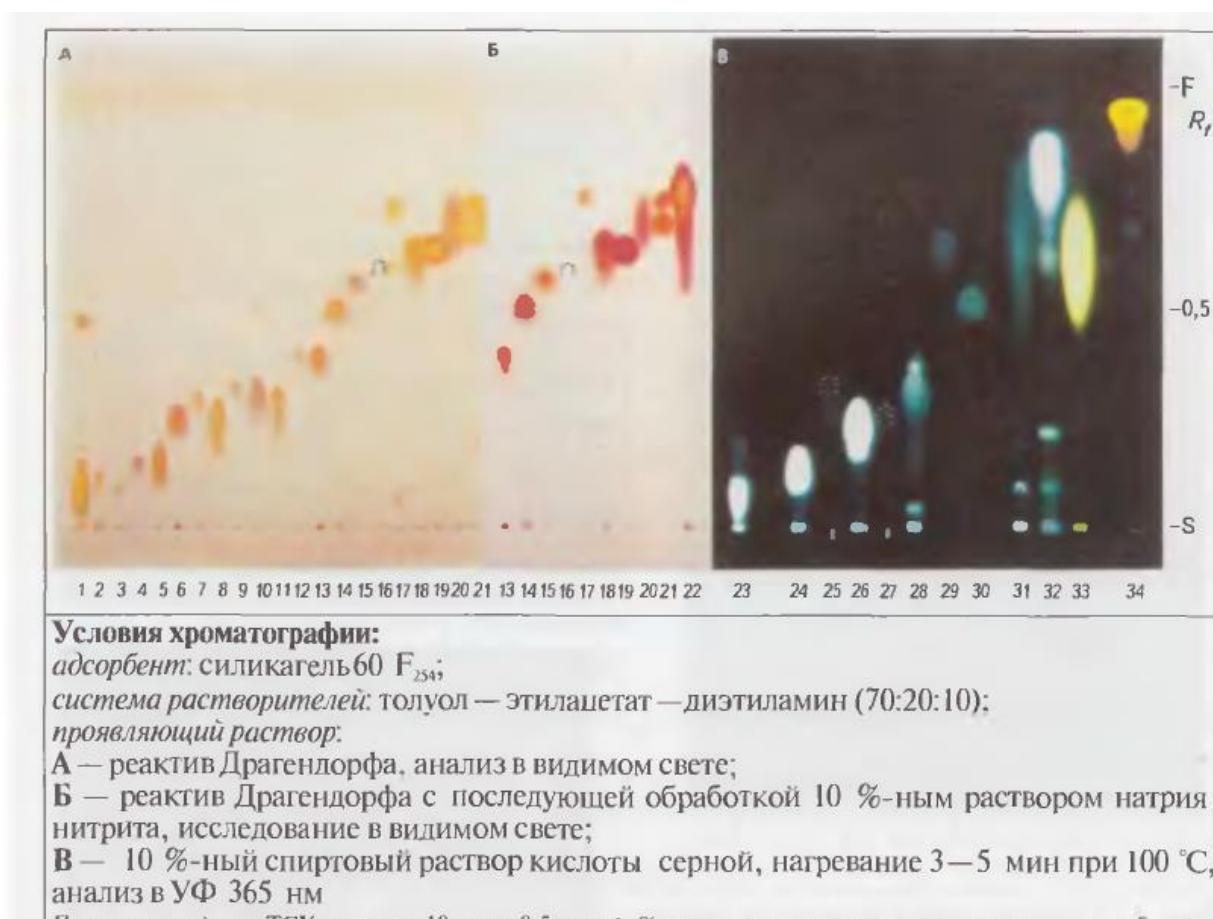
Методика. Основной раствор. К 0,6 г измельченных листьев красавки добавляют 15 мл кислоты серной 0,05 моль/л, тщательно взбалтывают 15 мин и фильтруют. Промывают фильтр кислотой серной 0,05 моль/л до получения 20 мл фильтрата. К полученному раствору добавляют 1 мл концентрированного раствора аммиака и выбалтывают основания алкалоидов в делительной воронке 2 раза по 10 мл эфира (свободного от пероксида). Объединяют эфирные извлечения и высушивают, пропуская через безводный натрия сульфат. Эфир отгоняют на водяной бане в вытяжном шкафу досуха и остаток растворяют в 0,5 мл метанола.

Растворы сравнения. Растворяют 50 мг гиосциамина сульфата в 9 мл метанола. Растворяют 15 мг скополамина гидробромида в 10 мл метанола. Смешивают растворы в соотношении 8:1,8 соответственно.

На пластиинку полосками длиной 3 и высотой 2 мм наносят по 20 мкл каждого раствора, оставляя между полосками расстояние по 1 см. Пластиинку

помещают в камеру с системой: ацетон—вода—концентрированный раствор аммиака (90:7:3). После прохождения фронта на 10 см пластиинку высушивают при 100–105 °C 15 мин, охлаждают и обрабатывают реактивом Драгендорфа. Алкалоиды проявляются в виде оранжевых или коричневых пятен на желтом фоне. Могут образоваться слабоокрашенные зоны, особенно по середине хроматограммы или на старте.

Пятна алкалоидов отмечают карандашом и обрабатывают хроматограмму раствором натрия нитрита до обесцвечивания. Могут произойти изменения окраски пятен от коричневой до красно-коричневой; не должны проявляться другие пятна.



Примечание: а) на ТСХ наносят 10 мкл 0,5 или 1 %-ных спиртовых растворов коммерческие образцы алкалоидов; б) соединения 23—34 имеют природную флуоресценцию в УФ 365 нм, которая усиливается кислотой серной

Рис. 1. Хроматограмма стандартных образцов важнейших алкалоидов: 1 — колхицин, 2 — болдин, 3 — морфин, 4 — пилокарпин, 5 — хинин, 6 — бруцин, 7 — цефазелин, 8 — хинидин, 9 — атропин, 10 — кодеин, 11 — цинхонин, 12 — скополамин, 13 — стрихнин, 14 — йохимбин, 15 — физостигмин, 16 — никотин, 17 — вератрин, 18 — эметин, 19 — папаверин, 20 — лобелин, 21 — мезаконитин и аконитин, 22 — наркотин (носскапин), 23 — серпентин, 24 — хинин, 25 — цинхонин, 26 — хинидин, 27 — цинхонидин, 28 — цефазелин, 29 — эметин, 30 — йохимбин, 31 — наркотин, 32 — гидрастин, 33 — берберин, 34 — сангвинарин



Рис. 2. Хроматограмма экстрактов ЛРсем. пасленовых, содержащих тропановые алкалоиды: 1 — экстракт листьев красавки, 2 — экстракт листьев белены, 3 — стандартная смесь гиосциамина сульфата ($R_f = 0,25$) и скополамина гидробромида ($R_f = 0,4$), 4 — экстракт листьев дурмана

Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Алкалоїди"

Мета роботи: навчитися правилам роботи з отрутними рослинами; навчитись проводити експрес-аналіз вмісту алкалоїдів на свіжій рослинній сировині; навчитись якісному і кількісному аналізу рослин на вміст алкалоїдів; ознайомити з отрутними рослинами, що ростуть на Україні; навчитись робити першу медичну допомогу при отруєнні алкалоїдами.

Алкалоїди - складні азотовмісні органічні сполуки основного характеру. Більшість алкалоїдів мають дуже великий фізіологічний вплив на організм.

Для екстрагування алкалоїдів з рослинної сировини та їх наступного якісного і кількісного визначення розроблено кілька методів. Звичайно, при дослідженні рослинної сировини користуються в основному двома способами:

- (a) екстрагуванням з кислого середовища спиртом (метод Стасс - Отто);
- (б) екстрагуванням з лужного середовища різними органічними розчинниками (метод Орехова - Фромме).

При виборі методу екстрагування алкалоїдів з рослинної сировини слід керуватися фізичними властивостями солей і основ певних алкалоїдів, оскільки солі деяких алкалоїдів погано розчиняються в спирті і водночас розчиняються в органічних розчинниках, а основи деяких алкалоїдів погано розчиняються в органічних розчинниках. При аналізі сировини невивченої рослинності треба застосовувати обидва методи екстрагування і різні розчинники.

Алкалоїди легко взаємодіють з різними хімічними реагентами, що може бути методом для їх виявлення та ідентифікації. Тепер відомо до 100 різних реактивів, які використовують для виявлення алкалоїдів.

Усі реактиви, використовувані для виділення алкалоїдів, можна поділити на дві групи:

- 1) загальноосадові реактиви на алкалоїди (осаджуvalльні);
- 2) спеціальні реактиви, які дають реакцію забарвлення.

Застосування загальноосадових реактивів ґрунтуються на властивості алкалоїдів утворювати нерозчинні прості або комплексні солі з кислотами, солями важких металів, комплексними йодидами, гетерополікислотами.

Застосування спеціальних реактивів полягає в хімічному відщепленні води, окисленні алкалоїдів, конденсації з альдегідами при одночасному відщепленні води і в утворенні характерних кристалів з різними хімічними речовинами ($KMnO_4$, сіль Рейнеке та ін.).

Методи екстрагування алкалоїдів з рослинної сировини

Метод Стасс - Отто. 25,0 г (або менше при обмеженій кількості сировини) порошку рослинни насипають у колбу, доливають 100 мл спирту і добавляють 1 - 1,5 г виннокам'яної кислоти; через корок колби вставляють скляну трубку завдовжки близько 1 м і колбу нагрівають на водяній бані 2 години. Утворений екстракт фільтрують і спирт видаляють випарюванням до сухого залиш-

ку на водяній бані. Після охолодження залишок обробляють водою; утворений розчин фільтрують. Фільтрат збовтують у ділильній лійці 5 хвилин з 20 мл ефіру. Ефірну витяжку зливають і випарюють на повітрі, а залишок обробляють водою і досліджують реактивом Моліша на присутність глікозидів. Кислу водяну рідину, яка залишилася в ділильній лійці, підлаговують розчином аміаку і збовтують з 20 мл хлороформу протягом 5 хвилин. Шар хлороформу заливають у фарфорову чашечку і випарюють на повітрі, а залишок обробляють 5 мл 1 %-ної соляної кислоти, перемішуючи скляною паличкою; рідину фільтрують крізь маленький фільтр, розливають по кілька на годинникові скельця для проби із загальними (осаджуvalnimi) реактивами на алкалойди.

Метод Орехова - Фромме. 2 г порошку рослинної сировини кладуть у колбу об'ємом 100 мл, доливають 1 мл 10 %-ного розчину аміаку і 20 мл хлороформу і збовтують протягом 1 години в приладі для збовтування. Потім рідину відфільтровують через вату в ділильну лійку об'ємом 100 мл і алкалойди екстрагують 15 мл 1 %-ної соляної кислоти і перемішують. Рідину фільтрують, розливають по кілька краплин на годинникові скельця і добавляють по 1 або 2 краплини різних загальних (осаджуvalnix) реактивів на алкалойди.

Експрес-метод Юрошевського. 1 г порошку рослинної досліджуваної сировини кладуть у скляну конічну колбу об'ємом 100 мл, заливають 25 мл 1 %-ної соляної або 1 %-ним розчином оцтової кислоти так, щоб матеріал був вільно занурений у неї і нагрівають на водяній бані протягом 5 хв. Після охолодження екстракт відфільтровують через лійку з паперовим фільтром і досліджують на алкалойди.

Якісні реакції на алкалойди і реактиви для їх виконання

З екстрактами виконують загальнопосадові і спеціальні реакції на алкалойди.

Техніка проведення загальнопосадових реакцій на алкалойди. Кілька краплин екстракту наносять на годинникові або предметні стекла і випарюють розчинник. Залишок розчинюють в 1 - 2 краплинах 0,1 мл 0,05н розчину соляної кислоти. Поряд поміщають 1 - 2 краплини відповідного реактиву і за допомогою скляної палички сполучають досліджуваний розчин та реактив. При наявності алкалойдів на місці стикання краплин повинні утворитися осад або каламутъ. Для зручності спостереження під скло треба підкласти чорний папір.

Оскільки не всі алкалойди однаково осаджуються загальними алкалойдними реактивами; для остаточного висновку про наявність алкалойдів слід виконати якомога більше реакцій (не менш як 5 -6).

Слід пам'ятати, що загальноалкалойдні реактиви утворюють осади з рядом азотовмісних органічних речовин, які є в рослинах, а також з синтетичними речовинами (антіпірин, акрихін, промедол та ін.).

Загальноосадові реактиви на алкалоїди:

1. *Реактиви Вагнера і Бушарда.* З підкисленим водним розчином солей алкалоїдів ці реактиви утворюють бурі осади, що являють собою сполуки гідройодидів алкалоїдів з йодом.
2. *Реактив Майєра* $HgJ_2 + KJ(K_2HgJ_4)$. З більшістю алкалоїдів у слабко-підкислених або нейтральних розчинах утворюються білі або жовтуваті осади. Цей реактив не осаджує кофеїну, колхіцину, соланіну. Межа чутливості алкалоїдів до реактиву Майєра різна. Наприклад, морфін осаджується до розведення 1 : 2 500, наркотин - 1 : 60 000, стрихнін і бруцин - 1 : 150000.
3. *Реактив Марме* $CdJ_2 + KJ(K_2CdJ_4)$. Цей реактив з алкалоїдами утворює білуваті або жовтуваті осади, часто розчинні в надлишку реактиву. Атропін, нарцеїн, вератрин, соланін, колхіцин, теобромін осаджуються лише з по-рівняно концентрованих розчинів. Кофеїн не осаджується.
4. *Реактив Драгендорфа* $BiJ_3 + KJ(KBiJ_4)$. Цей реактив в сірчанокислих розчинах алкалоїдів утворює аморфного виду оранжево-червоні або цегляні осади.
5. *Реактив Зонненштейна* (розчин фосфорно-молібденової кислоти) $H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$. Цей розчин - один з найбільш чутливих реактивів на алкалоїди: він утворює аморфні жовтуваті осади, які внаслідок відновлення молібденової кислоти набуває через деякий час синього або зеленого забарвлення. Луги і карбонати лужних металів розкладають ці осади і звільняють алкалоїди у вигляді основ.
6. *Реактив Шейблера.* (розчин фосфорно-вольфрамової кислоти) $H_3PO_4 \cdot 12WoO_3 \cdot 2H_2O$. Реактив утворює з солями багатьох алкалоїдів аморфні пластинки або осади. Деякі алкалоїди дуже чутливі до цього реактиву. Наприклад, стрихнін осаджується в концентрації 1 : 200 000, а хінін - у концентрації 1 : 100 000.
7. *Реактив Годфруа або БерTRANA.* Розчин кремнійвольфрамової кислоти $12WoO_3 \cdot SiO_2 \cdot 4H_2O$ осаджує дуже багато алкалоїдів з слабко підкислених соляною кислотою розчинів у вигляді Луги розкладають ці осади.
8. *Розчин таніну.* Свіжоприготовлений 10 %-ний розчин у воді з 10 % спирту. З солями алкалоїдів утворює білуваті або жовтуваті аморфні осади. Луги і свіжоосаджений $Pb(OH)_2$ розкладають ці осади, звільняючи алкалоїди.
9. *Пікринова кислота, 1 %-ний водний розчин.* З більшістю алкалоїдів утворює жовті осади пікратів. Пікринова кислота не осаджує аконітину, кофеїну, колхіцину, морфіну, теоброміну. Атропін осаджується лише в концентрованому розчині. Слід мати на увазі; що пікринова кислота може випадати в осад з розчинів під дією мінеральних кислот.
10. *Сулема, 5 %-ний водний розчин* $HgCl_2$. Утворює білі (дуже часто кристалічні) осади хлоромеркуратів алкалоїдів загальної формули $AlK \cdot nHCl \cdot mHgCl_2$. Наприклад, атропін утворює осад $C_{17}H_{23}NO_3 \cdot Cl \cdot 2HgCl_2$.

11. Хлорна платина - 5 %-ний водний розчин платинохлористоводневої кислоти H_2PtCl_6 . Утворює осади складу $AlK_2H_2PtCl_6$. Атропін осаджується цим реактивом лише в присутності спирту або ефіру.

12. Найчутливішими реактивами є фосфорно-молібденова і кремнійвольфрамова кислоти, розчин йодиду вісмуту в йодиді калію, йоду в йодиді калію та інші. Найменш чутливі розчин таніну і пікринова кислота.

Спеціальні реактиви:

1. Концентрована сірчана кислота.
2. Концентрована азотна кислота.
3. Реактив Ердмана: до 20 мл концентрованої сірчаної кислоти добавляють 10 краплин розчину, що складається з 10 краплин 30 %-ної азотної кислоти і 100 мл води.
4. Реактив Фреде: 0,05г молібденового ангідриду або 0,1г молібдату натрію (або амонію) розчиняють у 10 мл концентрованої сірчаної кислоти (розчин повинен бути свіжоприготовленим).
5. Реактив Маркі: дві краплини формаліну розчиняють при охолодженні в 10 мл концентрованої сірчаної кислоти (розчин повинен бути свіжоприготовленим). У таблиці подано характерні реакції окремих алкалоїдів.

Кольорові реакції деяких найважливіших алкалоїдів

Алкалоїд	Забарвлення спеціальними реактивами				
	конц. сірчана кислота	конц. азотна кислота	реактив Ердмана	реактив Фреде	реактив Маркі
1	2	3	4	5	6
Аконітін	жовте	—	жовте	жовте	—
Атропін, гіоциамін, скополамін	—	—	—	—	бурувате, при нагріванні брудно-зеленувате, буре
Бруцин	—	криваво-червоне, поступово жовтіє	криваво-червоне, поступово жовтіє	криваво-червоне, поступово жовтіє	—
Вератрин	жовте, що швидко переходить в оранжево-зелену флюоресценцію, червоне, кармінно-червоне	—	таке саме, як і з сірчаною кислотою, але швидко змінюється забарвленням	таке саме, як і з реактивом Ердмана	—
Іохімбін	безбарвне, з кристаликами $K_2Cr_2O_7$ дає фіоле-тово-червоні смужки	—	—	темно-синє, що переходить з країв у зелене	—

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6
Кодеїн	безбарвне, при нагріванні червонувате, синювате	буро-червоне, нарешті жовте	безбарвне, при нагріванні синіє.	світло-зелене, що поступово синіє	фіолетово-червоне, що переходить у синьо-фіолетове
Морфін	—	червоне	безбарвне, слабко-червоно-жовте, при нагріванні темніє	фіолетове, поступово синіє, брудно-зелене, жовте, блідо-рожеве	фіолетово-червоне, що переходить у фіолетово-синє
Нарцейн	сіро-буре, що переходить при нагріванні в криваво-червоне	—	—	синьо-зелене, що переходить у зелене, а потім у червоне; р-цю прискорює нагрівання	—
Папаверин	безбарвне, при нагріванні слабке синьо-фіолетове	жовте, оранжеве	темно-червоне	зелене, при нагріванні синє	—
Пілокарпін	—	—	—	—	при нагріванні жовте, що переходить у криваво-червоне і буро-червоне
Стрихнін	безбарвне, з кристаліками $K_2Cr_2O_7$ дає сині смужки	жовте	—	—	—
Хінін	голуба флюоресценція	—	—	—	—
Еметин чистий	—	жовте, оранжеве	зелене	Буре	—
Еметин-суміш алкалоїдів та іспекакуани	буро-зелене	—	—	Червоне, що швидко переходить у синьо-зелене	—
Езерин	безбарвне, що поступово жовтіє	жовте	червонувато-жовте	Червонувато-жовте	—

Хроматографічний аналіз

Приготування екстракту з рослинної сировини. 1 г порошку рослинної сировини (листи беладони, листи дурману звичайного, трава конвалії та ін.)