**Біохімія лікарських рослин**

**Лабораторне заняття № 12**

**Тема: Сполуки з хіноновою структурою (антраценпохідні)**

**Мета заняття:** ознайомитись із поняттям, класифікацією, фізико-хімічними властивостями, механізмами біосинтезу антрахінонів, методами виділення, якісного та кількісного аналізу лікарської сировини, що містить антрахінони, біологічною дією антраценпохідних.

**Перелік питань для самопідготовки по темам за схемою:**

**Антраценпохідні**

1. Визначення та класифікація.

2. Фізико-хімічні властивості.

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

**Навчальні завдання:**

**ЗАВДАННЯ 1. Виконати лабораторну роботу:**

**Методи виділення антраценпохідних та якісні реакції (див. додаток)**

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

***Синтез нафтохінонів і антрахінонів***

Шикімова кислота майже завжди служить попередником при біосинтезі похідних нафтохінону (рис. 1).



**Рис. 1. Утворення нафтохінонів і антрахінонів із шикімової кислоти**

Другим компонентом у цьому біосинтезі є 2-оксоглутарова (α-кетоглутарова) кислота, а важливим проміжним продуктом її конденсації з шикімової кислоти — о-сукцинілбензойна кислота. Далі відбувається циклізація з утворенням вже типових нафтохінонових структур, де ароматичне кільце побудоване на основі шикімової кислоти, хіноїдна частина молекули — з некарбоксильних С-атомів α-кетоглутарової кислоти. У представників родини *Rubiaceae* подібним шляхом утворюються і антрахінонові похідні. Додаткове шестичленне вуглецеве кільце їх молекули синтезується шляхом конденсації нафтохінонового похідного з диметилалільною формою “активованого ізопрену” — ізопентенілдифосфату. Продукт конденсації, піддаючись окислювальній циклізації, перетворюється в антрахінон (рис. 1).

У інших же вищих рослин антрахінонові похідні утворюються з ацетатних-малонатних залишків за типом полікетидного синтезу (рис. 2). Антрахінони є, мабуть, єдиною групою рослинних поліфенолів, вуглецевий скелет яких може цілком синтезуватися за ацетатно-малонатним шляхом. У цьому процесі молекулою-“затравкою” є молекула ацетил-КоА, до якої послідовно приєднуються 7 молекул малоніл-КоА із відщепленням від останніх при конденсації вільної карбоксильної групи з утворенням полікетидного ланцюга типу полікетокислоти.



**Рис. 2. Полікетидний шлях утворення антрахінонів**

Ця кислота нестійка і набуває стабільної форми лише після замикання кілець з утворенням проміжної сполуки — антрону. Суттєвою особливістю структури антрону є наявність у 2-му положенні молекули карбоксильної, а в 3-му — метильної групи. При подальших реакціях на шляху біосинтезу антрахінонів та інших антраценпохідних карбоксильна група зазвичай відщеплюєтся, а метильна — зберігається або окислюється, або в спиртову, або карбоксильну.

**ЗАВДАННЯ 3. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить антраценпохідні та узагальніть результати у вигляді таблиці.**

**Якісні реакції на антраценпохідні**

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

**Якісні реакції засновані на хімічних властивостях антраценпохідних:**

1. ***Реакція утворення антрахінолятів із лугом***. Може бути проведена в трьох варіантах:

а) *на сухій сировині* — при нанесенні кількох крапель 5-10% розчину натрію гідроксиду на сировину з'являється вишнево-червона пляма; позитивний результат спостерігається, якщо антраценпохідні присутні в окисленій формі (рекомендована ДФ XI для підтвердження справжності кори крушини);



б) *з водною витяжкою* (1:10) — при додаванні до водної витяжки з сировини декількох крапель 5-10% розчину лугу утворюється вишнево-червоне забарвлення;

в) *реакція Борнтрегера*. Дозволяє виявити емодини в присутності інших похідних антрацену.

Проба заснована на здатності антраглікозидів піддаватися лужному гідролізу з утворенням вільних агліконів. Одночасно відбувається окислення відновлених форм. Після підкислення гідролізату аглікони екстрагують ефіром. При струшуванні ефірного шару з розчином аміаку *емодин* переходять у водний шар, забарвлюючи його в вишнево-червоний колір. *Хризофанол* залишається в органічному шарі, фарбуючи його в жовтий колір.

****

Запропоновано ДФ ХI для підтвердження справжності кори крушини, листя сени, плодів жостеру проносного, коренів ревеню, кореневищ і коренів марени. Похідні алізарину, які містяться в сировині марени, забарвлюють аміачний шар у фіолетовий колір.

2. *Реакція мікросублімації* заснована на здатності антраценпохідних сублімуватися при 200 °С із подальшою конденсацією на холодній поверхні без зміни основної структури у вигляді жовтих крапель або жовтих голчастих кристалів. Може бути проведена в двох варіантах: в пробірці і на предметному склі. При нанесенні на сублімат розчину натрію гідроксиду утворюється вишнево-червоне (*похідні хризацину*) або фіолетове (*похідні алізарину*) забарвлення. Наводиться в ДФ ХI для підтвердження дійсності кори крушини.



3. *Реакція утворення лаків* заснована на здатностіантраценпохідних утворювати зі спиртовим розчином магнію ацетату комплекси, забарвлені в вишнево-червоний колір.

***Хроматографічне виявлення.*** Для ідентифікації антраценпохідних у лікарській рослинній сировині використовують паперову хроматографію та хроматографію в тонкому шарі сорбенту. Похідні антрацену виявляють за характерною флуоресценцією в ультрафіолетовому світлі.

Характер флуоресценції залежить від ступеня окислення і розміщення замісників: *антрахінони* мають оранжеву, рожеву, червону, вогняно-червону або фіолетову флуоресценцію; *антраноли* і *антрони* — жовту, блакитну або синю. Після обробки хроматограми відповідними реагентами (парами аміаку, розчинами їдких лугів або натрію гідрокарбонату) плями набувають жовтого, червоного або фіолетового забарвлення у видимому світлі.

**Методика. 0**,5 г подрібненої сировини вносять у колбу зі зворотним холодильником, заливають 5 мл етанолу і нагрівають на водяному нагрівнику протягом 5 хв.

Після охолодження надосадову рідину і зразки антрахінонів-“свідків” наносять капіляром на лінію старту пластинки “Силуфол”.

Пластинку поміщають у камеру з системою розчинників етилацетат-метанол-вода (100:17:13). Після хроматографування пластинку сушать на повітрі у витяжній шафі.

На хроматограмі антрахінони проявляються жовтими або оранжевими плямами, а після обприскування розчином лугу вони набувають червоного або фіолетового кольору, видимого при денному світлі.

**Кора крушини**

В УФ-світлі видно *4 плями*:

* рожевого кольору з Rf 0,16-0,18 (глюкофрангулін);
* жовтого кольору з Rf 0,44-0,46 (франгулін);
* оранжевого кольору з Rf 0,52-0,54 (емодин);
* рожевого кольору з Rf 0,76-0,78 (хризофанол).



***Умови:*** адсорбент 60F254, система розчинників: етилацетат – метанол – вода (100:13,5:10), проявляючий реактив: 5% спирт.розчин натрію гідроксиду, візуальний аналіз **А** – у видимому світлі, **Б** – у УФ 365 нм

**Рис. Хроматограма метанольних екстрактів кори крушини ламкої та жостера послаблюючого: 1 – суміш стандартних зразків глюкофрангуліну А (rf = 0,25), алоїну (rf = 0,45), франгуліну А (rf = 0,75) і франгуліну-емодину (фронт); 2 – екстракт кори крушини ламкої, 3 - екстракт плодів крушини ламкої, 4 - екстракт плодів жостера послаблюючого**

**Завдання 4.** Розгляньте **методи кількісного визначення вмісту антраценпохідних** та їх принципи. **Складіть схему основних етапів дослідження та дайте пояснення відповідним етапам.**

***Хід визначення вмісту антраценпохідних в корі крушини відповідно до фармакопейної статті ДФ XI:***

 *екстракція*

Суміш похідних антрацену *та гідроліз* Суміш агліконівта *екстракція*

в лікарській рослинній сировині супутніх речовин

 *CH3COOH, t ефір діетиловий*

 *очищення та*

 *забарвлення* Суміш агліконів *окислення* Сума солей

Ефірний екстракт різного ступеня гідрокси-

 *лужно-аміачний* окислення *О2, t* антрахінонів

 *розчин*

**📚теоретичні відомості**

Методи кількісного аналізу антраценпохідних у рослинній сировині засновані на визначенні вільних агліконів після кислотного гідролізу. Аглікони екстрагують в органічний розчинник і визначають різними методами.

1. ***Фотоелектроколориметричний метод.***

Заснований на здатності забарвлених антрахінолятів поглинати монохроматичне світло при довжині хвилі 540 нм.Запропонований у 1957 р. Аутергоффом, модифікований А.С. Романовою та А.І. Банковським.Аутергофф запропонував гідроліз та екстракцію агліконів об'єднати в одну стадію шляхом кип'ятіння наважки сировини з крижаною оцтовою кислотою і наступною екстракцією діетиловим ефіром.

*Стадії визначення:*

1. Гідроліз антраценпохідних та екстракція агліконів із сировини.

2. Отримання забарвлених солей.

Ефірну витяжку обробляють у ділильній лійці окремими порціями лужно-аміачного розчину (5% розчин натрію гідроксиду, що містить 2% розчин аміаку). Антраценпохідні у вигляді забарвлених антрахінолятів переходять у водну фазу; обробляють доти, поки остання порція лужно-аміачного розчину не буде залишатися безбарвною.

3. Окислення відновлених форм антраценпохідних.

Для переведення всіх форм антраценпохідних в окислені, частину лужно-аміачного розчину антрахінолятів нагрівають на водяній бані протягом 15 хв. Відновлені форми окислюються киснем повітря і вступають у реакцію з лужно-аміачним розчином, забарвлення стає інтенсивніше.

4. Вимірювання оптичної щільності забарвлених антрахінолятів за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр).

Вміст антраценпохідних у сировині (%) розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за хлоридом кобальту (CoCl2 × 6H2O), в перерахунку на істізин (1,8-дигідроксиантрахінон).

Фотоелектроколориметричний метод рекомендований ДФ XI для визначення вмісту антраценпохідних в сировині жостеру, ревеню, марени красильної.

***2. Спектрофотометричний метод.***

Цим методом визначають вміст антраценпохідних у листі сени. Структура діючих речовин обумовлює певні особливості дослідження:

- екстракцію сенозидів проводять водою при нагріванні;

- водну витяжку очищають від смолистих речовин;

- окислення відновлених форм проводять за допомогою заліза окисного хлориду (FeCl3);

- гідроліз глікозидів антрахінонів проводять 50% розчином сірчаної кислоти;

- оптичну щільність забарвлених антрахінолятів вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 523 нм;

- вміст суми антраценпохідних у перерахунку на хризофанол обчислюють за калібрувальним графіком, побудованим за хлоридом кобальту.

Існують й інші методи кількісного аналізу антраценпохідних, наприклад: потенціометричне титрування в неводних розчинах, полярографічне визначення, однак у рослинних екстрактах ці методи не дають задовільні результати.

**Завдання 5.** Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, заповніть таблицю.

**Фармакологічна дія та використання лікарської рослинної сировини, що містить антраценпохідні *(описати не менше 5 рослин)***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Рослина****(укр., 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** |  |  |  |  |  |  |

**Зробіть висновки**