

Лабораторне заняття № 6

Тема: Сполуки з хіноною структурою. Полімерні фенольні сполуки (Дубильні речовини)

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 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.).

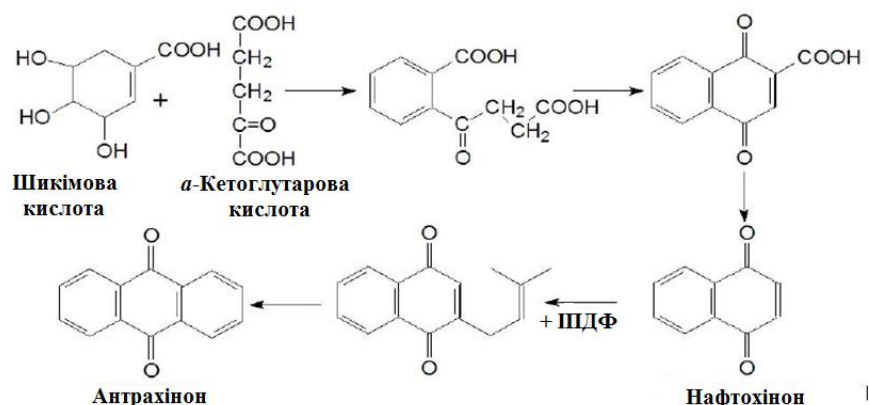


Рис. Утворення нафтохінонів і антрахінонів із шикімової кислоти

Другим компонентом у цьому біосинтезі є 2-оксиглутарова (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 некарбоксільних 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 карбоксільної 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 карбоксільної, а в 3-му — метильної групи. При подальших реакціях на шляху біосинтезу антрахінонів та інших антраценпохідних карбоксільна група зазвичай відщеплюється, а метильна — зберігається або окислюється, або в спиртову, або карбоксільну.

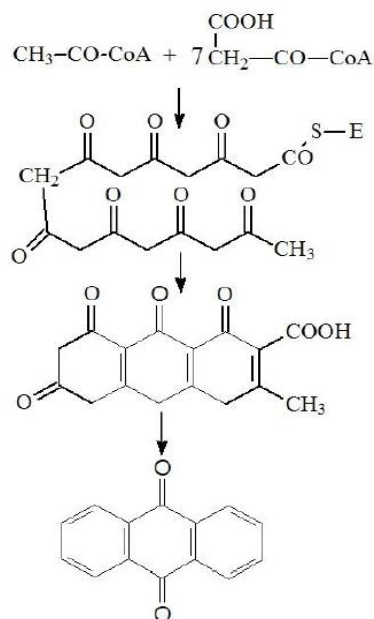


Рис. Полікетидний шлях утворення антрахінонів
Гідролізовані дубильні речовини

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

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

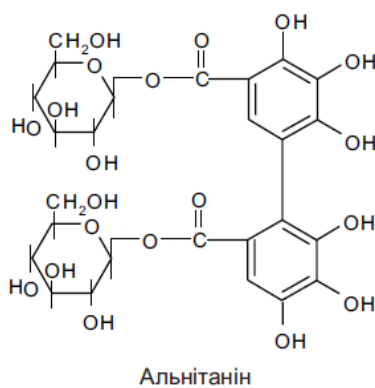
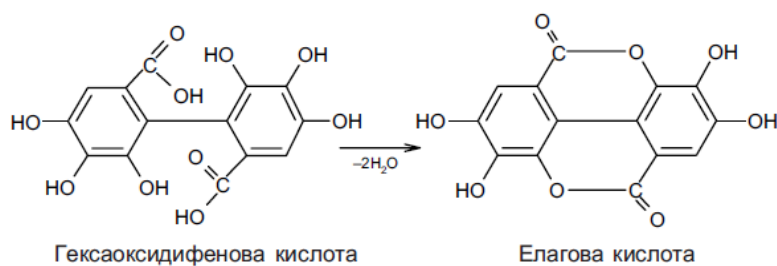


Рис. Утворення гідролізованих дубильних речовин

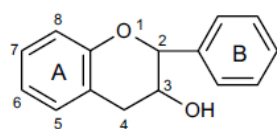
Ефіри галової кислоти і катехіну утворюють проміжну ланку між галотанінами та флавоноїдами.

Конденсовані дубильні речовини

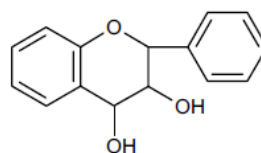
Конденсовані таніни є полімерами флавоноїдів і утворюються як продукти фенілпропаноїдного метаболізму. Утворення конденсованих дубильних речовин є наслідком окислювальних реакцій, що каталізуються ферментами фенолоксидазного або пероксидазного типу (рис. 17).

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.

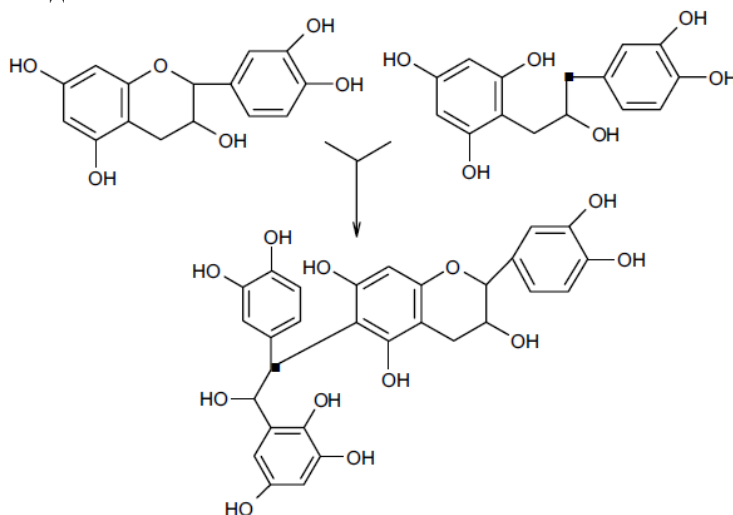


Рис. Утворення конденсованих дубильних речовин за Фрейденбергом

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

Якісні реакції на антраценпохідні

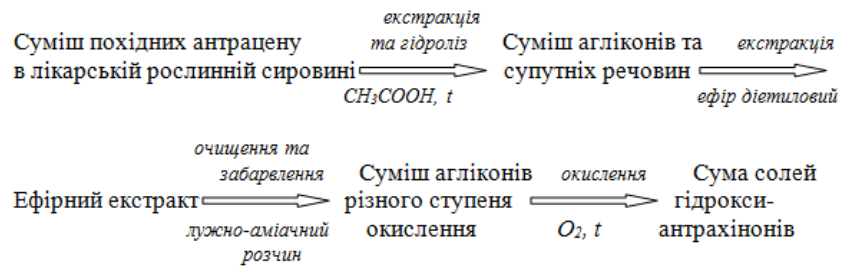
№	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)	Хімізм реакції
1	<i>Реакція утворення антрахінолятів із лугом:</i> - на сухій сировині - з водною витяжкою (1:10) - реакція Борнтредера			
2	<i>Реакція мікросублімації</i>			
3	<i>Реакція утворення лаків</i>			

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. Ауергоффом, модифікований А.С. Романовою та А.І. Банковським. Ауергофф 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 істизин (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.

Зробіть висновки.

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, сірковуглеці.

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 добавляють однакову кількість 0,5%-ного розчину желатини (у розчин желатини, щоб уникнути плісняви, добавляють 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 краплин піридину у випадку наявності дубильних речовин утворюється осад.

3. До 10 мл досліджуваного розчину добавляють 4 краплини 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 рН = 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 додають 5 краплин концентрованого розчину сірчистого амонію. Пірогалолові, що гідролізуються, дубильні речовини утворюють осад, пірокатехінові, що не гідралізуються, осаду 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;