

Перелік питань для самопідготовки по темам за схемою:

Антраценпохідні. Дубильні речовини

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. Виконайте лабораторну роботу: виділення антраценпохідних / дубильних речовин та якісний аналіз (див. метод. вказівки).

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

Синтез нафтохінонів і антрахінонів

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

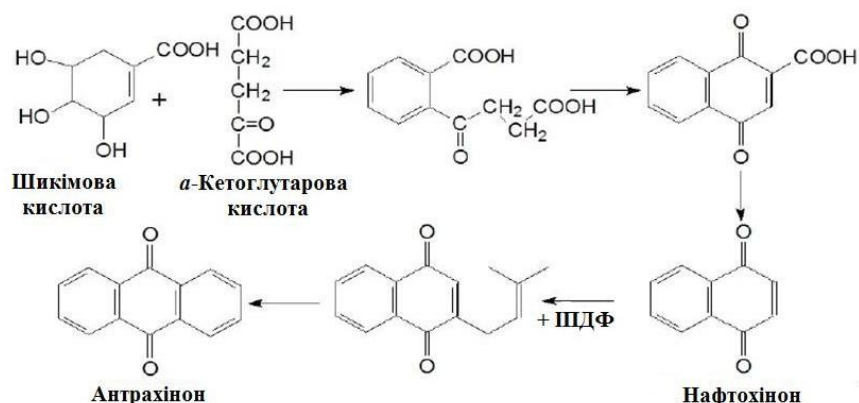


Рис. Утворення нафтохінонів і антрахінонів із шикімової кислоти

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.).

У інших же вищих рослин антрахінонові похідні утворюються з ацетатних-малонатних залишків за типом полікетидного синтезу (рис.). 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.

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 відщеплюється, а метильна — зберігається або окислюється, або в спиртову, або карбоксильну.

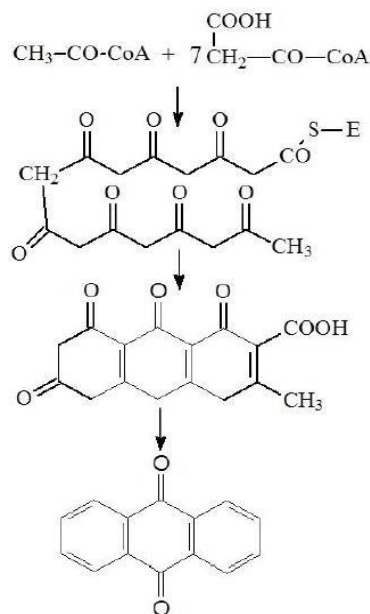


Рис. Полікетидний шлях утворення антрахінонів
Гідролізовані дубильні речовини

Гідролізовані таніни складаються із залишків галової кислоти, які в основному пов'язані з молекулами гексоз. Галові кислоти у рослин утворюються переважно за шикіматним шляхом.

Елагова кислота утворюється лактонізацією гексаоксидифенової кислоти при гідролітичному розпаді елаготанінів. Нагрівання або додавання мінеральних кислот прискорює цей процес.

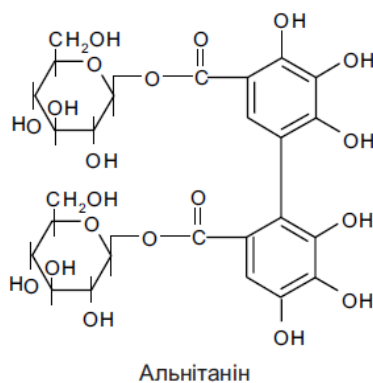
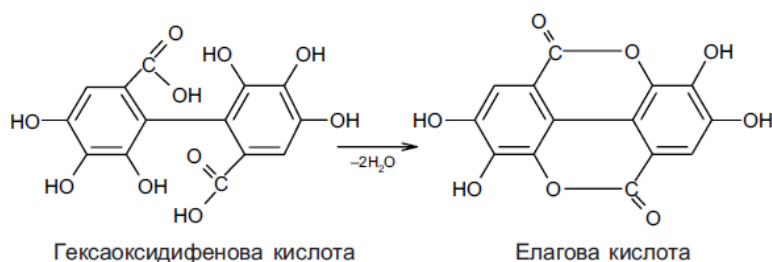


Рис. Утворення гідролізованих дубильних речовин

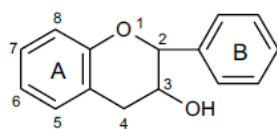
Ефіри галової кислоти і катехіну утворюють проміжну ланку між галотанінами та флавоноїдами.

Конденсовані дубильні речовини

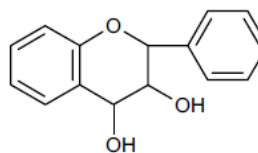
Конденсовані таніни є полімерами флавоноїдів і утворюються як продукти фенілпропаноїдного метаболізму. Утворення конденсованих дубильних речовин є наслідком окислювальних реакцій, що каталізуються ферментами фенолоксидазного або пероксидазного типу (рис. 17).

У механізмі утворення конденсованих дубильних речовин та їх хімічній будові ще багато неясного, незважаючи на численні дослідження у цій галузі. К. Фрейденберг висунув гіпотезу катехінової структури всіх конденсованих дубильних речовин. Він же вперше запропонував назву “катехіни” для речовини, що має будову флаван-3-ол.

Попередником конденсованих дубильних речовин є також флаван-3,4-діол, який широко зустрічається в рослинах.



Флаван-3-ол



Флаван-3,4-діол

Існують певні структурні вимоги, яким мають відповідати похідні флавану, щоб була можливою автоконденсація:

- група -ОН або -ОСН₃ у положенні 4 флаванового скелета;
- дві групи -ОН у мета-положенні кільця А або одна -ОН група в положенні С-7.

Флаван-3,4-діоли під дією кислоти конденсуються значно легше за відповідні флаван-3-оли.

Існує ряд доводів на користь того, що окислювальні реакції фенолів мають велике значення в біосинтезі лігнанів, алкалоїдів та ін.

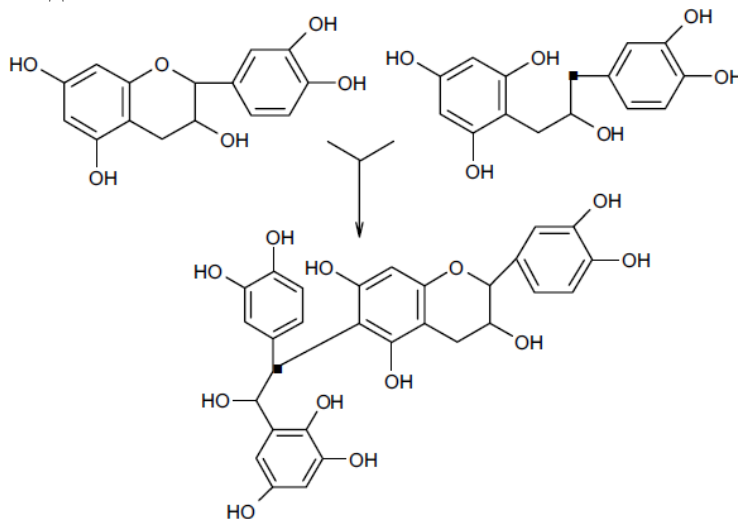


Рис. Утворення конденсованих дубильних речовин за Фрейденбергом

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

Якісні реакції на антраценпохідні

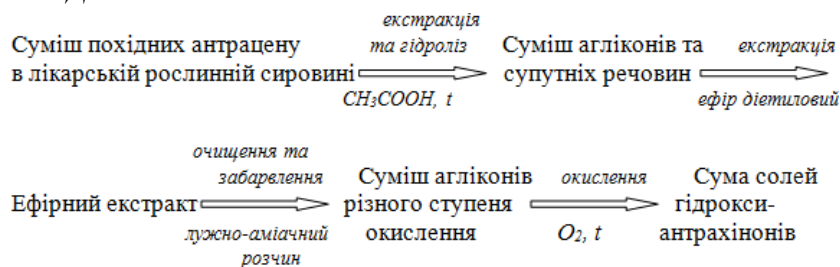
№	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)	Хімізм реакції
1	<i>Реакція утворення антрахінолатів із лугом:</i> - на сухій сировині - з водною витяжкою (1:10) - реакція Борнтрєгера			
2	<i>Реакція мікросублімації</i>			
3	<i>Реакція утворення лаків</i>			

Якісні реакції на дубильні речовини

№	Назва реакції (загальна / групова)	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			

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:



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 антрахіноліатів 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 антрахіноліатів 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 антрахіноліатів 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 антрахіноліатів за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр).

Вміст антраценпохідних у сировині (%) розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за хлоридом кобальту ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 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 (FeCl_3);
- гідроліз глікозидів антрахінонів проводять 50% розчином сірчаної кислоти;
- оптичну щільність забарвлених антрахіноліатів 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.

Таблиця

Фармакологічна дія та використання лікарської рослинної сировини, що містить антраценпохідні / дубильні речовини
(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.

Зробіть висновок до роботи.

Лабораторне заняття № 11

Тема: „Антраценпохідні та їх глікозиди”

Мета заняття – навчитися аналізувати рослини на вміст антраценпохідних речовин; ознайомитися з оцінкою на можливості використання рослин, що містять антраценпохідні в якості лікарської сировини.

Похідні антрацену широко поширені в природі. Вони виявлені у вищих рослинах, лишайниках, деяких нижчих грибах, а також знайдені у деяких комах і морських організмах.

Біля половини відомих антраценпохідних (приблизно 100 сполук) виділено з вищих рослин. Тут вони найчастіше часто зустрічаються в рослинах сімейств маренових, гречаних, крушинових, бобових, лілейних, звіробійних, вербенових і інших.

Рослини, що містять антраценпохідні, відвіку знаходять застосування для лікування різноманітних захворювань шкіри, а також у якості проносних засобів; отримані препарати нефролітичної дії та антибіотики. Деякі рослини відомі як джерела природних барвників.

Антраценпохідними називають групу природних сполук, в основі яких лежить ядро антрацену різноманітного ступеня окисленості по середньому кільці.

Методи виділення й ідентифікація

Для виділення антраглікозидів рослинний матеріал екстрагують водою, спиртами (етиловим, метиловим) або водно-спиртовими сумішами. Антрахінони, що мають у якості заступника карбоксильну групу, розчиняються у водяних розчинах карбонатів і гідрокарбонатів лужних металів і їхніх гідроксидів з утворенням солей. Аглікони краще розчинні в органічних розчинниках, але розчинність їх виборча. Для одержання агліконів глікозиди в рослинному матеріалі піддають гідролізу, нагріваючи з кислотою, або ензиматичному розщепленню, після чого витягають вільні аглікони етиловим спиртом, бензолом або хлороформом. На розходженні властивостей антраценпохідних у залежності від характеру і розташування заступників засновані всі класичні методи розподілу цих сполук. Основним методом дослідження антраценпохідних є хроматографічний. У якості сорбенту при цьому найбільш успішно застосовується поліамід; гарні результати дає також сілікагель. Розчинниками при хроматографічному аналізі антраглікозидів

служать головним чином водно-спиртові суміші, а при поділі агліконів — бензол, толуол, хлороформ.

Ідентифікація проводиться за допомогою хімічних і фізичних методів, що доповнюють один одного. З фізичних методів найбільш повну інформацію дають спектральні, що дозволяють установити клас сполук, а також наявність і характер заступників.

Якісні реакції на антраглікозиди

1. Реакція з лугом (реакція Борнтрєгера). 0,2 г здрібненого рослинного матеріалу кип'ятять протягом 2 хв. із 5 мл 10 %-ного NaOH. Після охолодження суміш розбавляють 5 мл води і фільтрують. 3 мл фільтрату поміщають у пробірку, додають 3 мл 10 %-ної HCl і 10 мл бензолу. Обережно перемішують і після поділу рідини зливають бензольний прошарок, фільтруючи його через вату. Фільтрат струшують із 3 мл 10 %-вого розчину аміаку. При наявності антраценпохідних аміачний прошарок приймає вишнево-червоне (1,8-діоксиантрахінони), пурпурне (1,4-діоксиантрахінони) або фіолетове (1,2-діоксиантрахінони) забарвлення.

Сутність реакції: при кип'ятінні рослинного матеріалу з лугом відбувається гідроліз антраглікозидів з утворенням вільних агліконів. Одночасно антрон- і антранолпохідні окислюються до антрахінонів. Оксиантрахінони, що утворилися, за рахунок фенольних гідроксилів дають феноляти, розчинні у воді. При підкислюванні водно-лужного витягу дисоціація фенольних гідроксилів припиняється і сполуки стають ліпофільними, у результаті чого при струшуванні з бензолом вони з водяного прошарку переходять у бензол; бензольний прошарок при цьому приймає жовте забарвлення оксиантрахінонів. При струшуванні бензольного прошарку з розчином аміаку знову відбувається утворення фенолятів антрахінонів і вони переходять в аміачний прошарок. Феноляти оксиантрахінонів мають яскравий вишнево-червоний, пурпурний або фіолетовий колір у залежності від положення оксигруп.

2. Сублімація антраценпохідних. На дно сухої пробірки поміщають 0,2 г здрібненого рослинного матеріалу та обережно нагрівають, тримаючи пробірку майже горизонтально. Температура сублімації 210°C, час сублімації 10 хвилин. Сублімат конденсується на холодних ділянках пробірки у вигляді жовтих крапель або жовтих голчастих кристалів. Після остигання пробірки до сублімату додають 1 краплю 5 %-ного NaOH в етиловому спирті; з'являється яскраве червоне або фіолетове забарвлення в залежності від складу антраценпохідних (утворення фенолятів).

Сутність реакції: антраглікозиди, що утримуються в рослинному матеріалі, при високій температурі розщеплюються з утворенням вільних агліконів; одночасно похідні антрона й антранола окислюються до антрахінонів, що возгоняються.

Методики хроматографічного визначення. При аналізі лікарської рослинної сировини, що містить антраценпохідні, використовується хроматографія на папері та у тонкому прошарку сорбенту.

При дослідженні складу антраглікозидів готують водяні витяги; при аналізі складу агліконів сировина екстрагується бензолом, етиловим або метиловим спиртом, що при нагріванні більш-менш задовільно екстрагують як вільні антраценпохідні, так і їхні глікозидні форми.

0,3 г здрібненого рослинного матеріалу нагрівають з 3 мл етилового спирту протягом 5 хв., доводячи до слабкого кипіння. Після остигання фільтрують. 0,1 мл фільтрату наносять на лінію старту і хроматографують в системі етилацетат – метиловий спирт – вода (100:17:13) на платівках "Сілуфол". Час хроматографування 30 - 40 хв. Хроматограму висушують на повітрі, обробляють 5 %-ним NaOH в етиловому спирті та розглядають при денному світлі й УФ світлі до і після оприскування. Одночасно хроматографують стандарт "свідок", наносячи його розчин поруч із досліджуваним витягом. За розміром R_f , характером забарвлення і флуоресценцією плям ідентифікують антраценпохідні досліджуваної сировини.

При дослідженні антраглікозидів хроматографування проводять у системі етилацетат - мурашина кислота - вода (10:2:3); аналіз вільних антраценпохідних ведуть у толуолі (хроматографія на папері).

Кількісний аналіз антраценпохідних

Більшість методів кількісного визначення антраценпохідних передбачає визначення суми вільних оксиантрахінонів після попереднього гідролізу антраглікозидів.

На даний час найбільш широко застосовується колориметричний метод, запропонований Аутергофом, у різноманітних модифікаціях. Метод прийнятий ГФ Х для визначення антраценпохідних у лікарській рослинній сировині. Метод ГФ Х з деякими змінами (з метою безпеки роботи етиловий ефір замінюють хлороформом) приводиться нижче.

Методика кількісного визначення суми антраценпохідних (вільних і пов'язаних у виді глікозидів)

0,05 г (точна наважка) порошку досліджуваної сировини поміщають у круглодонну колбу з нормальним шліфом місткістю 100 мл, з'єднують з оберненим холодильником і піддають гідролізу шляхом кип'ятіння протягом 15 хв. з 7,5 мл крижаної оцтової кислоти (при дослідженні кори жостеру ольховидного, кореня ревеня) або з 7,5 мл крижаної оцтової кислоти і 1 мл концентрованої HCl (при дослідженні листків сени, кореневища і кореня марени). Під час нагрівання колбу трохи похитують, щоб не припустити пригорання рослинного матеріалу. Після остигання в колбу, не знімаючи

холодильника, додають 30 мл хлороформу і кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв. для екстрагування вільних антраценпохідних. Після охолодження (колбу разом із холодильником зняти з водяної бані) хлороформний витяг фільтрують через вату в ділительну лійку місткістю 300 мл. Колбу двічі промивають хлороформом (по 10 мл) і, пропускаючи через цю ж вату, виливають у ділительну лійку; потім вату двічі промивають хлороформом (по 5 мл).

До хлороформного витягу в ділительній лійці додають 40 мл води і, злегка похитуючи лійку, домагаються перемішування прошарків рідини, щоб відмити надлишок кислоти. Після повного розшарування нижній (хлороформний) прошарок зливають у конічну колбу місткістю 250 мл, а верхній (водяний) прошарок відкидають. Хлороформний витяг знову переносять у ділительну лійку і доливають туди луго-аміачного розчину (5 %-ного NaOH , що містить 2 %-ний аміак), попередньо зполоснувши їм колбу. Похитуючи ділительну лійку домагаються ретельного перемішування прошарків рідини, щоб витягти антраценпохідні луго-аміачним розчином із хлороформу. На 5 хвилин ділительну лійку залишають у спокої, і після повного розшарування рідини зливають нижній, хлороформний, прошарок у конічну колбу; червоний або фіолетовий, прозорий водно-лужний прошарок зливають у мірну колбу місткістю 250 мл. Хлороформний прошарок знову переносять у ділительну лійку, доливають туди 20 мл луго-аміачного розчину, попередньо зполоскують їм колбу, і знову витягають антраценпохідні, як описано вище, доти, поки водно-лужний прошарок перестане забарвлюватися.

Зібрані водно-лужні витяги доводять у мірній колбі до позначки луго-аміачним розчином і перемішують. 25 мл отриманого забарвленого розчину поміщають у круглодонну колбу з нормальним шліфом, з'єднують з оберненим холодильником і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Після остигання вимірюють оптичну щільність розчину на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром ($\lambda = 525 \text{ нм}$) у кюветі з товщиною прошарку 10 мм (нульову відмітку встановлюють по дистильованій воді). При одержанні занадто інтенсивного забарвлення розчин перед колориметруванням розбавляють луго-аміачним розчином.

Концентрацію антраценпохідних у колориметричному розчині, виражену відносно істизину, визначають за калібрувальним графіком, побудованим по хлориду кобальту ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Для цього готують від 0,2 до 3,0 %-ного розчини хлориду кобальту (10 - 12 розчинів рівномірно зростаючої концентрації) і вимірюють їхню оптичну щільність на цьому ж фотоелектроколориметрі (калібрувальний графік студенти одержують готовим). На осі ординат відкладають значення оптичної щільності, а на осі абсцис - концентрацію антраценпохідних у міліграмах на 100 мл, виходячи з того, що 1 %-ний хлорид кобальту за оптичною щільністю відповідає 0,36 мг істизину в 100 мл луго-аміачного розчину. Готування еталонних розчинів і визначення їхньої оптичної щільності роблять не менше 3 разів.

Відсотковий вміст антраценпохідних у перерахунку на абсолютно суху сировину обчислюють за формулою:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot K}{m \cdot 10(100 - \omega)},$$

де a - концентрація антраценпохідних у мг на 100 мл, знайдена за калібрувальним графіком; V - початковий об'єм лужного витягу, мл; m - маса наважки сировини, г; ω - втрата в масі сировини при висушуванні, %; K - коефіцієнт розведення розчину перед колориметруванням.

Методика кількісного визначення антраглікозидів

Біля 0,1 г (точна наважка) здрібненої сировини поміщають у колбу місткістю 150 мл, доливають 100 мл води, перемішують 10 хв. і нагрівають з оберненим холодильником у киплячій водяній бані протягом 15 хв. при періодичному помішуванні (похитуванні). Після охолодження під струменем води суміш перемішують, дають відстоятися 10 хв. і фільтрують через паперовий складчастий фільтр. 25 мл отриманого витягу поміщають у колбу місткістю 100 мл, додають 2,5 мл 50 %-ної H_2SO_4 і нагрівають у киплячій водяній бані при періодичному перемішуванні протягом 30 хв. Після охолодження розчин переносять у ділильну лійку місткістю 300 мл, а колбу обполіскують 10 мл води і 60 мл хлороформу. Промивні води і хлороформ приєднують до основного витягу в ділильній лійці і збовтують протягом 5 хв. Після відстоювання хлороформний прошарок відокремлюють, а витяг збовтують із новою порцією (30 мл) хлороформу. До об'єднаного хлороформного витягу додають 50 мл луго-аміачного розчину й обережно збовтують протягом 5 хв. Після відстоювання прозорий водяний прошарок зливають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять луго-аміачним розчином до мітки і перемішують. Від отриманого розчину відбирають 25 мл і поміщають у конічну колбу з оберненим холодильником, нагрівають у киплячій водяній бані протягом 15 хвилин. Після охолодження рідина кількісно переносять у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм луго-аміачним розчином до позначки.

Оптичну щільність розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра при $\lambda = 525$ нм у кюветі з товщиною прошарку 10 мм, використовуючи в якості розчину порівняння луго-аміачний розчин.

Концентрацію похідних антрацену в розчині, виражену в хрізофановій кислоті, визначають за калібрувальним графіком, побудованим за розчинами хлорида кобальту. Відсотковий вміст антраценпохідних (у перерахунку на антраглікозиди) x обчислюється за формулою:

$$x = \frac{\alpha \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 1,59}{1000 \cdot 1000 m \cdot 25 \cdot 25 (100 - \omega)} = \frac{\alpha \cdot 8 \cdot 1,59}{m (100 - \omega)},$$

де α - концентрація антраценпохідних випробуваного розчину, знайдена за калібрувальним графіком, мг; m - маса наважки сировини, г; ω - втрата в масі

сировини при висушуванні, %; 1,59 - відношення середньої маси антраглікозидів до середньої маси агліконів.

Для визначення окремих сполук антраценпохідних користуються хроматоспектрофотометричними методами. З рослинного матеріалу антраценпохідні екстрагують у виді глікозидів або вільних агліконів і розділяють за допомогою хроматографії на папері або в тонкому прошарку сілікагеля. Для поділу антраценпохідних, що витягаються метиловим спиртом (антраглікозиди і вільні аглікони), запропоновано метод тонкошарової хроматографії на сілікагелі марки КСК у системі розчинників бензол - метиловий спирт (4:1). Плями антраценпохідних на хроматограмі відзначають в УФ світлі і збирають кожну пляму на скляний фільтр № 4. Фільтр промивають 0,5 н NaOH, кількісно переносять у мірну колбу на 50 мл і доводять об'єм 0,5 н розчином NaOH до позначки. Через 20 хв. визначають оптичну щільність розчинів за максимумом поглинання в УФ області.

Питання для підготовки:

1. Які природні речовини називають антраценпохідними? Класифікація.
2. У якому виді антраценпохідні знаходяться в рослинах?
3. Фізіологічна роль антраценпохідних у
4. рослинах.
5. Медично-біологічне значення антраценпохідних.
6. Методи ідентифікації антраценпохідних безпосередньо в рослинній сировині.
7. Фізико-хімічні властивості антраценпохідних.
8. Методи виділення з рослинної сировини.
9. Якісні реакції, можливість диференціювання з їхньою допомогою окремих груп антраценпохідних.
10. Хроматографічний аналіз, характеристичні особливості окремих груп антраценпохідних при порушенні в УФ світлі.

Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Дубильні речовини"

Мета роботи: навчитися екстрагувати дубильні речовини з рослинної сировини; навчитися ідентифікувати класи дубильних речовин; ознайомитися з оцінкою можливості використання рослин, що містять дубильні речовини в якості лікарської сировини, консервантів, антисептичних або інших засобів; навчитися проводити експерименти по виявленню залежності вмісту вторинних метаболітів від екологічних умов і фізіологічного становища рослин.

Дубильні речовини - безазотисті органічні сполуки рослинного походження, що мають в'язучий смак, здатні поглинатися недубленою шкірою і при взаємодії з білками шкіри перетворюють її в дублену. Дубильні речовини добре розчиняються в гарячій воді, метиловому та етиловому спиртах. Погано або зовсім не розчиняються в петролейному і етиловому ефірах, хлороформі, бензолі, сірководневу.

Якісні реакції на дубильні речовини

Готують настій з крупного порошку рослин, заливаючи окропом у концентрації 1 : 30, потім 15 хв. настоюють на киплячій водяній бані. Відфільтровують крізь ватний фільтр. З охолодженням і профільтрованим настоем у пробірках виконують такі реакції.

1. До 2-3 мл досліджуваного розчину краплями додають однакову кількість 0,5%-ного розчину желатини (у розчин желатини, щоб уникнути плісняви, додають трохи хлороформу). Щоразу перед використанням цей розчин розріджують нагріванням і знову охолоджують до кімнатної температури. При наявності дубильних речовин випадає осад або виникає помутніння. Осади розчиняються у гарячій воді і в надлишку розчину желатини. Спирт екстрагує з осадів майже всі дубильні речовини. Чутливість желатинової проби посилюється при додаванні слідів 0,1 н розчину соляної кислоти або 10 %-ного розчину кухонної солі. Оптимальне рН для цієї реакції лежить у межах 3,5 - 4,5.

2. При додаванні до невеликої кількості досліджуваного розчину кількох крапель піридину у випадку наявності дубильних речовин утворюється осад.

3. До 10 мл досліджуваного розчину додають 4 краплі гексаметилентетраамінового реактиву. При наявності дубильних речовин утворюються осад або помутніння. Гексаметилентетрааміновий (уротропіновий) реактив: 10 частин насиченого розчину ацетату цинку, 10 частин 30%-ного розчину ацетату амонію, 1 частина льодяної оцтової кислоти і 10 частин 30% розчину

гексаметилентетрааміну (уротропіну). Оптимум реакції буде при $\text{pH} = 5 - 6$; у лужному розчині осад не випадає. Чутливість реакції 1: 100 000 - 1:1 000 000. Фосфати заважають проведенню реакції.

4. Дубильні речовини осаджують розчинами алкалоїдів.

Методи, які дають можливість визнати різні групи дубильних речовин:

Для визначення характеру дубильних речовин (ті, що гідролізуються, галові, пірогалолові, конденсовано - катехінові) застосовують такі реакції.

1. *Реакція із залізоамонієвими галунами.* При добавлянні до частини екстракту кількох краплин залізоамонієвих галунів у випадку наявності дубильних речовин конденсованої групи виникає чорно-зелене забарвлення; у разі наявності дубильних речовин, що гідролізуються — чорно-синє. Реакцію треба проводити в нейтральному або слабо-кислому середовищі. Така реакція на дубильні речовини не специфічна, оскільки може бути зумовлена наявністю ефірних масел та інших речовин.

2. *Реакція з формальдегідом і соляною кислотою.* До 50 мл досліджуваного розчину, що містить дубильні речовини (концентрація дубильних речовин повинна становити приблизно 0,4%), добавляють 5 мл концентрованої соляної кислоти та 10 мл 40%-ного розчину формальдегіду отриману суміш кип'ятять у колбі з зворотним холодильником протягом 30 хв до кипіння. При наявності конденсованої групи дубильних речовин утворюється осад. Після охолодження суміш фільтрують. До 10 мл фільтрату доливають 1 мл 1 % розчину залізоамонійних галунів, а потім добавляють без збовтування приблизно 5 частин кристалічного ацетату натрію. У випадку присутності дубильних речовин, що гідролізуються у нейтральному середовищі з'являється фіолетове, або синє забарвлення фільтрату, особливо поблизу дна посудини, і кристалів ацетату натрію.

3. *Реакція з ацетатом свинцю в підкисленому оцтовою кислотою розчині.* До 5 мл прозорого досліджуваного розчину дубильної речовини (тієї самої концентрації, що й у попередній реакції) добавляють 10 мл 10 %-ної оцтової кислоти і 5 мл 10 %-ного розчину ацетату свинцю. При наявності танідів, що гідролізуються, протягом 5 хвилин повинен утворитися осад. При наявності конденсованих танідів фільтрат від 1 %-ного розчину залізоамонійних галунів повинен забарвитись у зелений або фіолетовий колір.

4. *Реакція з бромною водою.* До 5 мл аналізованого 0,4 %-ного відфільтрованого прозорого розчину добавляють 2 %-ний розчин бромної води до появи чіткого запаху бромну, потім суміш недовго кип'ятять. Результати реакції визначають через 5 хв. Помутніння або осад, що утворилися пізніше, до уваги не беруть. Дубильні речовини групи катехіну (які не гідролізуються) при добавлянні бромної води відповідно утворюють осад, а ті, що гідролізуються

(галотаніни), утворюють з бромом розчинні сполуки, які при надлишку броду поступово випадають в осад.

5. *Реакція з сірчистим амонієм.* До 5мл 0,4%-ного розчину дубильної речовини додавають 5 краплин концентрованого розчину сірчистого амонію. Пірогалолові, що гідролізуються, дубильні речовини утворюють осад, пірокатехінові, що не гідралізуються, осад не утворюють.

6. *Реакція з нітритом натрію.* До 2 мл витягу додають декілька кристалів NaNO_2 і 2 краплі 0,1 н HCl . При наявності гідролізуємих дубильних речовин з'являється коричневе забарвлення.

✓ *Хроматографічне визначення* (катехінів листа чаю ТСХ) 0,1 г подрібненої сировини (лист чаю) заливають 2 мл 95 %-ного етилового спирту і нагрівають на водяній бані до кипіння, охолоджують, фільтрують.

Отриманий етанольний екстракт завдають за допомогою капіляра на стартову лінію хроматографічної платівки "Сілуфол" (висота стовпчика рідини в капілярі 1,5 - 2 см; діаметр плями на стартовій лінії не більш 5 мм). Поруч із досліджуванним екстрактом на стартову лінію наносять у якості "свідка" розчин очищеної суми катехінів листа чаю. Після висушування платівку поміщають у хроматографічну камеру із системою розчинників н-бутанол - оцтова кислота - вода (40:12:28). Хроматографування проводять протягом 1,5 год. (пробіг фронту розчинника 10 - 12 см). Потім хроматограму висушують на повітрі й обприскують розчином 1 %-ного ваніліну в концентрованій соляній кислоті. Катехіни виявляються у вигляді червоно-оранжевих плям. Хроматограму на папері проводять в 2 %, 15 % оцтовій кислоті або в системі БОВ (5:4:1), а в якості проявника — залізоамонійні галуни.

Кількісне визначення дубильних речовин у рослинній сировині

Зараз нараховується близько 100 різних способів визначення дубильних речовин у рослинній сировині. Але кожний з запропонованих методів не досконалий. Труднощі, які виникають при кількісному визначенні дубильних речовин, полягають у тому, що поряд з дубильними речовинами в екстрактах визначаються інші речовини.

Усі методи кількісного визначення дубильних речовин у рослинному матеріалі можуть бути поділені на:

1) вагові, що базуються на осадженні та адсорбуванні дубильних речовин солями важких металів, алкалоїдами, шкіряним порошком, желатиною;

2) об'ємні, що засновані на окислюванні дубильних речовин титрованими розчинами перманганату калію, червоною кров'яною сіллю, йодом та іншими окислювачами;

3) колориметричні, що засновані на утворенні забарвлених продуктів з різними реагентами;

4) нефелометричні, що засновані на помутнінні розчинів при дії на розчини дубильних речовин певними осаджувачами;

5) рефрактометричні і спектрофотометричні методи.

Найбільшого поширення при кількісному визначенні набули вагові методи, менше - титрометричні і зовсім незначного - нефелометричні, рефрактометричні, колориметричні та спектрофотометричні методи.

*Кількісне визначення дубильних речовин у рослинному матеріалі
ваговим мідноацетатним методом*

Близько 2 г (точна наважка) середньої дрібності порошку (сито № 3) рослинного матеріалу екстрагують у колбі місткістю 250 мл трічі ефіром послідовно 20, 10 і 10, перший раз протягом 2 години двічі протягом 1 години, обережно зливаючи щоразу ефірний екстракт рослинного матеріалу. Оброблений ефіром рослинний матеріал послідовно кип'ятять з 50 і 30 мл по півгодини, проціджуючи відвари щоразу крізь вату у мірну колбу місткістю 100 мл; потім рослинний матеріал переносять у ту саму лійку і промивають невеликими порціями гарячої води до зникнення в рідині, що витікає реакції на дубильні речовини (проба з розчином хлорного заліза). Після охолодження рідину доводять до позначки і відбирають 50 мл, які випарюють у чашці на водяній бані до об'єму 20 мл і добавляють 20 мл спирту. Якщо при цьому утворюється осад йому дають відстоятись, рідину фільтрують крізь змочений водою фільтр, а осад промивають спиртом і фільтрують крізь той самий фільтр до зникнення реакції на дубильні речовини. До фільтрату добавляють 100 мл води, рідину випарюють на водяній бані до об'єму 30 мл. Після охолодження рідину фільтрують, фільтрат промивають невеликими порціями води до зникнення реакції на дубильні речовини. Фільтрат нагрівають до кипіння, добавляють 20 мл 4%-ного розчину ацетату міді до повного осадження дубильних речовин і нагрівають на водяній бані протягом 10-15 хв. Після охолодження розчин фільтрують крізь попередньо висушений і зважений беззольний фільтр. Осад на фільтрі промивають водою до зникнення реакції на мідь (проба з розчином залізосинеродистого калію) і сушать до сталої ваги. Потім фільтри з осадом спалюють, золу змочують азотною кислотою і прожарюють до сталої ваги. Різниця між вагою осаду танату міді та вагою залишку після прожарювання і визначає вміст дубильних речовин у взятій наважці. Процентний вміст дубильних речовин розраховують за формулою:

$$\omega = \frac{(e - a) - (d - c - e) \cdot 100}{P/2},$$

де ω – процент дубильних речовин; a – вага сухого беззольного фільтра, г; e – вага висушеного осаду танату міді з фільтром, г; c – вага порожнього тигля, доведеного до сталої ваги, г; d – вага тигля з золою після

прожарювання, г; e – вага золи фільтра (зазначена в обкладинці до фільтрів); P – наважка рослинної сировини, г.

Кількісне визначення дубильних речовин за методом К.С. Муджірі

З 10 г подрібненого сухого рослинного матеріалу тричі екстрагують дубильні речовини гарячою водою (з температурою 60°C), збовтуючи щоразу по 5 хв. Для одноразового екстрагування беруть звичайно 30 мл води. Утворений екстракт змішують, охолоджують до 15°, об'єм останнього доводять водою до 100 мл і фільтрують.

Беруть 1 мл фільтрату, вливають у градуйовану центрифугову пробірку з поділками, додають поступово при обережному збовтуванні пробірки обертальними рухами 4 мл 5 %-ного розчину гідрату окису барію. Одночасно в окрему таку саму пробірку як стандартний розчин вливають 1 мл 1 %-ного розчину таніну і додають таку саму кількість зазначеного вище реактиву в тій самій кількості. Об'єм рідини в пробірках доводять до 10 мл і центрифугують протягом 15 хвилин при 1600 обертах на хвилину.

Порівнюючи об'єм виділеного осаду, утвореного з 1 мл досліджуваного розчину, з об'ємом осаду стандартного розчину, обчислюють кількість таніну так: 0,4 мл осаду з 1 мл стандартного розчину відповідає 0,01 г таніну, а 0,5 мл осаду з 1 мл досліджуваного розчину відповідатиме:

$$0,4 \text{ мл} - 0,01 \text{ г} \qquad x = \frac{0,5 \cdot 0,01}{0,4} = 0,0125 \text{ г таніну}$$

$$0,5 \text{ мл} - x$$

Отже 100 мл такого розчину, що відповідають 10 г сировини, міститимуть 1,25 г таніну, що становить 12,5 %.

Процентний вміст таніну ω обчислюють за формулою: $\omega = \frac{a \cdot 10}{b}$,

де a – об'єм осаду з досліджуваного розчину, мл; b – об'єм стандартного розчину, мл.

Кількісне визначення дубильних речовин за методом

Левенталя - Курсановим

3 – 5 г подрібненої рослинної сировини (розмір часток не повинен перевищувати 2 – 3 мм) поміщають у конічну колбу місткістю 150 – 200 мл, заливають 30 мл етилового ефіру і настоюють 30 хв., після чого ефір обережно зливають, а решту сировини знову екстрагують 30 мл ефіру і залишають на такий самий час. Після обробки ефіром сировину заливають 80 мл гарячої води і нагрівають на киплячий водяній бані 30 хв.

Витяжку фільтрують крізь вату або вчетверо складену марлю, але попередньо оброблену витяжкою з рослинної сировини приблизно такої самої концентрації, бо вата і марля адсорбують дубильні речовини.

Під час фільтрування витяжки треба стежити за тим, щоб шматочки сировини не потрапляли на ватку або марлю. Сировину, що залишилася в колбі, знову заливають 80 мл гарячої води і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв.

Другу витяжку фільтрують крізь ту саму вату або марлю. Таким самим способом приготують третю, четверту і т. д. витяжки. Екстрагують до відсутності реакції у витяжці на дубильні речовини (повноту екстрагування перевіряють 1 %-ним розчином залізоаміакових галунів). Усі витяжки зливають у мірну колбу певної місткості залежно від об'єму витяжки і доводять водою до позначки. Можна збирати фільтрат і в звичайну колбу, але потім треба вимірювати об'єм витяжки мірним циліндром.

10 мл екстракту переносять у літрову колбу, куди додають 750 мл води і 25 мл розчину індигокарміну. Суміш без нагрівання титрують 0,01 н розчином перманганату калію при постійному перемішуванні скляною паличкою до утворення рідини золотаво-жовтого кольору. Паралельно ставлять холостий дослід без екстрагування дубильних речовин, беручи лише 25 мл розчину індигокарміну, які вносять у колбу, куди доливають 760 мл води, і титрують 0,01 н розчином перманганату калію до золотаво-жовтого кольору рідини. Розрахунок здійснюють за формулою:

$$\frac{(a - b) \cdot K \cdot 0,0004157 \cdot 100 \cdot об}{n \cdot m},$$

де a – кількість мілілітрів 0,01 н розчину перманганату калію, витраченого на дослід; b – кількість мілілітрів 0,01 н розчину перманганату калію, витраченого на холостий дослід; K – коефіцієнт поправки до 0,01 розчину перманганату калію; 0,0004157 – перерахунковий коефіцієнт на танін (за Нейбауером); 1 мл 0,01 н розчину перманганату калію відповідає 0,0004157 г таніну, за Курсановим – 0,000582 г; $об$ – об'єм витяжки дубильних речовин; n – наважка сировини; m – кількість мілілітрів витяжки, взятої для титрування.

*Кількісне визначення дубильних речовин у рослинній сировині за методом
Державної фармакопеї X видання*

Близько 2 г (точна наважка) подрібненої сировини, просіяної крізь сито з діаметром отворів 3 мм, переносять у конічну колбу місткістю 100 мл, заливають 50 мл окропу і нагрівають на водяній бані протягом 30 хвилин при інтенсивному перемішуванні. Рідину відстоюють протягом кількох хвилин і обережно проціджують крізь вату (так, щоб частинки сировини не потрапляли на вату) у мірну колбу місткістю 250 мл. Сировину в колбі повторно екстрагують окропом, як зазначено вище, і проціджують рідину в ту саму

мірну колбу. Екстрагування повторюють кілька разів до негативної реакції з розчином залізоаміакових галунів). Рідину в мірній колбі охолоджують і доводять водою до позначки. 25 мл отриманої рідини вливають у конічну колбу місткістю 1 л, додають 750 мл води, 25 мл розчину індігосульфокислоти і титрують при постійному перемішуванні 0,1н розчином перманганату калію до золотаво-жовтого забарвлення.

1 мл 0,1 н розчину перманганату калію відповідає 0,0004157 г дубильних речовин у перерахунку на танін. Паралельно проводять контрольний дослід, титруючи 25 мл індігосульфокислоти в 750 мл води.

Кількісний вміст дубильних речовин x розраховують за формулою:

$$x = \frac{(V_1 - V_2) K \cdot D \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_3 (100 - \omega)},$$

де V_1 – об'єм 0,1 н KMnO_4 , що пішов на титрування, мл; V_2 – об'єм 0,1 н KMnO_4 , що пішов на контрольну пробу, мл; K – виправлення до титру (за щавлевою кислотою); D – коефіцієнт перерахування на танін: для дубильних речовин, що гідролізуються дорівнює 0,004157; для конденсованих — 0,00582; V – загальний об'єм екстракту, мл; m – маса наважки сировини, г; V_3 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл.

✓ *Визначення дубильних речовин осадженням желатиною
за П.Я. Якимовим і Г.В. Крушаковою*

Потрібні реактиви. 1. Желатиновий розчин. У колбу насипають 10 г подрібненої желатини, заливають 400 мл холодної дистильованої води для видалення водорозчинних домішок і залишають стояти протягом 1 год. При частому збовтуванні. Потім обережно зливають воду з набряклої желатини, всипають у колбу 100 г кухонної солі, доливають 800 мл дистильованої води, підігрітої до 55° , і при цій температурі розчиняють желатину. Теплий розчин швидко фільтрують крізь складчатий фільтр у мірну колбу місткістю 1 л, промивають фільтр теплою водою і доводять до позначки.

Розчин желатини зберігають закритим при температурі не вище 15°C . Взята для дослідів желатина повинна містити золи не більше 2 % і вологи не більше 16 %. Приготовлений за описаним способом 1 %-ний розчин желатини повинен легко фільтруватися крізь складчастий паперовий фільтр при температурі $30 - 40^\circ$, а після фільтрування повинен бути прозорим. З тим самим розчином можна працювати протягом 5 днів; щодня перед початком роботи його треба підігрівати на водяній бані до $40 - 50^\circ\text{C}$.

2. Розчин таніну. Титр желатинового розчину встановлюють описаним вище способом за 0,4 %-ним розчином хімічно чистого таніну, вміст дубильних речовин якого назначають попереднім аналізом за стандартним методом з шкірним порошком.

Зважують на аналітичних терезах 1 г чистого таніну, розчиняють водою в мірній колбі місткістю 250 мл і доводять до позначки. Танін повинен легко і повністю розчинятись у холодній дистильованій воді і мати рН близько 4.

Титр желатини розраховують за таніном: дубильних речовин ТН у приготовленому 0,4 %-ному таніні за стандартним методом в 1 л міститься 3,3144г. Отже, у 10 мл таніну витрачено 4 мл розчину желатини, то Х-титр желатини в 1 г таніну буде такий:

$$X = \frac{0,003314 \cdot 1}{0,4} = 0,00829 \text{ г}$$

Техніка методу. У кілька пробірок (5 – 6) наливають точно по 10 мл досліджуваного прозорого розчину таніну (з рН близько 4 – 4,5) при температурі 15 – 20 С⁰. У кожную з пробірок наливають з бюретки, наповненої розчином желатини, різну кількість желатини (в мілілітрах). Наприклад, у першу пробірку наливають 1 мл, у другу – 2 мл, третю – 3 мл, четверту – 4 мл, п'яту – 5 мл.

Пробірки щільно закривають гумовими пробками і енергійно збовтують протягом 3 хв. Осади відфільтровують крізь маленькі паперові фільтри в сухі чисті пробірки і досліджують прозорі фільтрати на повноту осадження танінів, додаючи дві краплини желатинового розчину. У цьому досліді в перших трьох пробірках спостерігалась каламуть, а розчини в четвертій і п'ятій пробірках залишилися прозорими. Отже, кількість добавленої желатини повинна коливатися між 3 і 4 мл; точніше його знаходять, застосовуючи менші кількості розчину, як зазначено в таблиці 1.

Таблиця 1. Визначення таніну

№ пробірки	Кількість добавленої желатини, мл	Контроль розчином желатини у фільтраті	№ пробірки	Кількість добавленої желатини, мл	Контроль розчином желатини у фільтраті
1	1,0	пластівці	6	3,2	слабке помутніння
2	2,0	помутніння	7	3,4	опалесценція
3	3,0	слабке помутніння	8	3,6	слабка опалісценція
4	4,0	прозорий	9	3,8	прозорий
5	5,0	прозорий	10	4,0	прозорий

Питання для підготовки:

1. Поняття "дубильні речовини", флобафени, "харчові" дубильні катехіни.
2. Сутність класифікації дубильних речовин.
3. Напишіть формули вихідних мономерів дубильних речовин, що гідролізуються і конденсованих форм дубильних речовин.
4. Відзнаки фізико-хімічних властивостей мономерів дубильних речовин, що гідролізуються від конденсованих.
5. Якими реакціями можна визначити тип дубильних речовин у рослинній сировині?
6. Яка загальна реакція на фенольні сполуки позитивна з дубильними речовинами?
7. Які якісні реакції точно свідчать про наявність дубильних речовин у сировині?
8. Як проводиться очищення дубильних речовин рослинних екстрактів від супутніх сполук?
9. У чому сутність кількісного визначення дубильних речовин по методу Левенталя в модифікації Курсанова?
10. Принцип визначення дубильних речовин методикою, розробленою Якимовим і Крушаковою.
11. У чому відмінність будівлі конденсованих дубильних речовин від інших фенольних сполук?
12. Про що може свідчити збільшення вмісту дубильних речовин в однакових за видовою приналежністю рослинах, що ростуть в однакових і різноманітних екологічних умовах?