

Практичне заняття № 8

Тема 8. Лікарська рослинна сировина, яка містить комплекси БАР з вуглеводами.

Тема 9. Лікарська рослинна сировина, яка містить кардіостероїди.

Мета заняття: навчитися ідентифікувати глікозиди в свіжій та висушеній рослинній сировині.

Питання для самопідготовки:

Тема 8.

1. Комплекси БАР з вуглеводами.
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.

Тема 9.

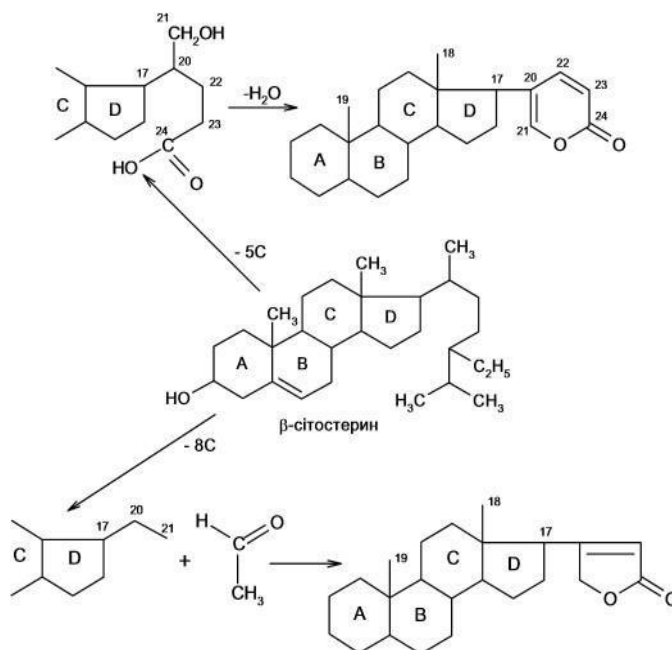
1. **СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ.** Визначення та класифікація, фізико-хімічні властивості.
2. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук у рослинній сировині.
3. Біологічна дія.
4. Біогенез.
5. Представники. Розповсюдження. Рослини, які містять ці сполуки.
6. Біологічні властивості та застосування в медицині.

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.

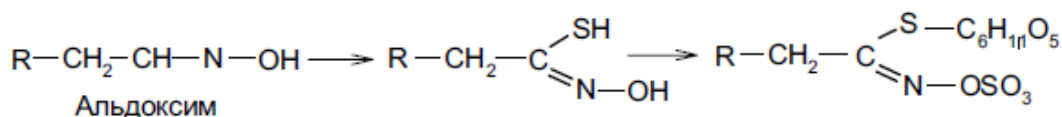
СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ Вважають, що обидва типи кардіостероїдів утворюються з β -сітостерину за рахунок зміни структури бічного ланцюга у C-17.



Розгляньте біогенез тіоглікозидів

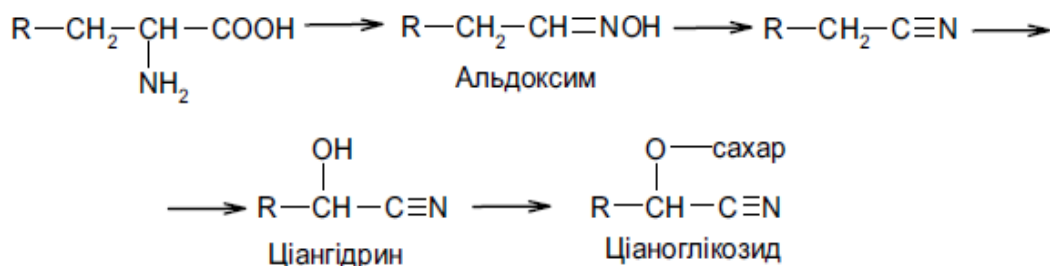
Вихідними речовинами у біогенезі даних сполук вважають амінокислоти: фенілаланін, триптофан, лейцин, гомометіонін, 2-аміно-4-фенілмасляну кислоту та ін. Перші стадії біосинтезу тіоглікозидів схожі з такими ж у ціаноглікозидів, що є доказом спорідненості між ними.

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 декарбоксилювання, дегідрування, гідроксильовання, 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 положення 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 **Л-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 рази 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)
<i>На стероїдне ядро</i>	Лібермана-Бурхарда		
	з реактивом Чугасва		
	Розенгейма		
<i>На ненасичене лактонне кільце 5-членне</i>	Кедде		
	Легалья		
	Раймонда		
	Бальє		
<i>На 6-членне лактонне кільце</i>	Тат'є		
<i>На вуглеводний компонент</i>	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).

ЗАВДАННЯ 6. Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, заповніть таблицю.

Таблиця

Фармакологічна дія та використання лікарської рослинної сировини, що містить серцеві глікозиди

(описати не менше 5 рослин)

№	Рослина (укр., рос., лат. назва, родина)	Сировина (листя, пагони, корені, кореневища, квітки, плоди тощо)	Хімічний склад	Діючі речовини	Фарма- кологічна дія	Назва субстанції або лікарського препарату
1						
2						
3						
4						
5						

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 циклопентанопергідрофенантрени, 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 їдкого 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 послідовним 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 (тальк). 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:

$$x = \frac{1,05aV_1 10}{V_2 m 1000000},$$

де a - кількість речовини, знайдений 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 Comvallariae)

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 теплого 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, зберігання.
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.