

## Біохімія лікарських рослин

### Лабораторне заняття № 4

#### Тема: Глікозиди. Кардіостероїди. Сапоніни

##### Перелік питань для самопідготовки:

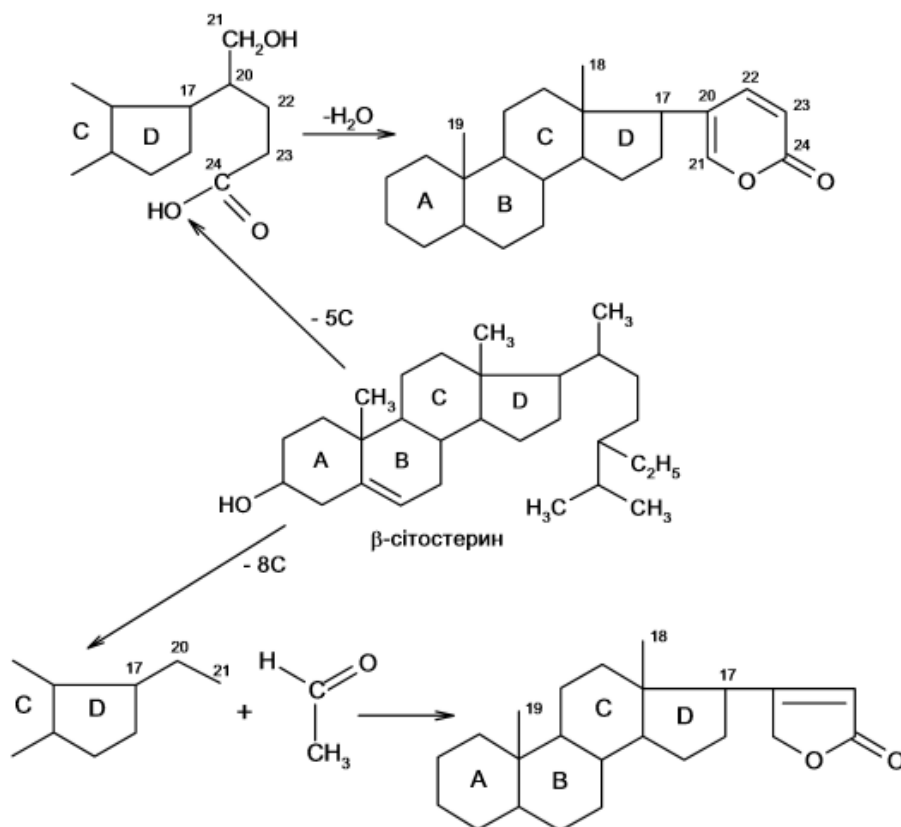
1. **КОМПЛЕКСИ БАР З ВУГЛЕВОДАМИ.** Глікозиди. Визначення та класифікація.
2. Фізико-хімічні властивості глікозидів.
3. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук в рослинній сировині.
4. Розповсюдження.
5. Біогенез.
6. Біологічна дія. Представники. Рослини, які містять ці сполуки. Біологічні властивості та застосування в медицині.
7. Біологічна активність сірковмісних та ціаногенних глікозидів.
1. **СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ.** Визначення та класифікація, фізико-хімічні властивості.
2. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук у рослинній сировині.
3. Біологічна дія.
4. Біогенез.
5. Представники. Розповсюдження. Рослини, які містять ці сполуки.
6. Біологічні властивості та застосування в медицині.
1. **САПОНІНИ.** Визначення та класифікація.
2. Фізико-хімічні властивості сапонінів.
3. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук в рослинній сировині.
4. Розповсюдження.
5. Біогенез.
6. Біологічна дія. Представники.
7. Рослини, які містять ці сполуки. Біологічні властивості та застосування в медицині.

##### Навчальні завдання:

**ЗАВДАННЯ 1.** Виконайте лабораторну роботу (див. додаток): виділення та якісні реакції

**ЗАВДАННЯ 2.** Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть загальну схему метаболізму утворення серцевих глікозидів / тіо-/ціаноглікозидів та сапонінів із зазначенням проміжних продуктів.

**СЕРЦЕВІ ГЛІКОЗИДИ** Вважають, що обидва типи кардіостероїдів утворюються з  $\beta$ -сітостерину за рахунок зміни структури бічного ланцюга у C-17.





**Найбільшу кардіотонічну активність** мають серцеві глікозиди, які конформаційно найменш стабільні. Кардіостероїди з трансконфігурацією кілець А/В у 3,3 раза менш активні за глікозиди, що мають цис-конфігурацію. І навпаки, у разі цис-конфігурації С/ D кілець серцевих глікозидів активність їх значно вища, ніж при транс-конфігурації.

**Малоактивні карденоліди і буфадієноліди**, які у структурі містять карбоксильні групи. Активність кардіостероїдних агліконів залежить від ступеня їх полярності: **чим вищий ступінь полярності, тим вища активність**. Підвищує активність і знижує кумуляцію альдегідна група при С-10.

**Завдання 4. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить серцеві глікозиди / глікозиди або сапоніни та узагальніть результати у вигляді таблиці.**

**Якісний аналіз ЛРС, яка містить серцеві глікозиди**

Група реакцій	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)
<i>На стероїдне ядро</i>	Лібермана-Бурхарда		
	з реактивом Чугаєва		
	Розенгейма		
<i>На ненасичене лактонне кільце 5-членне</i>	Кедде		
	Легалья		
	Раймонда		
	Бальє		
<i>На 6-членне лактонне кільце</i>	Тат'є		
<i>На вуглеводний компонент</i>	Келлера-Кіліані		
	Реакція з ксантгідролом		
	З реактивом Фелінга		
	Реакція Пезеца		
	Реакція з нітрофенілгідразиним та натрію гідроксидом		

**Якісний аналіз ЛРС, яка містить сапоніни**

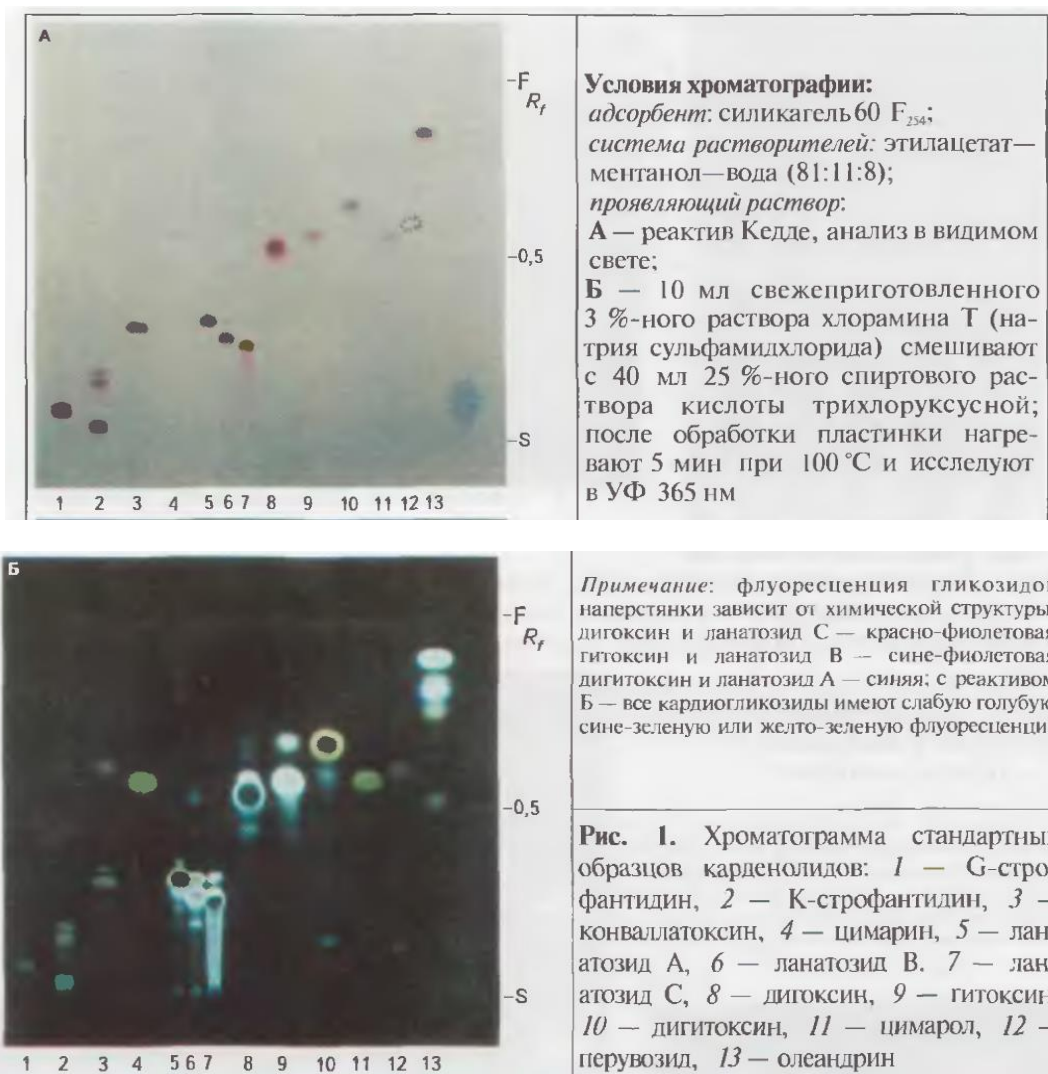
Група реакцій	Назва реакції	Реактиви	Результат реакції (забарвлення/осад)
<i>Засновані на фізичних властивостях</i>			
<i>Засновані на хімічних властивостях: - осадження</i>			
<i>Засновані на хімічних властивостях: - кольорові</i>			
<i>Засновані на біологічних властивостях</i>			

**Завдання 5. Проаналізуйте методи кількісного аналізу ЛРС, яка містить серцеві глікозиди. Розгляньте методіку в представленому нижче завданні, розрахуйте R<sub>f</sub> для типової хроматограми.**

**Задание 3.** Приготовьте очищенное извлечение из листьев наперстянки пурпуровой или шерстистой и идентифицируйте кардиотонические гликозиды ТСХ по методике *PhEur*. Зарисуйте схему хроматограммы и рассчитайте величину  $R_f$  кардиогликозидов в экстракте и достоверных образцов. Сравните полученные вами результаты с типовой хроматограммой, цв. вкл. XXI, рис. 1.

**Методика.** К 1,0 г измельченного сырья (сито 180) прибавляют смесь 20 мл 50 %-ного этанола и 10 мл 10 %-ного раствора свинца ацетата, кипятят 2 мин, охлаждают и центрифугируют. Надосадочную жидкость помещают в делительную воронку и взбалтывают с 20 мл хлороформа. Если образуется стойкая эмульсия, раствор центрифугируют. Хлороформный слой отделяют и пропускают через безводный натрия сульфат. 10 мл фильтрата упаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 1 мл смеси равных объемов хлороформа и метанола.

20 мкл полученного раствора наносят на пластинку в виде полосы длиной 2 см и шириной 0,3 см. Хроматографируют в системе растворителей этилацетат—метанол—вода (75:10:7,5), в качестве реактива для обработки хроматограммы используют смесь 2 мл 1 %-ного раствора хлорамина и 8 мл 25 %-ного спиртового раствора кислоты трихлоруксусной. Обработанную хроматограмму нагревают при 100—105 °С в течение 5—10 мин. Просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм. Могут наблюдаться зоны со светло-голубой флюоресценцией (пурпуреагликозид В, гитоксин), голубой или голубовато-зеленой (ланатозиды А, В, С) и коричневатой-желтой (пурпуреагликозид А, дигитоксин).



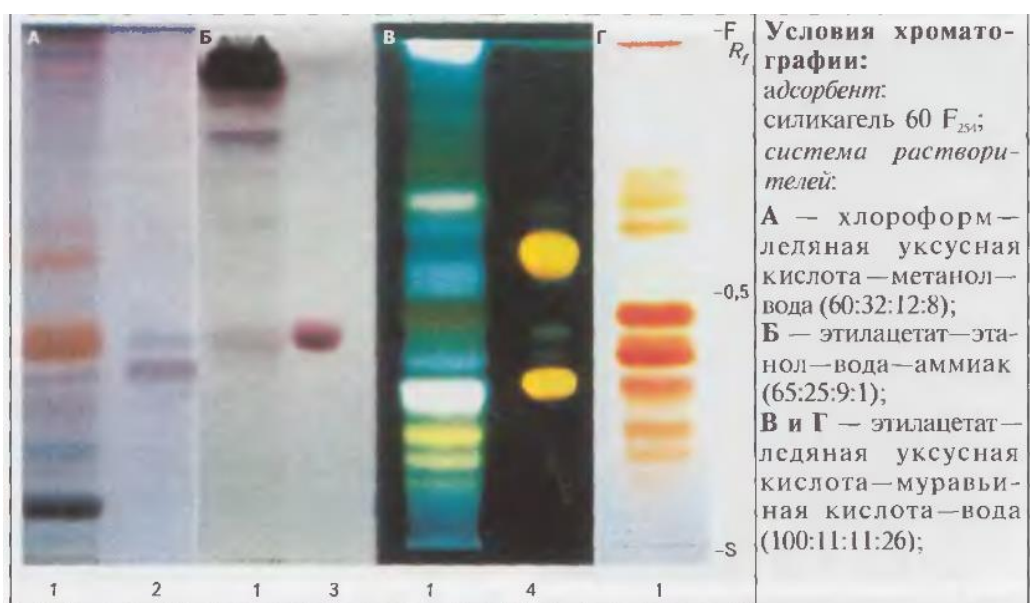
**ЗАВДАННЯ 6.** Проаналізуйте методи якісного/кількісного аналізу ЛРС, яка містить сапоніни.



**Задание 3.** Проведите обнаружение сапонинов методом тонкослойной хроматографии. Зарисуйте схему хроматограммы в лабораторный журнал, рассчитайте величину  $R_f$ . Сделайте заключение о наличии сапонинов в исследуемом образце сырья. Сравните полученные вами результаты с хроматограммами на цв. вкл. XVIII, рис. 4 и XIX, рис. 1.

**Методика.** 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл 70 %-ного спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане 15 мин. Охлажденный фильтрат упаривают в 2 раза и наносят 25–40 мкл на линию старта пластинки, покрытой слоем силикагеля; параллельно наносят растворы стандартных образцов сапонинов (эсцин).

Для разделения сапонинов пластинку помещают в камеру с системой растворителей хлороформ–метанол–вода (65:50:10). Когда фронт растворителей пройдет расстояние 10–11 см, пластинку вынимают, высушивают в вытяжном шкафу, просматривают хроматограмму в видимом и УФ-свете, обрабатывают 5 %-ным раствором кислоты серной в этаноле и сразу же 1 %-ным спиртовым раствором ванилина. Хроматограмму выдерживают в сушильном шкафу 5–10 мин при температуре 110 °С. Отмечают окраску пятен стандартных образцов и экстракта.



*проявляющий реактив:*

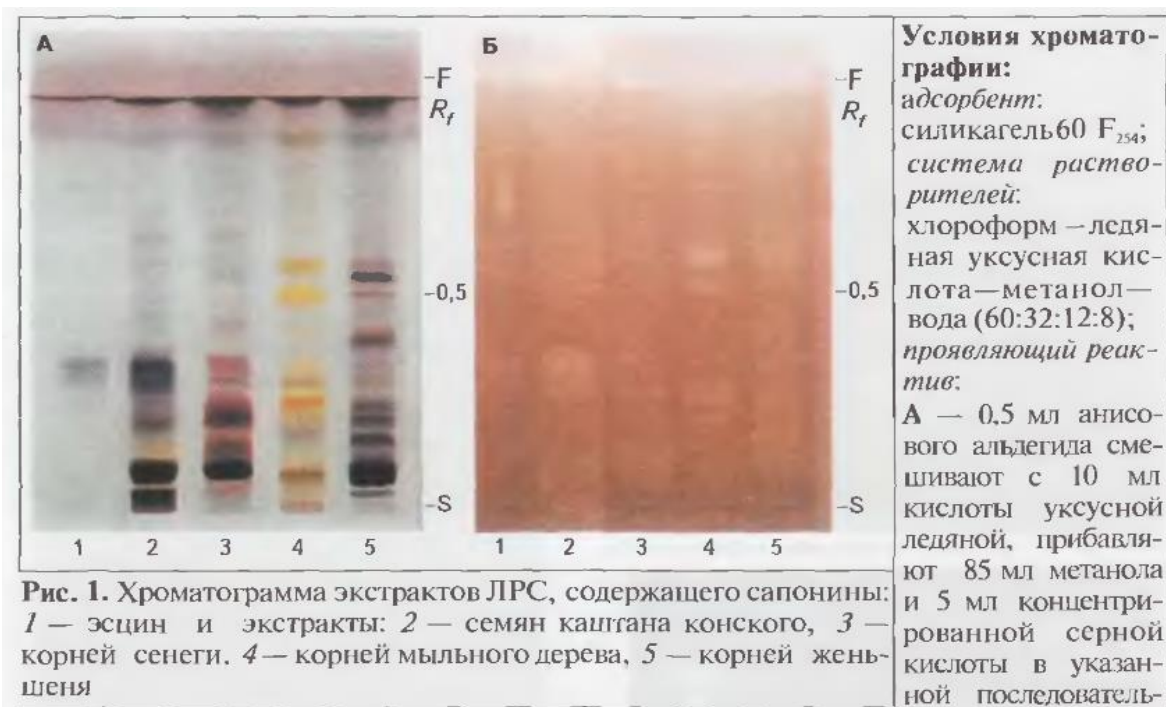
А и Б — 0,5 мл анисового альдегида смешивают с 10 мл кислоты уксусной ледяной, прибавляют 85 мл метанола и 5 мл кислоты серной концентрированной в указанной последовательности; хроматограмму опрыскивают реактивом, нагревают 5–10 мин при 100 °С и исследуют в видимом свете;

В — последовательно 1 %-ный метанольный раствор дифенилборилоксиэтиламина и 5 %-ный спиртовый раствор ПЭГ-4000 (10 мл и 8 мл соответственно), визуальный анализ в УФ 365 нм;

Г — 50 %-ный спиртовый раствор кислоты серной, анализ в видимом свете

*Примечание:* а) экстракцию сапонинов проводят 70 %-ным спиртом, спирт отгоняют и остаток растворяют в 2 мл смеси хлороформ–метанол (1:1); б) агликон–глицирретинвая кислота, который в системе А движется с фронтом, имеет в системе Б  $R_f=0,45$ ; в) в системе В гликозиды флаванонов и халконов в УФ 365 нм имеют беложелтую ( $R_f=0,15\text{--}0,3$ ) и темно-зеленую ( $R_f=0,4$  и  $R_f=0,7$ ) флуоресценцию

**Рис. 4.** Хроматограмма спиртового экстракта корней солодки: 1 — экстракт корней солодки, 2 — глицирризин (калиевая соль), 3 — глицирретинвая кислота, 4 — смесь рутина ( $R_f=0,3$ ) и гиперозида ( $R_f=0,55$ )



**Рис. 1.** Хроматограмма экстрактов ЛРС, содержащего сапонины: 1 — эсцин и экстракты: 2 — семян каштана конского, 3 — корней сенегги, 4 — корней мыльного дерева, 5 — корней женьшеня

ности; хроматограмму опрыскивают реактивом, нагревают 5—10 мин при 100 °С и исследуют в видимом свете;

**Б** — реакция гемолиза\*

*Примечание:* а) экстракцию проводят 70 %-ным спиртом; из 3 мл извлечения сапонины выбалтывают 5 мл бутанола, насыщенного водой, и далее раствор концентрируют до 1 мл; \*б) к 10 мл 3,6 %-ного раствора натрия цитрата прибавляют 90 мл свежей бараньей крови; 2 мл полученной крови смешивают с 30 мл фосфатного буфера (рН=7,4); хроматографическую пластинку обрабатывают в горизонтальном положении; сапонины проявляются в виде светлых пятен на красно-коричневом фоне

**Задание 4.** В образце ЛРС, содержащего сапонины, определите пенное число. Отнесите исследуемое сырье к одной из трех групп.

По величине пенного числа сапонинсодержащее ЛРС разделяют на три группы: свыше 5000 — высокое пенное число; 2000—5000 — среднее; меньше 2000 — низкое.

**Методика.** Навеску исследуемого сырья высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 60 °С, растирают в порошок и просеивают через сито 355. Из 1,0 г порошка по правилам ГФ XI (ст. «Настои и отвары», с. 147) готовят 1 %-ный настой. 10 мл настоя наливают в мерный цилиндр с притертой пробкой, который от отметки 10 мл должен иметь свободную длину 7—8 см до края цилиндра. Цилиндр с настоем энергично взбалтывают в течение 15 с.

Определяют минимальную концентрацию настоя, которая дает пену, не исчезающую в течение 1 мин.

**Пример расчета.** Исследуемый 1 %-ный раствор разбавили в 30 раз (2 мл первичного настоя и 58 мл воды). Общее разбавление составляет  $100 \times 30 = 3000$ . Следовательно, пенное число — 3000.

**Задание 5.** Определите гемолитический индекс сырья, содержащего сапонины.

Гемолитическим индексом называется наименьшая концентрация настоя, которая вызывает полный гемолиз эритроцитов, рассчитанная на единицу исследуемого вещества.

**Методика.** 1,0—2,0 г крупного порошка растительного сырья (масса навески зависит от гемолитического действия) взвешивают на ручных аптечных весах, помещают в колбу Эрленмейера, добавляют 0,9 г натрия хлорида, 100 мл кипящей воды, взвешивают колбу с содержимым на теххимических весах с точностью до 0,01 г, настаивают в течение 15 мин на кипящей водяной бане. Затем добавляют воду до первоначальной массы и фильтруют.

Опыт проводят в серии из 9 пробирок. Пипеткой с ценой деления 0,01 мл отмеряют в первую пробирку 0,9 мл исследуемого настоя, в следующую — 0,8, потом 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и, наконец, 0,1 мл. После этого содержимое каждой пробирки доводят изотоническим раствором до 1 мл. В каждую пробирку добавляют по 1 мл суспензии красных кровяных телец и взбалтывают. Через 24 часа наблюдают, в каких пробирках произошел гемолиз. Если гемолиз произошел в последней пробирке, то часть основного настоя разбавляют изотоническим раствором точно в 10 раз и готовят из него новую серию разбавлений, как описано выше.

Через 24 ч исследуют содержимое пробирок. В пробирках с максимальным разбавлением обычно наблюдается совершенно бесцветный раствор с осадком красных телец на дне (гемолиз не произошел), потом идут пробирки с окрашенным в красный цвет раствором, но с осадком на дне (частичный гемолиз), и, наконец, в пробирке, раствор которой окрашен в ярко-красный цвет без осадка на дне, произошел полный гемолиз эритроцитов.

Гемолитический индекс рассчитывают по формуле

$$HI = \frac{2 \cdot 100}{a \cdot b},$$

где  $a$  — начальная концентрация раствора, %;

$b$  — объем первичного раствора в пробирке, содержимое которой вызывает полный гемолиз, мл.

Поскольку кровь разных животных дает неодинаковые результаты, следует определить фактор поправки, исследовав эту кровь на стандартном растворе. В качестве стандарта используют 0,02 %-ный раствор чистого сапонина в изотоническом растворе. Осуществляют серию разведений стандартного раствора и на следующий день рассчитывают фактор  $F$ .

За единицу берут способность к полному гемолизу при разбавлении чистого сапонина 1:25 000.

Фактор  $F$  вычисляют делением 25 000 на фактическую концентрацию.

**Пример расчета.** Полный гемолиз происходит в пробирке, содержащей 0,5 мл первичного раствора.

$$HI = \frac{2 \cdot 100}{0,02 \cdot 0,5} = 20\,000, \quad F = \frac{25\,000}{20\,000} = 1,25$$

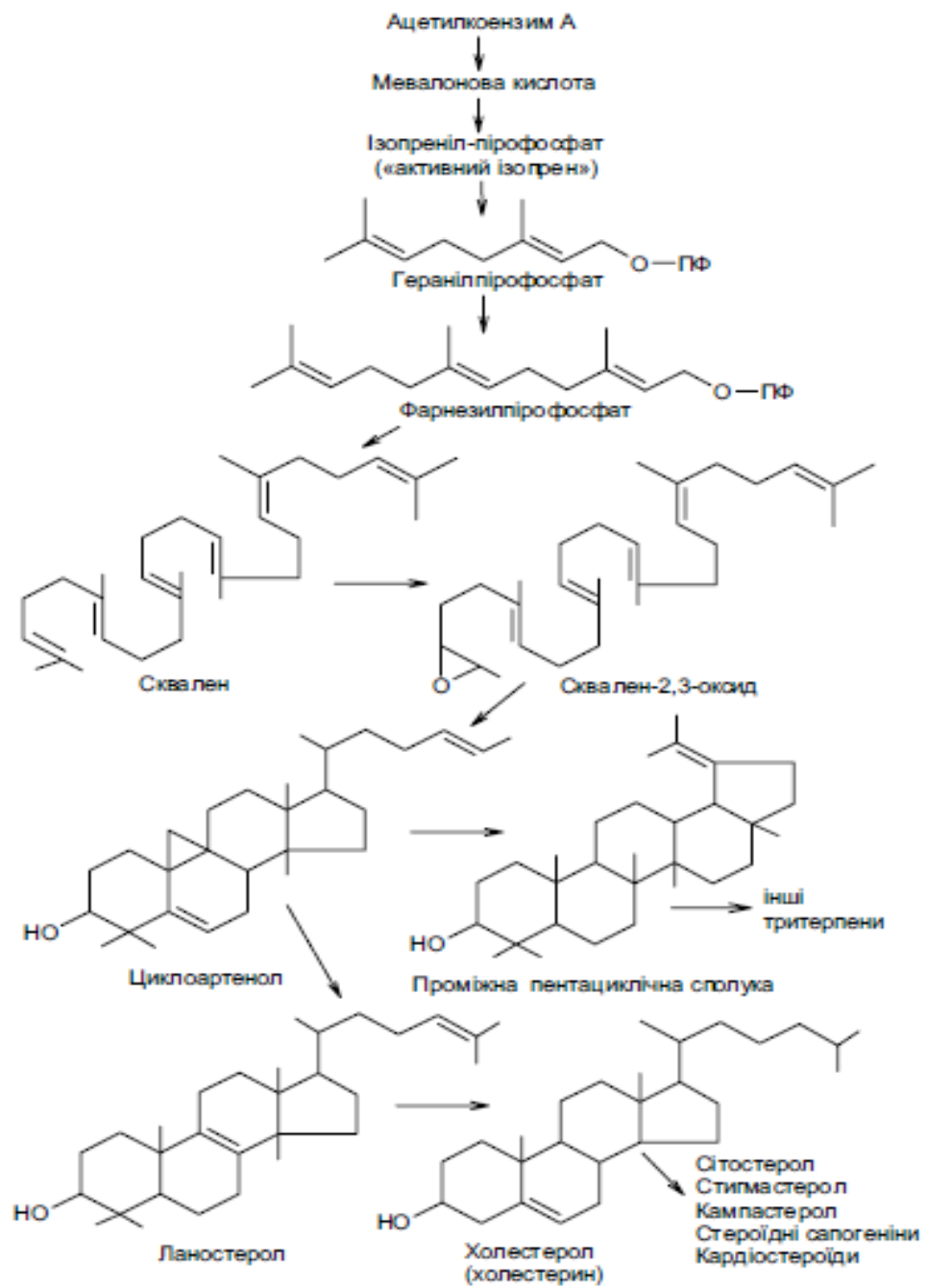
Фактор определяют одновременно с гемолитическим индексом и результат умножают на фактор.

**Примечание.** Гемолитический индекс некоторых видов ЛРС составляет для: корня женьшеня < 100; листьев плюща — 1000—1500; семян каштана — 6000 (в том числе эсцин — 9500—12 500); корня солодки — 250—300; корня мыльнянки — 2600—3900; корня сенеги — 2500—4500.

### Зробіть висновки.

### Додаток

### Загальний шлях біосинтезу тритерпенів та стероїдів





## Лабораторна робота

### Тема: Виділення та якісний аналіз ЛРС, яка містить сапоніни

**Мета роботи:** проаналізувати на прикладі сапонінів спільність біогенезу, структурні розходження і функціональні особливості цих сполук; навчитись проводити виділення та якісний аналіз сапонінів з лікарської рослинної сировини; розібрати методи кількісного аналізу сапонінів у рослинній сировині.

### Приготування витягу:

#### 1 спосіб.

5 г подрібненої сировини поміщають у конічну колбу на 100 мл зі зворотним холодильником. Заливають 50 мл 50%-го спирту і нагрівають на водяному нагрівнику 15 хв. Після охолодження фільтрують крізь складчастий фільтр. 20 мл фільтрату випаровують на водяному нагрівнику до 10 мл (звільнюються від спирту). Одержаний водний витяг використовують для проведення проби піноутворення і деяких осадкових реакцій, а також для визначення хімічної природи сапонінів; спирто-водний витяг — для інших якісних реакцій і хроматографічного аналізу.

#### 2 спосіб.

Для якісних реакцій готують водяний настій 1:10, підігріваючи здрібнену рослинну сировину на водяній бані протягом 10 хв. Настій після охолодження фільтрують і проводять з ним необхідні реакції. Для проведення реакції гемолізу еритроцитів крові з рослинної сировини готують настій на ізотонічному розчині.

### Якісні реакції:

**1. Проба піноутворення.** 1,5 мл витягу енергійно збовтують протягом 1 хв. Утворюється стійка піна.

#### **2. Реакції осадження:**

— до 1 мл водного витягу додають 3 – 4 краплини 10%-го розчину основного ацетату свинцю;

— до 1 мл водного витягу додають 3 – 4 краплі баритової води;

— до 1 мл спирто-водного витягу додають 1 мл 1%-го спиртового розчину холестерину.

— з реактивом Несслера. Реактив Несслера: 10г йодиду калію розчиняють у 10 мл води і поступово доливають при постійному розмішуванні насичений розчин сулеми, поки не з'явиться незникаюча червона каламуть. Додавляють 30 г їдкого калію і, коли останній розчиниться, доливають ще 1 мл насиченого розчину сулеми. Розводять до 200 мл, дають відстоятись, а потім рідину фільтрують;

— з реактивом Мілона. Реактив Мілона (два варіанти виготовлення): 1) 10 г нітрату ртуті розчиняють у 8,5 мл азотної кислоти і розбавляють подвійним об'ємом води; 2) 10 г металічної ртуті розчиняють у 15 мл концентрованої азотної кислоти і розбавляють подвійним об'ємом води, а прозорий розчин зливають;

— з солями міді (10% -ий розчин солі);

— з оцтовокислим або хлористим цинком (10 %-ний розчин солі);

— з хлорною ртуттю (сулемою) - 5% -ний розчин.

При наявності сапонінів утворюються осади або каламуть.

#### **3. Кольорові реакції.**

**Реакція Лафона.** До 2 мл спирто-водного витягу додають 1 краплину 10%-го розчину заліза III сульфату, 1 мл концентрованої сірчаної кислоти і обережно нагрівають; з'являється синьо-зелене забарвлення.

**Реакція Сальковського.** До 2 мл спирто-водного витягу додають 1 мл хлороформу і 5 – 6 краплин концентрованої сірчаної кислоти; з'являється забарвлення від жовтого до червоного.

**Реакція з п'ятихлористою сурмою.** До 1 мл спирто-водного витягу додають 0,5 мл насиченого розчину п'ятихлористої сурми в хлороформі; з'являється червоне забарвлення, що переходить у фіолетове.

**Реакція з сірчаною кислотою.** При додаванні 1-2 краплин концентрованої кислоти до розчину, що містить сапонін, виникає жовте забарвлення, яке поступово переходить у червоне (до 1/2 год.), а при більш тривалому відстоюванні і слабкому підігріванні - в червоно-фіолетове,

**Реакція з ваніліном і концентрованою сірчаною кислотою.** До 2 мл спиртового розчину ваніліну, додають 3 – 4 краплини концентрованої сірчаної кислоти; з'являється червоне забарвлення. При розведенні водою тритерпеноїди утворюють сині пластівці.

**Реакція з оцтовим ангідридом і сірчаною кислотою. (Реакція Лібермана-Бурхарда).** Досліджуваний розчин змішують з оцтовим ангідридом і потім обережно доливають такий самий об'єм сірчаної кислоти. При наявності сапонінів на межі зіткнення рідин виникає червоне забарвлення, яке переходить потім у фіолетове, синє або ізумрудно-зелене.

У присутності **йоду** розчину сапонінів або витяжка набуває золотаво-жовтого забарвлення.

При **бромованні** утворюється продукт, що забарвлює рідину в жовтувато-оранжевий колір.

**Визначення хімічної природи. Метод Фонтан – Кандела (Реакція піноутворення).** В одну з двох мірних пробірок наливають 5 мл 0,1 н. хлороводневої кислоти, а в другу — 5 мл 0,1 н. розчину натрію гідроксиду. В обидві пробірки додають по 3 краплини водного витягу і збовтують протягом 1 хв. При наявності в сировині тритерпенових сапонінів в обох пробірках утворюється піна однакового об'єму і стійкості, а коли присутні сапоніни стероїдної групи, то в лужному середовищі об'єм піни та її стійкість набагато більші.

**4. Реакції, засновані на біологічних властивостях. Гемоліз еритроцитів.** До 1 мл настою на ізотонічному розчині додають 1 мл 2 %-ної суспензії еритроцитів в ізотонічному розчині. Кров стає прозорою, яскраво-червоною (гемоліз).

**Хроматографічне виявлення.** Досліджуваний спирто-водний розчин і зразки відомих сапонінів (“свідки”) наносять на лінію старту пластинки “Силуфол”. Після висушування пластинку поміщають у камеру з системою розчинників бензол-метанол (8:2). Одержану хроматограму висушують на повітрі у витяжній шафі, а потім поміщають її на 1 – 2 хв. в ексікатор, насичений парами йоду; з'являються плями рожево-фіолетового кольору. Пластинки іноді обприскують 15%-м спиртовим розчином фосфорновольфрамової кислоти, нагрівають при 105<sup>0</sup> С у сушильній шафі 5 хв.; сапоніни проявляються у вигляді плям рожево-фіолетового кольору.

**Визначення вмісту.** Для кількісного визначення суми сапонінів застосовують гравіметричні методи, а для визначення індивідуальних сполук використовують титриметричний, полярографічний, спектрофотометричний, калориметричний та інші фізико-хімічні методи аналізу.