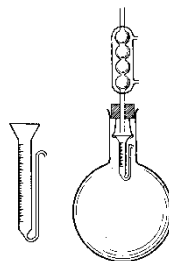


1. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

При всем структурном многообразии природных соединений наиболее распространены 2 способа их выделения из растительного сырья:

- Перегонка с водяным паром (сескви-, моно-, реже дитерпеноиды, летучие вещества).
- Экстракция разнополярными экстрагентами - наиболее универсальный метод. В зависимости от природы извлекаемых веществ, используют моно- или смеси растворителей без температурного воздействия или при нагревании с предварительным обезжириванием и гидролизом или одновременно, в одном процессе извлечения.

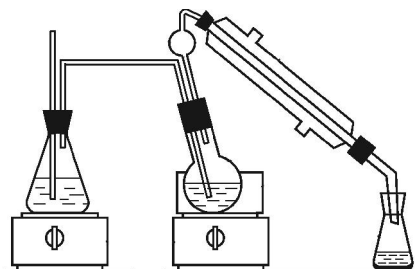
Эфирные масла выделяют, либо используя обычный прибор для перегонки с водяным паром, который изображен во всех лабораторных практикумах по органической химии, либо при низком содержании эфирных масел, используют градуированную насадку, которую укрепляют внутри прибора (между круглодонной колбой и обратным холодильником):



Метод ректификации используют для получения индивидуальных компонентов эфирных масел или для отделения доминирующей фракции. Щадящий режим экстракции осуществляют в аппаратах Сокслета, а обычный – в круглодонных колбах с обратным холодильником.



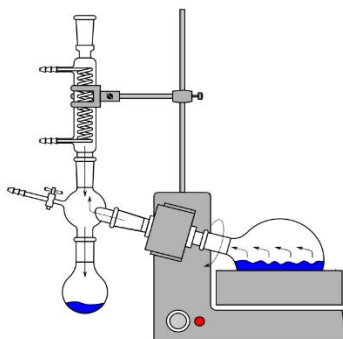
Аппарат Сокслета



Прибор для перегонки с водяным паром

На производствах используют автоматические экстракторы прерывного и непрерывного действия с пленочным или ротационным испарителем:

Реже используют метод осаждения из растворов, рекстракцию и метод «анфлераж», основанный на адсорбции (поглощении) летучих веществ, в том числе эфирных масел из цветков сорбентами (активированный уголь, твердые жиры, некоторые смолы, воск и др.). Процесс проводится в герметических рамах, собранных в батареи.



Методы анализа извлечений

Поскольку любое растение – это сложнейшая и разнообразная по составу система, нет метода универсального для выделения не только индивидуального вещества, но часто и компонентов одной группы. Спутниками могут быть родственные вещества других групп БАВ.

Современным методом контроля качественного состава и количественного содержания компонентов извлечения являются методы ВЭЖХ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Доступным является контроль состава любого извлечения методами БХ или ТСХ в присутствии стандартных образцов, либо использование качественных специфических реакций на основные функциональные группы.

Изучив состав извлечения, необходимо выбрать метод отделения целевого вещества от сопутствующих веществ, а затем или перекристаллизовать, или отделить микропримеси методом препаративной хроматорграфии на бумаге или в тонком слое сорбента (БХ, ТСХ), либо перегнать, если целевое вещество жидкость ($T_{\text{кип}}$, n_D , d , $[\alpha]_D$).

Для белков, углеводов, стероидов, amino- и разноосновных кислот используют метод электрофореза на бумаге.

О чистоте любого вещества и природе его функциональных групп судят по ИК-спектру соединения в области от 400 до 4000 см^{-1} (предпочтительно в таблетках КВг).

Также как качественные химические реакции, ИК-спектр подтверждает наличие всех функциональных групп и основных структурных особенностей, но оба метода не дают представлений о структуре соединения, без сопоставления со стандартными образцами веществ.

- Hal (F, Cl, Br, I) – 450-750 см^{-1}
- Природа R (алифатика, ароматика) – 700-1500 см^{-1} («область отпечатков пальцев»). 2700-2950 см^{-1} (алифатика).
- Различные простые эфирные C-O-C – связи (простые эфиры, чаще 1000-1100 см^{-1}), циклические формы углеводов (пиранозы, фуранозы), гетероциклические C-X-C – фрагменты – 700-1500 см^{-1} .
- Сопряженные системы (-C=C-C=C-) – 1550-1650 см^{-1} .
- Карбонилсодержащие соединения – 1600-1800 см^{-1} (хиноны, кетоны, альдегиды, кислоты, сложные эфиры).
- 2000-2200 см^{-1} – C≡C, C≡N, N≡N связи.
- 2500-2700 см^{-1} – все спиртовые OH-группы.
- 2750-2900(2950) см^{-1} – CH, CH₂, CH₃ – группы.
- 3000-3350 см^{-1} – OH-всех фенольных соединений, (3450) – кислотные OH-группы.
- Выше 3450 см^{-1} – амино-, амидные и др. азотсодержащие группы, циклические формы с участием атома азота.

Полная информация по физико-химическим методам отражена в многочисленных источниках, в том числе:

Литература

1. Р.А.Музычкина, Д.Ю.Корулькин. Основы химии природных соединений: Учебник.- Алматы, 2010.- 564с.
2. Р.А.Музычкина, Д.Ю.Корулькин. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах.- Алматы, 2004.- 286с.
3. Н.И.Гринкевич, Л.Н.Сафронич. Химический анализ лекарственных растений.- М.,1983.- 492с.
4. Л.А.Казицына, Н.Б.Куплетская. Применение УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии в органической химии.- М., 1971.- 264с.

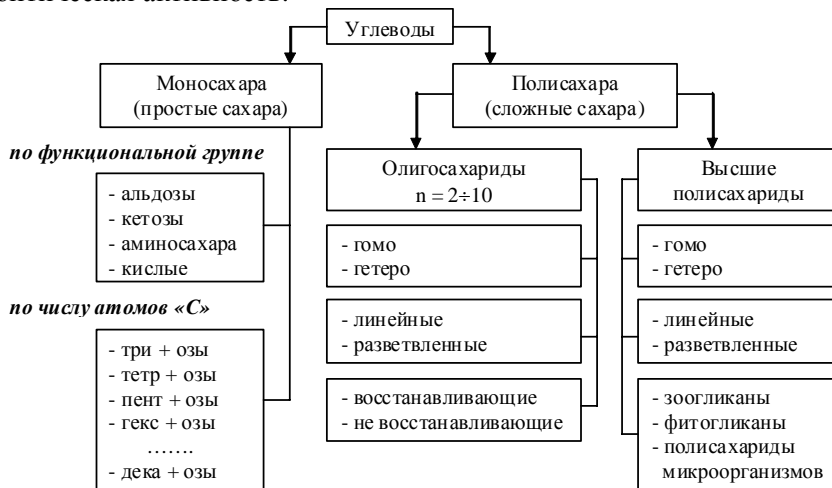
2. ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ПРЕВРАЩЕНИЯ

2.1. Углеводы и полисахара

Углеводы - вещества первичного синтеза. По химической природе это многоатомные альдегидо- или кетонспирты или многоатомные простые эфиры, т.е. все углеводы содержат альдегидную, либо кетонную группу, первичные и вторичные спиртовые группы или дополнительно простые эфирные связи между мономерными фрагментами (одинаковыми – гомо-, либо разными - гетерополисахара).

Исходя из этого, все они хорошо растворимы в воде (без нагревания или при нагревании) и в низкокипящих водно-спиртовых экстрагентах.

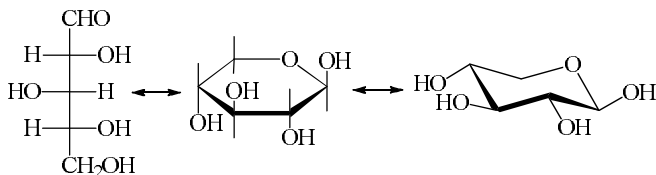
Содержатся углеводы во всех органах всех растений в разных количествах вместе с различными родственными соединениями в свободном или связанном состоянии. Многие структуры отличает оптическая активность.



* Наличие альдегидной группы подтверждают реакцией «серебряного зеркала», альдегидной либо кетонной – с ортолуидином и мочевиной. Атомность (число ОН-групп) доказывают по реакциям алкилирования или ацилирования.

Расположение OH-групп в пространстве, величину и конформацию углеродного скелета устанавливают комплексом ИК-, РСА- и масс-спектрометрией. При наличии стандартных образцов (СО) – по $[\alpha]_D$ и БХ или ТСХ по величинам R_f и цвету пятен от специфических проявителей.

D-ксилоза из кукурузных початков

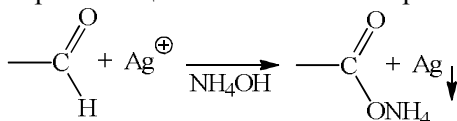


Образуется при гидролизе ксилана, содержащегося в значительных количествах в древесине, подсолнечной лузге, соломе, хлопковой шелухе и т.д.

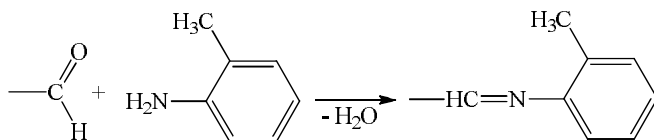
Выделение. Мелко измельченное сырье (кукурузные початки – 100 г) помещают в коническую колбу, заливают 100 мл 2% раствора аммиака, выдерживают в течение суток периодически перемешивая. Затем отжимают на фильтре, промывают горячей водой, переносят промытую массу в колбу, заливают 4% кислотой серной и нагревают 3 часа при температуре 80-85⁰С (не выше!). В этих условиях происходит гидролиз ксилана (пентозанов).

Гидролизат отфильтровывают, остаток отжимают, промывают на фильтре водой до нейтральной реакции. Фильтрат упаривают до густого состояния в вакууме при температуре не выше 50-55⁰С и перекристаллизовывают с активированным углем из спирта. Уголь отделяют, при охлаждении выпадают белые кристаллы. $T_{пл} = 144-145^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D +92^{\circ}\text{C}$.

Идентификация. 1. D-ксилоза - альдегидоспирт; альдегидную группу определяют реакцией «серебряного зеркала» при взаимодействии пробы вещества с аммиачным раствором AgNO_3 :



2. Добавляют раствор о-толуидина, появляется коричневое окрашивание:



3. БХ при наличии СО ксилозы по R_f, проявитель о-толуидин.

Модификация. 1. Небольшое количество (100 мг) ксилозы в круглодонной колбе с обратным холодильником нагревают в течение часа со 100 мл 70% уксусной (или 50 мл ледяной) кислоты. Смесь охлаждают до комнатной температуры и тонкой струей выливают на лед. Выпадают кристаллы ацетата, которые оставляют под слоем воды в течение 30-40 минут, отфильтровывают, высушивают. Определяют температуру плавления.

2. Небольшое количество (100 мг) ксилозы в конической колбе или в фарфоровом стакане окисляют 100 мл кислоты азотной (d=1,30-1,34), прибавляя небольшими порциями на холоду. После добавления всего объема кислоты, смесь нагревают на водяной бане (под тягой!) в течение 1 часа.

Охлаждают до комнатной температуры, добавляют избыток воды, упаривают. Если при этом выделяются пары окислов азота, снова добавляют воду и упаривают. Образуется продукт окисления ксилозы – триоксиглутаровая кислота, ее кристаллизуют из воды. T_{пл} 128⁰C.



3. Небольшое количество (100 мг) ксилозы в растворе воды (или спирта) помещают в коническую колбу и пропускают газообразный водород из газометра в течение 1 часа.

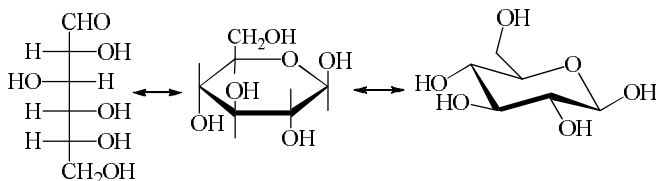
* При отсутствии водорода, в колбу Вюрца помещают железные опилки, олово или никель Ренея, соединяют с капельной воронкой. На отросток колбы Вюрца одевают газоотводную трубку, конец которой опускают в раствор ксилозы. Если используют Fe или Sn, то из делительной воронки прикапывают HCl кислоту, если Ni-Al, то 20% водный раствор NaOH.

При восстановлении ксилозы образуется ксилит (пятиатомный спирт).

Примечание. Вместо указанных выше реакций или в дополнение к ним, можно провести дегидратацию ксилозы

кислотой серной до фурфурола (специфический запах!) или получить озон (T_{пл} 160⁰C).

D-глюкоза из целлюлозы



Наиболее широко распространена во всех растениях в свободном или связанном состоянии, например, в крахмале, целлюлозе, олигосахарах и др.

Выделение. В коническую колбу, при охлаждении водой со льдом, наливают 50 мл концентрированной кислоты хлороводородной и добавляют небольшими порциями вату (до 10 г). После того, как вата намокнет, колбу закрывают пробкой и оставляют при комнатной температуре до полного растворения ваты. В зависимости от качества ваты смачиваемость и растворение может быть до суток. Раствор ваты охлаждают льдом, вынимают пробку, содержимое колбы разбавляют трехкратным количеством воды и упаривают в роторном испарителе или на водяной бане под вакуумом водоструйного насоса.

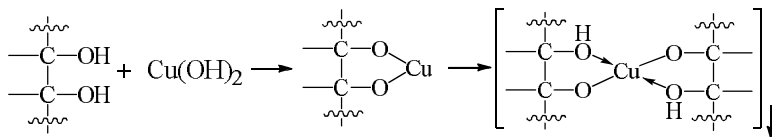
Остаток после отгонки разбавляют небольшим (30-50 мл) количеством воды и снова упаривают до полного удаления кислоты (проба с AgNO₃).

Полученный концентрат растворяют при перемешивании в небольшом количестве спирта и оставляют в холодильнике для кристаллизации.

Выпавшие кристаллы глюкозы повторно кристаллизуют из спирта. T_{пл} 146⁰C, [α]_D+52,3⁰.

Идентификация. 1. Глюкоза - альдоспирт, поэтому необходимо убедиться в функциональных группах: альдегидная – «серебряное зеркало» от действия раствора AgNO₃ или AgOH.

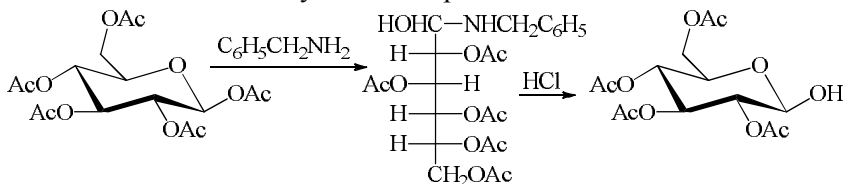
2. Рядовое расположение OH-групп проверяют по реакции с Cu(OH)₂ → осадок или раствор темно-голубого (синего) цвета:



3. БХ при наличии СО глюкозы.

Модификация. Получение 2,3,4,6-тетраацетата D-глюкозы:

Тетраацетат получают из пентаацетата при взаимодействии с бензиламином с последующим гидролизом HCl.



* Если указанного реагента нет, можно число OH-групп в молекуле глюкозы подтвердить получением пентаацетата.

Пентаацетат

Тетраацетат

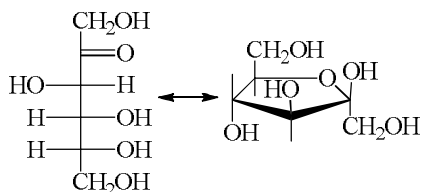
Глюкоза	5 г	Пентаацетат	5 г
Натрия ацетат	2 г	Бензиламин	5 г
Уксусная кислота	20 мл	Эфир	25 мл
Спирт	20-25 мл	Хлороформ	50 мл
		5н HCl	10 мл

β-пентаацетат-D-глюкозы. В круглодонную колбу помещают растертую смесь глюкозы и ацетата натрия, приливают уксусную кислоту и нагревают при встряхивании на водяной бане 30 минут. Если раствор прозрачный, нагревание продолжают еще 2 часа, затем тонкой струйкой выливают в 200 мл воды со льдом, оставляют на несколько часов. Выпавший осадок отсасывают и перекристаллизовывают из спирта.

Тетраацетат-D-глюкозы. В колбу с мешалкой помещают 5 г пентаацетата, 5г бензиламина и при охлаждении перемешивают 10-15 минут. Смесь становится однородной и выпадает осадок продукта взаимодействия. Добавляют 15-20 мл эфира, кристаллы отсасывают и промывают эфиром. Полученный осадок растворяют в 50 мл хлороформа и 10 мл 5н HCl, перемешивают. Хлороформный слой промывают водным раствором бикарбоната натрия и сушат CaCl₂. Выдерживают сутки в вакуумном

эксикаторе над осушителем, затем растирают с эфиром и получают кристаллический тетраацетат глюкозы. $T_{пл} 132^{\circ}C$.

Инулин и D-фруктоза из корней георгина или топинамбура



Выделение. Клубни (50 г.) измельчают, загружают в коническую колбу, заливают 40-50 мл кипящей воды и перемешивая, нагревают 30 минут. Содержимое колбы быстро отфильтровывают, осадок промывают горячей водой (5-10 мл); при охлаждении из фильтрата выпадает инулин, его отсасывают на фильтре и взвешивают.

Гидролиз инулина, проводят 5 мл 0,2% H_2SO_4 при нагревании в течение 1 часа на водяной бане, периодически перемешивая. К гидролизату добавляют порциями $BaCO_3$. Получившийся осадок отфильтровывают. Раствор упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане до сиропа и высушивают в вакуум-эксикаторе в течение суток, затем добавляют 10 мл абсолютного этанола, перемешивают, быстро фильтруют и ставят на кристаллизацию в холодильник. После кристаллизации из абсолютного спирта, $T_{пл} 100^{\circ}C$.

Идентификация. 1. Фруктоза-кетоспирт. Для доказательства кето-группы проводят реакцию с раствором мочевины → коричневое окрашивание или осадок.

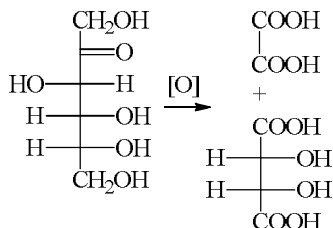
2. Реакция «серебряного зеркала» должна дать отрицательный результат.

3. К 5 мл 10% раствора фруктозы добавляют раствор 1 г фенолгидразина в 6 мл разбавленной 1:5 уксусной кислоты. Смесь нагревают на водяной бане 30 минут. При охлаждении выпадает осадок озазона фруктозы с $T_{пл} 208^{\circ}C$.

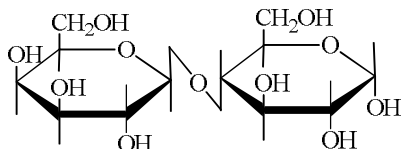
4. Фруктоза дает реакцию с $Cu(OH)_2$ (раствор или осадок синего цвета)

Модификация. 1 г фруктозы растворяют в 15 мл уксусной кислоты, добавляют 1 г прокаленного ацетата натрия и нагревают 1 час на кипящей водяной бане. К полученному раствору добавляют 5 г BaCO_3 или нейтрализуют раствором NaOH до слабо щелочной реакции и оставляют на 2-3 часа. Раствор фильтруют и оставляют на кристаллизацию пентаацетата фруктозы.

* При окислении раствора фруктозы 10% раствором KMnO_4 образуется смесь щавелевой и винной кислот.



D-лактоза из молока



Выделение. К молоку (0,5 л) добавляют 20 мл уксусной кислоты, перемешивают в течение 1 часа. Отделившуюся молочную сыворотку кипятят в фарфоровой чашке; при этом коагулирует сывороточный альбумин. Его отделяют через полотно, а раствор снова выпаривают до объема 10-15 мл.

При стоянии или при охлаждении начинает выделяться лактоза, ее отсасывают на воронке Бюхнера и сушат.

Чтобы получить чистую лактозу, продукт растворяют в спирте. Появляется муть, а через несколько часов выпадают кристаллы лактозы; их отделяют, сушат. $[\alpha]_{\text{D}}^{+55^{\circ}}$.

Идентификация. 1. Раствор лактозы в спирте восстанавливает раствор Фелинга.

2. При кислотном гидролизе образуется глюкоза и галактоза, которые дают реакцию «серебряного зеркала» и коричневый осадок с орто-толуидином.

3. БХ при наличии СО лактозы. Проявитель о-толуидин или α-нафтол.

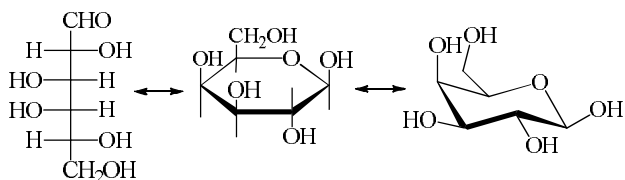
Модификация. 0,5 г ацетата натрия растворяют в 2-3 мл воды и добавляют 0,5 г фенилгидразина солянокислого.

Смесь нагревают до растворения, охлаждают, фильтруют. К фильтрату добавляют водный раствор лактозы, нагревают 30 минут на кипящей водяной бане, охлаждают и отфильтровывают желтый осадок озона, промывают на фильтре водой и кристаллизуют из водного спирта. $T_{пл} 200^{\circ}\text{C}$.

* Из лактозы можно получить глюкозу и галактозу после кислотного гидролиза (конц. H_2SO_4 , t°).

Лактозозон. Раствор, содержащий 0,5 г кристаллического ацетата натрия в 2-3 мл воды, приливают к 0,5 г хлористоводородного фенилгидразина. Смесь нагревают до полного растворения веществ, охлаждают и фильтруют. Фильтрат смешивают с раствором, содержащим 0,2 г лактозы в 1 мл воды. После нагревания в течение 30 мин на водяной бане и охлаждения лактозозон (плотные пучки из тонких желтых игл) отфильтровывают, промывают холодной водой и перекристаллизовывают из воды и спирта. Температура плавления лактозозона 200°C .

D-галактоза из лактозы



D-Галактозу получают гидролитическим расщеплением молочного сахара. Галактоза, как структурная часть, входит также в состав трисахарида рафинозы, выделяемой из свекловичной патоки и из таких сложных продуктов, как пектин, слизи, камеди, галактаны и некоторые сапонины. Галактоза, восстанавливаясь

амальгамой натрия, образует спирт дульцит, а окисляясь, дает одноосновную галактоновую кислоту и затем двухосновную - слизевую.

Выделение. Лактозу (20 г) растворяют в 50 мл воды, приливают 1 мл концентрированной серной кислоты и кипятят 2 ч в круглодонной колбе емкостью 100 мл, снабженной обратным холодильником. К горячему (но не кипящему) раствору осторожно добавляют около 1 г активированного угля, перемешивают и нейтрализуют горячим насыщенным раствором едкого бария. Нейтрализацию контролируют бумажкой конго.

Осадок отфильтровывают, к фильтрату добавляют около 1 мл ледяной уксусной кислоты и упаривают под вакуумом на водяной бане при температуре не выше 45⁰С. К теплому сиропу приливают 20 мл ледяной уксусной кислоты, раствор охлаждают льдом и вносят в него в качестве затравки кристаллик галактозы. Вместо затравки кристаллизацию можно вызвать трением стеклянной палочки о стенки сосуда. Через сутки выделившиеся кристаллы галактозы отфильтровывают, промывают несколькими миллилитрами холодного этилового спирта и потом небольшим количеством эфира.

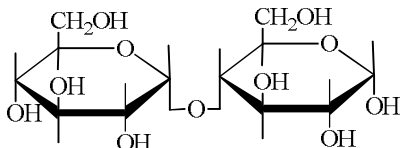
Температура плавления безводной галактозы 164-166⁰С, моногидрата 112-118⁰С; степень чистоты D-галактозы определяют по ее удельному вращению; $[\alpha]_D^{20} +81,7^0$. Температура плавления фенилозаона 196⁰С.

Идентификация. 1. С 1% раствором флороглюцина в соляной кислоте галактоза дает красное окрашивание.

2. Азотная кислота окисляет галактозу, превращая ее в не растворимую в воде слизевую кислоту.

В фарфоровой чашечке смешивают 2 г галактозы с 8-10 мл азотной кислоты (плотность 1,15) и выпаривают на водяной бане до сиропа. Нагревают до полного удаления окислов азота, добавляют 5-10 мл воды и оставляют стоять. Осадок отделяют, промывают теплой водой, растворяют в 10% растворе едкого натра, фильтруют и осаждают слизевую кислоту небольшим избытком разбавленной соляной кислоты. Мелкокристаллический осадок отфильтровывают, промывают и сушат. T_{пл.} 213-214⁰С.

Мальтоза из крахмала



Мальтоза – диглюкозид (солодовый сахар) получают по реакции гидролиза крахмала.

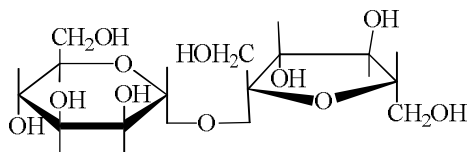
Выделение. Готовят суспензию из 5 г крахмала в 5 мл холодной воды, тоненькой струйкой при перемешивании вливают в 50-70 мл кипящей воды и нагревают в течение 1 часа на кипящей водяной бане до образования крахмального клейстера, добавляют 20 мл 10% H_2SO_4 , охлаждают до $50-55^{\circ}$; выдерживают при этой температуре 2-3 часа до отрицательной пробы с раствором йода. Раствор фильтруют и упаривают до 15-20 мл, затем добавляют 15 мл 95% спирта, перемешивают и оставляют на ночь в делительной воронке. На дне воронки образуется вязкая жидкость декстринов, ее отделяют, а спиртовый раствор упаривают до сиропа. Снова добавляют 10-15 мл спирта и кипятят 30 минут, добавляют активированный уголь, кипятят еще 30 минут, фильтруют и оставляют на кристаллизацию. $T_{пл}$ моногидрата $102-103^{\circ}C$, безводной мальтозы $160-165^{\circ}C$, $[\alpha]_D+138,3^{\circ}$.

Идентификация. 1. Мальтоза восстанавливает раствор Фелинга.

2. БХ при наличии СО мальтозы. Проявители о-толуидин, раствор Фелинга или α -нафтол.

Модификация. Получение озона. К 0,1 г мальтозы добавляют 0,2 г фенилгидразина хлористоводородного: 0,3 г NaAc и 3 мл воды. Смесь нагревают 15-20 минут на кипящей водяной бане, охлаждают, выпадает желтый осадок. Его отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из водного спирта (30-50%). $T_{пл}$ $206^{\circ}C$.

Сахароза из сахарной свеклы



Сахароза – невосстанавливающий дисахарид или α -D-глюкопиранозидо- β -D-фруктофуранозид.

Выделение. Вымытую свеклу (100 г) измельчают на терке, затем растирают в фарфоровой чашке до пасты, добавляют известкового молока (5 г) и оставляют при перемешивании на 2-3 часа. Затем массу отжимают через полотно или 3 слоя марли, переносят в колбу, добавляют 30-40 мл воды, встряхивают, отжимают. Через объединенный раствор пропускают CO₂ в течение 30-40 минут. Выпавший CaCO₃ отсасывают на воронке Бюхнера. Чуть желтоватый раствор обесцвечивают активированным углем, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме и охлаждают, выпадают кристаллы сахарозы, их отфильтровывают и кристаллизуют из небольшого объема воды. T_{пл} 160⁰C; 186⁰C (с разложением), $[\alpha]_D^{20} +66,5^0$.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO сахарозы, проявитель – раствор Фелинга.

2. ИК-спектр в таблетке KBr (1000-1100 см⁻¹ - C-O-C – связь, пиранозный и фуранозный циклы, α - и β -конфигурации).

Модификация. Получение октаметилсахарозы: В колбу с обратным холодильником помещают 1 г сахарозы, 2 г Ba(OH)₂, 0,5 г BaO и 10 мл диметилсульфата. Нагревают при температуре 70-80⁰C с перемешиванием в течение 1 часа.

Затем добавляют 5 мл метила йодистого в 10 мл хлороформа и продолжают нагревание и перемешивание еще 1 час.

Охлаждают смесь, добавляют 15-20 мл воды, перемешивают, фильтруют. Осадок на фильтре промывают водой, объединенный фильтрат упаривают досуха на роторном испарителе и метилированный сахар извлекают хлороформом.

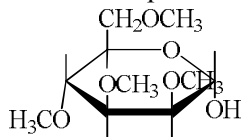
Хлороформный раствор наносят на пластинку силикагеля и хроматографируют в системе бензол-этанол 8:2. Проявителем

служит конц. H_2SO_4 . На хроматограмме должно быть одно пятно. Если пятен несколько – процесс метилирования продолжают йодистым метилом еще 1 час.

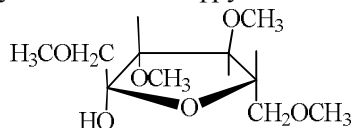
Хлороформ испаряют, сухой остаток взвешивают. Часть осадка используют на гидролиз.

* Метилат сахарозы в хлороформе используют для гидролиза и метанолиза. Хлороформ упаривают досуха, добавляют к остатку 10-15 мл этанола и 1-2 мл конц. HCl , нагревают в колбе с обратным холодильником в течение 3 часов. Затем раствор упаривают до половины объема, приливают 15-20 мл воды и нагревают до кипения.

Гидролиз октаметилсахарозы расщепляет молекулу на составные метилированные молекулы глюкозы и фруктозы:

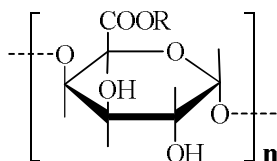


2,3,4,6-тетраметилглюкоза



1,3,4,6-тетраметилфруктоза

Пектин из плодов цитрусовых



Пектин входит в состав клеточных стенок, особенно фруктов и ягод. При нагревании с кислотой и сахаром образует студнеобразную массу (желе).

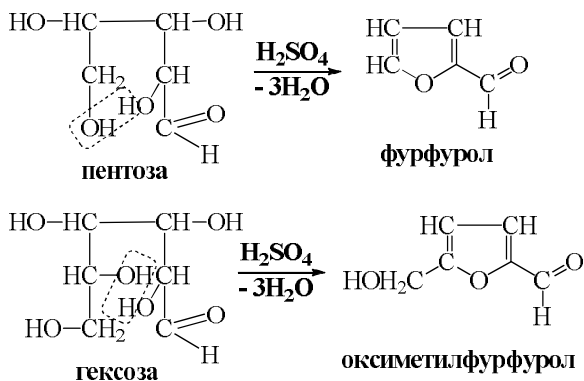
Выделение. Корочки лимона, апельсина или мандарина (50 г) измельчают, помещают в мешочке из ткани или марли в стакане, заливают 100 мл спирта для удаления эфирных масел, пигментов и других примесей. стакан закрывают часовым стеклом и ставят на кипящую водяную баню на 1 час. Сырье отжимают на воронке Бюхнера и снова заливают спиртом до слабо желтого цвета.

Отмытую массу помещают в колбу, приливают 100 мл 0,03 н HCl и нагревают на кипящей водяной бане 1 час. Горячую вытяжку фильтруют, массу промывают на фильтре горячей водой. Фильтрат охлаждают, нейтрализуют аммиаком до слабокислой реакции (индикатор) и упаривают в вакууме наполовину объема, добавляют спирт. Выпавший пектин центрифугируют, высушивают на воздухе или в термостате при температуре не выше 45°C.

Идентификация. 1. Небольшое количество пектина растворяют в 3-4 мл воды, добавляют несколько капель 10% основного ацетата свинца и нагревают на кипящей водяной бане. Если белый осадок окрашивается в оранжевый с красноватым оттенком цвет → галактуроновая кислота (*проба Эрлиха*).

2. $T_{пл}$ 156-158°C, $[\alpha]_D^{+55,3}$.

Фурфурол и оксиметилфурфурол из кукурузных початков



Выделение. В колбу Вюрца с холодильником и капельной воронкой помещают 25 г мелко измельченной лузги или початков, приливают 30 мл HCl и 50 мл воды. Колбу нагревают на песчаной бане и медленно отгоняют жидкость.

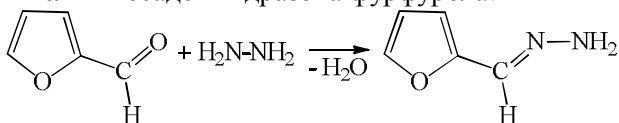
По мере уменьшения жидкости в колбе, из капельной воронки добавляют 15 мл HCl и 50 мл воды. Перегонку прекращают, когда объем отгона составит примерно 100-115 мл. Отгон нейтрализуют содой при перемешивании (индикатор), добавляют NaCl (10 г) и

отгоняют из колбы Вюрца 1/3 объема. В первых фракциях отгоняется эмульсия фурфурола.

К остатку в колбе добавляют 5г NaCl и экстрагируют эфиром. Эфирное извлечение добавляют к эмульсии фурфурола, сушат Na_2SO_4 , эфир отгоняют на водяной бане, а затем перегоняют с воздушным холодильником, собирая фракцию 160-162 $^{\circ}\text{C}$.

Идентификация. 1. Реакция «серебряного зеркала».

2. К пробе фурфурола добавляют этиленгликоль или диэтиленгликоль (2 мл) и постепенно при встряхивании и охлаждении водой прибавляют 1-1,5 мл 85% гидразин-гидрата. Выпадает желтый осадок гидразона фурфурола:



Количественный анализ углеводов в сырье и препаратах

Метод 1. Содержание восстанавливающих сахаров (X) в препарате, в пересчете на глюкозу и сухое вещество, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 460 нм;

D_0 - оптическая плотность глюкозы при длине волны 460 нм;

m - масса навески СО глюкозы, в граммах;

m_0 - масса навески препарата, в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Метод 2. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл кислоты хлороводородной разведенной и 20 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, охлаждают, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

20 мл раствора Бенедикта помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 мл воды очищенной,

нагревают до кипения при перемешивании. Титруют испытуемым раствором до желтовато-зеленого цвета.

Содержание углеводов (X), в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{F \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V}$$

где F – фактор D-глюкозы;

m – масса навески сырья, в граммах;

V – объем испытуемого раствора, израсходованный на титрование, в миллилитрах.

Примечания. *Приготовление раствора Бенедикта:* 100 г натрия карбоната растворяют в 600 мл воды очищенной, нагревая на водяной бане, прибавляют 200 г натрия-калия тартрата и 125 г калия роданида. Полученный раствор фильтруют (раствор 1). 18,0 г меди сульфата растворяют в 100 мл воды очищенной, нагревая на водяной бане, фильтруют (раствор 2). Смешивают раствор 1 и раствор 2 в мерной колбе вместимостью 1 л, прибавляют 5 мл 5% раствора натрия ферроцианида, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. Приготовленный раствор оставляют на ночь.

Стандартизация раствора Бенедикта. 1,2 г D-глюкозы (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 20 мл кислоты хлороводородной разведенной, прибавляют 50 мл воды очищенной, нагревают до кипения на водяной бане и выдерживают еще в течение 30 мин. Охлаждают, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 20 мл раствора Бенедикта помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 мл воды очищенной, нагревают до кипения при перемешивании. Титруют раствором D-глюкозы в течение 2 мин до точки эквивалентности, при которой раствор должен быть бесцветным.

$$\text{Коэффициент D-глюкозы} = \frac{m \cdot 4 \cdot 4.75 \cdot V}{5.01 \cdot 1000}$$

где m – масса навески D-глюкозы, в граммах;

V - объем раствора D-глюкозы, израсходованный на титрование в миллилитрах.

Приготовление кислоты хлороводородной разведенной. 20 мл кислоты хлороводородной концентрированной разбавляют водой очищенной до объема 100 мл.

Метод 3. Содержание фруктозанов: 5 мл водного извлечения помещают в пробирку для центрифугирования, прибавляют 25 мл спирта этилового 96%, перемешивают, нагревают на водяной бане при температуре 30⁰С в течение 5 мин, оставляют на 1 ч, затем центрифугируют со скоростью вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок количественно переносят на тот же фильтр и последовательно промывают 15 мл спирта этилового 96%, 10 мл ацетона и 10 мл этилацетата. Осадок на фильтре растворяют в 10 мл горячей воды очищенной при перемешивании, раствор фильтруют под вакуумом. Фильтр промывают еще два раза горячей водой очищенной порциями по 10 мл, фильтруют в тех же условиях, фильтраты объединяют. Раствор охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят при помощи 10 мл воды очищенной в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 0.1% раствора резорцина спиртового, доводят объем раствора кислотой хлороводородной концентрированной до метки, перемешивают. Полученный раствор помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, нагревают на водяной бане при температуре 80⁰С в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 485 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл воды очищенной, 5 мл 0.1% раствора резорцина спиртового, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл, доведенный кислотой хлороводородной до метки и обработанный аналогично испытуемому раствору, начиная со слов "Полученный раствор помещают в пробирку для центрифугирования...".

Содержание суммы фруктозанов (X), в пересчете на фруктозу, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{475 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 100}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 485 нм;

475 - удельный показатель поглощения продукта реакции взаимодействия фруктозы с резорцином в кислой среде при длине волны 485 нм.

БХ пробы гидролизата, проявитель анилинфталат при 100⁰С в сушильном шкафу. Галактуроновая кислота – темно-розовое пятно (если гидролиз не прошел – пятно другого цвета и низкие значения R_f).

Извлечение суммы углеводов из сырья

Навеску измельченного сырья (100 г) настаивать в течение суток с 50% этанолом. Экстракт слить, сырье повторно настаивать со спиртом до тех пор, пока новая порция экстракта не будет давать реакции с α-нафтолом на углеводы. Объединенные экстракты сконцентрировать под вакуумом при температуре водяной бани не выше 40⁰С до объема 40-50 мл (объем измерить).

1. *Реакция Молиша* на углеводы: к исследуемой пробе в пробирке добавить 1-2 капли 10% раствора α-нафтола, а затем по стенке пробирки осторожно прилить пипеткой конц. серную кислоту. Появление фиолетового кольца на границе раздела двух слоев указывает на присутствие углевода или вещества, содержащего углеводов).

2. o-Толуидиновый проявитель: в 10 мл 96% этанола растворяются 0,4 г салициловой кислоты и 0,5 мл свежеперегнанного o-толуидина. Равномерно увлажненная хроматограмма высушивается на воздухе, нагревается 5 мин. при 105⁰С. Альдопентозы проявляются в виде вишнево-фиолетовых, альдогексозы - зеленых, а некоторые кетозы - слабых желто-коричневых пятен.

3. *Мочевина*. 9 мл 96% этанола, 1 мл 1 н. водного раствора HCl, 0,1 г мочевины. Реактив хорошо сохраняется. Кетозы проявляются в виде серо-голубых пятен после высушивания при 105⁰С в течение 5 минут.

4. Резорциновый проявитель. Смешивается 1% спиртовый раствор резорцина с 0.2н спиртовым раствором HCl в отношении 1:1. Равномерно увлажненная, высушенная на воздухе хроматограмма нагревается 10 мин. при 80⁰C. Кетозы образуют вишневые пятна на розовом фоне, ксилоза и арабиноза - синие, глюкоза и галактоза - серые, рамноза - желтое.

Хроматография углеводов в тонком слое

Для хроматографического разделения углеводов в тонком слое используются следующие носители и системы растворителей:

1. Окись алюминия; этилацетат-пропанол-вода (10:2:1) или (10:5:3)

2. Целлюлоза; ацетон-бутанол-вода (7:2:1) либо пропанол-этилацетат-вода (15:2:3)

3. Силикагель; этанол-аммиак-вода (16:1:3) либо этанол-вода (95:5)

4. Гипс; хлороформ-метанол (19:2) для моно- и (19:5) для дисахаридов

5. Полиамид; этилформиат-метанол (8:1)

Проявители используются те же, что и при хроматографии на бумаге.

Примерные величины R_f углеводов при ТСХ на полиамиде в системе этилформиат-метанол (8:1):

мальтоза	0,15	галактоза	0,37	арабиноза	0,59
сахароза	0,23	манноза	0,38	ксилоза	0,61
глюкоза	0,39	фруктоза	0,52	рибоза	0,79

Общие приемы выделения олиго- и полисахаридов из растительного сырья

Методы выделения поли- и олигосахаров, прежде всего, зависят от таких свойств, как растворимость и лабильность к различным реагентам.

В подавляющем большинстве случаев различные полисахариды извлекают водой при комнатной или повышенной температуре, причем повышение температуры приводит к увеличению растворимости большинства полисахаридов.

Различная растворимость полисахаридов в воде иногда позволяет провести их фракционное извлечение. Так, при

извлечении крахмала теплой водой в раствор переходит амилоза; сильно разбухающий и более высокомолекулярный амилопектин переходит в раствор лишь в очень малой степени. Для кислых полисахаридов, например сульфатированных, извлечение целесообразно вести разбавленными минеральными кислотами, которые вытесняют их из соответствующих солей.

Крепкими горячими растворами щелочей иногда пользуются для извлечения полисахаридов с одновременной подготовкой к освобождению от белков, переходящих в щелочные альбуминаты и продукты щелочного расщепления, не осаждающиеся спиртом. Недостатком метода является частичная деполимеризация полисахаридов. Иногда для извлечения полисахаридов пользуются другими растворителями например, DMSO.

Затем извлеченные полисахариды осаждают. При этом полисахариды не только осаждаются, но и очищаются от низкомолекулярных примесей, в частности минеральных солей, моносахаридов и низших олигосахаридов. В качестве осадителя чаще всего пользуются этиловым спиртом. При концентрации спирта порядка 80% и выше большинство полисахаридов выпадает в осадок, а низкомолекулярные примеси остаются в растворе. Постепенно прибавляя спирт и выделяя осадки, выпадающие при повышающихся концентрациях спирта, удастся провести фракционное осаждение полисахаридов.

В некоторых случаях осаждение полисахаридов проводится солями. При осаждении нейтральных полисахаридов используется понижение их растворимости в присутствии нейтральных солей (например, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). При осаждении кислых полисахаридов, как, например, альгиновой или пектовой кислот, используется образование плохо растворимых в воде бариевых или кальциевых солей этих полисахаридов. Этот метод позволяет разделить кислые и нейтральные полисахариды.

Соли четвертичных аммониевых оснований с длинноцепочечным радикалом, успешно используются для разделения и фракционирования кислых и нейтральных полисахаридов. Катионы этих солей, как, например, бромид цетилтриметил-аммония и хлорид цетилпиридиния, образуют соли с анионными группировками (сульфатными и карбоксильными) кислых полисахаридов, а длинноцепочечный радикал катионов,

вследствие своей гидрофобности, способствует выпадению осадков.

Полисахариды образуют медные комплексы при осаждении раствором Фелинга (свежеприготовленный $\text{Cu}(\text{OH})_2$ в среде тартрата натрия). При наличии в моносахаридных остатках полисахарида двух цис-оксигрупп ион " Cu^{2+} " замещает атомы водорода этих гидроксигрупп, образуя не растворимое в воде соединение. Способ очень удобен для выделения маннанов и глюкоманнанов, обладающих цис-оксигруппами у С-2 и С-3 маннозных остатков. Последующее разложение медных комплексов полисахаридов проводят уксусной кислотой, после чего полисахариды осаждают спиртом. Необходимо, однако, подчеркнуть, что применение реактива Фелинга, содержащего крепкую щелочь, и уксусной кислоты в процессе регенерации полисахарида может привести к частичной деградаци и деполимеризации исходного полисахарида, например, щелочная обработка способствует гидролизу сложноэфирной связи непрочных ацетильных групп.

Примесь белков удаляется при помощи трихлоруксусной кислоты. Для этого полисахарид растворяют в 5-10% трихлоруксусной кислоте, отделяют белковый коагулят центрифугированием, а затем полисахарид осаждают из раствора спиртом. Метод хорош для освобождения от белков, но не безразличен для полисахаридов, вызывая их некоторую деполимеризацию. Более щадящим является метод Севага: при обработке раствора полисахарида хлороформом с амиловым спиртом белок отделяется на поверхности раздела хлороформ-водный раствор.

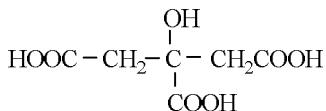
2.2. Органические кислоты и их производные

Органические кислоты относят к веществам первичного и вторичного синтеза. Многообразие их связано со структурой радикалов (алифатические, ароматические) числом COOH -групп (основность), наличием других функциональных групп (окси-, альдегидо-, кетон-, amino-, жировые, лишайниковые, сахарные, фенолокислоты и др.). Все кислоты, кроме аминокислот, имеют кислые рН, растворимы в воде и низкопроцентных спиртовых растворах. Общим методом их идентификации является метод БХ

в сравнении со СО и ИК-спектр в таблетке КВг (все функциональные группы, природа радикала, С=О (1730 и > см⁻¹, ОН > 3400 см⁻¹)).

В виду большого разнообразия карбоновых кислот, нет единого метода выделения их из растительного сырья.

Лимонная кислота из корочек лимона



Выделение. 10 г тонкоизмельченных корочек лимона в круглодонной колбе нагревают на кипящей водяной бане со 100 мл воды в течение 2 часов; охлаждают, сырье отжимают, водное извлечение концентрируют и кристаллизуют из спирта активированным углем.

Идентификация. 1. БХ при наличии СО.

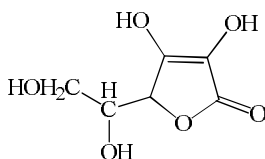
2. ИК-спектр (таблетка КВг) 2 полосы С=О (1730-1740 см⁻¹) интенсивностью 2:1. Полосы ОН-спиртовая (2500-2600 см⁻¹) и кислотные (>3400 см⁻¹).

3. 10 мл раствора лимонной кислоты титруют 0,1М раствором натрия гидроксида в присутствии фенолфталеина (1% спиртовый раствор) до бледно-розового окрашивания. Определяют основность.

4. В пробирку с газоотводной трубкой помещают 1 г лимонной кислоты, приливают 2 мл конц. Н₂SO₄, нагревают пламенем горелки, летучие продукты загораются голубым пламенем. Не прекращая нагревания, газоотводную трубку погружают в пробирку с известковой или баритовой водой, образуется муть и осадок, затем погружают в пробирку с раствором йода с добавлением нескольких капель раствора щелочи, образуется специфический запах йодоформа и желтое окрашивание или осадок.

* Модификация возможна по двум функциональным группам – спиртовой и карбоксильной.

Кислота аскорбиновая из плодов винограда



Циклический сложный эфир (лактон) четырехатомный, один асимметрический атом углерода, 2 оптических изомера + рацемат.

Выделение. Сухие плоды винограда – 10 г или свежие – 50 г измельчают в стакане, добавляют 80-100 мл воды, накрывают часовым стеклом и нагревают на кипящей водяной бане 2 часа. Охлаждают, сырье отжимают на воронке, извлечение упаривают в фарфоровой чашке досуха и кристаллизуют из спирта с активированным углем.

Идентификация. 1. Угол вращения (из спирта или из плодов).

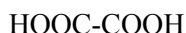
2. ИК-спектр: $-\text{COO}^-$, $\text{C}=\text{C}$, первичная, вторичная и третичная OH - группы.

3. БХ при наличии CO , проявитель 2,6-дихлорфенолиндофенолят.

Содержание кислоты аскорбиновой в сырье. 10 г измельченных плодов заливают 100 мл воды и настаивают с перемешиванием 1 час, затем нагревают на водяной бане 30 минут, фильтруют. В коническую колбу вливают 1 мл 2% раствора кислоты хлороводородной, 1 мл испытуемого раствора, 13 мл воды очищенной и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята (1 мл соответствует 0,000088 г аскорбиновой кислоты).

* Вместо 2,6-дихлорфенолиндофенолята можно использовать 0,5 мл раствора калия йодида 1%, 2 мл крахмала 0,5% и титровать 0,1М раствором калия йодата до появления светло-синего окрашивания. 1 мл раствора 0,1М калия йодата соответствует 0,008806 г кислоты аскорбиновой.

Щавелевая кислота из опилок



Выделение. Древесные опилки (50 г) помещают в стакан, приливают 300 мл 50% раствора NaOH, перемешивают и нагревают на плитке при 200-220⁰С 2 часа. Полученную зеленоватую массу охлаждают, разбавляют водой, фильтруют. Фильтрат упаривают на водяной бане досуха (щавелевокислый натрий).

Полученный осадок разлагают в стакане 20% H₂SO₄, фильтруют, раствор упаривают на водяной бане до начала кристаллизации и оставляют на холоду. T_{пл} 98⁰С.

Идентификация. 1. Сухую щавелевую кислоту нагревают в колбе с газоотводной трубкой конец опускают в раствор, баритовой или известковой воды, выделяется CO₂ и выпадает белый осадок BaCO₃ или CaCO₃.

2. Титрование 1М раствором NaOH (основность и количественный анализ).

DL-яблочная кислота из яблок



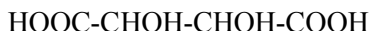
Двухосновная оксикислота. Один асимметрический атом углерода; 2 оптических изомера и рацемат.

Выделение. 100 г тонкоизмельченных яблок (предпочтительно незрелых или кислых сортов) заливают 100-150 мл воды и нагревают с перемешиванием на кипящей водяной бане 2-3 часа. Охлаждают, фильтруют, отжимая на фильтре жом. Жом заливают спиртом, нагревают 30 минут и отфильтровывают в первый фильтрат. Объединенный водно-спиртовый фильтрат упаривают в фарфоровой чашке до начала кристаллизации и оставляют на ночь. Кристаллы отделяют, при необходимости, кристаллизуют с активированным углем. T_{пл} 127-129⁰С, [α]_D водного раствора.

Идентификация. 1. БХ при наличии с СО.

2. ИК-спектр (KBr) 2 СООН (1730-1740; 3400 см⁻¹), один спиртовый ОН (2610-2650 см⁻¹), алифатика (2700-2850 см⁻¹).

D-винная кислота из винограда



Двухосновная двухатомная кислота, 2 асимметрических атома углерода, 4 изомера и рацемат.

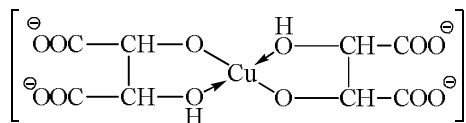
Выделение. 500 г ягод винограда (преимущественно кислых сортов) измельчают, отжимают сок. Жом переносят в стакан, заливают 200 мл воды, добавляют 1 г Na_2CO_3 . Нагревают 30 минут на кипящей водяной бане постоянно перемешивая. Теплый раствор фильтруют и добавляют к соку, проверяют pH (при необходимости нейтрализуют).

Нейтральный раствор упаривают до сиропа и кристаллизуют из спирта или из воды с активированным углем. $T_{\text{пл}} 170-172^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{+12}$ (20% водный раствор).

*Из маточного раствора, после отделения кристаллов винной кислоты, получают сегнетову соль. Для этого в фарфоровой чашке маточник упаривают досуха, затем добавляют 5 мл горячей воды и нейтрализуют K_2CO_3 и 1:1 NaOH , фильтруют, охлаждают и оставляют на кристаллизацию.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO .

2. При взаимодействии с $\text{Cu}(\text{OH})_2$ образуется темно-синее окрашивание:



4. $[\alpha]_D$ водного раствора

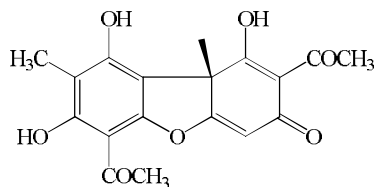
5. Титрование 1М NaOH (основность).

Сумма лишайниковых кислот из пармелии



Выделение. 10 г сырья (пармелии или другого лишайника) измельчают и помещают в аппарат Сокслета или в круглодонную колбу, прибавляют 100 мл спирта (или хлороформа, ацетона, этилацетата) и нагревают на кипящей водяной бане 2 часа. Охлаждают, фильтруют. К фильтрату добавляют 30 мл 10% раствора CaCO_3 и 10% HCl до прекращения образования мути. Водный слой отделяют в делительной воронке, прибавляют 10% раствор HCl до образования осадка. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой, высушивают. Кислоты экстрагируют этилацетатом, концентрируют досуха.

Усниновая кислота из лишайника



Выделение. 100 г мелкоизмельченного лишайника экстрагируют 100 мл эфира в аппарате Сокслета. Эфир отгоняют. Кислоту извлекают 100 мл хлороформа, добавляют 20% K_2CO_3 ; затем осторожно добавляют конц. HCl , выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой, высушивают. При необходимости кристаллизуют из хлороформа или из бензола.

$T_{\text{пл}} 200-201^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +490-500^\circ$.

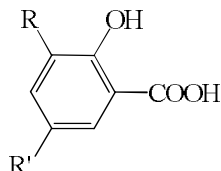
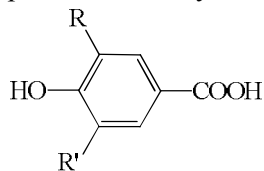
Идентификация. 1. БХ при наличии CO .

2. ИК (KBr) – все структурные элементы.

3. УФ, $\lambda_{\text{max}} 290 \text{ нм}$.

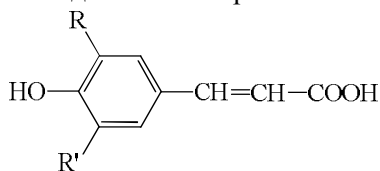
Фенолокислоты

Из фенолокислот состава $\text{C}_6\text{-C}_1$ наиболее распространены в растениях следующие восемь:



п-оксибензойная (R=R'=H)	салициловая (R=R'=H)
протокатеховая (R=OH; R'=H)	о-протокатеховая (R=OH; R'=H)
ванилиновая (R=OCH ₃ ; R'=H)	гентиизиновая (R=H; R'=OH)
галловая (R=R'=OH)	
сиреневая (R=R'=OCH ₃)	

Из оксикоричных кислот (C₆-C₃) одна или несколько из четырех кислот, приведенных ниже, содержатся в различных сочетаниях практически в каждом высшем растении.



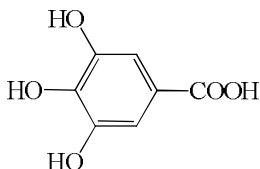
п-кумаровая (R=R'=H)	феруловая (R=OCH ₃ ; R'=H)
кофейная (R=OH; R'=H)	синаповая (R=R'=OCH ₃)

Выделение фенолокислот. К аликвотной части концентрированного спиртового экстракта, полученного из исследуемого сырья, добавить равный объем 5% водного раствора бикарбоната натрия. При этом фенолокислоты образуют хорошо растворимые в воде соли. Фенолы проэкстрагировать этилацетатом. Водную часть подкислить до кислой реакции и этилацетатом проэкстрагировать фенолокислоты. Этилацетатный экстракт промыть в делительной воронке несколько раз водой для удаления минеральной кислоты. Этилацетат отогнать досуха, сухой остаток растворить в минимальном количестве воды.

Хроматографический анализ фенолокислот. Для хроматографии фенолокислот на бумаге используются следующие системы растворителей: бензол-пропионовая кислота-вода (2:2:1) (орг.фаза); 2-пропанол-вод.аммиак-вода (8:1:1); бензол-уксусная кислота-вода (6:7:3); формиат натрия-муравьиная кислота-вода (10:1:200); бутанол-уксусная кислота-вода (8:2:2)

Идентификация. В УФ-свете все оксикоричные кислоты флуоресцируют голубым светом. Опрыскивание хроматограммы раствором железоаммониевых квасцов. Кислоты с 2 орто-окси-группами дают зеленое, а 3 рядовыми - синее окрашивание.

Галловая кислота из щавеля



Выделение. 50 г измельченных корней щавеля в конической колбе заливают 100 мл воды и выдерживают сутки при температуре 50-60⁰С. Фильтруют, добавляют 5% H₂SO₄ до кислой реакции и выдерживают 5-6 часов. Гидролизат обрабатывают петролейным эфиром (100 мл), эфир отгоняют, остаток кристаллизуют из горячей воды с углем. T_{пл} 220-222⁰С.

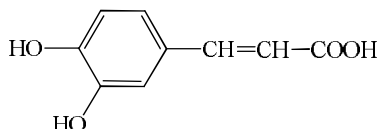
Идентификация. 1. БХ R_f 0,71, проявитель FeCl₃.

2. При добавлении 3% раствора AlCl₃ появляется муть, а при стоянии осадок.

3. ИК (КВг): фенольные ОН с колебательной структурой на полосе за счет ВМВС, СООН, ароматика.

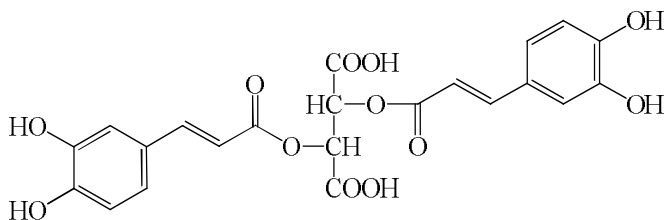
4. ПМР: один двухпротонный сигнал в области 6-8 м.д. (ароматика).

Кофейная кислота из зерен кофе



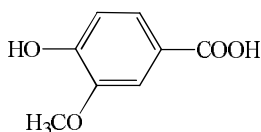
Выделение. 10 г зерен кофе (не жареного!) измельчают до порошка, помещают в круглодонную колбу, прибавляют 40 мл 40% спирта и нагревают с обратным холодильником 2 часа на кипящей водяной бане. Охлаждают, фильтруют. Фильтрат концентрируют досуха. При необходимости кристаллизуют из воды с активированным углем.

*По этой же методике можно получить **цикориевую кислоту из травы цикория:**



- Идентификация.** 1. БХ при наличии CO.
 2. УФ (спирт) 330 нм - кислота цикориевая.
 3. Обесцвечивание раствора KMnO_4 (C=C).
 4. Окрашивание при добавлении раствора FeCl_3 (фенольные OH).

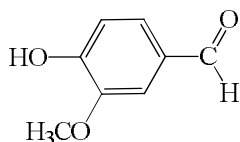
Ванилиновая кислота из ванильного порошка



Выделение. 1 г порошка ванили помещают в круглодонную колбу с обратным холодильником, добавляют 30 мл 70% спирта и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Охлаждают, фильтруют, концентрируют, оставляют на кристаллизацию.

- Идентификация.** 1. БХ при наличии CO.
 2. ИК-спектр (KBr) $\text{C}=\text{O} > 1740 \text{ см}^{-1}$, OH-кислоты (3400 см^{-1}), OH-фенола ($300\text{-}3350 \text{ см}^{-1}$), $1000\text{-}1100 \text{ см}^{-1}$ (C-O-C).

Ванилин из подсолнечной лузги



Выделение. 50 г подсолнечной лузги настаивают в смеси спирта и бензола 1:1 в течение суток для удаления жиров и воска.

Раствор отделяют, остаток высушивают на воздухе, заливают 50 мл 72% H_2SO_4 и оставляют на сутки. Затем в колбу заливают 300 мл воды и кипятят 1 час для гидролиза гликозидов и полисахаров. Охлаждают, осадок лигнина отсасывают на воронке Бюхнера, промывают водой, высушивают.

В колбу с обратным холодильником загружают 10 г лигнина, 300 мл 2 н NaOH и 40 мл нитробензола. Нагревают 3 часа на плитке ($\approx 170^\circ C$), охлаждают, содержимое переносят в фарфоровую чашку и упаривают на водяной бане до половины объема. Раствор ванилата натрия отфильтровывают, нейтрализуют H_2SO_4 до pH 4,5-5 (индикатор), центрифугируют, ванилин извлекают 25 мл бензола при нагревании. Бензольную вытяжку отгоняют досуха, а остаток смешивают с насыщенным раствором бисульфата натрия. Ванилин дает растворимое в воде бисульфитное производное, его отделяют центрифугированием, подкисляют раствор 10% H_2SO_4 , ванилин выпадает в осадок, его сушат и кристаллизуют из воды с углем. $T_{пл} 82^\circ C$.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO.

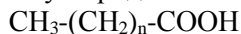
2. Бисульфитное производное (см. текст!).

3. Реакция с $FeCl_3$ – фенольный OH.

4. Реакция «серебряного зеркала» - альдегидная группа.

Жировые кислоты из жира и/или масла

Отличаются числом углеродных атомов (>10).



n=4 – капроновая

n=10 – лауриновая

n=6 – каприловая

n=12 – миристиновая

n=8 – каприновая

n=14 – пальмитиновая

$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ – олеиновая кислота

$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ – линолевая кислота

Все жиры и масла – сложные эфиры высших карбоновых кислот ($C > 10$, предельные, непредельные) и глицерина. Основное свойство сложных эфиров – гидролиз щелочной или кислотный.

Выделение. В фарфоровой чашке над плиткой нагревают жир или масло (3 г), прибавляют 6-7 мл конц. раствора NaOH до слабого кипения перемешивая палочкой. После 30 минут

нагревания добавляют воду и проверяют полноту омыления. [К нескольким каплям смеси добавляют 5-6 мл горячей воды, нагревают. Если проба растворяется нацело, нет капель жира – омыление закончено].

*После омыления в чашку добавляют 10-15 мл насыщенного раствора NaCl, охлаждают на поверхности всплывает слой мыла.

*Содержимое чашки растворяют в хлороформе или CCl₄, фильтруют, оставляют на кристаллизацию.

Идентификация. 1. ВЭЖХ или ГЖХ (качественный и количественный анализ одновременно).

2. К раствору кислот добавляют несколько капель бромной воды или раствора йода. Обесцвечивание – признак наличия ненасыщенных кислот.

3. Проводят гидролиз мыла 10% раствором HCl (полное растворение мыла), подщелачивание → на поверхность всплывает мыло.

Общие приемы выделения карбоновых кислот из растительного сырья

В виду большого разнообразия структур карбоновых кислот не существует единого метода выделения их из растительного сырья. Из сравнения методик, пригодных для отдельных классов кислот видно, что общей (кроме уроновых кислот) в них является лишь первоначальная стадия экстракции растительного сырья этиловым спиртом при температуре 40-60⁰C.

Выделение суммы свободных органических кислот возможно проводить методом анионообменной хроматографии на ионите АВ-17 или подобном. Для этого сток стеклянной колонки покрывают увлажненной тканью, заполняют подготовленным к работе ионитом АВ-17 до высоты 100 мм. При полностью открытом кране колонки вливают 5М кислоту уксусную до положения чуть выше поверхности ионита и промывают 50 мл 0.1М раствора кислоты уксусной. Выделение свободных органических кислот из спиртового экстракта проводят следующим образом: 10 мл образца вносят на подготовленный к работе анионит и пропускают со скоростью 1 кап/сек. Затем промывают колонку с такой же скоростью 50 мл 0.1М раствора кислоты уксусной, а затем 50 мл воды очищенной.

Связанные с анионитом кислоты элюируют со скоростью 1 кап/сек 100 мл 1М раствора натрия сульфата.

Для получения суммы свободных жирных кислот спиртовой экстракт подвергают омылению при нагревании в колбе с обратным холодильником с избытком водного раствора щелочи. После омыления, образец нейтрализуют раствором хлороводородной или серной кислот, дополнительно добавляют 3-5% (v/v) водный раствор кислоты фосфорновольфрамовой. Сумму кислот отделяют центрифугированием и/или фильтрованием.

Для выделения феноло-, оксикоричных и лишайниковых кислот к сконцентрированному спиртовому экстракту, добавляют равный объем 5% водного раствора натрия бикарбоната. При этом феноло-, оксикоричные и лишайниковые кислоты образуют хорошо растворимые в воде соли. Сопутствующие соединения трижды экстрагируют этилацетатом (по 15-20 мл). Водную часть подкисляют (до pH=4-5). Феноло-, оксикоричные и лишайниковые кислоты трижды экстрагируют этилацетатом по 10-15 мл. Этилацетатный экстракт промывают в делительной воронке несколько раз водой для удаления минеральной кислоты и концентрируют в мягких условиях.

Для выделения суммы уроновых кислот растений проводится экстракция водой при температуре 50-60⁰С в течение 2-3 часов. Водный экстракт концентрируют в мягких условиях, к концентрату добавляют четырехкратный объем спирта этилового 96%. Образовавшийся осадок сахаров отделяют центрифугированием. Для удаления белков к осадку добавляют 5-10 мл 10% кислоты трихлоруксусной, перемешивают, центрифугируют. Маточный раствор нейтрализуют добавлением насыщенного раствора натрия карбоната и концентрируют. Для осаждения уроновых кислот к концентрату добавляют 5 мл насыщенного раствора кальция(бария) хлорида, осадок отделяют центрифугированием, уроновые кислоты получают из солей действием натрия сульфата.

2.3. Терпеноиды

Терпеноиды - многочисленная группа соединений, состав которых кратен C₅H₈. По этому признаку их делят на моно- C₁₀H₁₆, сескви- C₁₅H₂₄, ди- C₂₀H₃₂, сестер- C₂₅H₄₀, три- C₃₀H₄₈, тетра- C₄₀H₆₄

и политерпены. Моно- и сескви- составные компоненты эфирных масел, три- сапонины, тетра- каротины и каротиноиды.

Все эфирные масла, на основе входящих в них компонентов, делят:

1. Монотерпены алициклические (гераниол, нерол, гераниол, цитронеллаль и др.), моноциклические (ментон, ментол, цинеол, лимонен, α -фелландрен), бициклические (камфора, борнеол, туйон).
2. Сесквитерпены алифатические (фарнезол), моноциклические (бисабол), бициклические (хамозулен), трициклические (ледол, матрицин).
3. Моно- и сесквитерпены ароматические (п-цимол, тимол, карвакрол, ванилин, анисовый альдегид, фенилэтиловый спирт).
4. Фенилпропаноиды (анетол, эвгенол, коричный спирт).

Как указывалось, эфирные масла получают методами перегонки с водяным паром, анфлераж, динамической адсорбции, экстракции летучими растворителями.

Для всех эфирных масел проводят:

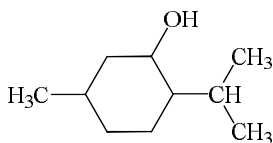
Определение подлинности эфирного масла: (цвет, запах, вкус, прозрачность), качественные реакции (описаны выше), ГЖ (по времени удерживания пиков компонентов).

Определение доброкачественности проводят по физическим константам (плотность, угол вращения, показатель преломления, температура застывания, растворимость в спирте) и химическим (кислотное, эфирное число, содержание доминирующих компонентов).

В эфирных маслах определяют также содержание возможных примесей (спирта, жирных и минеральных масел, воды), определение фенолов (раствор щелочи), определение кетонов (бисульфитный метод), определение лактонов, и состав масел методом ГЖХ [ГФ РК ч.1 с.226-233].

Эфирным маслам свойственны антимикробная, противовоспалительная, спазмолитическая, седативная, отхаркивающая, регенерирующая и др. виды активности.

L-ментол из перечной мяты

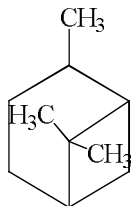


Выделение. 30 г сухих листьев мяты перечной заливают 100 мл горячей воды в круглодонной колбе с обратным холодильником, между ними закрепляют градуированную насадку и отгоняют эфирное масло. Как только объем масла в пробирке перестанет увеличиваться, отгонку прекращают, отмечают объем масла.

Для отделения примесей, масло растворяют в 50 мл спирта, добавляют 2 г КОН и кипятят 30 минут. Затем спирт отгоняют, к остатку добавляют 15 мл воды и 15 мл эфира. Эфирный слой после перемешивания отделяют, промывают водой до нейтральной реакции и сушат над Na_2SO_4 . $T_{\text{пл}} 42-43^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}} -49^\circ$ (20% этанол).

Идентификация. К 1 мл ментола добавляют каплю 1% раствора ванилина и 1 мл конц. $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow$ сине-фиолетовое окрашивание.

α -пинен из скипидара

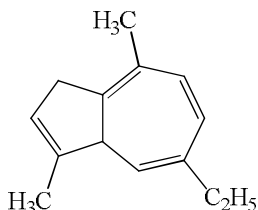


Выделение. 50 г скипидара высушивают над Na_2SO_4 и перегоняют из колбы Вюрца, собирая фракцию в пределах $150-160^\circ$. $n_{\text{D}}=1,4664$, $[\alpha]_{\text{D}} +53,7^\circ$.

Идентификация. ГЖХ

*В зависимости от вида растения, места, времени сбора сырья, состав скипидара меняется, среднее содержание α -пинена в нем около 13%. На ГЖХ можно видеть весь состав скипидара.

Хамазулен из горькой полыни или эвкалипта



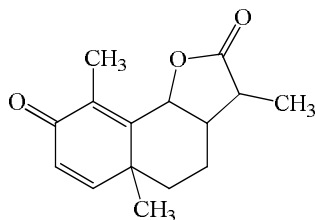
Бициклический углеводород группы азуленов, синего или фиолетового цвета, получается дегидрированием или дегидратацией сесквитерпеновых спиртов, кислот, лактонов.

Выделение. 50 г сухих листьев полыни горькой или эвкалипта экстрагируют 100 мл 70% спирта в аппарате Сокслета в течение часа. Затем приливают 50 мл 10% спиртового раствора КОН и нагревают 5 часов на водяной бане.

Охлажденный щелочной раствор осторожно подкисляют разбавленной H_2SO_4 до кислой реакции (индикатор) и перегоняют с водяным паром до бесцветных погонцов (хамазулен синий). Дистиллят в делительной воронке обрабатывают петролейным эфиром. Эфирные извлечения подкисляют порциями по 10 мл конц. HCl. Кислый экстракт разбавляют водой и хамазулен извлекают эфиром, сушат Na_2SO_4 , отгоняют на водяной бане, остаток сырого хамазулена перегоняют в вакууме, собирая фракцию 145-150°C.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO; 2. PCA.

Сантонин из цитварной полыни



По химической природе – лактон сантониновой кислоты. Бициклический сесквитерпен.

Выделение. Измельченные соцветия цитварной полыни (100 г) растирают в ступке с 20 г гашеной извести, помещают в коническую колбу, заливают 300 мл воды и кипятят 1 час; горячую массу фильтруют, промывают водой горячей, нейтрализуют HCl (индикатор) и порциями трижды по 30 мл обрабатывают хлороформом, взбалтывают с активированным углем, фильтруют, хлороформ отгоняют, остаток переносят в колбу с обратным холодильником и растворяют при кипячении в 30 мл 70% спирта. Горячий раствор фильтруют и оставляют на кристаллизацию. $T_{пл}$ 169-170⁰С, $[\alpha]_D -117,6^0$ (спирт).

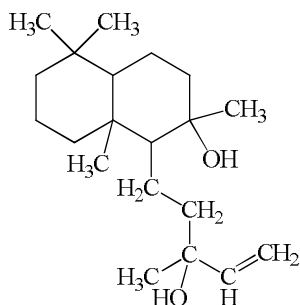
Идентификация. 1. Подщелачивание спиртового раствора сантонина спиртовым раствором КОН → карминово-красное окрашивание.

2. Горячий ($\approx 100^0$ С) раствор сантонина в 50% H₂SO₄ от добавления раствора FeCl₃ → кроваво-красный цвет.

3. БХ при наличии СО.

4. Метод PCA

Склареол из соцветий шалфея

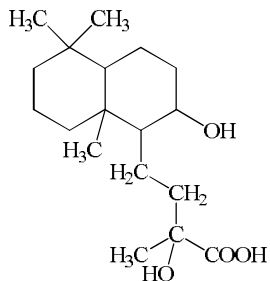


Выделение. 100 г измельченных соцветий мускатного шалфея заливают 500 мл петролейного эфира и оставляют на ночь. Экстракт сливают и отгоняют на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 100 мл спирта и выдерживают 5 часов в холодильнике для отделения воска. Осадок воска отфильтровывают или центрифугируют. Из фильтрата отгоняют спирт, остаток кристаллизуют из ацетона до исчезновения запаха. Проводят 3 кристаллизации из 10-15 мл ацетона. $T_{пл}$ 102-103⁰С, $[\alpha]_D -14^0$ (пиридин).

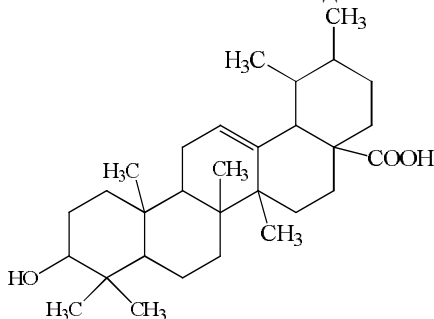
Идентификация. Реакция на третичный спирт: 0.1 г склареола, 0.1 г CuSO_4 запаивают в ампулу и выдерживают 1 час при 100°C в сушильном шкафу. Смесь синее.

Модификация. В колбе с мешалкой растворяют 1 г склареола в 12 мл ацетона и 4 мл воды, охлаждают и по каплям добавляют раствор 1,8 г KMnO_4 в 16 мл ацетона и 6 мл воды. Смесь перемешивают 30 минут, фильтруют от MnO_2 , промывают на фильтре 10% раствором Na_2CO_3 .

К ацетоновому раствору добавляют 15 мл раствора соды, ацетон отгоняют на водяной бане. Остатки содовых растворов объединяют и встряхивают с 20 мл эфира. К эфирному извлечению осторожно приливают 20% H_2SO_4 до кислой реакции (индикатор). Выпадающая склареоловая кислота растворяется в эфире, высушивается Na_2CO_3 , эфир отгоняют. $T_{\text{пл}} 153\text{-}154^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}} -1,3^\circ$.



Урсоловая кислота из лаванды или мяты



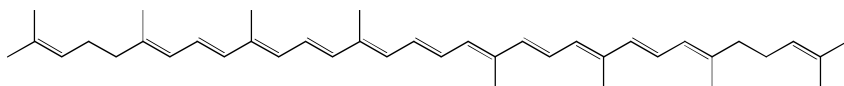
Выделение. 50 г измельченных соцветий лаванды или листьев мяты помещают в аппарат Сокслета и экстрагируют 2 часа 200 мл петролейного эфира для удаления примесей. Затем петролейное извлечение отделяют и продолжают экстракцию 200 мл спирта, охлаждают, выпавшую урсоловую кислоту отфильтровывают, обрабатывают эфиром с активированным углем. Эфир отгоняют на водяной бане, уголь с кислотой еще раз промывают эфиром,

отделяют уголь и оставляют эфирный раствор на кристаллизацию. $T_{пл}$ 275-280⁰С.

Идентификация. БХ или ТСХ на окиси алюминия; после хроматографирования пробы вещества высушивают в сушильном шкафу при 100⁰С, опрыскивают насыщенным раствором треххлористой сурьмы в хлороформе и снова выдерживают в сушильном шкафу 1-2 мин. Одно розовое пятно с R_f 0,35.

*Неочищенная урсоловая кислота дает 2 пятна, на старте и с R_f 0,35.

Ликопин из томатной пасты

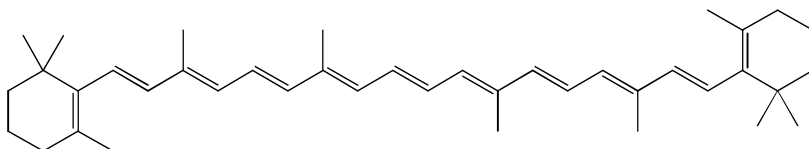


Выделение. 300 г томатной пасты заливают 300 мл спирта, энергично перемешивают и оставляют на 1-2 часа; снова перемешивают. Суспензию отсасывают на воронке Бюхнера. Желтый фильтрат отсасывают, а темно-красную «лепешку» снова заливают смесью 1:1 спирт и CCl_4 , встряхивают 20-30 минут. Суспензию фильтруют на воронке Бюхнера или центрифугируют.

Органический раствор сушат Na_2SO_4 и отгоняют на водяной бане при 60⁰С. Остаток в виде темного масла разбавляют 5 мл бензола, упаривают. Снова добавляют 10 мл бензола, нагревают на водяной бане и к кипящему раствору осторожно добавляют 15 мл спирта. Выпадают кристаллы ликопина, кристаллизацию заканчивают в холодильнике. $T_{пл}$ 169⁰С.

Идентификация. УФ (петролейный эфир) λ_{max} 446, 475, 505, 548 нм.

Каротин из моркови



Имеет 3 изомера (α , β , γ), провитамин А, тетратерпен.

Выделение. Из 1 кг мелко измельченной моркови отжимают сок. Сырье заливают водой, перемешивают в течение 40 минут, снова отжимают. Обе порции сока и раствор объединяют и нагревают на водяной бане при 60-70⁰С, оставляют до расслаивания. Белок оседает на дно, раствор центрифугируют, осадок взбалтывают с 10 г NaOH и 100 мл CCl₄ (3-4 раза). Раствор промывают водой от примеси белков и щелочи и отгоняют в вакууме при 30-40⁰С.

Остаток обрабатывают хлороформом, хлороформ отгоняют под вакуумом при 30⁰С досуха, быстро добавляют кипящий спирт (100 мл), выпадают кристаллы каротина, их отфильтровывают, промывают горячим спиртом, вновь растворяют в 100 мл хлороформа и осаждают 100 мл спирта, осадок сушат в вакуум-эксикаторе.

Темно-коричневые кристаллы с фиолетовым оттенком и металлическим блеском. T_{пл} 176-177⁰С.

Идентификация. БХ – три пятна (α, β, γ) каротины (в системе БУВ 40:12.5:29).

Общие методы выделения тритерпеновых гликозидов (сапонинов) из растительного сырья

Обычно суммарный экстракт для выделения сапонинов получают обработкой сырья полярными растворителями: метиловым или этиловым спиртом и водой. Сырье предварительно обрабатывают петролейным эфиром или четыреххлористым углеродом для разрушения комплексов сапонинов со стеринами.

Методы выделения суммы сапонинов из экстракта зависят от их строения. Гликозиды с небольшим числом моносахаридных остатков (3-4) обычно плохо растворимы в воде и выпадают в осадок при разбавлении спиртовых растворов водой. Полярные сапонины плохо растворимы в метиловом и этиловом спиртах и выпадают в осадок при охлаждении или продолжительном стоянии спиртовых растворов, либо при добавлении спирта к водным и водно-спиртовым растворам. Кислые сапонины растворимы в водных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении. Из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины осаждают этиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, а некоторые

- бутиловым и изоамиловым спиртами. Из водных растворов сопутствующие малополярные примеси извлекают этиловым эфиром, хлороформом, четыреххлористым углеродом, а тритерпеновые гликозиды - бутиловым или изоамиловым спиртом.

Полученные сапониновые фракции очищают повторным пересаживанием, что, однако, не приводит к полной очистке от полярных сопутствующих веществ: неорганических примесей, моно- и олигосахаридов, гликозидов других классов, органических кислот и др. Ряд методов основан на способности сапонинов образовывать нерастворимые в воде или водном спирте соли с гидроксидом бария или ацетатом свинца и комплексы с холестерином, танинами, белками. Соли затем разлагают угольной или серной кислотами; холестериновые комплексы - извлечением холестерина бензолом, толуолом, этиловым эфиром или пиридином; таниновые - кипячением с водной суспензией оксида цинка; белковые - извлечением гликозидов подходящими органическими растворителями. Эта группа методов дает более чистую сумму сапонинов, но не является общей методикой и не гарантирует количественного выделения и отсутствия значительного содержания балластных веществ в отдельных случаях. Сапонины, образующие коллоидные растворы, очищают от примесей, дающих истинные растворы (моносахариды, минеральные вещества), с помощью диализа и электролиза. Хорошие результаты очистки сапониновых фракций от растительных пигментов и восстанавливающих сахаров получены при гельфильтрации на сефадексах V-25, V-50 и A-25.

Схема выделения сапонинов из соевой муки была разработана в Институте органической химии УНЦ РАН. Для выделения сапонинов проводили экстракцию при кипячении метанолом (96% этанолом) с предварительным обезжириванием сырья этилацетатом или 70% этанолом. Сумму сапонинов выделяли экстрагированием сухого спиртового остатка в смеси бутанол - вода (1:1). Для выделения агликона сумму сапонинов гидролизовали 7% HCl, в результате чего была получена смесь соясапогенолов, из которой колоночной хроматографией был выделен основной тритерпеноид соясапогенол В.

2.4. Алкалоиды

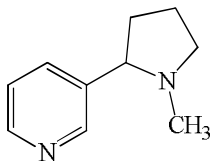
Все алкалоиды содержат от 1 до 7 (чаще 4-х) атомов азота. В растениях могут быть в виде оснований, солей, реже кислот, что сказывается на методах их выделения.

Главная задача процесса получения алкалоидов из растительного сырья – их эффективная экстракция и отделение балластных веществ, основную массу которых составляют клетчатка и другие полисахариды. Кроме того, в экстракт могут переходить растительные белки, гликопротеиды, хлорофилл, различные дубильные вещества и пр. Часто растения содержат сразу несколько алкалоидов близких по своему строению и свойствам, т.е. возникает задача их разделения на индивидуальные вещества.

В качестве сырья используются либо дикорастущие растения, либо специально выращиваемые культуры на возделываемых землях. Последние являются более удобным сырьем для получения алкалоидов, поскольку содержание в них алкалоидов, как правило, выше, чем в дикорастущих растениях. Имеются специализированные хозяйства по выращиванию лекарственных растений, включая специально выведенные селекционерами культуры с повышенным содержанием ценных алкалоидов.

Атомы азота могут быть первичными, вторичными и третичными. Для идентификации используют качественные реакции, БХ и ТСХ.

Никотин из табака



Выделение. 100 г табака растирают в ступке с 15 г гашеной извести, загружают в круглодонную колбу и перегоняют с водяным паром (проба не должна давать осадка с 2% раствором кремневольфрамовой кислоты).

Дистиллят подкисляют щавелевой кислотой до кислой реакции (индикатор) и упаривают на водяной бане до сиропа

оксалата никотина. Его обрабатывают 30% раствором щелочи до нейтральной реакции и извлекают основание эфиром (2-3 раза по 30 мл). Эфирное извлечение сушат и отгоняют.

Свежеполученный никотин – бесцветное масло без запаха. При хранении становится вязким, темнеет до почти черного.

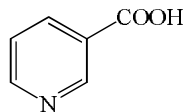
$[\alpha]_D^{20} - 168^{\circ}$ (эфир), $n_D^{20} 1,5280$, $d^{20} 1,0924$.

Идентификация. БХ, проявитель реактив Драгендорфа, R_f 0,44.

Модификация – получение никотиновой кислоты из никотина – основания по реакции окисления азотной кислотой или $KMnO_4$.

К 15 г свежеперегнанного никотина при охлаждении добавляют 100 мл конц. кислоты азотной и оставляют во льду с солью на 2-3 часа. Затем к холодному раствору никотина добавляют еще 10-15 мл разбавленной азотной кислоты по каплям, тщательно перемешивая. После этого смесь упаривают до 15-20 мл, охлаждают.

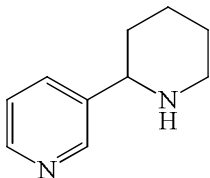
Выпадает светло-желтый нитрат никотиновой кислоты, его отфильтровывают, растворяют в 40 мл горячей воды и при $70-80^{\circ}C$ выделяют никотиновую кислоту прибавлением соды до pH 3.1-3.7, выдерживают 1-2 часа, фильтруют, при необходимости кристаллизуют с углем из воды.



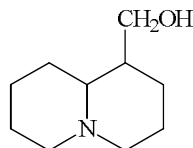
Идентификация продукта. 1. В кислых растворах с солями меди образуется плохо растворимый голубой осадок никотината меди.

2. $T_{пл} 235-236^{\circ}C$.

Анабазин и лупинин из анабазинсульфата или анабазиса



Анабазин



Лупинин

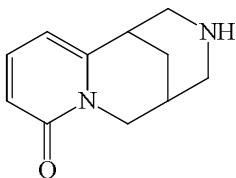
Выделение. Из травы анабазиса сумму алкалоидов выделяют экстракцией хлороформом в течение 2-3 часов с последующим

разделением ТСХ на окиси алюминия или на колонках элюируя петролейным эфиром лупинин (4-5 фракций) $T_{пл}$ 63-67 $^{\circ}$ C. Затем элюируют смесь алкалоидов, а затем спиртом вымывают анабазин.

Из анабазинсульфата сумму алкалоидов получают после подщелачивания 40% раствором NaOH с последующей экстракцией бензолом. Получают смесь 85% анабазина и 15% лупинина. $n_D=1,534-1,538$.

Разделение проводят ТСХ на окиси алюминия или на колонках, как описано выше. Проявитель – кремневольфрамовая кислота 2%.

Цитизин из термопсиса



Часто цитизин получают в сумме с анагирином, пахикарпином, термопсином.

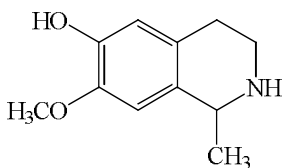
Выделение. 100 г измельченных семян или травы термопсиса заливают на ночь 12% раствором NH_3 и дихлорэтаном (300 мл). Этой смесью экстрагируют 2-3 раза (проба на полноту извлечения алкалоидов реактивом Драгендорфа или 2% кремневольфрамовой кислотой – отсутствие осадка).

Объединенный дихлорэтановый экстракт обрабатывают небольшим количеством 5% H_2SO_4 , фильтруют и подщелачивают 25% NH_3 до появления запаха. Алкалоиды экстрагируют 300 мл хлороформа (контроль – кремневольфрамовая кислота). Хлороформный экстракт сушат Na_2SO_4 и отгоняют на водяной бане. Остаток несколько раз извлекают 10 мл эфира. Нерастворившийся в эфире остаток – сырой цитизин. $T_{пл}$ 153-154 $^{\circ}$ C.

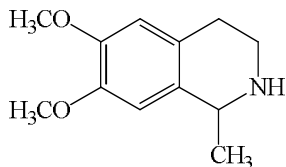
Идентификация. 1. БХ при наличии CO, проявитель кремневольфрамовая кислота.

2. К спиртовому раствору 10 мг цитизина по каплям добавляют конц. HNO_3 до кислой реакции (индикатор). Выпадают кристаллы нитрата цитизина с $T_{пл}$ 187-188 $^{\circ}$ C.

Сальсолин и сальсолидин из солянки Рихтера



Сальсолин

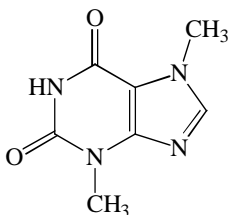


Сальсолидин

Выделение. 50 г измельченной надземной части солянки Рихтера обрабатывают 50 мл 25% NH_3 при встряхивании равномерно увлажняя сырье. Подготовленное сырье экстрагируют 3 раза дихлорэтаном по 50 мл. Дихлорэтановые извлечения подкисляют 10% H_2SO_4 и разделяют слои. Кислый раствор обрабатывают 25% NH_3 (индикатор) до нейтральной реакции и алкалоиды извлекают хлороформом. Кристаллизуют из смеси спирта и ацетона (1:1).

* Разделяют сальсолин и сальсолидин методом ВЭЖХ.

Теобромин из какао



Выделение. 100 г порошка какао в фарфоровом стакане смачивают водой, добавляют известковое молоко, 10 г негашеной извести перемешивают и кипятят 30 минут. Экстракт отфильтровывают, упаривают в вакууме до 50 мл и вновь добавляют известковое молоко (осаждаются смолы и красящие вещества). Смесь фильтруют, фильтрат упаривают до 10-15 мл и охлаждают.

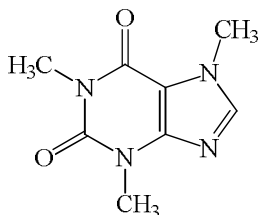
Теобромин осаждают добавлением конц. HCl (индикатор) и оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отфильтровывают, промывают водой. При необходимости очищают растворяя в

водном NaOH и пропускают CO₂ до осаждения теобромина, фильтруют, промывают ледяной водой.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO.

2. Теобромин образует студень от добавления небольших количеств воды, 10% NaOH, NH₃ и 10% AgNO₃. Смесь встряхивают, смесь окрашивается.

Кофеин из чая

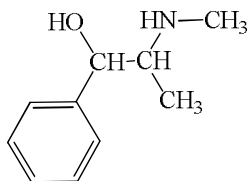


Выделение. Тонко измельченные листья чая (50 г) смешивают с 25 г MgO в 150 мл воды, кипятят 10-15 минут. Водный раствор отделяют декантацией, подкисляют 25 мл разбавленной H₂SO₄ (индикатор) и концентрируют в фарфоровой чашке на водяной бане до объема 10-15 мл, фильтруют и экстрагируют 3 порциями хлороформом по 30 мл, отгоняют на водяной бане, кристаллизуют из горячей воды с углем. T_{пл} 234⁰C.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO.

2. 10 мг кофеина + 10 капель 5% H₂O₂ + 1 капля 25% HCl + NH₃ → пурпурное окрашивание.

L-эфедрин из эфедры



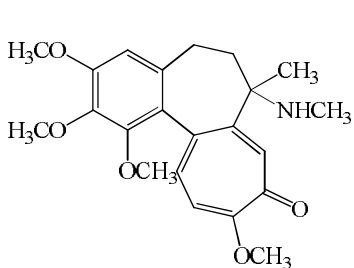
Выделение. Готовят 500 мл 2% уксусной кислоты, заливают измельченную траву эфедры (100 г) и экстрагируют 4 часа с перемешиванием. Фильтруют и упаривают экстракт до 40-50 мл.

Осторожно малыми порциями подщелачивают до $\text{pH} \approx 10$ 15% NaOH и 3 раза экстрагируют петролейным эфиром по 50 мл; сушат, петролейный эфир отгоняют, маслообразный остаток обрабатывают 20 мл 2н уксусной кислоты, добавляют 30 мл 10% раствора щавелевой кислоты и оставляют на кристаллизацию. Выпавший эфедрина оксалат отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из горячей воды. $T_{\text{пл}} 249^{\circ}\text{C}$.

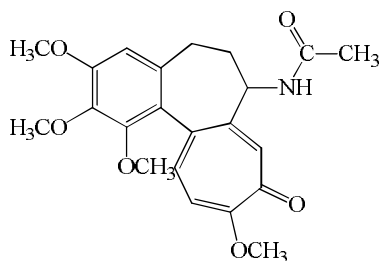
*L-эфедрин оксалат трудно растворим в холодной воде, а псевдоэфедрин – легко. Это используют для их разделения. $T_{\text{пл}}$ псевдоэфедрина 235°C .

Идентификация. По величине $[\alpha]_D$ из 20% водного спирта.

Колхамин и колхицин из безвременника великолепного



Колхамин



Колхицин

Выделение. 30 г луковиц безвременника великолепного измельчают до кашицеобразной массы и экстрагируют 50 мл воды с добавлением 15% бисульфита натрия в стакане с мешалкой в течение 1 часа. Экстракцию повторяют 2-3 раза. 100-150 мл полученной водной вытяжки экстрагируют 2-3 раза хлороформом при соотношении 3:1 по объему; упаривают до объема 10 мл.

0.1 мл экстракта наносят на пластинки ТСХ с Al_2O_3 II степени активности и хроматографируют в системе хлороформ – этанол 24:1, используя проявитель Драгендорфа.

Хроматограммы просматривают в УФ-свете и отмечают пятна колхамина и колхицина, соскабливают; заливают 15% HCl , элюат фильтруют в мерную колбу на 25 мл, объем доводят до метки 15%

НСІ (отсутствие алкалоидов после извлечения кислотой, проверяют реактивом Драгендорфа).

Концентрация суммы 2 алкалоидов определяется по формуле:

$$X = \frac{B \cdot V_1}{m \cdot V_2}$$

где m – навеска сырья, г;

V_1 – объем хлороформного концентрата, мл;

V_2 – объем хлороформного экстракта, нанесенного на пластинку ТСХ, мл;

B – количество колхицина и колхамина, определенное по калибровочному графику, мг;

Идентификация. 1. ТСХ проводят при наличии СО или по величине R_f .

2. Калибровочный график строят по СО колхамина или колхицина.

Количественное определение суммы алкалоидов в сырье

Около 5 г порошка растения (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100 мл, добавляют 5 мл раствора аммиака, 50 мл этилацетата, настаивают при перемешивании в течение 2 часов.

Полноту экстракции алкалоидов этилацетатом проверяют по отсутствию опалесценции от добавления калия тетраиодмеркурата $/K_2HgI_4/$ к сухому остатку, полученному выпариванием 5 мл извлечения и добавлением к остатку 1 мл 0.5н раствора кислоты серной.

Полученное извлечение фильтруют, добавляют 10 мл кислоты хлороводородной разбавленной, затем подщелачивают раствором аммиака и три раза экстрагируют 10 мл хлороформа. Объединенные извлечения упаривают досуха.

К сухому хлороформному остатку добавляют 15 мл спирта этилового 95%, 20 мл 0.01н раствора кислоты хлороводородной и оттитровывают избыток кислоты 0.01н раствором натрия гидроксида в присутствии метилового красного.

Содержание алкалоидов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{32.74 \cdot (20 - V) \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}$$

где V - объем 0.01н раствора натрия гидроксида, пошедшего на титрование в миллилитрах;

m - масса навески сырья в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Общие методы выделения алкалоидов из растительного сырья

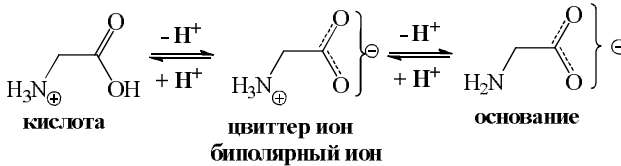
В экстрактор загружают мелкоизмельченную высушенную траву. Алкалоиды при энергичном перемешивании трижды экстрагируют хлороформом в соотношении 1:5 в течение 3 часов, после чего экстракт сливают и концентрируют в мягких условиях (температура не выше 50⁰С) до небольшого объема.

После чего проводят реэкстракцию 3% водным раствором HCl. Образующиеся при реэкстракции соли алкалоидов хорошо растворимы в воде и переходят из хлороформной фазы в водный раствор. Полученный водный раствор солей алкалоидов, после предварительного подщелачивания раствора до рН 8-9, вторично реэкстрагируют хлороформом. Экстракт суммы оснований алкалоидов отделяют от водного слоя с водорастворимыми примесями и тщательно промывают водой до нейтральной реакции промывных вод, концентрируют в мягких условиях.

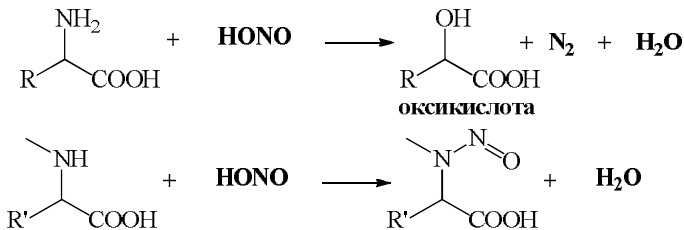
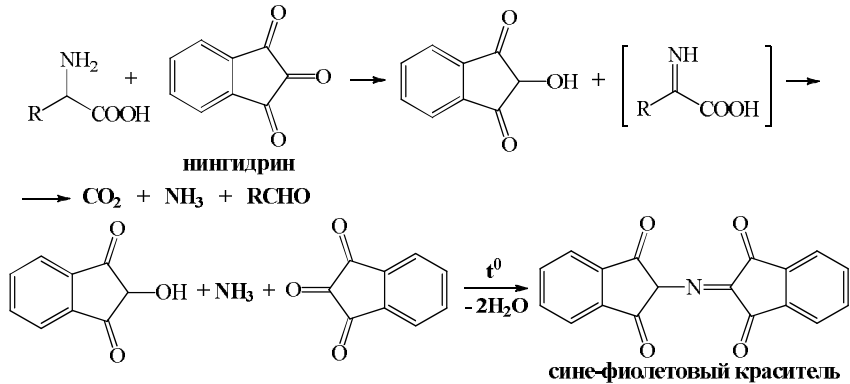
Технический продукт, полученный после описанной выше двойной реэкстракции, представляет собой алкалоид свободный от основной массы балластных веществ, но может содержать еще значительное количество примесей. Для получения чистой суммы алкалоидов используются либо многократные повторяющиеся операции очистки, либо сочетание различных способов на каждом этапе очистки. Хорошо кристаллизующиеся алкалоиды (основания или соли) могут быть доочищены трех-четырекратной перекристаллизацией из воды или органического растворителя с применением осветляющих абсорбентов (активированный уголь, прокаленная окись алюминия, пористые силикаты и т.п.).

2.5. Аминокислоты

Все аминокислоты отличает характерное свойство этой группы веществ первичного синтеза – амфотерность, что используют в методах их выделения.

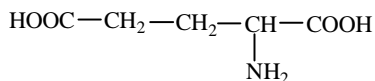


Отличает реакция с раствором нингидрина и азотистой кислотой; образуются разноокрашенные растворы, реже осадки и выделение N_2 :



К настоящему времени отработано много методов синтеза аминокислот, реже их выделяют из природных источников.

L-глутаминовая кислота из муки



Выделение. Из 100 г пшеничной муки замесить тесто, оставить на 20-30 минут. Затем разминать тесто пальцами под струей воды до прозрачности промывных вод. Отмытую массу растянуть тонким слоем на стеклянной пластинке и сушить при 105°C.

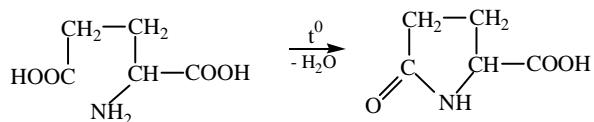
В колбу внести сухой порошок, залить 35 мл конц. HCl и нагревать 4-5 часов на кипящей водяной бане (под тягой!).

Колбу оставить на ночь, затем вдвое разбавить водой и отфильтровать на воронке Бюхнера.

Для выделения свободной глутаминовой кислоты из хлоргидрата, его растирают в ступке, добавляя к смеси небольшое количество анилина. Густую массу разбавляют двойным объемом воды, переносят в фарфоровую чашку, нагревают 10 минут на кипящей водяной бане, охлаждают, фильтруют на воронке Бюхнера. Глутаминовую кислоту растворяют в 10-15 мл спирта, растирают, фильтруют через ту же воронку, промывают спиртом, высушивают. $T_{\text{пл}} 224-225^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +12^\circ$.

Идентификация. БХ при наличии CO, проявитель нингидрин.

Модификация. Получение L-пирролидонкарбоновой кислоты:



В пробирке нагревают 7 г. L-глутаминовой кислоты, 7 мл воды, нагревают до 130°C и выдерживают при этой температуре 4-5 часов (лучше в автоклаве или в сушильном шкафу). Желтый раствор охлаждают и упаривают в вакууме до образования масла, которое при перемешивании затвердевает. Остаток растворяют в диоксане при нагревании до кипения, фильтруют. При охлаждении

из фильтрата выпадает желтоватый осадок L-пирролидон-карбоновой кислоты. $T_{пл} 152-160^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} - 9,9^{\circ}$.

Казеин и тирозин из молока

Казеин – белок молока, фосфопротеин.

Выделение. К раствору (0.5 л) молока 1:1 разбавленному водой, добавляют 6 мл уксусной кислоты и получают сыворотку; отжимают ее через ткань, промывают водой и растирают в фарфоровой чашке с небольшим объемом 1% раствора NaOH (индикатор), слабо подогревают, оставляют на ночь. На поверхность всплывает жир, его отделяют, фильтрат подкисляют 6-10 мл уксусной кислоты, осаждается казеин. Его отжимают и растирают с небольшим количеством спирта в пасту, промывают спиртом, потом эфиром, сушат на воздухе.

Полученный казеин кипятят 5 часов в колбе с обратным холодильником с 3-х кратным (весовым) количеством 25% H_2SO_4 . После охлаждения к темной жидкости добавляют при нагревании насыщенный раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$ до слабо щелочной реакции (индикатор). Для осаждения ионов бария, пропускают CO_2 . Осадок смешивают со 100 мл воды, нагревают до кипения, фильтруют, упаривают до появления кристаллов тирозина.

Кристаллизуют тирозин из горячей воды с углем. $T_{пл} 314-316^{\circ}\text{C}$.

Идентификация. Помимо тирозина при гидролизе казеина образуются: лейцин, глутаминовая кислота, пролин, серин и некоторые другие аминокислоты, в зависимости от качества молока. Все они остаются в маточных растворах. Их можно идентифицировать методом БХ при наличии CO , проявитель нингидрин.

Аминокислоты из белковых веществ гороха

В горохе чаще всего обнаруживают сумму аминокислот: аргинин, гистидин, лизин, тирозин, аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

Выделение. 50 г измельченных семян гороха экстрагируют в аппарате Сокслета петролевым эфиром для удаления жира. Затем

гороховую муку заливают 200 мл 10% NaCl, перемешивают и оставляют на ночь в холодильнике. Вытяжку центрифугируют прозрачную надосадочную жидкость насыщают сульфатом аммония и опять оставляют на ночь в холодильнике.

Выпавший осадок белков фильтруют, высушивают. В колбу с обратным холодильником помещают сухой белок, наливают 20 мл 6N HCl, чтобы весь белок пропитался раствором.

Колбу нагревают на горячей бане до растворения белка, а затем проводят гидролиз на кипящей водяной бане в течение 10 часов. После этого HCl упаривают в вакууме при 35°C, остаток хлоргидратов аминокислот сушат, растворяют в теплой воде, фильтруют и упаривают.

Идентификация. 1. Анализ суммы аминокислот можно провести ТСХ 10% изопропилового раствора в присутствии СО или электрофорезом на бумаге, пропитанной ацетатным буфером с рН 3,8 (200 мл 1 N CH₃COONa + 170 мл 1 N HCl, добавляют до 1 л). Проявитель нингидрин.

2. Аминокислотный анализатор (качественный компонентный и количественный анализ).

2.6. Полифенолы (кумарины, хиноны, флавоноиды, дубильные вещества)

Все полифенолы содержат 2 и более ОН-групп в кольце (кумарины, простые фенолы и фенолокислоты) или в кольцах (ксантоны, антрахиноны, флавоноиды, дубильные вещества).

Для **проявления фенолов** используют следующие реакции:

1. Реакции азосочетания, приводящие к образованию окрашенных азосоединений с:

а) диазотированным п-нитроанилином (ДзПНА): 3% раствор п-нитроанилина в 8% соляной кислоте смешивают непосредственно перед употреблением с несколькими каплями 5% раствора NaNO₂. Хроматограмму опрыскивают этим раствором и затем еще 20% раствором соды;

б) диазотированной сульфаниловой кислотой (ДзСК): Непосредственно перед использованием смешивают 0,3% раствор сульфаниловой кислоты в 8% соляной кислоте с несколькими

каплями 5% раствора NaNO_2 . Хроматограмму опрыскивают этим реактивом, а затем 20% раствором соды.

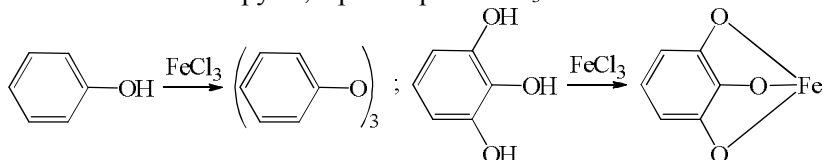
2. Реакция окисления окисью серебра: 0,1н раствор азотнокислого серебра смешивают с 5н водным аммиаком в соотношении 1:1. Хроматограмму опрыскивают и высушивают при 105° в течение 5-10 минут. Фенолы проявляются в виде коричневых пятен.

3. Образование комплекса с 1% раствором железомонийных квасцов в воде: Фенолы, имеющие орто-диоксигруппировку, окрашиваются в зеленый, а три рядовые оксигруппы - в синий цвет.

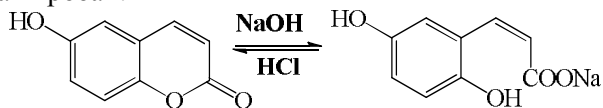
4. При нагревании до $80-90^\circ$ с 5% этанольным раствором фосфорномолибденовой кислоты проявляются синие пятна на белом фоне. Выдерживание хроматограммы в парах аммиака увеличивает интенсивность окраски.

5. 1% раствор ванилина в конц. соляной кислоте окрашивает фенолы, имеющие мета-диоксигруппы, в красный цвет.

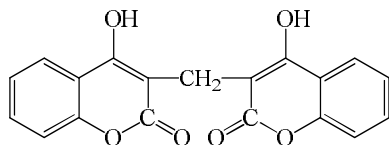
Фенолы и все полифенольные соединения идентифицируют по различному окрашиванию, в зависимости от относительного расположения OH -групп, с раствором FeCl_3 :



Кумарины (лактоны, циклические сложные эфиры) отличает «лактонная проба»:



Дикумарин из донника лекарственного



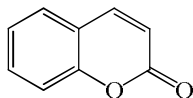
Выделение. 50 г измельченной травы донника лекарственного в аппарате Сокслета экстрагируют 70 мл спирта 2 часа. Извлечение фильтруют и экстракцию повторяют еще раз. Объединенные спиртовые извлечения концентрируют до объема 10-15 мл и 3 раза порциями извлекают эфиром, концентрируют досуха.

Идентификация. 1. БХ при наличии СО.

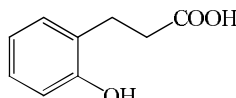
2. От добавления $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ серо-бурое окрашивание.

3. Как лактон – расщепление от H_2SO_4 и NaOH (спиртовый раствор).

Кумарин и мелилотовая кислота из донника



Кумарин



Мелилотовая кислота

Выделение. Мелкоизмельченные листья донника (20 г) в аппарате Сокслета экстрагируют 4 часа петролейным эфиром (200 мл) для удаления пигментов и воска.

Эфир отгоняют, сырье заливают водой, нагревают до кипения, фильтруют. Извлечение водой повторяют еще 2 раза.

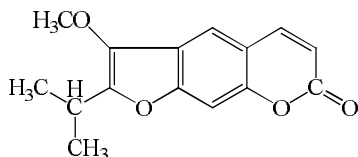
Водные вытяжки нагревают до кипения, добавляют 20 мл 10% NaOH , охлаждают. Экстрагируют эфиром до обесцвечивания (зеленый цвет эфирного извлечения). Щелочной раствор подкисляют 20% раствором H_2SO_4 до кислой реакции. Выделяется смесь кумарина и мелилотовой кислоты. Смесь фильтруют. Чтобы отделить кумарин от мелилотовой кислоты, кислый раствор обрабатывают содой до щелочной реакции, мелилотовая кислота превращается в натровую соль. Экстрагируют 2-3 раза эфиром кумарин, а в содовом растворе остается мелилотовая кислота в виде соли, его подкисляют 20% H_2SO_4 , фильтруют, кристаллизуют из горячей воды с углем.

$T_{\text{пл}}$ кумарина 70°C , $T_{\text{пл}}$ мелилотовой кислоты- $82-83^{\circ}\text{C}$.

Идентификация. 1. Запах кумарина – запах свежескошенного сена, мелилотовой кислоты – медовый.

2. С раствором $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ синее окрашивание.
3. При нагревании с конц. раствором KOH образуется оксикумаровая кислота с $T_{\text{пл}} 207^\circ\text{C}$.

Пейцеданин из корней и семян горчичника



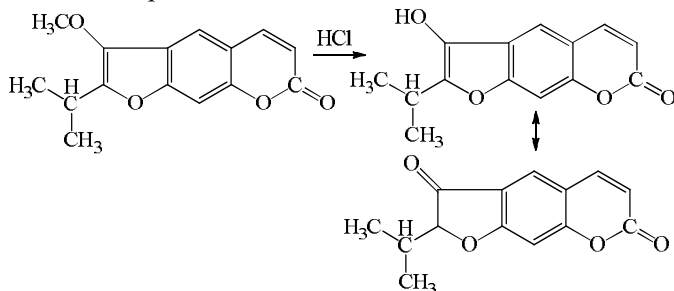
Выделение. 50 г измельченных корней горчичника заливают 300 мл спирта, периодически перемешивают и оставляют на ночь. Фильтруют, спирт отгоняют на роторном испарителе до 30-40 мл, добавляют двойной объем воды и оставляют на холоду на ночь. Выделившийся осадок отфильтровывают, высушивают.

Сухой остаток обрабатывают порциями горячим петролевым эфиром (300 мл), фильтруют и оставляют на ночь.

Выпавший желтый осадок отсасывают, сушат, кристаллизуют из петролевого эфира или хлороформа. $T_{\text{пл}} 102-103^\circ\text{C}$.

Модификация.

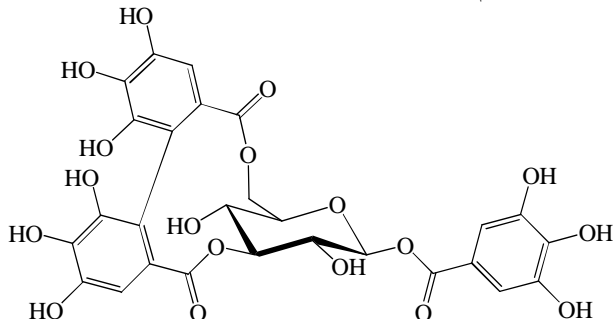
А. В колбу на 100 мл помещают 1 г пейцеданина, добавляют 50 мл спирта, нагревают на водяной бане до растворения осадка, охлаждают, добавляют 5 мл конц. HCl , нагревают 5 минут, выпадает осадок ореозелона с $T_{\text{пл}} 177^\circ\text{C}$.



В. 0,1 г ореозелона растворяют в 5 мл спирта, добавляют (0,3 г в 1 мл воды) раствор солянокислого гидросиламина и нагревают на водяной бане с обратным холодильником 1 час. Образующийся оксим желто-зеленого цвета извлекают эфиром.

Дубильные вещества различают по цвету растворов или осадков от действия раствора железоаммониевых квасцов (ЖАК). Гидролизуемые дубильные вещества дают от серого до черного, конденсированные – черно-зеленое окрашивание.

Танин и галловая кислота из щавеля



А. Выделение танина. 100 г измельченных корней щавеля заливают водой и нагревают 2 часа на водяной бане при температуре 60⁰С, настаивают 2-3 часа. Извлечение сливают, добавляют 30 г NaCl и экстрагируют 200 мл смеси этилацетат-этанол или бутилацетат-бутанол 3:1.

Органический экстракт разбавляют равным количеством воды, насыщают CO₂, растворители отгоняют на кипящей водяной бане. Вязкую массу переносят в фарфоровую чашку и высушивают в вакуум-эксикаторе.

В. Получение галловой кислоты. 4 г танина в 40 мл 50% H₂SO₄ нагревают на кипящей водяной бане 4-5 часов. Охлаждают и экстрагируют 3-4 раза эфиром. Эфирное извлечение сушат Na₂SO₄, отгоняют эфир. T_{пл} 220-222⁰С.

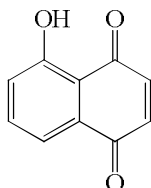
Идентификация. 1. БХ при наличии CO.

2. К водному раствору галловой кислоты прибавляют несколько капель FeCl₃ → темно-синее окрашивание.

3. От нагревания крупинки галловой кислоты с 1 мл конц. H₂SO₄ → рубиновое окрашивание.

Все **хиноны и карбонилсодержащие соединения** (бензо-, нафто-, антрахиноны, ксантоны, флавоны) дают желтое окрашивание с NH_3 и AlCl_3 (отдельные пробы или совместное действие), осадки с AlCl_3 и H_3BO_3 (комплексы или хелаты), красное окрашивание с NaOH (фенольные OH). «Хингидронная» проба (на п-хиноны).

Юглон из кожуры грецких орехов



Выделение. 50 г измельченной кожуры грецких орехов заливают 25 мл 10% H_2SO_4 , нагревают в колбе с обратным холодильником 4-5 часов, выдерживают ночь, экстрагируют 3-4 раза порциями петролейного эфира. К объединенному эфирному извлечению добавляют FeCl_3 (или KMnO_4), перемешивают и выдерживают при температуре $40-50^\circ\text{C}$ 2 часа. Фильтруют, эфир отгоняют. Желтовато-оранжевый остаток юглон, $T_{\text{пл}} 154-155^\circ\text{C}$.

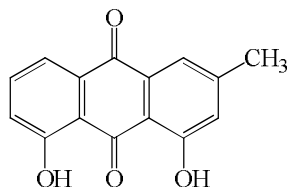
*Для очистки юглон кристаллизуют из петролейного эфира с углем или сублимируют, $T_{\text{пл}} 163^\circ\text{C}$.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO .

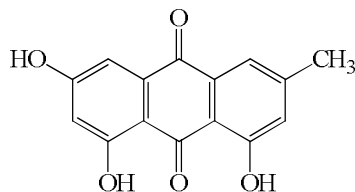
2. Хингидронная проба \rightarrow коричневое окрашивание, муть или осадок.

3. ИК (KBr): OH -фенольная ($>3000 \text{ см}^{-1}$), $\text{C}=\text{O}$ (хинон) $1660-1680 \text{ см}^{-1}$.

Хризофановая кислота и эмодин из щавеля или ревеня



Хризофановая кислота



Эмодин

Выделение. Мелко измельченные корни щавеля или ревеня (100 г) заливают 300 мл смеси бензол-спирт 10:1, настаивают 1 час, перемешивают, добавляют еще небольшое количество экстрагента и нагревают 2 часа на кипящей водяной бане. Фильтруют, обрабатывают в делительной воронке 10% раствором NaOH. Красный щелочной слой отделяют и подкисляют 20% H₂SO₄ до кислой реакции, цвет раствора меняется на желтый, его экстрагируют бензолом, сушат Na₂SO₄, концентрируют.

Очистку и разделение компонентов суммы проводят на колонке MgCO₃ (верхняя зона-эмодин, нижняя-хризофанол).

Зоны можно элюировать бензолом или вытолкнуть из колонки слой в стаканчики, залить диоксаном или смесью бензол-спирт 1:1. Извлечения отфильтровать от сорбента, концентрировать. T_{пл} хризофанолола 194-195⁰C, эмодина – 254-256⁰C.

Идентификация. 1. БХ при наличии СО хризофанолола и эмодина.

2. Хризофанол не растворим в 3-5% растворах NaHCO₃, эмодин растворим с розовым окрашиванием.

3. ИК (KBr) – эмодин отличает единичный сигнал β–ОН группы (3030-3050 см⁻¹).

* **Из любого антрацен-содержащего сырья** (щавели, ревени, марена, подмаренники, крушины, александрийский лист, сenna, алоэ и др.) производные антрахинонов получают по схеме: сырье → измельченное сырье → изопропиловый спирт (агликоны + гликозиды) → бензол (агликоны) → водное извлечение (полисахара, гликозиды) → +1:4 этанол → в осадке полисахара, в растворе – агликоны антрахинонов → разделение агликонов на колонке с MgCO₃ → индивидуальные агликоны.

Флавоноиды (рутин в том числе) отличаются степенью окисленности среднего гетерокольца, числом и разнообразием расположения ОН-групп.

У ксантонов, антрахинонов и кумаринов разнообразие связано с числом и расположением ОН и других заместителей.

Флавоноиды отличает от ксантонов характер конденсации третьего ароматического кольца.

Как уже отмечалось выше, в растительном сырье могут быть различные типы флавоноидных соединений, агликоны, гликозиды,

отличающиеся степенью окисленности колец и связанной с этим различной растворимостью в спиртах, водно-спиртовых растворах, ацетоне, водно-ацетоновых смесях и других растворителях.

Для выбора более или менее селективного метода извлечения флавоноидов, целесообразен предварительный качественный химический или хроматографический анализ компонентного или группового состава веществ в анализируемом объекте и разделение на группы.

Реакции флавоноидов, позволяющие определить положение некоторых гидроксильных групп

Реактив Вильсона: 0,5 г борной кислоты и 0,5 г безводной лимонной кислоты растворяют в 20 мл безводного этанола. Хроматограмму обрабатывают реактивом и сушат при 100-110⁰С в течение 10-15 минут. Зелено-желтая флуоресценция указывает на наличие 5-окси- и 5-метоксифлавонов и 5-окси- и 5-метокси-флавононов; желтая флуоресценция - на присутствие 5-окси- и 5-метоксихалконов.

Реактив Димрота: насыщ. раствор борной кислоты в укусном ангидриде. Хроматограмму обрабатывают реактивом и сушат при 100-110⁰С в течение 10 минут. Желтая или оранжевая флуоресценция указывает на присутствие 5-оксифлавонолов и их метиловых эфиров.

Укусный ангидрид. Пятна флавоноидов элюируют этанолом и к элюату добавляют укусный ангидрид. Голубая флуоресценция указывает на наличие метоксильной группы в положении 5.

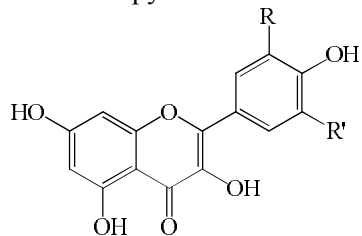
2% раствор хлорокиси циркония в этаноле. 1. Хроматограмму обрабатывают реактивом. Желтая окраска указывает на присутствие 5-оксифлавонов и 5-оксифлавонолов, зеленая флуоресценция указывает на наличие 5-оксифлавонолов. 2. Пятна, имеющие после обработки хлорокисью циркония желтую окраску, вырезают и обрабатывают 5% водным раствором лимонной кислоты, пятна, обесцвеченные после обработки раствором лимонной кислоты, подвергаются двухминутному воздействию паров горячей 25% HCl. Исчезновение желтой окраски или зелено-желтой флуоресценции указывает на присутствие 3-гликозидов флавонолов, этерифицированных в положении 3 флавонолов, 5-оксифлавонов. Если желтая окраска не исчезает, то это указывает

на наличие свободного гидроксила в положении 3. Появление желтой флуоресценции - на наличие 3-гликозидов флавонолов, подвергшихся гидролизу.

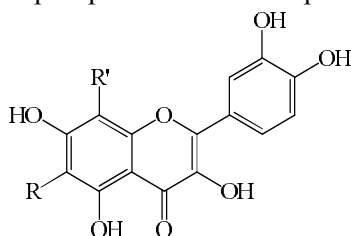
Раствор свежеприготовленного диазотированного сульфаниламида: к 1 мл 0,5% раствора белого стрептоцида в 10% серной кислоте добавляют 0,2% раствора NaNO_2 . 1. Пятна флавоноидов вырезают, смачивают 10% раствором щелочи и свежеприготовленным раствором диазотированного сульфаниламида. Оранжево-красная окраска, появляющаяся тотчас, указывает на присутствие 7-оксифлавонов, 7-оксифлавонолов и 7-оксиизофлавонов. Оранжевая или красная окраска, появляющаяся через 1-2 минуты, объясняется наличием 7-оксифлавононов. 2. При отрицательной реакции, пятна флавоноидов обрабатываются 2-3 мин. парами горячей 25% HCl , затем диазотированного сульфаниламида и щелочи. Появление оранжево-красной окраски указывает на наличие 7-гликозидов, подвергшихся гидролизу.

* Т.к. в реакцию азосочетания вступает ряд фенольных соединений, то эту реакцию выполняют после установления типа флавоноида. Помимо 7-гликозидов, отрицательную реакцию могут давать 7-оксифлавоноиды, имеющие заместители в положении 8, например С-гликозиды (аллиарозиды, витексин, ориентин и др.), но они после обработки HCl гидролизу не подвергаются.

Флавонолы, отличающиеся от флавонов наличием гидроксильной группы в положении 3, распространены очень широко:



Кемпферол ($\text{R}=\text{R}'=\text{H}$)
 Кверцетин ($\text{R}=\text{OH}$; $\text{R}'=\text{H}$)
 Изорамнетин ($\text{R}=\text{OCH}_3$; $\text{R}'=\text{H}$)
 Мирицетин ($\text{R}=\text{R}'=\text{OH}$)



Кверцетагетин ($\text{R}=\text{OH}$; $\text{R}'=\text{H}$)
 Госсипетин ($\text{R}=\text{H}$; $\text{R}'=\text{OH}$)

Для хроматографического анализа флавонов, флавонолов и их гликозидов наиболее часто применяются следующие системы

растворителей: н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5); 2% уксусная кислота; 15% уксусная кислота; этилацетат, насыщенный водой; фенол-вода (73:27 по весу)

В водных системах растворителей агликоны флавонов и флавонолов неподвижны, в то время как гликозиды движутся в зависимости от количества и природы сахарных остатков - дигликозиды более подвижны, чем моногликозиды, 7-гликозиды менее подвижны, чем 3-гликозиды.

Сумма флавоноидов из соцветий пижмы

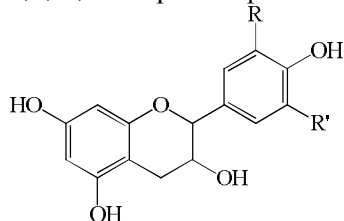
Выделение. Измельченное сырье экстрагируют в аппарате Сокслета хлороформом в течение 3 часов при нагревании. Извлечение фильтруют, к сырью добавляют спирт 70% и экстрагируют еще 3 часа. Спиртовое извлечение фильтруют, фильтрат отгоняют досуха. Остаток 3 раза обрабатывают этилацетатом. Объединенные этилацетатные извлечения концентрируют в вакууме досуха.

Идентификация. 1. БХ при наличии CO.

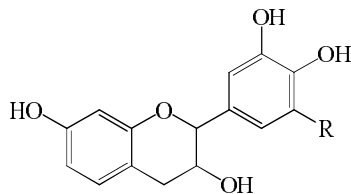
2. Добавление спиртового раствора $AlCl_3 \rightarrow$ желтый осадок. Цвет усиливается от добавления NH_3 .

3. УФ: λ_{max} 330нм.

Флаван-3-олы (катехины) – оптически активные вещества. Из флаван-3-олов наиболее широко распространены стереоизомеры 3,5,7,3',4'-пентаоксифлаван - (+)-катехин и (-)-эпикатехин и реже 3,5,7,3',4',5'-гексаоксифлаван, 3,5,7,4'-тетраоксифлаван, 3,7,3',4'-тетраоксифлаван и 3,7,3',4',5'-пентаоксифлаван.

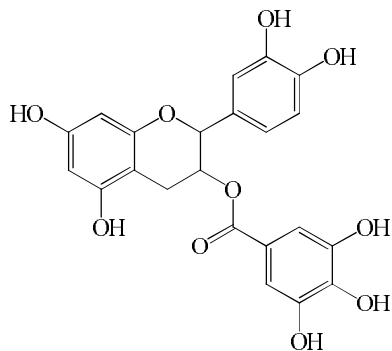


катехин ($R=OH$; $R'=H$)
галлокатехин ($R=R'=OH$)
афцелехин ($R=R'=H$)



физетинидол ($R=H$)
робинетинидол ($R=OH$)

В растениях они встречаются либо в свободном виде, либо в виде галлатов:



либо (что очень редко) в виде гликозидов.

Обнаружение. Измельченное сырье залить этилацетатом. После настаивания в течение одного часа экстракт слить. Нанести капилляром на фильтровальную или хроматографическую бумагу и проявить ванилиновым реактивом. В присутствии флаван-3-олов развивается красная окраска. Реакция не специфична, так как окрашивание вызывается образованием иона карбония при действии ванилина в кислой среде на соединения, содержащие 1,3,5-триоксигруппы. Эту реакцию дают и флаван-3,4-диолы.

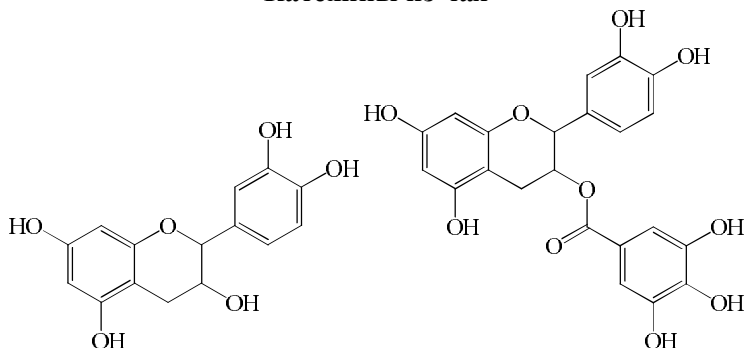
Более точная идентификация катехинов и их отличие от флаван-3,4-диолов могут быть достигнуты хроматографическим анализом в следующих системах растворителей: н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), верхняя фаза или (40:12,5:29); уксусная кислота 2% или 6%

Проявление проводят просматриванием хроматограмм в УФ-свете и опрыскиванием реактивами: солями железа (1% раствор $FeCl_3$ или железоаммониевых квасцов). Катехины, содержащие в кольце две орто-оксигруппы, проявляются в виде зеленых пятен, катехины с тремя рядовыми оксигруппами - синих. 2) С 1% раствором ванилина в конц. соляной кислоте образуется оранжево-красная окраска у катехинов, красная - галлокатехинов, розовая - эфиров катехинов. 3) Диазотированная сульфаниловая кислота проявляет катехины в виде оранжево-красных пятен, диазотированный п-нитроанилин - оранжевых.

Хроматография катехинов в тонком слое проводится на

силикагеле Г в системе хлороформ-этилацетат-муравьиная кислота (50:40:10). Примерные величины R_f : эпигаллокатехин – 0.14, эпикатехин – 0.23, галловая кислота – 0.37.

Катехины из чая



Катехины чая – негидролизующиеся дубильные вещества. При нагревании с разбавленными кислотами они дают нерастворимые флобафены. Содержание танидов в зеленом чае 22-24%, в черном чае – 14-17% от сухой массы.

Выделение. 50 г измельченных листьев зеленого чая в конической колбе заливают 150-200 мл горячей воды и нагревают 1 час на кипящей водяной бане, охлаждают, фильтруют (можно этот процесс повторить дважды). К водному извлечению добавляют ацетат свинца, перемешивают; темный осадок таната свинца обрабатывают 1% раствором H_2SO_4 до кислой реакции (индикатор).

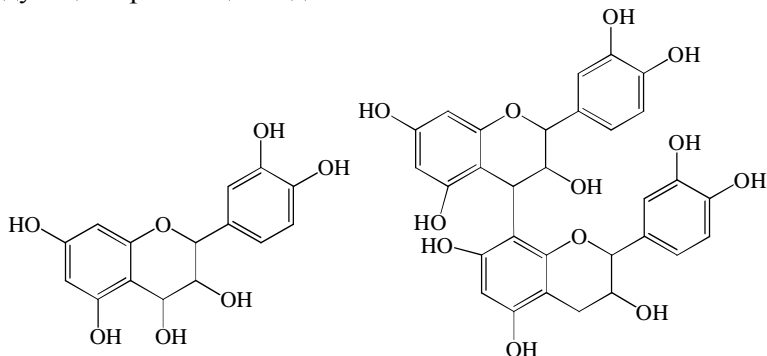
Сульфат свинца отфильтровывают. Раствор дважды обрабатывают этилацетатом порциями по 10-15 мл. Этилацетат отгоняют на водяной бане, остаток высушивают.

Идентификация. 1. Продукт растворяют в воде, добавляют:

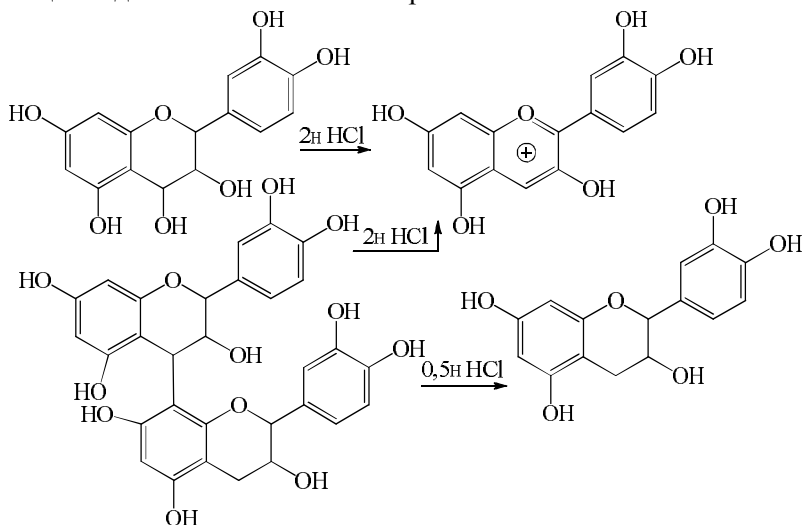
- Раствор $FeCl_3$ → зелено-черное окрашивание;
- Раствор ванилина в HCl → малиновое окрашивание;
- Капля конц. HCl → красный осадок флобафена, при стоянии → коричневый.

2. Двумерная БХ: БУВ 40:12,5:29 / 2% CH_3COOH , проявитель – 1% раствор ЖАК. Катехины – зеленое окрашивание, катехингаллат – синее.

Проантоцианидины - бесцветные флавоноиды, способные при нагревании в кислой среде превращаться в красители - антоцианидины. Этим свойством обладают мономерные флаван-3,4-диолы, димеры флаванов с С₄-С₈-формой связи и поликонденсированные флаваны. Наиболее широко распространены следующие проантоцианидины:

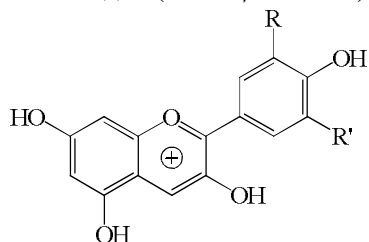


Обнаружение. 2 мл спиртового экстракта или 5 г сухого сырья нагреть 20 минут на кипящей водяной бане с 2н HCl в этаноле в колбе с обратным холодильником. После охлаждения спиртовый экстракт разбавить водой и проэкстрагировать образовавшиеся антоцианидины изоамиловым спиртом.



Различить мономерные флаван-3,4-диолы, димеры и поликонденсированные флаваны можно по положению на хроматограмме: высокомолекулярные флаваны образуют дорожки от точки нанесения по движению водных систем в зависимости от молекулярного веса - чем ниже мол. вес, тем выше продвигается фронт дорожки. Наиболее высокомолекулярные флаваны остаются в точке нанесения или несколько сдвигаются в направлении движения БУВ. Флаван-3,4-диолы в 2% уксусной кислоте располагаются выше соответствующих катехинов. Все флаван-3,4-диолы имеют в БУВ значения R_f ниже 0.5, а в 2% уксусной кислоте - от 0.47 до 0.55. Димерные флаваны располагаются выше флаваи-3,4-диолов в водных системах (0.45-0.70), и подобно им в БУВ (0.14-0.50).

В растениях *соли флавилия* встречаются обычно в виде гликозидов (*антоцианинов*). Основными агликонами являются:



Пеларгонидин ($R=R'=H$)
 Цианидин ($R=OH$; $R'=H$)
 Пеонидин ($R=OCH_3$; $R'=H$)
 Дельфинидин ($R=R'=OH$)
 Петунидин ($R=OH$; $R'=OCH_3$)
 Мальвидин ($R=R'=OCH_3$)

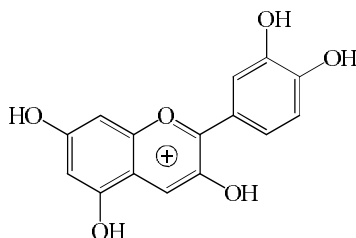
Обнаружение. В большинстве случаев о присутствии антоцианов можно судить по красной или синей окраске растительных тканей. Красно-оранжевая, коричневая или "черная" окраска лепестков обычно является следствием наличия смеси антоцианов и пигментов флавоноидного или каротиноидного типа, которые образуют "фон". Выдерживание тканей, содержащих антоцианы, в парах аммиака приводит к изменению окраски на фиолетовую или синюю. Если антоцианы сопровождаются флавонами, то пары аммиака вызывают появление зелено-синей или чисто зеленой окраски.

Выделяют антоцианы из цветков и плодов обработкой сырья 1% раствором HCl в этаноле, методом настаивания в течение 1-3 суток. Полученное извлечение разбавляют трехкратным количеством воды и извлекают антоцианы изоамиловым спиртом.

В случае присутствия солей флавилия, спиртовый раствор окрашивается в красный цвет. Отделяют спиртовый слой. При действии 10% раствора щелочи наблюдается переход окраски в синюю или зеленую. При подкислении раствора, красная окраска восстанавливается. Более точное определение антоцианов производится хроматографированием на бумаге в системах растворителей: уксусная кислота-соляная кислота-вода (5:1:5), (30:3:10) или (15:3:82); 2н соляная кислота; изоамиловый спирт-36% соляная кислота-вода (5:1:1); бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), верхняя фаза.

Антоцианы можно наблюдать на хроматограммах непосредственно в виде красных пятен.

Антоцианидины из лепестков розы или пиона



Выделение. 50 г измельченных сухих лепестков розы или пиона заливают 100 мл 1% раствора HCl в спирте, настаивают сутки. Извлечение фильтруют, концентрируют при температуре 35-40⁰С под вакуумом. Остаток разбавляют равным объемом 20% HCl, спирт отгоняют на водяной бане. Проходит гидролиз гликозидов, агликаны из этого раствора извлекают изоамиловым спиртом. Краситель можно осаждать петролейным эфиром.

*Отделять от сопутствующих веществ можно на колонке целлюлозы элюируя примеси смесью уксусная кислота-соляная кислота-вода 5:1:5, а красители - спиртовым раствором HCl.

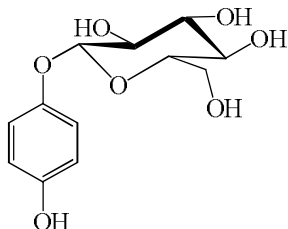
Идентификация. 1. БХ при наличии СО.

2. Добавляют 1-3 мл 10% раствора кислоты щавелевой в смеси ацетон-вода 1:1 → яркое окрашивание.

2.7. Гликозиды различных типов

Гликозиды – это сложные вещества, состоящие из любых по природе агликонов и углеводов. Многообразие гликозидов связано с многообразием агликонов и углеводных фрагментов. По химической природе все гликозиды имеют С-О-С, С-С, реже С-N, С-N-С, С-S-С связи. Поэтому основное химическое свойство – гидролиз (составные части молекул).

Арбутин из листьев или плодов бадана



Выделение. 100 г измельченных листьев или корней бадана медленно вносят в 200 мл кипящей воды и кипятят 40-50 минут, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме до небольшого объема, оставляют в холодильнике на кристаллизацию.

После суток стояния, застывшую массу промывают 50 мл смеси спирт-эфир (4:1), затем холодной водой, высушивают светло-серый порошок, $T_{пл} 195^{\circ}C$.

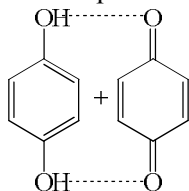
Идентификация. 1. БХ при наличии CO .

2. От добавления $FeCl_3 \rightarrow$ синее окрашивание.

Модификация. Навеску арбутина кипятят 15-20 минут с 1% H_2SO_4 , охлаждают. При стоянии из холодного гидролизата кристаллизуется гидрохинон. $T_{пл} 170^{\circ}C$.

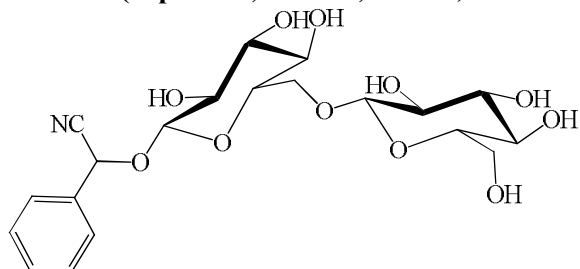
Идентификация продуктов. 1. БХ при наличии CO .

2. Хингидронная проба \rightarrow коричневый осадок (гидрохинон).



3. ИК-спектр (КВг) – ароматика, фенольные OH

**Амигдалин из плодов (косточек) миндаля или персика
(абрикоса, вишни, сливы)**

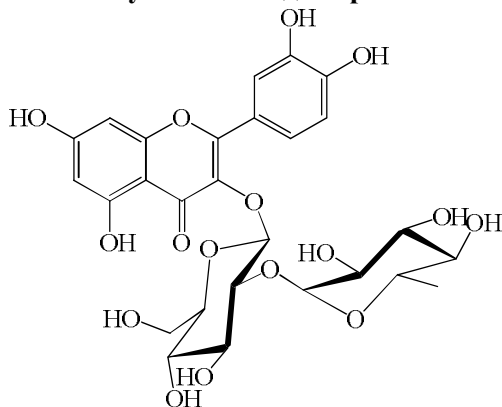


Выделение. Косточковые плоды (200 г) на 2-3 минуты засыпают в кипящую воду, снимают оболочку, измельчают и кипятят в 100 мл 90% спирта в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Извлечение сливают (при необходимости фильтруют) и упаривают в вакууме до 10-15 мл, охлаждают и приливают равный объем эфира, осаждается амигдалин. Его отфильтровывают, промывают 50 мл эфира, оставляют сушить. $T_{пл} 200^{\circ}C$.

Идентификация. 1. БХ в сравнении с СО (при наличии).

2. ИК (KBr) $700-1500\text{ см}^{-1}$, C-O-C – $1000-1100\text{ см}^{-1}$, $C\equiv N$, CH, OH (углевод).

Рутин из плодов гречихи



Флавоноидный гликозид (рутинозид кверцетина), витамин Р.

Выделение. 50 г измельченных плодов гречихи в аппарате Сокслета или в круглодонной колбе с обратным холодильником заливают 100 мл 70% спирта этилового, нагревают в течение 2 часов. Спиртовое извлечение фильтруют и отгоняют на водяной бане под вакуумом почти досуха. Остаток дважды обрабатывают эфиром по 10 мл. После испарения эфира, рутин извлекают кипящей водой 2 раза по 20 мл, фильтруют и оставляют на кристаллизацию (желтые иглы).

Идентификация. 1. БХ в присутствии CO (при наличии).

2. К 1 мл раствора рутина добавляют 0.1 мл 10% раствора FeCl_3 , появляется темно-зеленое окрашивание, после добавления 0.1 мл 8% NaOH → красно-коричневое окрашивание.

3. К раствору 10 мг рутина в 5 мл этанола добавляют 1 г цинка и 2 мл 25% раствора HCl . В течение нескольких минут появляется красное окрашивание.

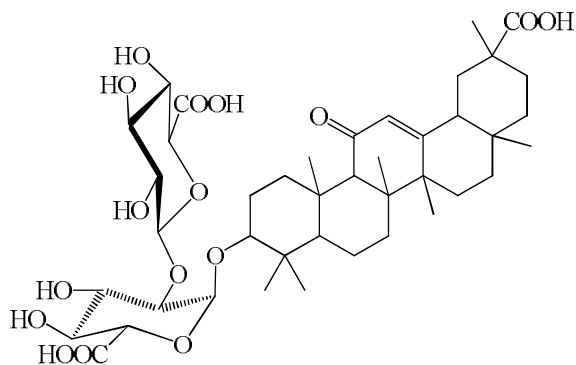
Модификация. Поскольку рутин - гликозид, его можно гидролизовать. 0,4 г рутина растворяют в 2 мл спирта, добавляют 20 мл 1% HCl и выдерживают при температуре $35-40^\circ\text{C}$. После длительного стояния выпадают кристаллы кверцетина.

Идентификация продуктов. 1. БХ при наличии CO .

2. Восстанавливает раствор $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ (углеводы).

3. Восстанавливает раствор Фелинга при нагревании (углеводы).

Глицирризиновая кислота из солодки



Выделение. Измельченные корни солодки (100 г) заливают пятикратным количеством воды и нагревают 5-6 часов при кипении воды. Водное извлечение сливают и кипятят до коагуляции белковых веществ.

Охлаждают смесь, фильтруют, фильтрат упаривают на водяной бане до объема 25-30 мл, охлаждают. Неочищенную глицирризиновую кислоту в круглодонной колбе с обратным холодильником нагревают со 100 мл ацетона 3 часа. Экстракт охлаждают, фильтруют, при необходимости кристаллизуют с активированным углем.

Идентификация. 1. Проба на пенообразование.

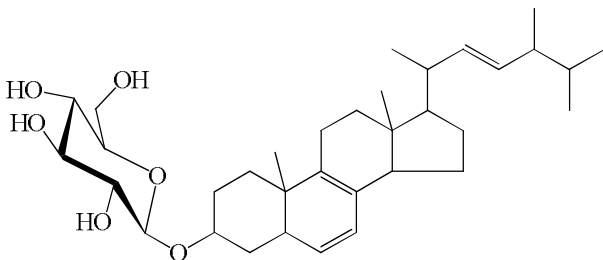
2. При добавлении нескольких капель 1% свинца ацетата среднего появляется осадок.

3. БХ, проявитель 25% спиртовый раствор кислоты фосфорновольфрамовой – малиновое окрашивание, от фосфорномолибденовой – темно-синее окрашивание.

4. ЖЖХ с УФ-детектором при наличии СО.

Модификация. Ацетоновый фильтрат подщелачивают при перемешивании спиртовым раствором КОН (2 г в 16 мл) до слабо щелочной реакции, выпадает осадок трикальевой соли глицирризиновой кислоты. Ее отделяют, промывают на фильтре небольшим количеством ацетона, высушивают, растирают в порошок.

Эргостерин из дрожжей



Выделение. В круглодонную колбу с воздушным холодильником наливают раствор 100 г NaOH в 300 мл воды, всыпают 100 г дрожжей и кипятят 5 часов при перемешивании.

Густую массу гидролизата охлаждают и обрабатывают 100 мл эфира. Эфирный слой отделяют и отгоняют на водяной бане. Отгон эфира повторно используют для извлечения эргостерина.

После отгонки эфира, эргостерин растворяют в 100 мл спирта, охлаждают до -5°C . Выпавшие кристаллы отсасывают, сушат. При необходимости кристаллизуют из смеси спирт-бензол 1:1 с активированным углем. $[\alpha]_{\text{D}} -135^{\circ}$ (CHCl_3).

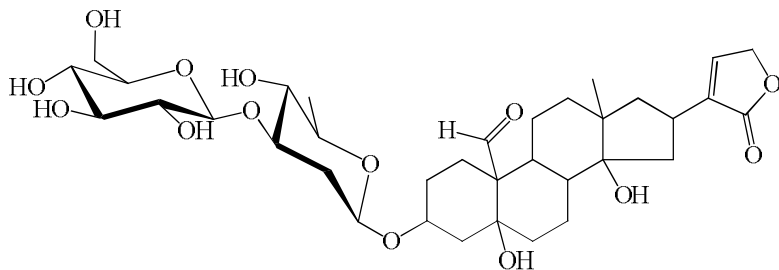
Идентификация. 1. Обесцвечивание раствора KMnO_4 ($\text{C}=\text{C}$).

2. С хлоридом сурьмы в $\text{CHCl}_3 \rightarrow$ фиолетовое окрашивание.

3. ИК-спектр (KBr) – все структурные элементы без карбоциклов.

4. РСА кристаллов (карбоциклы, валентные углы, длины связей).

Олиторизид из семян джута или строфанта



Вещество относится к группе сердечных гликозидов (дигиталиса - строфанта). Агликон – строфантидин. Углеводы - D-глюкоза и D-бонвиноза.

Выделение. Тонко размолотые семена джута (100 г) заливают 200 мл дихлорэтана и настаивают 10-12 часов (обезжиривание).

Сырье высушивают и экстрагируют 80% спиртом 3-5 раз по 2 часа при нагревании на водяной бане. Объединенные извлечения упаривают под вакуумом на бане при температуре $40-45^{\circ}\text{C}$ до густого сиропа и разбавляют двукратным объемом ацетона; осаждается липкая масса, а светлый экстракт сливают. Для осаждения примесей к экстракту добавляют небольшими порциями 40% раствор ацетата свинца. Выпавший осадок отделяют и промывают спиртом. Для удаления возможного

избытка ионов свинца добавляют 10% раствор Na_2SO_4 . Через несколько часов раствор фильтруют и упаривают до 30-40 мл. густой светло-коричневый остаток оставляют в термостате при 35-37 $^{\circ}\text{C}$ на несколько суток. Олигосахарид выпадает в виде мелких слипшихся кристаллов, их отделяют и сушат. При необходимости кристаллизуют из смеси 4 мл спирта + 15 мл воды.

Кристаллы фильтруют, растворяют в 2-3 мл спирта и 15-20 мл эфира и оставляют на кристаллизацию. $T_{\text{пл}}$ 202-204 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}-4,5^{\circ}$.

Идентификация. 1. Проба Легалья (1% раствор нитропруссиды натрия и 1-2 капли 10% KOH → красное окрашивание) – лактонное кольцо.

2. На часовом стекле от добавления нескольких капель конц. H_2SO_4 → зеленое окрашивание.

Модификация. Все гликозиды подвергаются гидролизу на составляющие фрагменты. 0,5 г олигосахарида растворяют в 2 мл спирта, добавляют 20 мл 0,1 н H_2SO_4 . Смесь выдерживают при 35-40 $^{\circ}\text{C}$ 4-5 часов. После стояния выпадают кристаллы строфантина. Его отфильтровывают, промывают водой до нейтральной реакции, сушат. При необходимости кристаллизуют из спирта. $T_{\text{пл}}$ 156-157 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}+40^{\circ}$.

Количественное определение суммы гликозидов в растениях

10 г сухого сырья 3 раза экстрагируют в колбе с обратным холодильником трехкратным количеством 96% этанола на кипящей водяной бане. Полученные извлечения объединяют и концентрируют до сиропообразного остатка. Полученный остаток растворяют в небольшом количестве горячей воды для осаждения балластных веществ, прибавляют раствор основного ацетата свинца, доводят объем водой до 25 мл и центрифугируют.

Из полученной надосадочной жидкости отбирают 20 мл (что соответствует 8 г материала), для удаления ионов свинца, добавляют насыщенный раствор фосфата натрия, доводят объем до 24 мл и снова центрифугируют.

Отбирают 15 мл надосадочной жидкости (5 г материала), помещают в делительную воронку и извлекают 1:5 объемом смеси хлороформ-этанол 2:1. Спиртово-хлороформные извлечения

концентрируют, остаток обрабатывают 3-4 мл CCl_4 , фильтруют. Осадок на фильтре высушивают при $70-80^\circ\text{C}$ и взвешивают.

* Вместо смеси хлороформ-спирт, можно использовать смесь CCl_4 -спирт в том же соотношении.

Количественное определение суммы сердечных гликозидов в сырье

25 г свежих листьев экстрагируют абсолютным, а затем 70% этанолом. Объединенные извлечения концентрируют под вакуумом при $50-60^\circ\text{C}$ до удаления спирта. Водный остаток реэкстрагируют CCl_4 , а затем гликозиды извлекают смесью изопропиловый спирт-хлороформ 1:3. Спиртово-хлороформное извлечение концентрируют под вакуумом, остаток сушат при 50°C и взвешивают.

Количественный анализ стероидных гликозидов в сырье (тигогенин)

100 г сухих листьев измельчают, обезжиривают хлороформом или петролейным эфиром. После удаления растворителя сырье гидролизуют 4н H_2SO_4 в присутствии 5% бутанола на кипящей водяной бане в течение 3 часов.

Охлаждают, фильтруют, промывают водой и нейтрализуют 5% раствором Na_2CO_3 . Осадок высушивают и экстрагируют петролейным эфиром в аппарате Сокслета.

Петролейно-эфирное извлечение концентрируют, осадок промывают холодным петролейным эфиром, высушивают, взвешивают.

Общие методы выделения гликозидов из растительного сырья

Экстракцию *сердечных гликозидов* из растительного сырья, чаще всего, проводят метиловым или этиловым спиртами (70-80%). Полученное извлечение подвергают очистке от сопутствующих веществ. Для этого, упаренное под вакуумом (50°C) спиртовое извлечение подвергают многократной обработке

органическими растворителями, чаще всего четыреххлористым углеродом, до полного удаления сопутствующих веществ или же применяют сорбционные методы очистки, используя оксид алюминия, нанесенный на стеклянные фильтры.

Разделение суммы сердечных гликозидов проводят, чаще всего, на хроматографических колонках, заполненных сорбентами (оксид алюминия, силикагель). В дальнейшем нужные зоны элюируют определенными растворителями. Так, для нативных гликозидов наперстянки элюирование проводят смесью хлороформа с изопропиловым спиртом (3:1). Полученные элюаты выпаривают под вакуумом досуха при 50⁰С, затем проводят перекристаллизацию до получения индивидуально чистых веществ.

Феноловые гликозиды извлекают из растительного материала двух-, трехкратной экстракцией этиловым и метиловым спиртами (96, 70 и 40%) либо водой при температуре 70-80⁰С. Очистку спиртовых извлечений ведут общепринятым для гликозидов способом. Метод включает следующие стадии: фильтрация и сепарирование извлечения, осаждение полифенолов раствором свинца ацетата, отделение осадка, упаривание фильтрата, двукратную экстракцию сухого остатка спиртом этиловым 96%, упаривание спиртового экстракта и обработку маслянистого остатка смесью хлороформ - этанол и кристаллизацию целевого гликозида из этой смеси.

Выделение производных **флороглюцина** из растительного сырья проводят экстракцией различными органическими растворителями: этиловым эфиром, хлороформом, ацетоном, этиловым и метиловым спиртами. Получаемый после отгонки растворителя густой экстракт обрабатывают водным раствором гидроксида бария, оксида магния и т.д., в результате чего флороглюциды переходят в феноляты.

Водные растворы затем подкисляют концентрированными хлороводородной, серной или уксусной кислотами, при этом в осадок выпадает сумма флороглюцидов, называемая сырым филицином.

Выделение индивидуальных гликозидов, проводят, как правило, методом адсорбционной хроматографии на полиамиде, силикагеле, целлюлозе. В качестве элюирующих смесей

используются вода и водный спирт, если адсорбентом служит полиамид или целлюлоза, либо различные смеси органических растворителей для всех перечисленных адсорбентов.

Гликозиды флавоноидов, антрахинонов, кумаринов и ксантонов извлекают водно-органическими растворителями при нагревании. Отделение от сопутствующих веществ проводят методами осаждения, бумажной, адсорбционной или тонкослойной хроматографией с последующим элюированием гликозидов водой, затем водно-спиртовыми смесями различной концентрации.

3. АНАЛИЗ ЛЮБОГО ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ

- | | | |
|---|------------------------------------|---|
| 1 | Растворимость в воде и рН раствора | В воде растворимы вещества, содержащие ОН-группы (спирты, полисахара, все углеводы – рН нейтральная), фенолы ограниченно (рН-слабокислая), окси-, феноло-, amino- и все другие кислоты (рН-нейтральная для аминокислот, кислые для всех других кислот), ограниченная растворимость, рН-основные – амины, алкалоиды. |
| 2 | Проба сжигания | <ul style="list-style-type: none">• Без копоти – насыщенные соединения, с копотью – ненасыщенные;• бурое или коричневое пламя – вещество содержит азот;• пламя искрит – вещество содержит серу;• пламя зеленого цвета – вещество содержит галогены в структуре или галогенгидраты. <p>*Полнота сгорания – вещество чистое.</p> |
| 3 | ИК-спектр (KBr) | Скелет молекулы, ненасыщенные связи, все функциональные группы. |
| 4 | Белки | <ul style="list-style-type: none">• Осаждаются солями свинца, меди и др.тяжелыми металлами (денатурация |

белка), трихлоруксусной, пикриновой, сульфосалициловой, лимонной кислотами, спиртом и танином.

- Ксантопротеиновую пробу дают все белки, триптофан и тирозин. Раствор белка нагревают с конц. азотной кислотой → бледно-желтое окрашивание; охлаждают и добавляют конц. NH_3 → оранжевое.

5 Углеводы

- Общей является реакция с реактивом Фелинга (4 г CuSO_4 в 100 мл воды, 15 г NaOH , 20 г сегнетовой соли) → оранжево-красный осадок закиси меди (редуцирующие сахара).

- Общий реактив на сахара – щелочной раствор 3,5-динитросалицилата (капля на бумаге), нагреть 5 мин до 100°C → коричневое окрашивание (0,5 г 3,5-динитросалициловой кислоты, 4 г NaOH в 100 мл воды).

- Полисахара осаждаются 3-5 кратным избытком спирта 95%.

- Крахмал со спиртовым раствором йода или с раствором йода в йодистом калии → темно-синее окрашивание.

6 Алкалоиды

- Кремневольфрамовая кислота 2% водный раствор → муть или осадок.

- Растворы некоторых двойных солей (ртутнойодистого калия – реактив Майера, висмутнойодистого калия – реактив Драгендорфа).

- Пикриновая и пикролоновая кислоты смешивают подкисленные H_2SO_4 водные растворы алкалоидов с пикриновой кислотой (ярко желтое окрашивание).

7 Гликозиды

- Реакция Легала → красное окрашивание (сердечные гликозиды).

- Реакция Келлер-Килнани → бурое окрашивание и сверху сине-зеленый или синий слой.
 - Проба на пенообразование с кислотой и со щелочью – сапонины тритерпеновые и стероидные.
 - Кислотный гидролиз – БХ.
- 8 Флавоноиды
- Прибавляют 3 капли конц. HCl+Zn пыль, подогревают. Через 5-10 минут → красное или оранжево-красное окрашивание (антоцианы).
 - C NH₃, AlCl₃ отдельно или вместе → желтое окрашивание (C=O, HO...C=O...OH).
 - Ванилин в конц. HCl или 65% H₂SO₄ → розовое окрашивание (катехины), красное, малиновое – лейкосоединения, флавоноиды, конденсированные ДВ.
 - Проба Шинода. Добавляют Mg порошок и конц. HCl → оранжевое → красное окрашивание.
 - Реакция Хайса. Добавляют 1-2 капли диазотированного п-NO₂ анилина → желтое → коричневое окрашивание.
- 9 Антрахиноны бензо-, нафто-
- Реакция Борнтрегера, от 10% спиртового NaOH → красное (1,8-диокси-), пурпурное (1,4-диокси-), фиолетовое (1,2-диокси-), красно-бурое (восстановленные формы антронов и антранолой).
 - 3% спиртовый ацетат магния – разное окрашивание в зависимости от расположения OH-групп.
 - «Хигидронная проба» с раствором гидрохинона → коричневое окрашивание.
- 10 Дубильные вещества
- Раствор ЖАК 1% - серое до черного окрашивание (гидролизуемые), а темно-зеленое (конденсированные танины).

- | | | |
|----|--------------------------|--|
| 11 | Иридоиды | <ul style="list-style-type: none"> • Сырье чернеет при хранении. Горечи. • <u>Реактив Шталя</u> (5 мл конц. HCl + 50 мл спирта + 1 г п-диметиламинобензальдегида) → сине-зеленое окрашивание. |
| 12 | Каротиноиды | <ul style="list-style-type: none"> • <u>Реакция Карра-Прайса</u>. Добавляют 2 мл раствора сурьмы хлорида в хлороформе → зеленовато-синее → бурое окрашивание. |
| 13 | Кумарины | <ul style="list-style-type: none"> • <u>«Лактонная проба»</u>. Добавляют 10 капель 10% раствора КОН в спирте, нагревают 5 мин + 10% HCl до кислой реакции → муть или осадок. |
| 14 | Фенолы,
фенолокислоты | <ul style="list-style-type: none"> • 1-3 капли <u>бромтимолового голубого</u> → желтое окрашивание. • Добавление 1-2 мл <u>2% раствора свинца ацетата основного</u> → окрашивание или осадок. • Добавляют 1-3 мл <u>1-5% раствора FeCl₃</u> → различное окрашивание. |
| 15 | Аминокислоты | <ul style="list-style-type: none"> • Добавляют 1-2 капли нингидрина → различное окрашивание (NH₂, NH). |

Литература к разделу 3

1. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Методология исследования растительных метаболитов. - Алматы: MV-Print, 2012. – 324 с.
2. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах.- Алматы: Казак университеті, 2004.- 264с.
3. Бердимуратова Г.Д., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Биологически активные вещества растений. Выделение, разделение, анализ.- Алматы: Атамұра, 2006.- 438с.
4. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Технология производства и анализ фитопрепаратов.- Алматы: Казак университеті, 2011. – 360 с.
5. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Основы химии природных соединений.- Алматы: Казак университеті, 2010.-564 с.

4. МЕДИЦИНСКИЕ РАСТЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОМИНИРУЮЩИЕ ГРУППЫ БАВ

▪ Различные углеводы (семена льна, подорожника, корни алтея, листья мать-и-мачехи, подорожника большого и блошного, цветки липы, корни салепы, абрикосовая камедь, трагокант, плоды малины, морская капуста, клубни картофеля, одуванчик, девясил, цикорий, топинамбур (инулин), цветки коровяка (4 вида)).

▪ Витамины (цветки ноготков, трава сушеницы топяной, череды, плоды рябины, тыквы, облепихи, лимон, все цитрусовые, смородина, шиповник, листья крапивы, кукурузные рыльца, трава пастушьей сумки, цветки и листья зайцегуба, плоды и кора калины, плоды моркови, аронии).

▪ Терпеноиды (розовое масло, плоды кореандра, лаванда, листья мяты перечной, шалфея, эвкалипта, плоды тмина, цветки ромашки 3 вида, ягоды можжевельника, корневище с корнями валерианы, айра, девясила, березовые почки, трава тысячелистника, побеги багульника, цветки арники (2 вида), почки тополя (4 вида), плоды аниса, фенхеля, трава тимьяна, чабреца, душицы, продукты сосны и пихты, трава Melissa, плоды укропа, камфорное дерево, шишки ели и хмеля, трава полыни горькой, цитварной, эстрагон, цветки гвоздики).

▪ Гликозиды (листья наперстянки, семена строфанта (2 вида), трава горицвета, ландыша (3 вида), желтушника (2 вида), корневище с корнями морозника, диоскореи (3 вида), заманихи, пиона трава, трава пустырника, листья трилистника, трава золототысячника, корни горечавки, одуванчика, кора обвойника, листья олеандра, корни солодки (4 вида), корневище с корнями синюхи, семена и листья каштана, корень колючелистника (4 вида), аралии, листья ортосифона, истода (2 вида), корни женьшеня трава астрагала, корневище цимицифуги, листья юкки, трава якорцев, семена пажитника, корневище с корнями левзеи).

▪ Фенолы и фенолокислоты (плоды клюквы, малины, побеги каланхоэ, листья толокнянки, брусники, листья и кора ивы, лабазник (2 вида), корневище папоротника, мхи (лишайники), пармелия, эверния (2 вида), уснея (4 вида), кладония (3 вида), корни и корневище родиолы розовой, элеутерококка, кора сирени, листья омелы, трава эхинацеи (корни и корневище), плоды

расторопши, псоралеи плоды, корни горичника, вздутоплодника, виснаги).

- Лигнаны (плоды лимонника, корни лопуха – 3 вида, корневища с корнями подофилла).

- Кумарины (трава донника (2 вида), корневище и корни вздутоплодника, плоды пастернака, псаролеи, листья и плоды инжира, плоды амми (2 вида), корни горичника (2 вида)).

- Флавоноиды (листья чая, цветки василька синего, гибискуса, бессмертника (2 вида), листья бархата, цветки и плоды боярышника (2 вида), трава зверобоя (4 вида), листья гинкго, цветки датиски, трава леспедецы (2 вида), володушки (2 вида), горца птичьего, перечного, почечуйного, цветки бузины, листья и плоды земляники, трава золотарника, хвоща, эрвы, фиалки (2 вида), корни шлемника, солодки, трава очитка, овса, плоды лимона, софоры, гречихи, створки плодов фасоли, корни стальника).

- Ксантоны (трава копеечника – 2 вида).

- Хиноны (листья грецкого ореха, листья и плоды сенны, корни ревеня, щавеля (8 видов), кора крушины (2 вида)).

- Дубильные вещества (галлы китайские, сумах, турецкие – дуб зараженный, корневище змеевика (3 вида), корни и корневище кровохлебки, корневище бадана, соплодия ольхи (2 вида), листья скумпии, сумаха дубильного (2 вида), кора дуба (2 вида), корневище лапчатки, плоды черники, черемухи (2 вида)).

- Алкалоиды (трава сферофизы, козлятника, плоды стручкового перца, трава эфедры (3 вида), клубни безвременника, трава лобелии, побеги анабазина, трава чистеца, листья и корни красавки (3 вида), листья белены, дурмана (2 вида), корневище скополии (5 видов), трава крестовника, термопсиса (3 вида), софоры, баранца, плауна (3 вида), корни ипекуаны, корневище кубышки, кора хинного дерева, плоды мордовника (2 вида), трава чистотела, листья и корни барбариса, трава мячка желтого, маклеи (2 вида), клубни стефании, листья унгернии (2 вида), коробочки мака, листья катарантуса, трава барвинка, василистника, корни раувольфии, рожки спорыньи, семена чилибухи, трава пассифлоры, осоки парвской, гармалы, семена кофе, листья чая китайского, фирмианы простой, трава аконита (2 вида), живокости (2 вида), паслена, корневище с корнями чемерицы Лобеля).

5. СЫРЬЕ, МАЛОИЗУЧЕННОЕ В ХИМИЧЕСКОМ ПЛАНЕ

- Трава аврана лекарственного (ФС 42-2358-85);
- Плоды айланта высочайшего (китайский ясень) (ФС 42-59-71);
- Листья подбела (белокопытника гибридного) (ФС 42-150-80);
- Трава живучки Лаксмана (ВФС 42-1569-80);
- Трава зопника колючего (ФС 42-1565-92);
- Корневище касатика (ирис желтый) (ФС 42-17-72);
- Листья копытня европейского (ФС 42-60-72);
- Листья мимозы стыдливой (ФС 42-64-72);
- Корни окопника жесткого (шероховатого) (ФС 42-52-72);
- Трава полыни обыкновенной (чернобыльник) (ФС 42-209-83);
- Трава сухоцвета однолетнего (ФС 42-2171-84);
- Чага (трутовник косой), березовый гриб (ФС 42-53-72);
- Трава шалфея эфиопского (ФС 42-2393-85);
- Трава лапчатки серебристой и др.

Литература к разделам 4 и 5

1. Куркин В.А. Фармакогнозия.- Самара, 2007.- 1239 с.
2. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия.- М.: Москва, 2002.- 670 с.
3. Палов М. Энциклопедия лекарственных растений.- М.: Мир, 1998.- 467с.
4. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений.- Новосибирск, 1990.- 333с.
5. Кюсев А. Полный справочник лекарственных растений.- М., 2000.- 992с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Введение	4
1	Общие методы выделения природных соединений из растительного сырья	5
	Методы анализа извлечений	6
2	Природные соединения, их выделение, идентификация, превращения	8
2.1	Углеводы и полисахара	8
	D-ксилоза из кукурузных початков	9
	D-глюкоза из целлюлозы	11
	Инулин и D-фруктоза из клубней георгина или топинамбура	13
	D-лактоза из молока	14
	D-галактоза из лактозы	15
	Мальтоза из крахмала	17
	Сахароза из сахарной свеклы	18
	Пектин из плодов цитрусовых	19
	Количественный анализ углеводов в сырье и препаратах	21
	Извлечение суммы углеводов из сырья	24
	Хроматография углеводов в тонком слое	25
	Общие приемы выделения олиго- и полисахаридов из растительного сырья	25
2.2	Органические кислоты и их производные	27
	Лимонная кислота из корочек лимона	28
	Кислота аскорбиновая из плодов винограда	29
	Щавелевая кислота из опилок	30
	D,L-яблочная кислота из яблок	30
	D-винная кислота из винограда	31
	Сумма лишайниковых кислот из пармелии	31
	Усниновая кислота из лишайника	32
	Галловая кислота из щавеля	34
	Кофейная кислота из зерен кофе	34
	Ванилиновая кислота из ванильного порошка	35
	Ванилин из подсолнечной лузги	35
	Жировые кислоты из жира и/или масла	36
	Общие приемы выделения карбоновых кислот из растительного сырья	37

2.3	Терпеноиды	38
	L-ментол из мяты перечной	40
	L-пинен из скипидара	40
	Хамазулен из горькой полыни или эвкалипта	41
	Сантонин из цитварной полыни	41
	Склареол из соцветий шалфея	42
	Урсоловая кислота из лаванды или мяты	43
	Ликопин из томатной пасты	44
	Каротин из моркови	44
	Общие методы выделения тритерпеновых гликозидов (сапонинов) из растительного сырья	45
2.4	Алкалоиды	47
	Никотин из табака	47
	Анабазин и лупинин из анабазинсульфата или анабазиса	48
	Цитизин из термопсиса	49
	Сальсолин и сальсолидин из солянки Рихтера	50
	Теобромин из какао	50
	Кофеин из чая	51
	L-эфедрин из эфедры	51
	Колхамин и колхицин из безвременника великолепного	52
	Количественное определение суммы алкалоидов в сырье	53
	Общие методы выделения алкалоидов из растительного сырья	54
2.5	Аминокислоты	55
	L-глутаминовая кислота из муки	56
	Казеин и тирозин из молока	57
	Аминокислоты из белковых веществ гороха	57
2.6	Полифенолы (кумарины, хиноны, флавоноиды, дубильные вещества)	58
	Дикумарин из донника лекарственного	59
	Кумарин и мелилотовая кислота из донника	60
	Пейцеданин из корней и семян горчичника	61
	Танин и галловая кислота из щавеля	62
	Юглон из кожуры грецких орехов	63
	Хризофановая кислота и эмодин из щавеля или ревеня	63
	Сумма флавоноидов из соцветий пижмы	67
	Катехины из чая	69
	Антоцианидины из лепестков розы или пиона	72

2.7	Гликозиды различных типов	73
	Арбутин из корней бадана	73
	Амигдалин из косточек миндаля или персика	74
	Рутин из плодов гречихи	74
	Глицирризиновая кислота из солодки	75
	Эргостерин из дрожжей	76
	Олиторизид из семян джута или строфанта	77
	Количественное определение суммы гликозидов в растениях	78
	Количественное определение суммы сердечных гликозидов в сырье	79
	Количественный анализ стероидных гликозидов в сырье	79
	Общие методы выделения гликозидов из растительного сырья	79
3	Анализ любого природного соединения	81
4	Медицинские растения, содержащие доминирующие группы БАВ	85
5	Сырье, малоизученное в химическом плане	87