

БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ИММАНУИЛА КАНТА

Л. Н. Скрыпник

МЕТОДЫ АНАЛИЗА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Издательство
Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта
2023

УДК 543.06:615.322
ББК 24.43
С458

Рецензенты

О. В. Кригер, д-р техн. наук, проф. факультета биотехнологий,
Национальный исследовательский университет ИТМО;

П. В. Масленников, канд. биол. наук, доц. ОНК
«Институт медицины и наук о жизни», БФУ им. И. Канта

Скрышник, Л. Н.

С458 Методы анализа биологически активных веществ лекарственных растений : учебно-методическое пособие / Л. Н. Скрышник. — Калининград : Издательство БФУ им. И. Канта, 2023. — 57 с.
ISBN 987-5-9971-0780-2

Представлен теоретический материал по классификации, методам экстракции, качественному и количественному анализу основных классов биологически активных соединений растений — фенольных соединений, изопреноидов и алкалоидов. Приведено описание лабораторных работ по анализу лекарственного растительного сырья, содержащего соединения данных классов.

Предназначено для студентов естественно-научных направлений (химии, биологии) по дисциплинам «Химия природных соединений», «Лекарственные растения — источники БАВ», «Технология и анализ растительного сырья», а также для студентов, выполняющих курсовые и выпускные квалификационные работы по химии природных соединений, физиологии и биохимии растений, биотехнологии.

УДК 543.06:615.322
ББК 24.43

ISBN 987-5-9971-0780-2

© Скрышник Л. Н., 2023
© БФУ им. И. Канта, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Растения как источник биологически активных веществ | 4 |
| Методы анализа фенольных соединений в лекарственных растениях | 9 |
| Лабораторная работа № 1. Определение суммарного содержания фенольных соединений с использованием реактива Фолина — Чокалтеу | 19 |
| Лабораторная работа № 2. Определение суммарного содержания флавоноидов | 21 |
| Лабораторная работа № 3. Определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот | 24 |
| Методы анализа изопреноидов в лекарственных растениях ... | 28 |
| Лабораторная работа № 4. Идентификация монотерпеноидов методом тонкослойной хроматографии | 35 |
| Лабораторная работа № 5. Качественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего сапонины | 37 |
| Лабораторная работа № 6. Определение тритерпеновых пентациклических кислот в лекарственных растениях | 40 |
| Методы анализа алкалоидов в лекарственных растениях | 45 |
| Лабораторная работа № 7. Определение кофеина в экстракте чая | 49 |
| Лабораторная работа № 8. Определение суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин в траве чистотела | 51 |
| Лабораторная работа № 9. Определение суммарного содержания алкалоидов по реакции с бромкрезоловым зеленым | 53 |

РАСТЕНИЯ КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Растения использовались для различных целей с ранней истории человечества. Древнейшее письменное свидетельство применения растений в медицинских целях было найдено на шумерской глиняной плите из Нагпура, возраст которой составляет примерно 5000 лет. Другие исторические письменные источники были найдены в Месопотамии, Египте, греческой и исламской цивилизациях. Самые ранние записи задокументировали использование примерно 1000 растений, включая виды *Cedrus Duham.*, *Commiphora myrrha Engl.*, *Cupressus sempervirens L.*, *Glycyrrhiza glabra L.* и *Papaver somniferum L.* Эти растения сначала использовались в качестве лекарственных средств в неочищенных формах, включая порошки, чай, настойки, припарки и т. д. В начале XIX века применение лекарственных растений уже включало выделение активных компонентов. Химия природных биологически активных соединений началась с работы Сертурнера, который выделил морфин из *Papaver somniferum L.* в 1803 году. Затем последовало несколько подобных работ, например были выделены эметин (*Carapichea ipecacuanha (Brot.) L. Andersson*), стрихнин (*Strychnos nux vomica L.*), хинин (*Cinchona officinalis L.*), колхицин (*Colchicum autumnale L.*), атропин (*Atropa belladonna L.*), папаверин (*Papaver somniferum L.*) и салицин (*Salix ssp.*). Выделение соединений в XIX веке (особенно алкалоидов, которые легко отделялись от других органических соединений) привело к использованию чистых соединений с гораздо более безопасной и эффективной дозировкой [1].

Отличительной особенностью растений является продукция ими так называемых вторичных метаболитов, которые обладают различной биологической активностью и обуславливают лекарственные свойства растений. Вторичные метаболиты представляют собой разнообразную биохимическую группу

веществ, продуцируемых растительной клеткой посредством вторичных метаболических путей, производных от первичных метаболических путей. В отличие от первичных метаболитов, участвующих в основных метаболических путях, необходимых для выживания организма, вторичные метаболиты не являются необходимыми для роста и развития растения, но играют важную роль в межвидовой конкуренции, адаптации к условиям окружающей среды и защите, включая защиту от травоядных и микробов.

В настоящее время выделено и идентифицировано около двухсот тысяч различных вторичных метаболитов. Их можно классифицировать на основе химической структуры и/или путей биосинтеза. Простая классификация включает три основные группы: терпеноиды (полимерные производные изопрена, биосинтезированные по мевалонатному или немевалонатному путям), фенольные соединения (биосинтезированные по шикиматному пути, содержащие одно или несколько гидроксированных ароматических колец) и алкалоиды (небелковые азотсодержащие соединения, биосинтезированные из аминокислот). Вместе эти три группы составляют около 90% всех вторичных метаболитов. К минорным группам вторичных метаболитов относят цианогенные гликозиды, тиольные гликозиды (глюкозинолаты), беталаины, лектины, ацетогенины [1].

Широкий спектр биологической активности вторичных метаболитов растений обусловлен разнообразием химической структуры представителей различных классов соединений. Особенно активно исследуется антибактериальное, противовоспалительное, антиоксидантное, противораковое, иммуномодулирующее, кардио-, нейро- и гепатопротекторное действие растительных экстрактов и выделенных из них индивидуальных соединений [2].

Вместе с тем использование растений в качестве источников биологически активных веществ имеет ряд ограничений, среди которых можно отметить и тот факт, что некоторые виды лекарственных растений растут только в определенных регионах, что приводит к трудностям с их сбором и несет возможные риски исчезновения этих видов. Более того, вторичные метаболиты обычно присутствуют в растениях в небольших

количествах, и сбор достаточного количества материалов может быть как разрушительным для окружающей среды, так и экономически нецелесообразным. Кроме того, на качественном и количественном составе вторичных метаболитов в растениях сильно сказываются условия их произрастания, что затрудняет стандартизацию растительного лекарственного сырья. Основными направлениями исследований, связанными с преодолением этих трудностей, являются повышение эффективности экстракции биологически активных соединений из растительного материала; культивирование растений (отдельных частей и органов) *in vitro*; химический синтез природных соединений или их структурных аналогов.

Для экстракции биологически активных соединений из растительного сырья долгие годы использовались так называемые традиционные методы экстракции, такие как твердожидкостная экстракция (например, мацерация, перколяция), жидкостно-жидкостная экстракция и твердофазная микроэкстракция. Эти традиционные методы устарели и имеют много недостатков, таких как разрушение и потеря биологически активных соединений во время экстракции, низкий выход, длительное время экстракции, более высокое потребление энергии и неэкономичность. В настоящее время особое внимание уделяется разработке экологически чистых и инновационных методов экстракции для извлечения биологически активных соединений из различных природных источников. Эти методы включают экстракцию с помощью ультразвука, экстракцию в сверхкритической жидкости, экстракцию с помощью микроволновой печи, экстракцию жидкостью под давлением, экстракцию мембранной ультрафильтрацией, экстракцию с мгновенным контролируемым перепадом давления, экстракцию с применением поверхностно-активных веществ и ферментативную экстракцию, отличающиеся высоким выходом и эффективностью [2].

В течение последних нескольких десятилетий возрастает интерес к получению биологически активных молекул из растений, их отдельных органов и клеток, культивируемых *in vitro*. Они представляют собой альтернативную перспективу производства ценных биологически активных молекул с помощью различных биотехнологических подходов, основными пре-

имуществами которых являются постоянство выхода и качества продуктов растительного происхождения, более короткие производственные циклы (по сравнению с выращиванием целых растений), повышенная биобезопасность (отсутствие экологического или генетического загрязнения). Основная цель всех биотехнологических подходов — высокая продуктивность, выход и концентрация целевых биологически активных соединений. Для достижения этой цели используются различные стратегии, например проектирование подходящей биореакторной системы, выбор высокопродуктивных линий, оптимизация питательной среды, метаболическая инженерия, двухфазное культивирование и иммобилизация растительных клеток [3].

Альтернативой выделению биологически активных соединений из растительного сырья выступает их полный или частичный синтез. Так, для некоторых природных соединений были успешно разработаны и внедрены в производство технологии их химического синтеза (например, атропин, кофеин, пилокарпин и др.). Однако синтез некоторых соединений сложной структуры (с большой молекулярной массой и несколькими хиральными центрами) иногда невозможен или требует нескольких стадий и дорогостоящих расходных материалов, что делает его использование экономически нерентабельным по сравнению с экстракцией соединений из растений. Более целесообразными представляются подходы, основанные: 1) на частичной химической модификации выделенных природных соединений с целью улучшения их стабильности, растворимости и других физико-химических свойств; 2) на использовании природных соединений в качестве «скаффолдов» для синтеза молекул с необходимой биологической активностью; 3) на синтезе структурных аналогов природных соединений, проявляющих ту же биологическую активность [4; 5].

Таким образом, растения представляют собой источник огромного разнообразия природных соединений, отличающихся по химической структуре и биологической активности. Развитие современных методов экстракции, очистки и анализа этих соединений, а также биотехнологических методов получения и переработки растительного сырья и методов органического синтеза и модификации природных соединений не только об-

условливает широкое использование растений в традиционной медицине, но и делает их актуальным объектом исследования при разработке новейших фармацевтических препаратов.

Список литературы

1. *Süntar I.* Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants // *Phytochemistry Reviews*. 2020. Vol. 19, 5. P. 1199—1209.
2. *Usman I. et al.* Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds // *International Journal of Food Properties*. 2022. Vol. 25, 1. P. 1215—1233.
3. *Marchev A. S., Yordanova Z. P., Georgiev M. I.* Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites // *Critical reviews in biotechnology*. 2020. Vol. 40, 4. P. 443—458.
4. *Dzobo K.* The role of natural products as sources of therapeutic agents for innovative drug discovery // *Comprehensive Pharmacology*. 2022. P. 408—422.
5. *Newman D. J., Cragg G. M.* Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 // *Journal of natural products*. 2020. Vol. 83, 3. P. 770—803.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Фенольные соединения — один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, обладающих биологической активностью. Активность обеспечивается наличием свободного или связанного фенольного гидроксила. Фенольные соединения делятся на три группы:

- 1) простые фенолы (фенилы, фенолоспирты, фенолокислоты, кумарины и др.) с одним ароматическим кольцом;
- 2) фенолы с двумя ароматическими кольцами (флавоноиды, стильбены и др.);
- 3) полимерные фенолы (полифенолы).

Более активными являются фенольные соединения первой и второй групп, которые обладают широчайшим спектром фармакологического действия (антимикробным, антиоксидантным, противовоспалительным, антиканцерогенным, иммуномодулирующим, кардиопротекторным и др.) [1].

Среди простых фенольных соединений наибольшее содержание в лекарственных растениях характерно для фенольных кислот. Термин «фенольные кислоты» обычно описывает фенольные соединения, имеющие одну карбоксильную группу. Фенольные, или фенолкарбоновые, кислоты, как правило, присутствуют в связанных формах, таких как амиды, сложные эфиры или гликозиды, и редко в свободной форме. Фенольные кислоты делятся на две подгруппы. Первая подгруппа включает производные гидроксibenзойной кислоты; вторая — производные гидроксикоричной кислоты.

Гидроксibenзойные кислоты имеют общую структуру C₆-C₁ и представляют собой производные от бензойной кислоты. Они находятся в растворимой форме (конъюгированы с сахарами или органическими кислотами) или связаны с фракциями клеточных стенок в виде лигнина. По сравнению с гидроксикоричными кислотами гидроксibenзойные кислоты содержатся

в растениях обычно в низких концентрациях. Наиболее часто встречающимися гидроксibenзойными кислотами являются п-гидроксibenзойная, протокатеховая, ванилиновая и сирeneвая кислоты [2]. Структурные формулы данных гидроксibenзойных кислот представлены на рисунке 1.

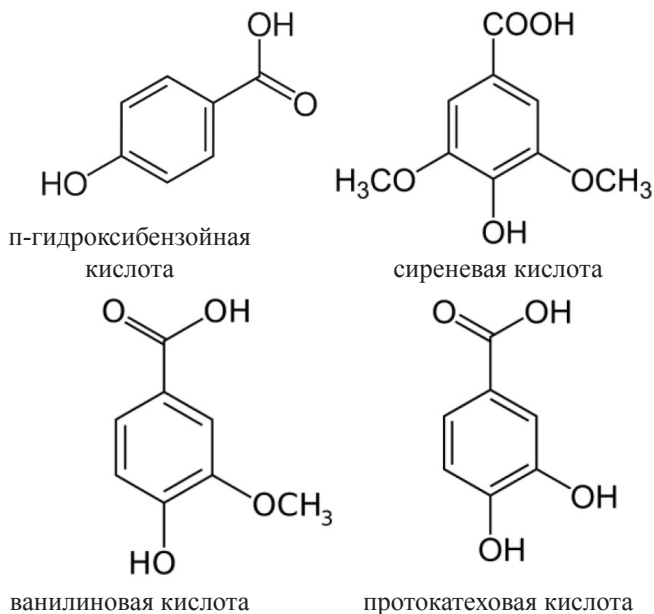


Рис. 1. Структурные формулы отдельных представителей гидроксibenзойных кислот

Гидроксикоричные кислоты — это производные коричной кислоты, они часто присутствуют в лекарственных растениях в виде простых эфиров с хинной кислотой или глюкозой. Наиболее распространенная растворимая гидроксикоричная кислота — хлорогеновая кислота, имеющая в своей структуре остатки кофейной и хинной кислот. Помимо хлорогеновой кислоты наиболее распространенными гидроксикоричными кислотами растений являются феруловая, кофейная, п-кумаровая и синапиновая кислоты (рис. 2) [2].

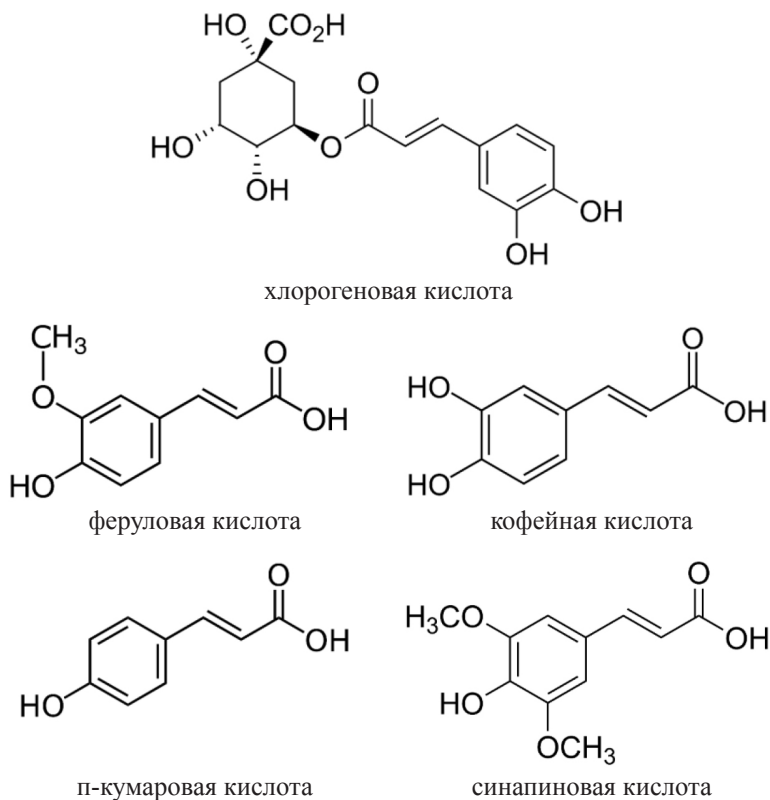


Рис. 2. Структурные формулы отдельных представителей гидроксикоричных кислот

Среди фенольных соединений с двумя ароматическими кольцами самую многочисленную, разнообразную и наиболее исследуемую группу составляют флавоноиды — соединения С6-С3-С6-ряда (рис. 3). К синтезу флавоноидов способны преимущественно клетки высших растений, причем на них приходится почти половина из 10000 известных к настоящему времени фенольных соединений. Большинство флавоноидов представляют собой водорастворимые гликозиды, локализуемые преимущественно в клеточном соке (вакуолях) [3].

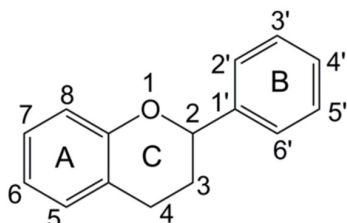


Рис. 3. Базовая структура флавоноидов

Классифицируют флавоноиды в зависимости от степени окисления трехуглеродного фрагмента молекулы (пиранового гетероцикла). Различают следующие группы флавоноидов в порядке увеличения степени окисленности пиранового кольца:

- незамещенные флаваны (отсутствие функциональных групп и двойных связей);
- катехины и флаван-4-олы (одна гидроксильная группа у С3- или С4-атомов соответственно);
- лейкоантоцианидины (две гидроксильные группы — у С3- и С4-атомов);
- дигидрохалконы (отсутствие пиранового кольца и карбонильная группа);
- халконы (отсутствие пиранового кольца, двойная связь и карбонильная группа);
- антоцианидины (гидроксильная группа у С3 и две двойные связи);
- флаваноны (карбонильная группа у С4);
- флаванолы (карбонильная группа у С4 и гидроксильная у С3);
- флавоны (карбонильная группа у С4 и двойная связь);
- флавонолы (карбонильная группа у С4, гидроксильная у С3 и двойная связь);
- ауроны (пятичленное лактоновое кольцо, карбонильная группа и двойная связь) [4].

Наибольшее распространение среди перечисленных выше групп в растениях имеют флавоны и флавонолы, а также антоцианы. Как правило, в растительной клетке эти флавонои-

ды представлены в гликолизированной форме. Наиболее распространенной формой флавоноидных гликозидов являются О-гликозиды, но также могут быть обнаружены С-гликозиды. Гликозилирование повышает растворимость, распределение и метаболизм, облегчая транспорт через мембрану, а метилирование увеличивает поступление флавоноидов в клетки и защищает их [5]. Структурные формулы некоторых представителей флавоноидов представлены на рисунке 4.

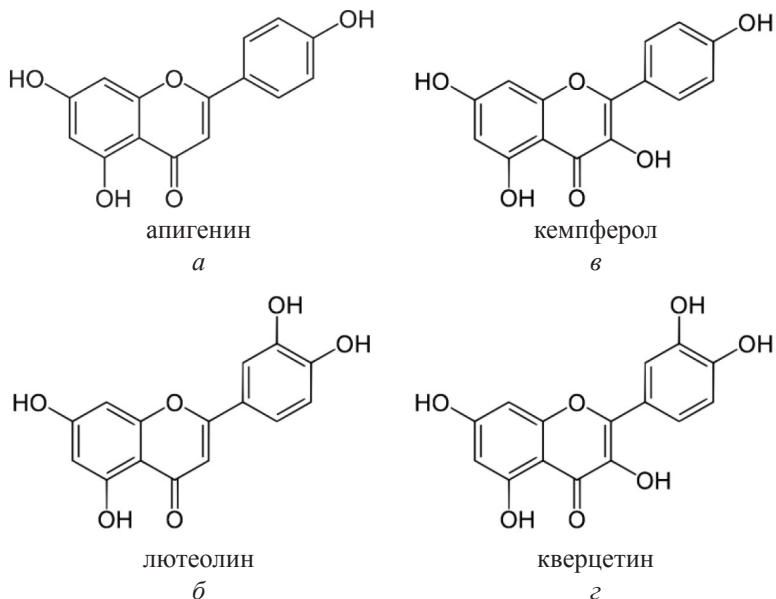


Рис. 4. Структурные формулы представителей групп флавонов (а, б) и флавонолов (в, г)

Полимерные фенольные соединения принято разделять на четыре подгруппы:

- гидролизуемые дубильные вещества (сложные эфиры глюкозы и галловой кислоты);
- негидролизуемые (конденсированные) дубильные вещества (полимеры флавоноидов);

- лигнины (полимеры оксикоричных спиртов);
- меланины (темноокрашенные соединения) [3].

Одним из начальных этапов в определении фенольных соединений является их экстракция из растительного материала. На выход фенольных соединений могут влиять несколько параметров, включая время экстракции, температуру, соотношение растворителя и образца, количество повторных экстракций образца, а также тип растворителя (наиболее часто применяют воду, ацетон, этилацетат, спирты (метанол, этанол и пропанол) и их смеси). Матрица образца и размер частиц также сильно влияют на экстракцию фенольных соединений из растительного сырья, так как они могут связываться с другими элементами образца, такими как углеводы и белки. В этом случае для высвобождения связанных фенольных соединений используют различные виды гидролиза (кислотный, щелочной или ферментативный). Из-за проблем, связанных с традиционными методами экстракции (мацерацией, экстракцией по Сокслету, экстракцией при нагревании), все большее распространение получают альтернативные методы экстракции, такие, например, как экстракция с помощью ультразвука (UAE), микроволновой печи (MAE), ультразвука и микроволн (UMAE), экстракция сверхкритической жидкостью (SFE), субкритической водой (SCWE) и экстракция под высоким гидростатическим давлением (HNPP). Эти методы сокращают время экстракции, уменьшают выделение токсичных загрязняющих веществ за счет снижения потребления органических растворителей и относительно просты в применении [6].

Для качественного и количественного определения растительных фенольных соединений используются следующие методы: спектрофотометрия, УФ-спектроскопия, хроматография, в том числе совместно с масс-спектрометрией.

Спектрофотометрические методы наиболее часто применяются для определения суммарного содержания фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот, проантоцианидинов, катехинов. Так, для определения суммарного содержания фенольных соединений наибольшее распространение нашел метод, основанный на использовании реактива Фоли-

на — Чокалтеу. Основным недостатком данного метода является неспецифическое реагирование реактива с другими соединениями, содержащимися в растительном сырье (аскорбиновой кислотой, ароматическими аминами, сахарами). Суммарное содержание флавоноидов определяют по реакции комплексообразования данных соединений с хлоридом алюминия. Проантоцианидины определяют с применением бутанол-НСI-смеси. Метод основан на расщеплении межфлавоноидных связей в проантоцианидине с помощью горячей кислоты с последующей реакцией автоокисления и превращения флаван-3-олов в антоцианидины, имеющие розовую окраску и максимум поглощения при 510—520 нм [6].

Для идентификации фенольных соединений в большинстве случаев пользуются спектрами их поглощения в ультрафиолетовой области (220—400 нм). Фенольные соединения имеют выраженную хромофорную систему, поэтому их спектры информативны и обеспечивают существенную информацию о структуре, дающую возможность определить тип фенола. Спектр поглощения флавоноидного соединения содержит, как правило, две полосы: одна из них в низковолновой (210—290 нм) части — полоса II, другая — в более длинноволновой (320—380 или 490—540 нм для антоцианидинов) части — полоса I. Наличие заместителей определяет положение УФ-спектра фенольных соединений так же, как и наличие кольца В или А. Положение и интенсивность максимумов зависят от дальнейших структурных различий. Так, у флаванонов и флаванололов цикл В не сопряжен с карбонильной группой, поэтому они отличаются от других групп флавоноидов положением полосы II в области 270—290 нм и наличием полосы I в виде плеча при 310—330 нм, в то время как для флавонов и флавонолов специфическим признаком служит положение полосы I в области 320—355 и 340—385 нм соответственно. Для халконов характерно положение полосы II в несколько более длинноволновой области (рис. 5). Спектры кумаринов содержат две главных полосы при 278 и 310 нм, а у их гидроксильных производных главный максимум расположен выше 300 нм [7].

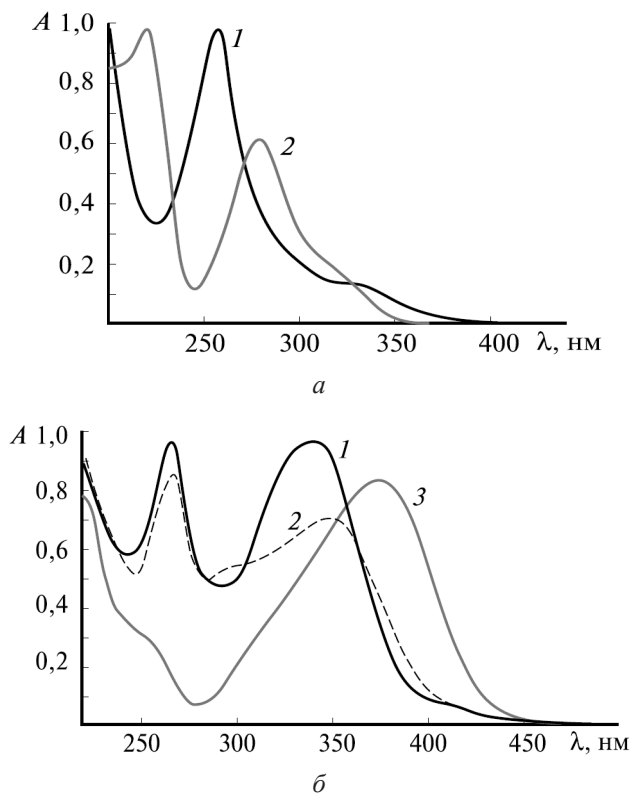


Рис. 5. Положение полос поглощения в УФ-видимой области спектра для различных флавоноидов: а — для изофлавона (1) и флавонона и флавонола (2); б — для флавона (1), флавонола (2) и халкона (3) [7]

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является быстрым, хорошо воспроизводимым методом, который требует малого количества анализируемого вещества и используется для количественного, качественного анализа и препаративного выделения. Для фенольных соединений более употребительны колонки с обращенно-фазными сорбен-

тами (RP-8; RP-18) и детектирование с помощью УФ-видимого детектора с переменной длиной волны. В настоящее время широко используется диодно-матричный детектор (ДМД), позволяющий одновременно с выделением пика на хроматограмме получать УФ-видимый спектр вещества, соответствующего этому пику. Такой экспериментальный прием значительно облегчает задачу идентификации веществ. Ацетонитрил и метанол или их водные формы являются основными подвижными фазами, используемыми для количественного определения фенольных соединений с помощью ВЭЖХ. Менее распространено использование этанола, тетрагидрофурана и изопропанола. При проведении хроматографирования рекомендуется поддерживать рН подвижной фазы в диапазоне рН 2—4, чтобы избежать ионизации фенольных соединений при идентификации. Таким образом, водные подкисленные подвижные фазы преимущественно содержат уксусную кислоту, но также возможно использование муравьиной и фосфорной кислот или фосфатных, цитратных и ацетатно-аммонийных буферов при низком рН. Система градиентного элюирования применяется чаще, чем система изократического элюирования.

Соотнесение пика на хроматограмме с «принадлежащим» ему веществом — наиболее трудная задача. Удобный прием — использование параллельного хроматографирования хорошо известных так называемых стандартных образцов и сравнение с ними хроматограммы исследуемого объекта. Стандартное вещество в идеале должно быть наиболее родственно фенольным соединениям и иметь подобные хроматографические свойства. В качестве стандартного вещества для флавоноидов часто применяется рутин, являющийся коммерчески доступным продуктом. Он хорошо подходит для количественного анализа флавоноловых гликозидов. Для содержащихся в смеси других флавоноидов могут быть использованы такие коммерчески доступные стандарты, как апигенин-7-гликозид — для флавоновых гликозидов, катехин — для флаван-3-олов, нарингенин — для дигидрофлавонов, дигидрокверцетин — для дигидрофлавонолов, даидзеин — для изофлавонов.

При отсутствии стандартов фенольных соединений альтернативой ВЭЖХ-УФ-ДМД (высокоэффективная жидкост-

ная хроматография с УФ-детектированием на диодной матрице) становится жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС), с помощью которой возможно определение структуры фенольных соединений. Структуры фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях и продуктах питания в ЖХ-МС устанавливают посредством ионизации распылением в электрическом поле (или электроспрей, ЭС, ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД, APCI). Ионизацию осуществляют как в отрицательном, так и в положительном режимах [6].

Газовая хроматография (ГХ) — еще один метод, применяемый для разделения, идентификации и количественного определения фенольных соединений, таких как фенольные кислоты, конденсированные дубильные вещества и флавоноиды. Основными проблемами анализа фенольных соединений методом ГХ, в отличие от ВЭЖХ, являются слабая летучесть фенольных соединений и, как следствие, необходимость использования дополнительного этапа анализа — дериватизации с целью преобразования данных соединений в более летучие производные. С помощью ГХ количественное определение фенолов в растительном сырье может также включать дополнительные этапы очистки, такие как удаление липидов из экстракта, высвобождение фенолов из гликозидных и сложноэфирных связей в ферментативной, щелочной и кислой средах [6].

Помимо хроматографических методов в настоящее время одним из наиболее перспективных и эффективных методов разделения и анализа сложных смесей фенольных соединений является капиллярный электрофорез, который основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Преимущества этого метода заключаются в высокой эффективности разделения, возможности определения малых количеств вещества в течение короткого промежутка времени, малом расходе реактивов и простой пробоподготовке. Кроме того, капиллярный электрофорез не требует насосов высокого давления, необходимых для жидкостной хроматографии, и расход высококиштых растворителей намного меньше [6].

Лабораторная работа №1

Определение суммарного содержания фенольных соединений с использованием реактива Фолина — Чокалтеу

Удобным и простым методом определения фенольных соединений является спектрофотометрический метод Фолина — Чокалтеу, основанный на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой фенольные соединения окисляются реактивом Фолина — Чокалтеу, состоящим из смеси фосфорно-вольфрамовой $H_3PW_{12}O_{40}$ и фосфорно-молибденовой $H_3PMo_{12}O_{40}$ кислот, который, в свою очередь, восстанавливается в смесь окислов вольфрама (W_8O_{23}) голубого цвета и молибдена (Mo_8O_{23}). Абсорбция раствора при 750 нм пропорциональна содержанию фенольных соединений в растворе. В качестве стандарта используют галловую кислоту [8].

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр ЮНИКО-1201; шейкер, пипетки или дозаторы переменного объема; градуированные (мерные) пробирки на 10 мл; пробирки типа Эппендорф, водяная баня; холодильник лабораторный стеклянный; плоскодонные колбы на 100 мл; стаканы на 100 мл; фильтровальная бумага; водный раствор 70%-ного этилового спирта; 11,5%-ный раствор карбонат натрия; реактив Фолина — Чокалтеу; стандартный раствор галловой кислоты с концентрацией 1 мг/мл.

Приготовление растворов:

1. Этиловый спирт, 70%-ный водный раствор — 700 мл 95%-ного этилового спирта смешивают с 250 мл дистиллированной воды.

2. Реактив Фолина — Чокалтеу — 75 мл коммерческого реактива Фолина — Чокалтеу разбавляют в 750 мл дистиллированной воды.

3. Карбонат натрия, 11,5%-ный водный раствор — 57,5 г карбоната натрия растворяют в 500 мл дистиллированной воды.

4. Галловая кислота, стандартный раствор с концентрацией 1 мг/мл — 50 мг галловой кислоты растворяют в 50 мл 95%-ного этилового спирта (в мерной колбе).

Ход работы

1. Экстракция.

Способ 1. Навеску образца (высушенные и измельченные растения) 0,5 г переносят в плоскодонную на 100 мл и заливают 50 мл 70%-ного раствора этилового спирта. Затем содержимое колбы с обратным холодильником нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают и отфильтровывают в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют дважды. Фильтраты собирают в одну колбу, объем доводят до метки 70%-ным этиловым спиртом.

Способ 2. Навеску образца 0,05 г переносят в пробирку типа Эппендорф (№1) на 2,0 мл, добавляют 1000 мкл 70%-ного раствора этилового спирта. Пробирку помешают в шейкер и перемешивают при 1400 об./мин в течение 1 ч. Полученное извлечение центрифугируют при 4500 об./мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирают в отдельную пробирку (№2), а осадку приливают 500 мкл 70%-ного раствора этилового спирта и повторяют экстракцию (1400 об./мин, 30 мин). Полученное извлечение центрифугируют (4500 об./мин, 10 мин), надосадочную жидкость переливают в пробирку №2. Объем раствора в пробирке №2 доводят до 2 мл 70%-ным раствором этилового спирта.

2. Построение градуировочного графика.

Растворы галловой кислоты для построения градуировочного графика с массовой концентрацией 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 мг/мл готовят разбавлением стандартного раствора галловой кислоты с концентрацией 1 мг/мл. Для этого в мерные пробирки вместимостью 10 мл пипеточным дозатором вводят 200; 400; 600; 800; 1000 мкл стандартного раствора галловой кислоты с концентрацией 1 мг/мл, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Берут 5 пробирок на 10 мл, добавляют 100 мкл калибровочного раствора (в соответствии с таблицей 1), 300 мкл реактива Фолина — Чокалтеу, 3 мл 11,5%-ного раствора карбоната натрия, 3 мл дистиллированной воды, перемешивают. В качестве контроля используют дистиллированную воду. Через 30 мин снимают показания оптического поглощения растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Результаты заносят в таблицу 1, строят градуировочный график.

Таблица 2

Данные для построения градуировочного графика

| № пробирки | Концентрация галловой кислоты, мг/мл | Оптическое поглощение |
|------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,02 | |
| 2 | 0,04 | |
| 3 | 0,06 | |
| 4 | 0,08 | |
| 5 | 0,10 | |

3. Определение фенольных соединений в экстрактах лекарственных растений.

В пробирки на 10 мл добавляют 100 мкл растительного экстракта, 300 мкл реактива Фолина — Чокалтеу, 3 мл 11,5%-ного раствора карбонат натрия, 3 мл дистиллированной воды, перемешивают. В качестве контроля используют дистиллированную воду. Через 30 мин снимают показания оптического поглощения растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм. В случае если оптическое поглощение раствора с экстрактом больше оптического поглощения крайней точки градуировочного графика, то проводят разбавление экстракта.

Содержание фенольных соединений рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot n}{m},$$

где C — суммарное содержание фенольных соединений, мг/г; C_x — концентрация фенольных соединений, найденная по градуировочному графику, мг/мл; V — общий объем экстракта, мл; n — коэффициент разбавления; m — масса навески, г.

Лабораторная работа №2**Определение суммарного содержания флавоноидов**

Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов основано на образовании комплексных соединений флавоноидов с ионами алюминия с максимумами поглощения в области 410—440 нм [9].

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр ЮНИКО-1201; шейкер, пипетки или дозаторы переменного объема; градуированные (мерные) пробирки на 10 мл; пробирки типа Эппендорф, водяная баня; холодильник лабораторный стеклянный; плоскодонные колбы на 100 мл; стаканы на 100 мл; фильтровальная бумага; 96%-ный этиловый спирт; водный раствор 70%-ного этилового спирта; 2%-ный раствор хлорида алюминия; 30%-ная уксусная кислота; стандартный рутина с концентрацией 1 мг/мл.

Приготовлен ие растворов:

1. Этиловый спирт, 70%-ный водный раствор — 700 мл 95%-ного этилового спирта смешивают с 250 мл дистиллированной воды.

2. Хлорид алюминия, 2%-ный спиртовой раствор — 2,0 г хлорида алюминия смешивают с 98,0 г 96%-ного этилового спирта до полного растворения.

3. Уксусная кислота, 30%-ный водный раствор — 30 мл ледяной уксусной кислоты смешивают с 70 мл дистиллированной воды.

4. Рутин, стандартный раствор с концентрацией графика 1 мг/мл — 50 мг рутина, предварительно высушенного при 130—135 °С, в течение 3 ч растворяют при нагревании в 300 мл 96%-ного этилового спирта (в мерной колбе), охлаждают и доводят объем раствора до метки тем же спиртом.

Ход работы

1. *Экстракция.* Экстракцию флавоноидов из высушенных лекарственных растений проводят по способам 1 или 2, описанным в лабораторной работе № 1.

2. *Построение градуировочного графика.*

Растворы рутина для построения градуировочного графика с массовой концентрацией 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 мг/мл готовят разбавлением стандартного раствора рутина с концентрацией 1 мг/мл. Для этого в мерные пробирки вместимостью 10 мл пипеточным дозатором вводят 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 мл

стандартного раствора рутина с концентрацией 1 мг/мл, доводят объем до метки 96%-ным этиловым спиртом и тщательно перемешивают.

Берут 5 пробирок на 10 мл, добавляют 1 мл 2%-го спиртового раствора $AlCl_3$, 2 мл калибровочного раствора (в соответствии с таблицей 2) и 1—2 капли 30%-ного CH_3COOH . Доводят объем реакционной смеси до метки 70%-ным этанолом и тщательно перемешивают. Показания оптического поглощения снимают через 30 мин при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения выступал аналогично приготовленный раствор без добавления $AlCl_3$.

Таблица 2

Данные для построения градуировочного графика

| № пробирки | Концентрация рутина, мг/мл | Оптическое поглощение |
|------------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,025 | |
| 2 | 0,050 | |
| 3 | 0,10 | |
| 4 | 0,20 | |
| 5 | 0,50 | |

3. Определение содержания флавоноидов в экстрактах лекарственных растений.

В мерную пробирку на 10 мл добавляют 1 мл 2%-ного спиртового раствора $AlCl_3$, 2 мл экстракта и 1—2 капли 30%-ного CH_3COOH . Доводят объем реакционной смеси до метки 70%-ным этанолом и тщательно перемешивают. Показания оптического поглощения снимают через 30 мин при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения выступал аналогично приготовленный раствор без добавления $AlCl_3$.

Содержание флавоноидов рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot n}{m},$$

где C — суммарное содержание флавоноидов, мг/г; C_x — концентрация флавоноидов, найденная по градуировочному графику, мг/мл; V — общий объем экстракта, мл; n — коэффициент разбавления; m — масса навески, г.

Лабораторная работа №3

Определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот

Определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье основано на использование хромогенной системы $\text{HCl-NaNO}_2\text{-Na}_2\text{MoO}_4\text{-NaOH}$, которая образует комплексы с орто-дигидроксифенолами с максимумами поглощения в области 500—530 нм [10]. В качестве стандарта рекомендуется использовать хлорогеновую или розмариновую кислоты в зависимости от того, какая из них преобладает в анализируемом виде растения.

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр ЮНИКО-1201; шейкер, пипетки или дозаторы переменного объема; градуированные (мерные) пробирки на 10 мл; пробирки типа Эппендорф, водяная баня; холодильник лабораторный стеклянный; плоскодонные колбы на 100 мл; стаканы на 100 мл; фильтровальная бумага; 96%-ный этиловый спирт; водный раствор 70%-ного этилового спирта; 0,5 М раствора соляной кислоты; реагент Арно; 8,5%-ный раствор гидроксида натрия; стандартный раствор хлорогеновой или розмариновой кислоты с концентрацией 1 мг/мл.

Приготовление растворов:

1. Этиловый спирт, 70%-ный водный раствор — 700 мл 95%-ного этилового спирта смешивают с 250 мл дистиллированной воды.

2. Соляная кислота, 0,5 М — 4,5 мл концентрированной соляной кислоты ($\rho=1,174$ г/мл) смешивают с 95,5 мл дистиллированной воды).

3. Гидроксид натрия, 8,5%-ный водный раствор — 8,5 г NaOH смешивают с 91,5 г дистиллированной воды до полного растворения.

4. Реагент Арно — 10 г NaNO_2 и 10 г Na_2MoO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

5. Хлорогеновая или розмариновая кислота, стандартный раствор с концентрацией 1 мг/мл — в мерной колбе на 50,0 мл растворяют 50 мг хлорогеновой или розмариновой кислоты в 96%-ном этиловом спирте.

Ход работы

1. *Экстракция.* Экстракцию гидроксикоричных кислот из высушенных лекарственных растений проводят по способам 1 или 2, описанным в лабораторной работе № 1.

2. *Построение градуировочного графика.*

Растворы хлорогеновой или розмариновой кислоты для построения градуировочного графика с массовой концентрацией 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 мг/мл готовят разбавлением стандартного раствора хлорогеновой или розмариновой кислоты с концентрацией 1 мг/мл. Для этого в мерные пробирки вместимостью 10 мл пипеточным дозатором вводят 0,10; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 мл стандартного раствора кислоты с концентрацией 1 мг/мл, доводят объем до метки 96%-ным этиловым спиртом и тщательно перемешивают.

Берут 5 пробирок по 10 мл, добавляют 1,0 мл стандартного раствора (в соответствии с таблицей 3), 2 мл 0,5 М HCl, 2 мл реагента Арно, 2 мл 8,5%-ного раствора NaOH и доводят до 10,0 мл дистиллированной водой. Абсорбцию исследуемого раствора измеряют сразу при 505 нм (при использовании в качестве стандарта розмариновой кислоты) или при 525 нм (при использовании в качестве стандарта хлорогеновой кислоты). В качестве раствора сравнения применяют раствор, состоящий из всех перечисленных выше компонентов за исключением реагента Арно.

Таблица 3

Данные для построения градуировочного графика

| № пробирки | Концентрация хлорогеновой или розмариновой кислоты, мг/мл | Оптическое поглощение |
|------------|---|-----------------------|
| 1 | 0,01 | |
| 2 | 0,05 | |
| 3 | 0,10 | |
| 4 | 0,20 | |
| 5 | 0,50 | |

3. Определение содержания гидроксикоричных кислот в экстрактах лекарственных растений.

В мерные пробирки по 10,0 мл добавляют 1,0 мл экстракта, 2 мл 0,5 М HCl, 2 мл реагента Арно, 2 мл 8,5%-ного раствора NaOH и доводят до 10,0 мл дистиллированной водой. Абсорбцию исследуемого раствора измеряют сразу при 505 нм (при использовании в качестве стандарта розмариновой кислоты) или при 525 нм (при использовании в качестве стандарта хлорогеновой кислоты). В качестве раствора сравнения применяют раствор, состоящий из всех перечисленных выше компонентов за исключением реагента Арно.

Содержание гидроксикоричных кислот рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot n}{m}$$

где C — суммарное содержание гидроксикоричных кислот, мг/г; C_x — концентрация гидроксикоричных кислот, найденная по градуировочному графику, мг/мл; V — общий объем экстракта, мл; n — коэффициент разбавления; m — масса навески, г.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение растительным фенольным соединениям. Какой биологической активностью обладают фенольные соединения?

2. Охарактеризуйте основные классы фенольных соединений, приведите примеры типичных представителей данных классов.

3. Какое лекарственное растительное сырье нормируется по содержанию фенольных соединений (флавоноидов или гидроксикоричных кислот) согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (XIV издание)?

4. Перечислите методы экстракции фенольных соединений из лекарственного растительного сырья. Какие растворители являются наиболее подходящими для экстракции флавоноидов? Какие параметры экстракционного процесса оказывают наиболее существенное влияние на выход фенольных соединений?

5. Какие методы наиболее часто применяются для исследования качественного и количественного состава фенольных соединений в лекарственных растениях? Назовите основные преимущества и ограничения при использовании каждого из методов.

Список литературы

1. *Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдрашилов Б. С., Музафаров Е. Н.* Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / отв. ред. Е. И. Маевский. Пушино : Synchronbook, 2013.

2. *Kumar N., Goel N.* Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications // *Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 24. e00370.

3. *Абдрахимова Й. Р., Валиева А. И.* Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты. Ч. 3. Фенольные соединения : учеб.-метод. пособие. Казань : Казанский университет, 2012.

4. *Борисова Г. Г., Ермошин А. А., Малева М. Г., Чукина Н. В.* Основы биохимии вторичного обмена растений : учеб.-метод. пособие / под общ. ред. Г. Г. Борисовой ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014.

5. *Dias M. C., Pinto D. C.G.A., Silva A. M.S.* Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity // *Molecules*. 2021. Vol. 26. P. 5377.

6. *Khoddami A., Wilke M. A., Roberts T. H.* Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds // *Molecules*. 2013. Vol. 18. P. 2328—2375.

7. *Тюкавкина Н. А., Зурабян С. Э., Белобородов В. Л. и др.* Органическая химия : учебник для вузов : в 2 кн. Кн. 2: Специальный курс / под ред. Н. А. Тюкавкиной. М. : Дрофа, 2008.

8. *Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.* М. : Федеральный центр санэпиднадзора Минздрава России, 2004.

9. *Shraim A. M., Ahmed T. A., Rahman M. M., Hijji Y. M.* Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation // *LWT*. 2021. Vol. 150. P. 111932.

10. *Štefan M. B., Vuković Rodríguez J., Blažeković B. et al.* Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on Lamiaceae species // *Food Analytical Methods*. 2014. Vol. 7. P. 326—336.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗОПРЕНОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Изопреноидами (терпеноидами) называют самый многочисленный класс природных соединений, углеродный скелет которых построен из разветвленных С5-единиц, называемых изопреновыми единицами. Это обширная группа соединений, имеющих общую формулу $(C_5H_8)_n$. Второе название — терпеноиды — от немецкого слова *terpentin* (скипидар), так как скипидар представляет собой смесь легких изопреноидов.

Обычно терпенами называют соединения, содержащие целое число С5-единиц независимо от присутствия в молекуле функциональных групп (гидроксильных, карбонильных и др.). Термин «терпеноиды» применяют для соединений с различным числом углеродных атомов, но биосинтез которых явно прошел из С5-единиц.

Изопрен (C_5H_8) — летучее соединение, которое легко переходит в газообразную форму. Содержится в растениях в очень малых количествах. В организмах животных и в растениях для биосинтеза линейных и циклических олигомеров и полимеров исходным соединением служит активный изопрен — 5-изопентенилдифосфат. Биосинтез изопреноидов может осуществляться по мевалонатному (путь синтеза терпеноидов для животных, протекает вне хлоропластов; например синтез стероидных гормонов) и немевалонатному (характерен для растений, протекает в пластидах) путям [1].

Изопреноиды, как и многие другие натуральные продукты, проявляют биологическую активность, которая используется для профилактики и лечения заболеваний человека. Сотни изопреноидных соединений и их производных были протестированы на клеточные и молекулярные основы их фармакологической активности. Продемонстрированная биологическая активность различных классов терпеноидов в исследованиях

in vitro и *in vivo* включает противовоспалительное, антиоксидантное, антиагрегационное, антикоагулянтное, противоопухолевое, седативное и обезболивающее действие [2].

Классификацию изопреноидов проводят по количеству остатков изопрена в молекуле. Исходя из этого выделяют следующие группы [1].

1. Монотерпены (C_{10}) и сесквитерпены (C_{15}).

Моно- и сесквитерпены, как правило, являются легкоиспаряющимися жидкостями, часто с разнообразным запахом. Известно более 3000 этих соединений. Это основные компоненты эфирных масел, которые часто обладают бактерицидным действием. Примеры монотерпенов: мирцен, оцимен, лимонен, ментол, камфора (рис. 6). К сесквитерпенам относятся хамазулен, ледол, неролидон, фарнезол.

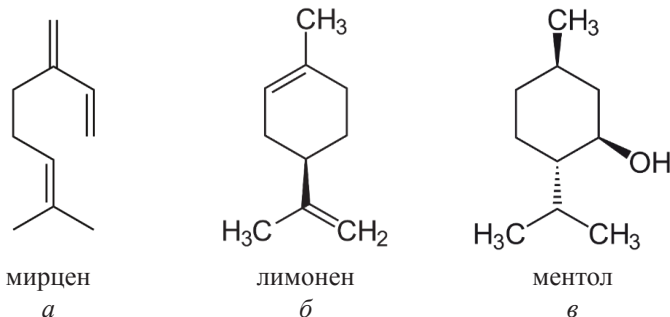


Рис. 6. Структурные формулы представителей группы монотерпенов

Особые группы моно- и сесквитерпенов образуют вещества, у которых в состав кольца (колец) входит один или несколько атомов кислорода (иридоиды, сесквитерпеновые лактоны). Иридоиды, как правило, в виде гликозидов часто обладают специфическим горьким вкусом и являются горечами — веществами, возбуждающими аппетит и улучшающими пищеварение. Некоторые из них имеют бактериостатическое (аукубин) и противоопухолевое (арглабин) действие. Известным представителем этой группы является артемизинин, ко-

торый обладает наиболее быстрым действием среди всех существующих в настоящее время лекарств против тропической малярии.

2. Дитерпены (C_{20}).

Дитерпены насчитывают несколько тысяч структур, представляют собой главный компонент смол у голосеменных (ель, сосна, пихта, кедр). Часто дитерпены, входящие в состав смол, обладают бактерицидными свойствами, являются токсинами и репеллентами для животных-фитофагов. Например, в смоле сосны и некоторых видов тропических бобовых растений содержится большое количество дитерпенового репеллента — абиевой кислоты. Фитол, входящий в состав хлорофилла, может рассматриваться как гидрированный дитерпеновый спирт. Представитель дитерпенов — известное противораковое соединение — паклитаксел (таксол) из коры тиса (рис. 7).

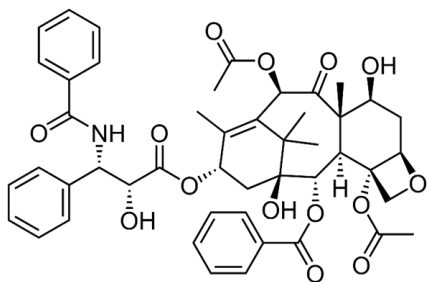


Рис. 7. Структурная формула паклитаксела

3. Сестерпены (C_{25}).

Сестерпены отличаются разнообразными химическими структурами, в том числе могут включать линейные, моноциклические, бициклические, трициклические, тетрациклические и макроциклические каркасы. Однако сестерпены в природе встречаются редко. Они были выделены из растений, грибов и насекомых. Представителем данной группы изопреноидов является, например, маноалид (рис. 8). Маноалид — блокатор кальциевых каналов. Он обладает антибиотическим, болеутоляющим и противовоспалительным действием и был выде-

лен из некоторых видов губок, в том числе в разновидностях *Luffariella variabilis*, обитающих в западной части Тихого океана. Из лекарственного растения *Leucoscepttrum canum* был выделен сестерпен — лейкосцептрин, проявляющий ингибиторную активность в отношении пролилэндопептидазы, что позволяет рассматривать данное соединение в качестве перспективного для терапии нейродегенеративных заболеваний.

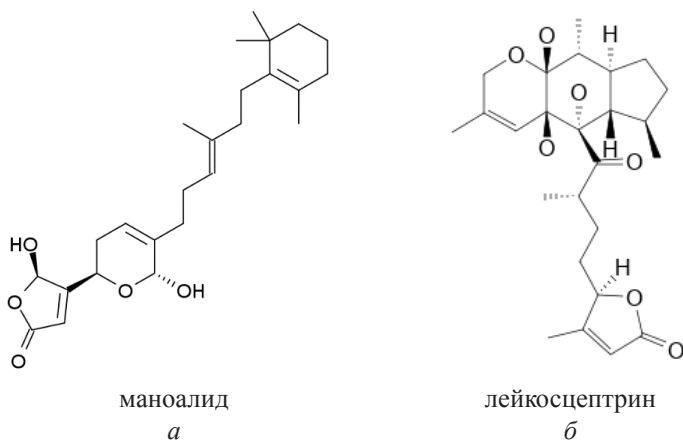


Рис. 8. Структурные формулы представителей группы сестерпенов

4. Тритерпеноиды (C_{30}).

Отличия тритерпеноидов от других классов изопреноидов: меньшее разнообразие структурных типов; более широкое распространение в различных группах живых организмов; некоторые тритерпены претерпевают деградацию углеродного скелета, иногда весьма существенную — от C_{30} до C_{18} . Эти деградированные тритерпеноиды составляют группу важнейших физиологически активных соединений, называемых стероидами.

В растениях большинство тритерпенов являются типичными вторичными метаболитами (за исключением фитостеринов). К ним относятся следующие виды.

1. Сердечные тритерпеновые гликозиды представляют собой стероиды с дополнительным кислородсодержащим пятичленным или шестичленным кольцом. Углеводная часть молекулы содержит от одного до пяти моносахаридов, соединенных между собой. Примеры сердечных гликозидов: дигитоксин, адонитоксин, конваллатоксин и конвалламарин. Сердечные гликозиды оказывают избирательное кардиотоническое действие на сердечную мышцу, понижают возбудимость проводящей системы сердца.

2. Стероидные тритерпеновые гликозиды представляют собой модифицированные стероидные или тритерпеновые структуры. Многие из данных соединений обладают поверхностной активностью и вызывают гемолиз эритроцитов, поэтому часто эти гликозиды называют сапонинами (от латинского названия растения *Saponaria* — мыльнянка). Молекула сапонинов состоит из сахара и агликона, называемого сапогенином. Сапонины по строению их агликонов делятся на две группы: стероидные (агликоны — производные циклопентанопергидрофенантрена (стерана) и тритерпеновые (агликон — пентациклические или тетрациклические тритерпеноиды). Представителями первой группы являются диосгенин, диосцин, париллин, второй — олеаноловая, урсоловая, бетулиновая кислоты.

3. Экдистероиды — гормоны линьки насекомых, обнаружены во многих растениях, представляют собой стероиды с большим количеством гидроксильных групп (рис. 9).

4. Тетратерпены (C_{40}) представлены в растениях, главным образом, каротиноидами — жирорастворимыми пигментами желтого или оранжевого цвета.

5. Политерпены. Полиизопреновая цепочка каучука содержит от 1000 до 6000 остатков изопрена, а цепочка гутты — около 100. Эти вещества имеют различия и в строении полиизопреновой цепочки: цепочка каучука имеет *цис*-конфигурацию, а цепочка гутты — *транс*-конфигурацию.

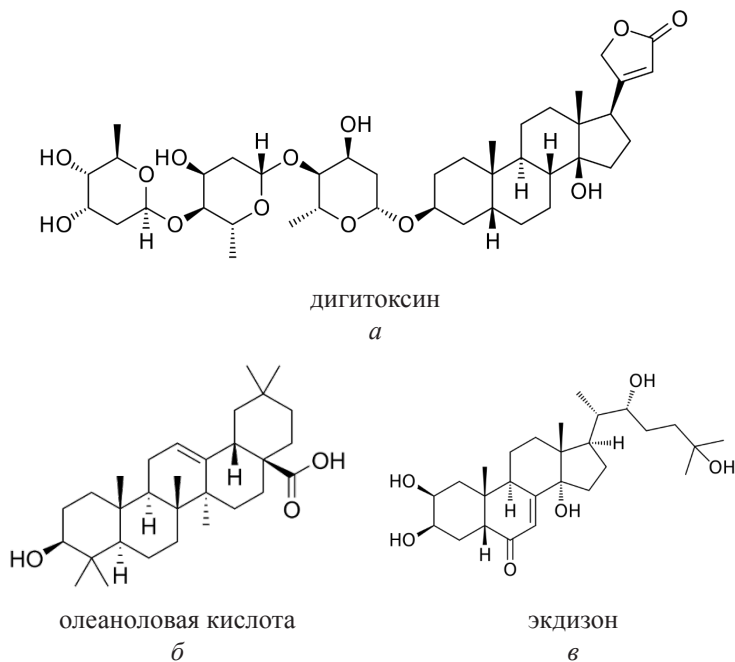


Рис. 9. Структурные формулы представителей группы тритерпеноидов

Экстракцию изопреноидов из твердых и жидких образцов проводят органическими растворителями с низкими температурами кипения (ацетон, этилацетат, этанол, метанол и др.). Часто экстракцию осуществляют в течение определенного времени (иногда до нескольких суток) в аппарате Сокслета. Для выделения эфирного масла (смеси моно- и сесквитерпенов) из растительного материала широко используется перегонка с водяным паром [3]. Однако экстракция неполярными растворителями, такими как петролейный эфир, диэтиловый эфир и гексан, может быть предпочтительнее из-за образования побочных продуктов при повышенных температурах в процессе гидродистилляции. Экстракцию сесквитерпеновых лактонов,

дитерпенов, стеролов и менее полярных тритерпеноидов также можно проводить с использованием диэтилового эфира или хлороформа. Экстракты, полученные с использованием этилацетата и ацетона, содержат оксигенированные дитерпеноиды, стеролы и тритерпеноиды. Этанол, метанол, и вода приводят к экстракции высокооксигенированных тритерпенов, полярных по природе, а также тритерпеноидных и стероловых гликозидов. Полная экстракция растительного материала любыми полярными растворителями, такими как ацетон, водный метанол (80%), водный этанол с последующей рекстракцией гексаном, хлороформом и этилацетатом, также используется для ступенчатого извлечения терпеноидов и стеролов [4].

Для идентификации терпеноидов используются различные спектроскопические методы: УФ-спектроскопия, фотометрия для окрашенных изопреноидов (например, каротиноидов), ИК-спектроскопия, ПМР- и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурный анализ.

Для разделения и определения терпенов также широко применяются следующие хроматографические методы.

1. ТСХ (тонкослойная хроматография) и БХ (бумажная хроматография) — сравнительно доступные методы, которые позволяют проводить качественное и полуколичественное определение основных компонентов эфирного масла (ЭМ). Для разделения ЭМ применяются системы растворителей различной полярности. Детектирование проводят облучением хроматограмм УФ-светом или с помощью реагентов-проявителей (конц. H_2SO_4 , иногда с добавлением ванилина или анисового альдегида, SbCl_3 или фосфорномолибденовой кислоты и др.), образующих окрашенные соединения с определяемыми веществами. Недостатками ТСХ и БХ является относительно большая длительность анализа, сравнительно малая эффективность разделения, невозможность точного количественного определения компонентов смеси.

2. ВЭЖХ с успехом используется для анализа смесей терпеновых соединений. Важное преимущество ВЭЖХ — возможность анализа малолетучих и термолабильных соединений. По-

лупрепаративная ВЭЖХ позволяет разделить сложные смеси терпеноидов на фракции, что значительно упрощает их последующее исследование с помощью ГЖХ.

3. ГЖХ (газожидкостная хроматография) наиболее широко используется для сложных смесей терпеновых соединений. Это обусловлено следующим: терпеноиды имеют температуру кипения от 150 до 350°C и достаточное парциальное давление для проведения анализа этим методом. Для анализа смесей терпеноидов успешно используют различные неподвижные фазы (НЖФ) широкого диапазона полярности — от неполярных (SE-30, OV-101) до полярных (карбовакс 20М). Чувствительность метода ГЖХ определяется типом используемого детектора. При исследовании смеси терпеновых соединений преимущественно используются плазменно-ионизационный детектор и детектор по теплопроводности.

Одним из наиболее часто используемых методов при анализе смеси терпенов является метод газовой хромато-масс-спектрометрии. Существующие библиотеки масс-спектральной информации позволяют быстро идентифицировать большинство терпеновых соединений. Для повышения надежности идентификации рекомендуется дополнительно проводить расчет линейных индексов удерживания. Сравнение экспериментального и библиотечного индекса удерживания дает дополнительную хроматографическую точку идентификации, сочетание которой с масс-спектрометрическими данными позволяет более надежно идентифицировать соединения [3].

Лабораторная работа №4

Идентификация монотерпеноидов методом тонкослойной хроматографии

Идентификация монотерпеноидов, содержащихся в лекарственных растениях, основана на их разделении в тонком слое сорбента с последующим сравнением показателей R_f и цвета пятен, обнаруживаемых на пластине со значениями, полученными для стандартных растворов ментола и тимола [5].

Оборудование, реактивы, материалы: хроматографическая камера для пластинок размером 10×10 см; пластинки со

слоем силикагеля; стандартный раствор ментола; стандартный раствор тимола; элюент (смесь растворителей толуола и этилацетата в соотношении 95:5); дихлорметан; конические колбы на 100 мл; фильтровальная бумага; капилляры; раствор для детектирования (уксуснокислый раствор анисового альдегида в этаноле).

Приготовление растворов:

1. *Приготовление раствора стандартного образца тимола.* Около 0,01 г тимола (содержание основного вещества $\geq 95\%$) растворяют в 10 мл 96%-ного спирта. Раствор хранят в прохладном, защищенном от света месте не более 90 суток.

2. *Приготовление раствора стандартного образца ментола.* Около 0,01 г ментола (левоментола) растворяют в 10 мл 96%-ного спирта и перемешивают. Раствор хранят в прохладном, защищенном от света месте не более 90 суток.

3. *Приготовление раствора для детектирования.* Последовательно смешивают 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл 96%-ного раствора этанола и 5 мл серной кислоты концентрированной.

Ход работы

1. *Экстракция терпеноидов.* Навеску растительного образца 1,0 г измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями 0,5 мм, переносят в колбу на 100 мл, приливают 5 мл дихлорметана и взбалтывают в течение 15 мин. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

2. *Проведение хроматографирования в тонком слое (ТСХ).*

Перед проведением хроматографирования камеру насыщают элюентом (смесью растворителей толуола и этилацетата (95:5)) в течение 60 мин.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на пластиковой или алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и по 5 мкл растворов ментола и тимола.

Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру, предварительно насыщенную элюентом, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80—90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают

из камеры, сушат до удаления следов растворителей и обрабатывают раствором для детектирования (уксуснокислый раствор анисового альдегида в этаноле), выдерживают в сушильном шкафу при 100—105 °С в течение 3—5 мин и просматривают сразу же в дневном свете. Результаты идентификации заносят в таблицу 4.

Таблица 4

Результаты идентификации терпеноидов методом ТСХ

| № пятна (от линии старта) | Значение R_f | Экстракт | Ментол | Тимол |
|------------------------------|----------------|----------|--------|-------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

На хроматограмме растворов стандартных образцов ментола и тимола должны обнаруживаться зона красного или оранжево-красного цвета с R_f около 0,5, принятая за $R_s=1,0$ (тимол) и зона синего или фиолетового цвета с R_s около 0,5 (ментол).

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться следующие зоны липофильных соединений: зоны синего, сине-зеленого, зеленого или фиолетового цвета с R_s (по тимолу) около 0,3 и 0,5; зона фиолетового цвета с R_s около 1,5; допускается обнаружение зоны коричневого цвета на линии старта, зоны красного или розового цвета с R_s около 0,8, зоны синего, сине-зеленого или зеленого цвета с R_s около 0,1 и 1,2 и другие дополнительные зоны (терпеноиды).

Лабораторная работа №5.

Качественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего сапонины

Для обнаружения сапонинов в растительном сырье пользуются реакциями, основанными на физических, химических и биологических свойствах сапонинов. К первой группе относят-

ся реакция на пенообразование; ко второй — реакция осаждения и цветные реакции; к третьей — проба на гемолиз эритроцитов [6].

Оборудование, реактивы, материалы: водяная баня; обратный холодильник; 50%-ный раствор этилового спирта; фильтровальная бумага; конические колбы на 100 мл; пробирки на 10—20 мл; 10%-ный раствор хлорида бария; серная кислота концентрированная; 10%-ный раствор ацетата свинца; 10%-ный раствор сульфата железа; хлороформ.

Приготовление растворов:

1. Хлорид бария, 10%-ный водный раствор — в стакане смешивают 10 г хлорида бария и 90 г дистиллированной воды до полного растворения.

2. Ацетат свинца, 10%-ный водный раствор — в стакане смешивают 10 г ацетата свинца и 90 г дистиллированной воды до полного растворения.

3. Сульфат железа, 10%-ный водный раствор — в стакане смешивают 10 г сульфата железа и 90 г дистиллированной воды до полного растворения.

4. Этиловый спирт, 50%-ный водный раствор — 500 мл 95%-ного этилового спирта смешивают с 450 мл дистиллированной воды.

Ход работы

1. *Экстракция сапонинов из растительного сырья.*

Приготовление водного извлечения. Взвешивают 5,0 г измельченного растительного сырья, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и приливают 50 мл воды. Содержимое колбы нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр.

Приготовление водно-спиртового извлечения. Взвешивают 5,0 г измельченного растительного сырья, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и приливают 50 мл 50%-ного раствора этилового спирта. Содержимое колбы нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр.

2. Проведение качественных реакций на сапонины.

Для проведения качественных реакций используют водные и водно-спиртовые извлечения. Результаты реакций и наблюдаемые эффекты отмечают в таблице 5.

Таблица 5

Качественные реакции на сапонины

| Качественная реакция | Предполагаемый результат реакции | Фактический результат реакции |
|--|--|-------------------------------|
| <i>Проба на пенообразование</i> 2—3 мл <i>водного извлечения</i> энергично встряхивают в течение 1 мин. (Это не только чувствительная проба, но и довольно характерная, так как других веществ, обладающих такой способностью к пенообразованию, в растениях не встречается) | Образуется обильная и стойкая пена | |
| <i>Осаждение сапонинов солями бария (магния)</i> В пробирку к 2 мл <i>водного извлечения</i> прибавляют несколько капель раствора соли бария | Образуется осадок | |
| <i>Осаждение сапонинов ацетатом свинца</i> В пробирку к 2 мл <i>водного извлечения</i> прибавляют несколько капель 10%-го ацетата свинца | Образуется осадок | |
| <i>Цветные реакции (реакции выполняются под тягой)</i> | | |
| <i>Реакция с концентрированной серной кислотой</i> В пробирку к 2 мл <i>водно-спиртового извлечения</i> прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты | Появляется красное или красно-фиолетовое окрашивание | |

Окончание табл. 5

| Качественная реакция | Предполагаемый результат реакции | Фактический результат реакции |
|---|---|-------------------------------|
| <i>Проба Лафона на сапонины</i> В пробирку к 2 мл <i>водно-спиртового извлечения</i> прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, несколько капель 10%-го сульфата железа | Появляется зеленоватое или сине-зеленое окрашивание | |
| <i>Реакция Сальковского</i> К 2 мл <i>водного извлечения</i> в пробирке прибавляют 1 мл хлороформа и несколько капель кислоты серной концентрированной. Не перемешивать слои! | Органический слой окрашивается в оранжевый цвет | |

Лабораторная работа №6

Определение тритерпеновых пентациклических кислот в лекарственных растениях

Качественная идентификация тритерпеновых пентациклических кислот проводится после предварительного гидролиза и разделения смеси агликонов в тонком слое сорбента. Определение содержания суммы тритерпеновых сапонинов спектрофотометрическим методом основано на реакции их взаимодействия с концентрированной серной кислотой. Тритерпеноиды протонируются по двойной связи с образованием карбокатиона, а при наличии карбоксильной группы при C₂₈ атоме углерода имеет место последующая лактонизация. При этом наблюдается характерный максимум поглощения при 310 нм [7].

Оборудование, реактивы, материалы: хроматографическая камера для пластинок размером 10×10 см; пластинки со слоем силикагеля; денситометр; плитка, фарфоровые чашки для выпаривания; спектрофотометр; круглодонные колбы на 250 мл; элюент (бензол-ацетон в соотношении 3:1); стандарт-

ный раствор олеаноловой кислоты с массовой концентрацией 0,4 мкг/мл; 10%-ный раствор серной кислоты; концентрированная серная кислота; ледяная уксусная кислота, концентрированная соляная кислота; 95%-ный этиловый спирт.

Приготовление растворов:

1. Серная кислота, 10%-ный водный раствор, в термостойкий стакан приливают 88 мл воды и по каплям, постоянно перемешивая, добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты.

2. Олеаноловая кислота, стандартный раствор с концентрацией 0,4 мг/мл — 0,004 г олеаноловой кислоты растворяют в 10,0 мл 95%-ного этилового спирта.

Ход работы

1. *Экстракция тритерпеновых пентациклических кислот из растительного сырья.*

Навеску образца (высушенные и измельченные растения) 1,0 г переносят в круглодонную колбу на 250 мл и заливают 50 мл 70%-ного раствора этилового спирта. Затем содержимое колбы с обратным холодильником нагревают на водяной бане в течение 40 мин. Полученное извлечение охлаждают и отфильтровывают в мерную колбу на 100 мл. Экстракцию повторяют дважды. Фильтраты собирают в одну колбу, объем доводят до метки 70%-ным этиловым спиртом.

2. *Проведение гидролиза.* Из полученного согласно п. 1 экстракта отбирают 10 мл и выпаривают досуха на плитке. Полученный остаток растворяют в 10 мл смеси, состоящей из уксусной кислоты ледяной, концентрированной соляной кислоты и воды в соотношении 3,5:1,0:5,5. Полученный раствор переносят в круглодонную колбу и нагревают на водяной бане в течение 2 ч. Затем к смеси добавляют 20 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровывают. Осадок на фильтре промывают водой и растворяют в 10,0 мл 95%-ного этилового спирта.

3. *Хроматографическое разделение тритерпеновых пентациклических кислот и денситометрическое определение их суммарного содержания.*

Перед проведением хроматографирования камеру насыщают в течение 30 мин.

На старт пластинки капилляром наносят 1, 2, 3, 4 и 5 мкл стандартного раствора олеаноловой кислоты и по 10 мкл спиртового экстракта (п. 1) и гидролизата исследуемого растения (п. 2). Расстояние между точками не менее 1 см. Хроматографирование осуществляют в камере в системе «бензол — ацетон» (3:1). После хроматографирования пластинки высушивают и обрабатывают 10%-ным раствором серной кислоты. Далее пластинки высушивают в сушильном шкафу в течение 15—20 мин при температуре 110 °С. Зоны адсорбции веществ тритерпеновой природы и СО должны иметь окраску розово-вишневого цвета, переходящую в голубой.

После проявления цвета пластинки фотографируют и проводят определение площади пятен в программе Image J. Результаты определения заносят в таблицу 6, строят градуировочный график и рассчитывают содержание тритерпеновых пентациклических кислот.

Таблица 6

Данные для построения градуировочного графика

| Точка | Объем стандартного раствора олеаноловой кислоты, мкл | Количество олеаноловой кислоты, мкг | Площадь пика |
|-------|--|-------------------------------------|--------------|
| №1 | 1,0 | 0,4 | |
| №2 | 2,0 | 0,8 | |
| №3 | 3,0 | 1,2 | |
| №4 | 4,0 | 1,6 | |
| №5 | 5,0 | 2,0 | |

Содержание тритерпеновых пентациклических кислот рассчитывают по формуле

$$C = C_x \frac{V}{10 \cdot 1000 \cdot m}$$

где C — содержание тритерпеновых пентациклических кислот (мг/г); C_x — количество тритерпеновых пентациклических кислот (мкг), найденное по градуировочному графику; m — масса навески, г; V — объем экстракта, мл.

4. *Спектрофотометрическое определение суммарного содержания тритерпеновых пентациклических кислот.* К 3 мл гидролизата прибавляют 6 мл концентрированной серной кислоты, смесь инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре. Оптическое поглощение регистрируют при 310 нм. В качестве раствора сравнения используют концентрированную серную кислоту. Параллельно проводят реакцию стандартного раствора олеаноловой кислоты (0,4 мг/мл) с серной кислотой и также определяют оптическое поглощение этого раствора при 310 нм.

Содержание тритерпеновых пентациклических кислот рассчитывают по формуле

$$C = C_{cm} \cdot \frac{A_x \cdot V}{A_{cm} \cdot m}$$

где C — содержание тритерпеновых пентациклических кислот (мг/г); C_{cm} — концентрация стандартного раствора олеаноловой кислоты (мг/мл); A_x — оптическое поглощение исследуемого раствора; A_{cm} — оптическое поглощение стандартного раствора олеаноловой кислоты; V — объем экстракта, мл; m — масса навески, г.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение растительным изопреноидам. Какой биологической активностью обладают изопреноиды?
2. Охарактеризуйте основные классы изопреноидов, приведите примеры типичных представителей данных классов.
3. Какое лекарственное растительное сырье нормируется по содержанию эфирного масла согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (XIV издание)?
4. Перечислите методы экстракции различных групп изопреноидов из лекарственного растительного сырья. Какой метод используется наиболее часто для выделения эфирного масла?
5. Какие методы наиболее часто применяются для исследования качественного и количественного состава изопреноидов в лекарственных растениях? Назовите основные преимущества и ограничения при использовании каждого из методов.

Список литературы

1. Борисова Г. Г., Ермошин А. А., Малева М. Г., Чукина Н. В. Основы биохимии вторичного обмена растений : учеб.-метод. пособие / под общ. ред. Г. Г. Борисовой ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014.

2. Tetali S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use // *Planta*. 2019. Vol. 249. P. 1—8.

3. Писарев Д. И., Новиков О. О. Методы выделения и анализа эфирных масел // Актуальные проблемы медицины. 2012. Т. 18, № 10. С. 25—30.

4. Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev M. I. Terpenoids // *Pharmacognosy*. Academic Press, 2017. P. 233—266.

5. ФС 2.5.0029.15 Мята перечной листья *Menthae piperitae folia* // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. М. : ФЭМБ, 2018. Т. 4. С. 6287—6288.

6. Кудашкина Н. В., Мецзякова С. А., Хасанова С. Р. Фитохимический анализ : учеб. пособие. Уфа : ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2019.

7. Федосеева Л. М., Башар Д. Б. Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской // Химия растительного сырья. 2016. № 1. С. 181—184.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА АЛКАЛОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Алкалоиды представляют собой гетерогенную группу азотсодержащих гетероциклических соединений основного характера, обладающих ярко выраженной физиологической активностью.

Как правило, алкалоиды содержатся в растениях в виде солей яблочной, винной, лимонной и других кислот. В свободном виде они нерастворимы в воде, но растворяются в органических растворителях [1]. По химической структуре алкалоиды обычно разделяют на две подгруппы: протоалкалоиды, которые содержат азот не в гетероцикле, и истинные алкалоиды, содержащие азот в гетероцикле. Гликоалкалоиды, а также ряд других алкалоидов (например, алкалоиды аконита) по типу синтеза и по структуре фактически являются изопреноидами. Поэтому эти алкалоиды было решено выделить в особую группу — изопреноидных псевдоалкалоидов [2].

Таким образом, по «модифицированной» химической классификации сейчас принято разделять алкалоиды на три подгруппы (рис. 10):

- истинные алкалоиды (азот в составе гетероцикла);
- протоалкалоиды (азот не в гетероцикле);
- псевдоалкалоиды (синтез не из аминокислот).

Истинные алкалоиды включают следующие подгруппы [3].

1. Пирролидиновые алкалоиды — производные пирролидина или его бициклического аналога тропана (например, атропин, стахидрин, бетоницин).

2. Пиперидиновые алкалоиды (например, кониин, ареколин, пелетиреин).

3. Пиридиновые алкалоиды: 1) те, которые содержат только пиридиновый гетероциклический фрагмент; 2) те, которые содержат дополнительный гетероциклический фрагмент (напри-

мер, пирролидиновый или пиперидиновый); 3) те, в молекулах которых пиридиновый цикл сконденсирован с аlicyclicами разного размера. Например, никотин, анабазин, актинидин.

4. Пирролизидиновые алкалоиды, содержащие в своей структуре гетероциклическую систему 1-метилпирролизидина (например, платинецин, платифиллин, саррацин).

5. Хинолизидиновые алкалоиды, в основе которых лежит структурный фрагмент хинолизидина — бициклического гетероцикла с атомом азота в узле, своего рода азотистого производного декалина. Например, люпинин, цитизин, спартеин.

6. Изохинолиновые алкалоиды (например, кодеин, берберин, папаверин).

7. Индольные алкалоиды. В молекулах этих алкалоидов индольное ядро часто сохраняет свою ароматическую структуру, но иногда оно может быть гидрировано, ацилировано по атому азота или окислировано по пятичленному циклу. Часто в молекулу входят в качестве составляющих пиридиновые и пиперидиновые фрагменты. Например, стрихнин, бруцин, резерпин, винкамин, винбластин.

8. Пуриновые алкалоиды (например, кофеин, теofilлин и теобромин).

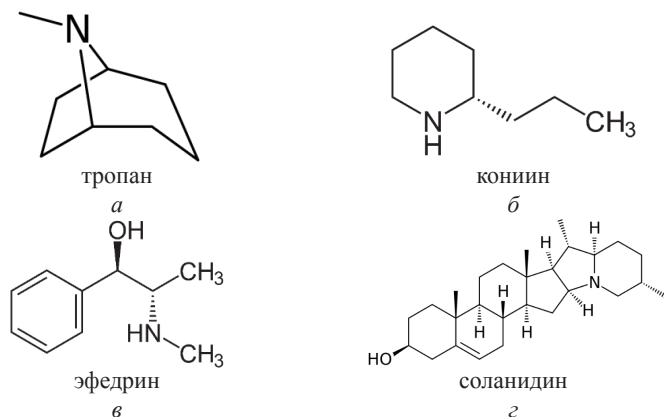


Рис. 10. Структурные формулы представителей групп истинных алкалоидов (а, б), протоалкалоидов (в) и псевдоалкалоидов (г)

Параллельно с химической классификацией существует и биохимическая классификация. По ней алкалоиды подразделяются на подгруппы согласно исходной для их синтеза аминокислоте. Различают следующие алкалоиды:

— синтезирующиеся из L-орнитина (простые пирролидиновые алкалоиды, тропановые алкалоиды, пирролизидиновые алкалоиды);

— из L-лизина (пиперидиновые алкалоиды, хинолизидиновые алкалоиды);

— L-триптофана (сложные индольные алкалоиды, β -карболиновые алкалоиды);

— L-фенилаланина (сложные изохинолиновые алкалоиды);

— антраиловой кислоты (протоалкалоиды, хинолиновые алкалоиды, хиназолиновые алкалоиды);

— L-тирозина (сложные изохинолиновые алкалоиды);

— гистидина (пуриновые алкалоиды) [1].

Из растительного сырья алкалоиды могут быть извлечены в виде свободных оснований и в виде солей. Для выделения алкалоидов в виде солей растительное сырье обрабатывают водой или спиртом с добавлением 1—2%-ной кислоты (хлористоводородной, серной, винной, уксусной или др.). Для очистки от балластных гидрофильных веществ извлечение подщелачивают и образовавшиеся основания алкалоидов экстрагируют несмешивающимся с водой органическим растворителем (хлороформом, дихлорэтаном, бензолом и др.). Операцию очистки повторяют несколько раз. Органический растворитель отгоняют, остаток, содержащий сумму алкалоидов, при необходимости разделяют на отдельные соединения с помощью хроматографии. Для выделения алкалоидов в виде оснований растительный материал обрабатывают раствором аммиака или натрия гидрокарбоната. Образовавшиеся основания алкалоидов экстрагируют органическим растворителем, в который переходят некоторые липофильные примеси. Далее очистку проводят переводом алкалоидов в соли, а затем снова в основания [4].

Для качественного обнаружения алкалоидов в растительных экстрактах используют общие (осадочные) реакции. Для идентификации проводят специфические (цветные) реакции, микрокристаллоскопические реакции и хроматографический анализ.

Общие реакции на алкалоиды, или реакции осаждения, позволяют предварительно установить наличие алкалоидов даже при незначительном их содержании. Алкалоиды осаждаются солями тяжелых металлов, комплексными йодидами, комплексными кислотами, дубильными веществами и некоторыми органическими соединениями кислотного характера. Однако следует учитывать, что с общими осадочными реактивами образуют осадки некоторые другие органические соединения, находящиеся в неочищенных извлечениях (например, холин, бетаин, протеины, белки и др.). Поэтому для получения достоверных результатов реакции лучше проводить с очищенными экстрактами. Вследствие различной чувствительности алкалоидов к общеосадочным реактивам реакции обычно проводят с 5—7 различными реактивами. Наиболее часто используют реактивы Майера (раствор ртути дихлорида и калия йодида), Вагнера и Бушарда (растворы йода в растворе калия йодида), Драгендорфа (раствор висмута основного нитрат и калия йодида с добавлением кислоты уксусной), Марме (раствор кадмия йодида в растворе калия йодида), растворы кремневольфрамовой, фосфорно-молибденовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой кислот, танина и др.

Специфические реакции на алкалоиды используют для установления присутствия определенного алкалоида или группы алкалоидов в растительном сырье. Их проводят с индивидуальными алкалоидами или с очищенной суммой алкалоидов. В качестве специфических реакций часто используют концентрированную серную или азотную кислоту, а также концентрированную серную кислоту, содержащую формальдегид (реактив Марки) или аммония молибдат (реактив Фреде) и др. Микрорекристаллоскопические реакции проводят в основном в токсикологической химии. Изучают под микроскопом форму кристаллов после проведения реакций с пикриновой и пикриловой кислотами, с роданидными и йодидными комплексами металлов [4].

Количественное определение алкалоидов проводят следующие методами.

1. Гравиметрический (весовой) метод.

Алкалоиды переводят в весовую форму, осадок отделяют, высушивают, взвешивают.

2. Титриметрические методы:

а) ацидиметрическое прямое или обратное титрование;

б) титрование в неводных средах: точку эквивалентности определяют, используя индикатор или проводят потенциометрическое титрование.

3. Физико-химические (инструментальные) методы:

а) УФ-спектроскопия. Гетероциклы, лежащие в основе строения отдельных групп алкалоидов, часто имеют характерные максимумы поглощения в УФ-свете. Так, производные пиридина имеют максимум при длине волны 260 нм, хинолина (изохинолина) — при 250, 290, 310 нм, индола — 260 (255) и 300 нм, пурина — 220, 260, 270 нм;

б) спектрофотометрический метод. Определение в видимой области (400—700 нм) основано на измерении абсорбции окрашенных комплексов алкалоидов с кислотными реагентами (пикриновой кислотой, тропеолином 00, метиловым оранжевым, бромфеноловым синим и т. п.);

в) ИК-спектроскопия;

г) полярографический метод;

д) хроматографические методы. Для разделения и последующего качественного и количественного определения индивидуальных алкалоидов могут быть использованы ТСХ, ВЭЖХ, ГХ с различными детектирующими системами [4].

Лабораторная работа №7

Определение кофеина в экстракте чая

Метод количественного определения кофеина основан на получении хлороформного экстракта из чая и на способности кофеина, содержащегося в экстракте, поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda=275$ нм). Сопутствующие компоненты (танины, пигменты и др.) не мешают определению кофеина [5].

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр; водяная баня; фильтровальная бумага; конические колбы на 100 мл; делительные воронки на 50 мл; пробирки с притертыми пробками; хлороформ; вата; кофеин.

Приготовление растворов: кофеин, стандартный раствор с концентрацией 1 мг/мл — 10 мг кофеина растворяют в 10 мл хлороформа.

Ход работы

1. *Экстракция кофеина.* Навеску образца чая 0,5 г заливают 50 мл нагретой до 100°C дистиллированной водой. Экстракцию осуществляют в течение 10 мин при постоянном перемешивании. Далее раствор быстро охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Для выделения кофеина полученный экстракт переносят в делительную воронку и добавляют хлороформ в соотношении 1 : 1 (например, берут 5 мл экстракта и 5 мл хлороформа). Время экстракции — 2 мин. После этого органическую фазу собирают в пробирку с притертой пробкой. Слив хлороформной фракции из делительной воронки осуществляют через небольшой кусок ваты, смоченной в хлороформе.

2. *Построение градуировочного графика.* В качестве стандарта используют раствор кофеина с концентрацией 1 мг/мл. Серию растворов с концентрацией 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 мкг/мл согласно таблице 7. Оптическую плотность полученных растворов измеряют на спектрофотометре при 275 нм.

Таблица 7

Данные для построения градуировочного графика

| Концентрация стандартного раствора кофеина, мкг/мл | Объем раствора кофеина (с концентрацией 1 мг/мл), мкл | Объем хлороформа, мкл | Оптическая плотность |
|--|---|-----------------------|----------------------|
| 10 | 100 | 9900 | |
| 25 | 250 | 9750 | |
| 50 | 500 | 9500 | |
| 75 | 750 | 9250 | |
| 100 | 1000 | 9000 | |

3. *Определение кофеина в экстракте чая.* Экстракт подготавливают так, как описано в пункте 1. Перед анализом полу-

ченный экстракт разбавляют в пять раз. Оптическую плотность полученного экстракта кофеина измеряют на спектрофотометре в УФ-области при 275 нм.

Расчет содержания кофеина производят по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot n}{m \cdot 1000 \cdot 10}$$

где C — содержание кофеина мг/г; C_x — концентрация кофеина, найденная по градуировочному графику, мкг/мл; V — общий объем экстракта чая, мл; n — коэффициент разбавления; m — масса навески, г; 1000 — коэффициент перевода мкг в мг.

Лабораторная работа №8

Определение суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин в траве чистотела

Определение суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин основано на изучении интенсивности поглощения продукта реакции алкалоидов с хромотроповой кислотой в кислой среде при 570 нм [6].

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр; водяная баня; роторный испаритель; фильтровальная бумага; конические колбы со шлифом на 500 мл; мерные колбы на 250,0 мл; мерные колбы на 25,0 мл; круглодонные колбы на 100 мл; делительные воронки на 250 мл; 12%-ная уксусная кислота; аммиак концентрированный; хлористый метилен; 96%-ный этиловый спирт; 9,8%-ный раствор серной кислоты; 1%-ный раствор натриевой соли хромотроповой кислоты в серной кислоте.

Приготовление растворов:

1. Серная кислота, 9,8%-ный водный раствор — в термостойкий стакан приливают 90 мл воды и по каплям, постоянно перемешивая, добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты.

2. Уксусная кислота, 12%-ный водный раствор — 25 мл ледяной уксусной кислоты смешивают с 180 мл дистиллированной воды.

3. Хромотроповой кислоты натриевая соль, 1%-ный раствор в концентрированной серной кислоте. 1,0 г хромотроповой

кислоты динатриевой соли растворяют в 100 мл концентрированной серной кислоты в ультразвуковой бане. Срок годности раствора не более 30 суток при хранении в сосудах из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте.

Ход работы

1. *Экстракция алкалоидов.* Около 0,75 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл 12%-ной уксусной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане 30 мин при периодическом перемешивании. После охлаждения содержимое колбы с помощью 12%-ной уксусной кислоты, разведенной количественно, переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора той же кислотой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл фильтрата.

В делительную воронку вместимостью 250 мл переносят 25,0 мл фильтрата, в которую затем последовательно добавляют 6 мл концентрированного раствора аммиака и 100 мл метиленхлорида и встряхивают в течение 30 мин. После расслоения нижний (органический) слой отделяют. 50 мл органического слоя помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и выпаривают на роторном испарителе в вакууме при температуре 40°C досуха.

Сухой остаток растворяют в 2—3 мл 96%-ного этилового спирта, слегка нагревая колбу в горячей воде. Переносят раствор в мерную колбу вместимостью 25 мл. Ополаскивают круглодонную колбу 2 раза по 10 мл 9,8%-ной серной кислоты и переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

2. *Определение алкалоидов.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл раствора А, прибавляют 5 мл 1%-ной натриевой соли хромотроповой кислоты в серной кислоте, закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Доводят объем раствора концентрированной серной кислотой до метки и перемешивают (раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий все те же реагенты кроме экстрак-

та алкалоидов. Оба раствора помещают на кипящую водяную баню на 20 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и при необходимости доводят до 25 мл концентрированной серной кислотой, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на хелидонин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{\%} \cdot m \cdot 25 \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A — оптическая плотность раствора Б; $A_{\text{см}}^{\%}$ — удельный показатель поглощения комплекса хелидонина с хромотроповой кислотой при длине волны 570 нм, равный 933; m — навеска сырья, г; W — влажность сырья, %.

Лабораторная работа №9

Определение суммарного содержания алкалоидов по реакции с бромкрезоловым зеленым

Способность отрицательно заряженных ионов кислотных красителей, например бромкрезолового зеленого, образовывать с ионами противоположного знака интенсивно окрашенные ионные ассоциаты, легко экстрагируемые органическими растворителями, позволяют использовать кислотные красители в качестве реагентов в экстракционно-фотометрическом анализе органических соединений основного характера, в том числе алкалоидов [7].

Оборудование, реактивы, материалы: спектрофотометр; водяная баня; обратный холодильник; роторный испаритель; фильтровальная бумага; круглодонные колбы со шлифом на 100 мл; делительные воронки на 25 мл; мерные колбы на 25,0 мл; мерные пробирки на 10,0 мл; фильтровальная бумага; индикаторная бумага; 90%-ный этиловый спирт; 2 н. соляная кислота; 0,1 н. гидроксид натрия; хлороформ; бромкрезоловый зеленый, фосфатный буфер (рН 4,7); стандартный раствор атропина (0,1 мг/мл).

Приготовление растворов:

1. Этиловый спирт, 90%-ный водный раствор — 900 мл 95%-ного этилового спирта смешивают с 50 мл дистиллированной воды.

2. Соляная кислота, 2 н. водный раствор.

3. Гидроксид натрия, 0,1 н. водный раствор.

4. Бромкрезоловый зеленый, $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л — 69,8 мг бромкрезолового зеленого смешивают с 3 мл 2 н. NaOH (80 г NaOH растворяют в 1 л дистиллированной воды) и 5 мл дистиллированной воды, нагревают и перемешивают до полного растворения. Доводят до общего объема раствора 1000 мл дистиллированной воды.

5. Фосфатный буфер, pH 4,7 — pH 2 М раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного (71,6 г Na_2HPO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды) доводят до 4,7 с использованием 0,2 М раствора лимонной кислоты (42,02 г лимонной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды).

6. Атропин, стандартный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл — 10 мг атропина растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Ход работы

1. *Экстракция алкалоидов.* Навеску измельченного растительного материала (1 г) переносят в круглодонную колбу и добавляют 50 мл 90%-ного этанола. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане с использованием обратного холодильника в течение 40 мин. Полученный экстракт фильтруют, фильтрат высушивают на роторном испарителе при температуре 45 °С. Остаток растворяют в 10 мл 2 н. раствора HCl и снова фильтруют. Фильтрат количественно переносят в делительную воронку и трижды промывают 10 мл хлороформа. Далее раствор нейтрализуют до pH=7 с использованием 0,1 н. NaOH, переносят в мерную колбу на 25,0 мл и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

2. *Построение градуировочного графика.* Аликвоты (0,4; 0,6; 0,8; 1,0 и 1,2 мл) стандартного раствора атропина (с концентрацией 0,1 мг/мл) переносят в делительную воронку на

25 мл. Добавляют к нему 5 мл фосфатного буферного раствора (рН 4,7) и 5 мл раствора бромкрезолового зеленого. Далее смесь перемешивают с 1, 2, 3 и 4 мл хлороформа. Все порции хлороформного экстракта собирают в мерную пробирку на 10,0 мл. Объем раствора доводят до 10,0 мл хлороформом. Поглощение комплекса в хлороформе измеряют при 470 нм против холостого опыта, приготовленного, как указано выше, но без атропина. Результаты измерений заносят в таблицу 8 и строят градуировочный график.

Таблица 8

Данные для построения градуировочного графика

| Объем стандартного раствора атропина, мл | Содержание атропина, мкг | Оптическая плотность |
|--|--------------------------|----------------------|
| 0,4 | 40 | |
| 0,6 | 60 | |
| 0,8 | 80 | |
| 1,0 | 100 | |
| 1,2 | 120 | |

3. *Определение суммарного содержания алкалоидов в растительных экстрактах.* Для проведения реакции алкалоидов растительных экстрактов с бромкрезоловым зеленым 1,0 мл извлечения (см. п. 1) переносят в делительную воронку на 25,0 мл, добавляют 5 мл фосфатного буферного раствора (рН 4,7) и 5 мл раствора бромкрезолового зеленого. Далее смесь перемешивают с 1, 2, 3 и 4 мл хлороформа. Все порции хлороформного экстракта собираются в мерную пробирку на 10,0 мл и доводят объем до метки хлороформом. Оптическое поглощение измеряют при 470 нм против холостого опыта, приготовленного, как указано выше, но без растительного экстракта.

Расчет суммарного содержания алкалоидов в растительном сырье производят по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot n}{m \cdot V_1 \cdot 1000}$$

где C — суммарное содержание алкалоидов, мг/г; C_x — содержание алкалоидов, найденное по градуировочному графику, мкг; V — общий объем экстракта, мл; n — коэффициент разбавления; m — масса навески, г; V_1 — объем экстракта, отобранный для проведения реакции с бромкрезоловым зеленым, мл; 1000 — коэффициент перевода мкг в мг.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение растительным алкалоидам. Какой биологической активностью обладают алкалоиды?
2. Охарактеризуйте основные классы алкалоидов, приведите примеры типичных представителей данных классов.
3. Какое лекарственное растительное сырье нормируется по содержанию алкалоидов согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (XIV издание)?
4. Перечислите методы экстракции алкалоидов из лекарственного растительного сырья. Какие растворители являются наиболее подходящими для экстракции алкалоидов?
5. Какие методы наиболее часто используются для исследования качественного и количественного состава алкалоидов в лекарственных растениях? Назовите основные преимущества и ограничения при использовании каждого из методов.

Список литературы

1. *Борисова Г. Г., Ермошин А. А., Малева М. Г., Чукина Н. В.* Основы биохимии вторичного обмена растений : учеб.-метод. пособие / под общ. ред. Г. Г. Борисовой ; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014.
2. *Зибарева Л. Н.* Алкалоиды — вторичные метаболиты растений : учеб. пособие. Томск : Изд-во Томского государственного университета, 2022.
3. *Гюкавкина Н. А., Зурабян С. Э., Белобородов В. Л. и др.* Органическая химия : учебник для вузов : в 2 кн. Кн. 2: Специальный курс / под ред. Н. А. Гюкавкиной. М. : Дрофа, 2008.
4. *Практикум по фармакогнозии* : учеб. пособие для студ. вузов / В. Н. Ковалев, Н. В. Попова, В. С. Кисличенко и др. ; под общ. ред. В. Н. Ковалева. Харьков : Изд-во НФаУ, 2003.

5. Артемьева В. В., Бочкарева И. И., Дьякова И. Н. Фитохимический анализ чая китайского (*Thea sinensis* L.) // Новые технологии. 2015. №4. С. 152—156.

6. ФС 2.5.0105.18 Чистотела большого трава *Chelidonii majoris herba* // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. М. : ФЭМБ, 2018. Т. 4. С. 6606—6613.

Учебное издание

Скрыпник Любовь Николаевна

**МЕТОДЫ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. Т. Иванова*

Компьютерная верстка *Е. В. Денисенко*

Подписано в печать 16.10.2023 г.

Дата выхода в свет 26.10.2023 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л. 3,6

Тираж 300 экз. (1-й завод 50 экз.). Заказ 101

Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта
236041, г. Калининград, ул. Невского, 14