

Біохімія лікарських рослин

Лабораторне заняття № 5

**Тема: Сполуки з одним та двома ароматичним ядром
(Прості феноли та їх похідні, кумарини, флавоноїди)**

Перелік питань для самопідготовки по темам за схемою:

Прості феноли та їх похідні, кумарини, флавоноїди.

1. Визначення та класифікація.
2. Фізико-хімічні властивості.
3. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук в рослинній сировині.
4. Розповсюдження у рослинному світі (де містяться та значення для рослини).
5. Біогенез (біосинтез в рослинному організмі).
6. Біологічна дія сполук. Основні сполуки, які знайшли застосування в медицині.
7. Рослини, які містять ці сполуки. Їх застосування в медицині та народному господарстві.

Навчальні завдання:

ЗАВДАННЯ 1. Виконати лабораторну роботу:

Методи виділення кумаринів/флавоноїдів та якісні реакції (див. додаток)

ЗАВДАННЯ 2. Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть **загальну схему метаболізму утворення простих фенолів, кумаринів, флавоноїдів** із зазначенням проміжних продуктів.

ЗАВДАННЯ 3. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить простих фенолів, кумаринів, флавоноїдів та узагальніть результати у вигляді таблиці.

Якісні реакції на прості феноли / кумарини / флавоноїди

№	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)	Хімізм реакції
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Зробіть висновки.

Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Кумарини"

Мета роботи: навчитися аналізувати рослини на утримання кумаринів; навчитися проводити якісний аналіз на піроновий цикл (лактони); навчитися проводити хроматографію на суміш, що містить ліпофільні компоненти; прогнозувати напрямки фармакологічного пошуку.

Кумарини - природні сполучення, в основі яких лежить бензо- α -пірон (лактон цис-орто-оксикоричної кислоти).

Для виділення кумаринів із рослинної сировини, як правило, застосовують різноманітні розчинники: метиловий і етиловий спирт, бензол, хлороформ, етиловий і петролейний ефіри.

Найбільш вичерпна екстракція кумаринів, як вільних, так і зв'язаних (глікозидів) досягається етиловим спиртом. Одержуваний після відгону спирту густий екстракт частіше усього послідовно обробляється розчинниками: хлороформом, етиловим ефіром та іншими.

З метою відділення кумаринів від супутніх речовин часто сконцентрований екстракт із рослинної сировини обробляють 0,5 %-вим водняним розчином КОН для видалення кислих і фенольних компонентів. Після чого екстракт обробляють 5 %-вим водно-спиртовим розчином КОН протягом 1/2 - 1 год. При цьому кумарини утворюють солі кумаринових кислот. Одночасно відбуваються й інші реакції, наприклад, омилення жирів та інших складних ефірів. Індиферентні складові частини екстракту (стерини, спирти, вуглеводні й ін.) видаляються при обробці етиловим ефіром лужного розчину, розведеного попередньо 6 - 8 кратною кількістю води. Водно-лужний розчин підкислюється розведеною HCl. При цьому звільняються органічні кислоти, а присутні кумаринові кислоти переходять із відщипленням елементів води в кумарини. Суміш кислот і кумаринів витягається етиловим ефіром. Кислі складові частини з лактонної фракції можна видалити додаванням по краплях 0,5 %-вого водяного лугу в розчин, у який вони переходять, у той час як нейтральні кумарини, як більш стійкі стосовно розведеного лугу, залишаються в етиловому ефірі.

При описаному методі виділення суми кумаринів важко уникнути деякого розщеплення кумаринів, тому як для очищення кумаринів від супутніх речовин, так і для виділення індивідуальних сполук широке використання одержали хроматографічні методи. У якості сорбента при хроматографуванні кумаринів частіше використовуються оксид алюмінію і сілікагель. Кумарини добре елюювати з колонки сумішшю петролейного ефіру з хлороформом, бензолом, сумішшю бензола з етилацетатом, сумішшю бензолу з метиловим спиртом (у різноманітних співвідношеннях) і ін. Ефірні

олії, гліцериди, стероїди і тритерпени звичайно виявляються в перших фракціях елюата, потім вимиваються кумарини. Кумарини на колонці й в елюатах виявляються по флуоресценції в УФ світлі. Проведення хроматографічного поділу кумаринів на колонці полегшується застосуванням паперової і тонкошарової хроматографії для якісного аналізу елюатів. Методи паперової і тонкошарової хроматографії дозволяють швидко встановлювати однорідність елюата, виявивши навіть незначні кількості домішок.

Методи якісного аналізу

Приготування витягу з рослинної сировини. 2 г здрібненої сировини (плоди амі великої, пастернаку посівного, коренів горічника і порізняка рясноцвітного й ін.) заливають 20 мл етилового спирту і кип'яють протягом 15 хв. з оберненим холодильником. Після охолодження фільтрують.

Якісні реакції

1. При взаємодії солей діазонія з кумаринами в слабко лужному середовищі група $ArNa$ вступає у 6-положенні кумаринової системи, т. е. в пара-положенні к фенольному гідроксилилу цис-, орто-оксікоричної кислоти. До 3 - 5 мл спиртового витягу додають 10 краплин 10 %-ного КОН у метиловому спирті і нагрівають протягом 5 хв. на водяній бані (при наявності кумаринів розчин жовтіє), потім додають 5 краплин свіжоприготовленого діазореактиву Паулі за Кутачеком. При наявності кумаринів розчин набуває колір від коричнево-червоного до вишневого.
2. При дії гарячого розведеного луку кумарини повільно гідролізуються, при цьому утворюються жовті розчини солей кумарової кислоти (цис-, орто-оксікоричної). При підкисленні лужних розчинів або при насичуванні їх CO_2 регенеруються кумарини в незмінному стані. До 3 - 5 мл спиртового витягу додають 10 краплин 10 %-ного КОН у метиловому спирті; розчин нагрівають на водяній бані. Потім добавляють 5 - 10 мл дистильованої води і добре перемішують, після чого розчин нейтралізують 10 %-ною HCl до кислої реакції. Якщо при цьому спостерігається помутніння або випадіння осаду, то це вказує на ймовірну присутність кумаринів у сировині (лактонна проба).
3. Сублімація. В чисту суху пробірку помістити 0,2 г подрібненого рослинного матеріалу та обережно нагріти до $100 - 105^{\circ}C$, утримуючи пробірку від себе майже горизонтально. Час сублімації 10 хвилин. Кумарини сублімуються у вигляді гольчатих кристаліків на стінці пробірки. Після охолодження пробірки до сублімату додають 1 краплю 5 %-ного розчину $NaOH$ в етиловому спирті. Не повинне з'являтися червоного або фіолетового забарвлення.

Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Флавоноїди"

Мета роботи: познайомитися з властивостями бензо- γ -пірону; навчитися проводити якісний та кількісний аналіз на його похідні; навчитись оцінювати рослини на можливість використання в сировини, в різноманітних сферах народного господарства.

Флавоноїди дуже поширені в рослинному світі, особливо серед вищих рослин. Ця група речовин тепер набуває великого теоретичного і практичного значення. Основна маса флавоноїдів знаходить застосування в медичній практиці як речовини, що мають Р-вітамінну активність; деякі з них виявляють жовчогінну, діуретичну та інші дії. У рослинах флавонові речовини містяться, головним чином, у вигляді глікозидів.

Флавоноїди - це похідні феніл-бензо- γ -пірону і відрізняються один від одного ступенем відновлюваності або окислюваності γ -піронового ядра, що називається хромоном.

Флавоноїди сполуки мають різні угруповання, що зумовлює наявність великої кількості різноманітних реакцій, які застосовуються для вивчення як усієї групи в цілому, так і окремих підгруп флавоноїдів.

Якісні реакції на флавоноїди

Для якісних реакцій на флавоноїди використовують водні або спиртові витяжки з рослинного матеріалу, а також розчини виділених флавонових речовин. Для деяких реакцій на цю групу речовин можна використати як сирий, так і сухий рослинний матеріал.

Приготування витяжки з рослинної сировини: 1 г здрібненої сировини (трава гречки, бутони софори японської, квітки пижми та ін.) поміщають у колбу місткістю 25 мл і заливають 10 мл етилового спирту. Колбу з'єднують із зворотним холодильником і нагрівають на водяній бані на протязі 10 хвилин з моменту кипіння спирту у колбі. Після охолодження отриманий витяг фільтрують через паперовий фільтр.

1. *Реакція з концентрованою соляною кислотою.* Флавоноїди при взаємодії з концентрованою соляною кислотою утворюють інтенсивне жовте забарвлення або жовті кристали, які добре розчиняються в 1 %-ному розчині лугу. Цій реакції заважають антоціани і катехіни. Перші дають червоне забарвлення, яке маскує жовтий колір, другі - осад.
2. *Реакція з їдкими лугами і концентрованим аміаком.* З їдкими лугами, концентрованим аміаком і карбонатами лужних металів флавоноїди, флаванони, флавоноли, флаванололи утворюють інтенсивне жовте

забарвлення, яке при нагріванні переходить в оранжеве або червоне; халкони і аурони дають червоне або пурпурове забарвлення. Чисті катехіни не зафарблюються, але у присутності навіть невеликої кількості домішок (продуктів окислення) з'являється жовте забарвлення. Антоциани в присутності аміаку або карбонату натрію дають синє або фіолетове забарвлення. Для цих реакцій застосовують 10%-ний розчин лугу або карбонату лужного металу. Треба враховувати, що аналогічні реакції дають оксикумарини але при цьому утворюється червоне або пурпурове забарвлення.

- + 3. З 1 %-ним ваніліном у концентрованій соляній кислоті катехіни утворюють червоно-малинове забарвлення.
4. Реакція з трихлористою сурмою. 5-оксифлаволи і 5-оксифлавоноли, взаємодіючи утворюють комплексні сполучення жовтого або червоного кольору.
- + 5. При обробці середнім оцтовокислим свинцем спиртових розчинів флавонолів, халконів, ауронів, що містять вільні ортогідроксильні угруповання в кільці В, утворюються забарвлені осадки як червоного, так і синього кольорів.
- + 6. Ціанідинова реакція. При додаванні до спиртового екстракту флавоноїдів 2 - 3 краплин концентрованої соляної кислоти і кількох стружок металічного магнію утворюється червоне або червоно-фіолетове забарвлення. Замість соляної кислоти можна використати оцтову кислоту; тоді при наявності флавоноїдів можуть виникати різні забарвлення (червоне, синє, зелене та ін.).
7. Реакція Вільсона з борно-лимонним реактивом. До 2 мл досліджуваної витяжки з рослинного матеріалу додають 8 мл лимонно-борного реактиву (в 4-кратній кількості порівняно з досліджуваним розчином). Суміш залишають на 5 хв. при кімнатній температурі; при наявності флавоноїдів виникає стійке лимонно-жовте забарвлення, яке зберігається протягом кількох годин. Для контрольного визначення, яке потрібне для врахування власного забарвлення досліджуваного розчину, замість розчину борної кислоти додають такий самий об'єм ацетону. Ця реакція може бути використана для кількісного колориметричного визначення флавоноїдів.

Приготування витяжки для реакції Вільсона. Рослинний матеріал висушують у сушильній шафі при температурі 60°C протягом кількох годин до повного видалення вологи, потім подрібнюють і просівають крізь сито з отворами діаметром 1 мм. З приготовленого таким способом матеріалу беруть наважку близько 1 г, кладуть її в патрон з фільтрувального паперу і екстрагують сухим хлороформом для видалення пігментів і смол. Після екстрагування сухий вміст пакету кількісно переносять у колбочку і кип'ятять з 30 мл абсолютного метанолу із зворотним холодильником протягом 30 хв.

Після закінчення екстрагування вміст колбочки кількісно переносять у мірну колбу на 50 мл, доводять до позначки сухим метанолом, а потім фільтрують крізь сухий фільтр. 10 мл фільтрату переносять у невелику колбочку і відганяють спирт досуха. Плівку, що залишилася на дні колбочки, обробляють 1 мл сухого метанолу і розчин кількісно переносять у мірну колбу на 25 мл, старанно промиваючи сухим ацетоном, і доводять ним до позначки. При добавлянні ацетону в колбі випадає дрібний пластівцевоподібний осад. Розчин з мірної колби фільтрують у суху колбу, звідки беруть проби для якісного і кількісного визначення флавоноїдів. При наважці 1 г кожний мілілітр фільтрату відповідає 0,008 г рослинного матеріалу. Реакції заважає наявність слідів води, яка спричиняє крайню нестійкість комплексу.

8. *Реакції з солями важких металів.* При взаємодії флавоноїдів з солями окисного заліза виникає зелене забарвлення різних відтінків, зрідка коричневого або пурпурного. Для реакцій використовують 3-5 %-ний спиртовий розчин хлорного заліза. З солями алюмінію багато флавоноїдів утворюють забарвлені продукти, що інтенсивно флюоресцирують в ультрафіолетовому світлі. Для реакцій використовують 1 %-ний спиртовий розчин трихлористого алюмінію.

9. *З солями цирконію в присутності лимонної кислоти* флавоноїди утворюють лимонно-жовте забарвлення, яке добре флюоресцирує в ультрафіолетовому світлі. 0,5 - 1 мг флавоноїду розчиняють у 10 мл метанолу і добавляють 1 мл 2 %-ного метанольного розчину солі цирконію. З солями берилію флавоноїди утворюють сполуки, які флюоресціюють в ультрафіолетовому світлі, дещо відмінно від флюоресценції самих флавоноїдів. Для реакції використовують 1 %-ний розчин солей берилію.

Хроматографічні методи дослідження флавоноїдів

Тепер для виділення і дослідження флавоноїдів все частіше використовують хроматографічні методи.

Флавоноїди звичайно екстрагують із свіжого рослинного матеріалу гарячим 70^o етиловим спиртом, метанолом або водою. Для екстрагування флавоноїдів можна використати 96^o спирт. Утворені екстракти фільтрують і за допомогою капілярної піпетки наносять на папір. Екстракти з листків спочатку обробляють петролейним ефіром для видалення хлорофілу, який заважає хроматографуванню.

В якості хроматографічних систем можуть бути використані водні, спиртові, фенольні, вуглецеві розчинники. Водні розчинники: 15 %-на оцтова кислота. Спиртові розчинники: н-бутанол - оцтова кислота - вода (4:1:5) або в інших співвідношеннях. Фенольні розчинники: фенол або м-крезол, насичені водою, і оцтова кислота (50:48:2 за об'ємом). Вуглецеві розчинники: бензол - лігроїн (температура кипіння суміші 84^o - 103^o) - метанол - вода в