**Лабораторна робота №7**

**Тема: Глікоалкалоїди**

***Мета заняття:*** навчитися здійснювати виділення, якісний та кількісний аналіз глікоалкалоїдів в лікарській рослинній сировині.

***Перелік питань для обговорення:***

1. Глікоалкалоїди: визначення, класифікація.

2. Фізико-хімічні властивості глікоалкалоїдів.

3. Методи виділення глікоалкалоїдів.

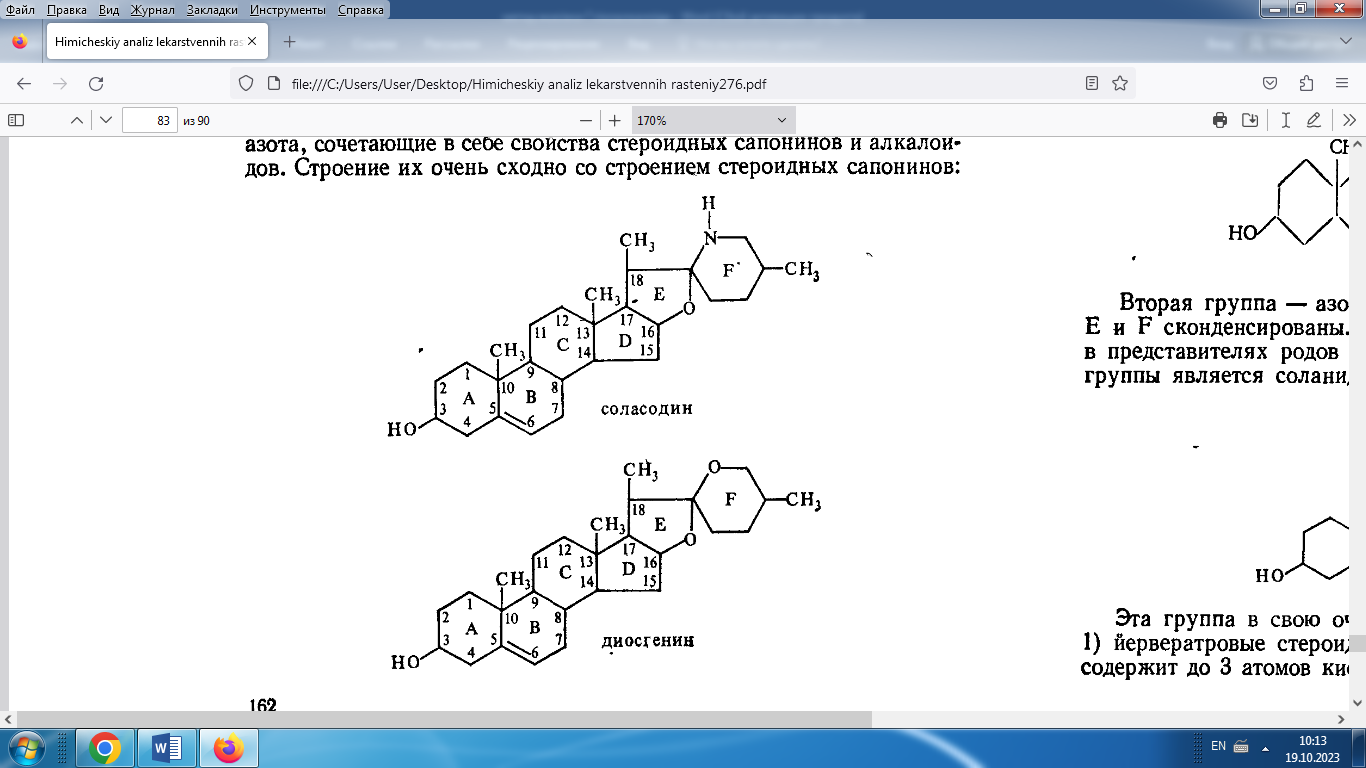
4. Якісне визначення глікоалкалоїдів.

5. Кількісне визначення глікоалкалоїдів.

6. Лікарська рослинна сировина, яка містить глікоалкалоїди.

***Теоретична довідка:***

***Глікоалкалоїди (стероїдні алкалоїди)*** — це похідні циклопентанопергідрофенантрену з гетероциклічним атомом азоту, що поєднують властивості стероїдних сапонінів і алкалоїдів. Будова їх дуже подібна до будови стероїдних сапонінів:



Глікоалкалоїди використовують для отримання гормональних препаратів типу кортизону.

***Будова аглікону та цукрового компонента.*** В основі структури стероїдних алкалоїдів лежить скелет циклопентанопергідрофенантрену, пов'язаний із гетероциклічною системою. У 3-му положенні знаходиться група ОН, через яку відбувається приєднання вуглеводної частини молекули. У положеннях 10, 13, 18 є метильні групи (-СН3). Більшість глікоалкалоїдів в кільці В у положенні 5, 6 містять подвійний зв'язок. Вуглеводна частина молекули стероїдних алкалоїдів представлена, як і у сапонінів, цукрами: D-глюкозою, D-галактозою, L-рамнозою, L-арабінозою, D-ксилозою, L-фруктозою та кислотами D-глюкуроновою та D-галактуроновою.

***Класифікація.*** Стероїдні алкалоїди можна поділити на дві групи.

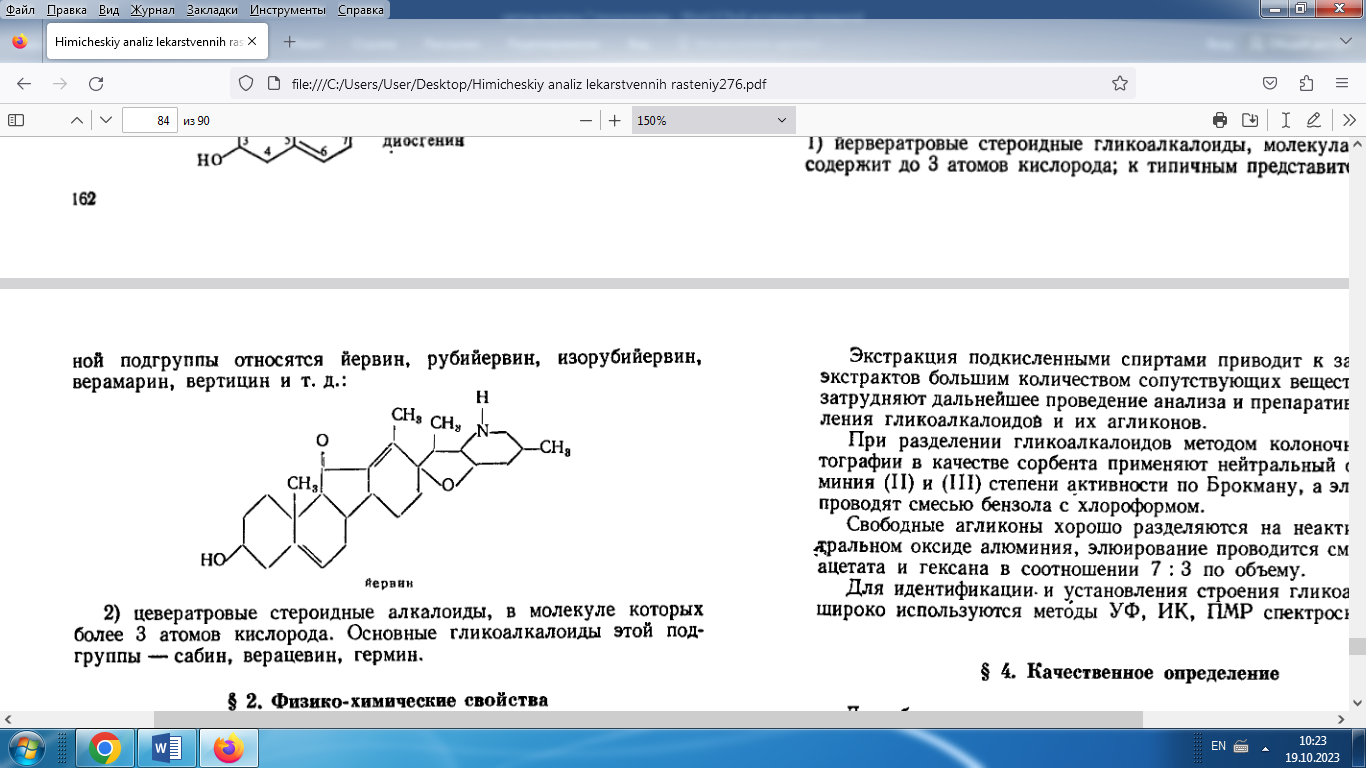
*Перша група* - азотовмісні аналоги сапонінів; вони найчастіше зустрічаються у представниках роду пасльон. Як і похідні спіростану, глікоалкалоїди цієї групи утворюють нормальні (соласодин) та ізо-ряди сполук (томатидин).

*Друга група* - азотовмісні стероїди, в яких кільця Е і F сконденсовані. Ці сполуки найчастіше зустрічаються у представниках родів пасльон та чемериця. Представником цієї групи є соланідин. Ця група у свою чергу поділяється на дві підгрупи:

1. *йервератрові стероїдні глікоалкалоїди*, молекула яких містить до 3 атомів кисню; до типових представників даної підгрупи відносяться йервін, рубійєрвін, ізорубійєрвін, верамарин, вертицин і т. д.
2. *цевератрові стероїдні алкалоїди*, у молекулі яких понад 3 атоми кисню. Основні глікоалкалоїди цієї підгрупи - сабін, верацевин, гермін.

|  |  |
| --- | --- |
| **томатидин** | **соланідин** |
|  |  |

**йервін**



**Фізико-хімічні властивості.** Стероїдні алкалоїди, в основному, кристалічні речовини, що добре кристалізуються з 80%-го етилового спирту. Трапляються аморфні глікоалкалоїди, як, наприклад, соланокапсидин.Глікоалкалоїди – оптично активні сполуки, що мають певний кут обертання. Вони майже не розчиняються у воді, етиловому ефірі, хлороформі, розчиняються у гарячому етиловому спирті.

В результаті наявності атома азоту в агліконі стероїдні алкалоїди мають основні властивості і можуть утворювати солі. Солі більшості глікоалкалоїдів - аморфні речовини, крім кристалічного хлоргідрату соланіну, температура плавлення якого 212 °С (з розкладанням). Як і солі інших алкалоїдів, солі глікоалкалоїдів розчиняються у воді.

Стероїдні алкалоїди піддаються ферментативному та кислотному гідролізу. Лужний гідроліз проводиться рідко, оскільки деякі глікоалкалоїди стійкі до лугів. Наприклад, соланін стійкий до лугу, але при нагріванні його з розведеною НС1 відбувається розщеплення на соланідин (аглікон) і три молекули цукрів: D-глюкозу, D-галактозу, L-рамнозу.

***Методи виділення.*** Одним з поширених методів виділення глікоалкалоїдів є кисла екстракція розведеними кислотами з послідуючим осадженням аміаком. Використовуються розведена сірчана кислота, 0,5-2% розчин азотної та ортофосфорної кислот, 2% розчин холодної метафосфорної кислоти, 5% оцтова кислота та ін. Недолік кислотної екстракції - погана фільтрація пухкого осаду «сирих» глікоалкалоїдів, що частково можна уникнути, застосовуючи для підлужування не розчин аміаку, а вапняне молоко.

Екстракція підкисленими спиртами призводить до забруднення екстрактів великою кількістю супутніх речовин, які ускладнюють подальше проведення аналізу та препаративного виділення глікоалкалоїдів та їх агліконів.

При поділі глікоалкалоїдів методом колонкової хроматографії як сорбент застосовують нейтральний оксид алюмінію (II) і (III) ступеня активності за Брокманом, а елюювання проводять сумішшю бензолу з хлороформом.

Вільні аглікони добре поділяються на неактивному нейтральному оксиді алюмінію, елюювання проводиться сумішшю етилацетату та гексану у співвідношенні 7 : 3 за об’ємом.

Для ідентифікації та встановлення будови глікоалкалоїдів широко використовуються методи УФ, ІЧ, ПМР спектроскопії.

***Якісне визначення.*** Для виявлення стероїдних алкалоїдів та їх агліконів у рослинній сировині застосовуються реакції осадження і фарбування, а також хроматографічні методи аналізу (тонкошарова, паперова хроматографія).

Глікоалкалоїди осаджуються холестерином, дигітоніном; дають реакції фарбування з n-оксибензальдегідом, анісовим альдегідом, резорцином, формальдегідом. Найчастіше використовується реакція Альберта (формальдегід у сильнокислому середовищі) - у присутності глікоалкалоїдів з'являється малиново-червоне забарвлення.

При виявленні стероїдних алкалоїдів методом паперової хроматографії використовують різні суміші розчинників: метилетилкетон, насичений водою; н-бутанол - оцтова кислота - вода (10: 2: 5); н-бутанол - піридин - вода (10: 2: 5) та ін.

Для обробки хроматограм найчастіше застосовують реактив Драгендорфа (помаранчеві плями) або концентрований хлороформний розчин трихлористої сурми з подальшим нетривалим нагріванням при 105 °С (цегляно-червоне фарбування).

При застосуванні тонкошарової хроматографії як сорбенти використовують силікагель. Системи розчинників також дуже різноманітні: н-бутанол - метиловий спирт - диетиламін (17:1:2); хлороформ - метиловий спирт - оцтова кислота (18:1:1); хлороформ - 25% розчин аміаку (1000:1); гексан - ацетон (4:1) та ін. Хроматограми обробляються парами йоду.

***Кількісне визначення.*** Існуючі методи кількісного визначення стероїдних алкалоїдів можна поділити на такі групи.

***1. Титрометричні методи.*** Глікоалкалоїди добре відтитровуються соляною кислотою з диметиловим жовтим, а також потенціометрично з сурм'яним або скляним електродами.

Недолік титрометричних методів – тривалість промивання технічних глікоалкалоїдів від аміаку.

***2. Методи бромування.*** Глікоалкалоїди, що мають подвійний зв'язок у положенні 5, 6 можуть кількісно бромуватися піридинсульфатбромідом. Цей метод придатний лише для аналізу препаратів соласодину, а не рослинної сировини та напівпродуктів її виробництва.

***3. «Цукрові» методи.*** Після проведення кислого гідролізу глікоалкалоїдів та осадження агліконів проводять титрування від’єднаних цукрів 0,1 н перманганатом калію. Недоліком «цукрових» методів є те, що деякі цукри можуть випадати в осад разом із «сирими» глікоалкалоїдами і, таким чином, завищувати результати аналізу.

***4. Гравіметричні методи***. Ці методи розроблені переважно для препаративних цілей і часто комбінуються з колонковою хроматографією. Якщо метод не комбінується з попереднім поділом на колонці, визначається сума глікоалкалоїдів або їх агліконів. Схема методу зводиться до наступного: глікоалкалоїди екстрагують з рослинної сировини розведеним розчином H2SO4 з подальшим осадженням їх розчином аміаку.

Отриманий осад глікоалкалоїдів обробляють етиловим спиртом, що кипить, і гідролізують розведеним розчином НСl при кип'ятінні. Після підлужування аглікони вичерпно екстрагують бензолом. Розчинник відганяють, залишок висушують при 120 °С до постійної маси і зважують.

***5. Колориметричні методи.*** Хоча стероїдні алкалоїди дають реакції фарбування з багатьма альдегідами, для кількісного визначення застосовується лише реакція з формальдегідом у сильнокислому середовищі (малиново-червоне фарбування), оскільки фарбування з іншими альдегідами не підпорядковується закону Ламберта — Бера.

***Хід роботи***

***Методика якісних реакцій. Приготування витягу:*** подрібнену рослинну сировину заливають 5%-ним розчином оцтової кислоти у співвідношенні 1 : 10, збовтують на змішувачі (вібраторі) 40 хв, потім відфільтровують через паперовий фільтр. До 1 мл витягу додають кілька крапель 1% розчину холестерину в етиловому спирті. Утворюється осад.

***Методика визначення вмісту соласодину в траві пасльону дольчастого (Herba Solani laciniati) експрес-методом.***

Експрес-метод призначений для швидкої оцінки зразків пасльону для відбору селекційних зразків із вмістом соласодину вище заданого значення. Метод має орієнтовне значення. Надалі кількісними методами встановлюється точний вміст соласодину. Попередня оцінка проводиться при хроматографічному поділі за розміром плями та інтенсивністю забарвлення після прояву.

0,5 г подрібненого листя пасльону (сито № 2) поміщають у колбу місткістю 25 мл, заливають 10 мл етилового спирту і екстрагують зі зворотним холодильником протягом 30 хв. на киплячій водяній бані. Вміст колби фільтрують у гарячому вигляді через скляну лійку із щільним тампоном вати в конічну колбу місткістю 50 мл. Осад на фільтрі промивають 15 мл спирту етилового (дрібно). Фільтрат кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Об'єм екстракту доводять спиртом до 25 мл розчин перемішують. Відбирають піпеткою з колби 1 мл розчину та з бюретки додають до даної проби 3 мл етилового спирту (робочий розчин). Піпеткою наносять 0,005 мл робочого розчину на пластинку «Силуфол» з відривом 1 см від краю пластинки. На одну платівку можна наносити кілька проб. Відстань між точками нанесення 12-15 мм.

Діаметр плями на старті не повинен перевищувати 5 мм. Як контроль використовують робочий розчин з листя пасльону дольчатого, що містять точно певну кількість соласодину.

Платівку закріплюють вертикально в камері, занурюючи нижній край пластинки в розчинник лише на 1-2 мм. В якості рухомої фази використовують систему хлороформ - метиловий спирт - вода (61 : 32 : 7). Для кращого насичення з трьох сторін камери поміщають фільтрувальний папір. Коли розчинник піднімається до верхнього краю пластинки, її виймають і сушать впродовж 5 хв у сушильній шафі при 100 °С. Платівку охолоджують на повітрі впродовж 2-3 хв, рівномірно обприскують 20% H2SO4 в етиловому спирті. Пластинку висушують впродовж 2-3 хв на повітрі і поміщають у відкриту сушильну шафу при 100 °С на 2-3 хв до появи малинових плям. Хроматограму закривають склом і візуально порівнюють розмір та інтенсивність забарвлення плям аналізованих та контрольних зразків. Через 20-30 хв, коли плями починають зникати, хроматограму переглядають повторно (рис.). Контрольний екстракт, з якого готують робочий розчин, можна зберігати в щільно закритій колбі в холодильнику 1 міс (якщо не утворюється осад).

***Реактиви та обладнання:*** етиловий спирт (етанол) 95%-ий; метиловий спирт (метанол); хлороформ; H2SO4 (конц.); вода дистильована, платівки «Силуфол»; колби плоскодонні із нормальним шліфом місткістю 25 мл; холодильники зворотні скляні лабораторні із нормальним шліфом; лійки скляні для фільтрування діаметром 5 см; колби конічні місткістю 25 та 50 мл; колби мірні місткістю 25 мл; мікропіпетка вимірювальна місткістю 0,01 мл; пульверизатор скляний герметичний; камера хроматографічна для ТШХ; шафа сушильна лабораторна; лазні водяні лабораторні; плитка електрична побутова; бюретки місткістю 10 мл; вата гігроскопічна.

|  |  |
| --- | --- |
|  | ***Мал. Схема (ТСХ) стероїдних сполук листя пасльону дольчатого:*** І - робочий розчин з листя аналізованого зразка пасльону дольчатого; II - "контроль" - робочий розчин з листя пасльону дольчатого, що містить певну кількість соласодину; 1 - діосгенін; 2 - соласодин; 3 - грациллін; 4 - глікоалкалоїди |

***Визначення соланіну в картоплі.***

**Оснащення:** зразки картоплі, скальпелі, ступки, реактиви для дослідження.

***Теоретична довідка***

***Соланін*** – глікоалкалоїд, міститься у рослинах з родини пасльонових (позеленіла картопля, пасльон, недостиглі плоди томатів). Діє місцево подразнююче і резорбтивно. Викликає запалення слизових оболонок шлунка і кишечнику, збуджує, далі пригнічує центральну нервову систему, гемолізує еритроцити, при виділенні із організму уражає нирки та шкіру.

***Хід роботи.*** З клубня картоплі роблять декілька зрізів товщиною 1 мм від верхівки до основи по осі, яка ділить картоплю на рівні половинки. Два розрізи поперечно – біля основи і верхівки картоплини., три – з боків і в ділянці біля вічок. Зрізи поміщають у фарфорові чашки на них наносять по краплях концентровану оцтову кислоту, декілька крапель концентрованої сірчаної кислоти і декілька крапель 5%-го розчину перекису водню. В місцях зрізу, що містить соланін, з’являється темно – малинове або червоне забарвлення.

Заповнити таблицю за результатами проведеного дослідження.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№ з/п** | **Об’єкт досліджень** | **Результати досліджень** | **Висновок** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**Зробити висновки.**