**Сапонины. Антраценпроизводные. Классификация, физико-химические и**

**биологические свойства, пути использования, методы анализа**

Название этих природных соединений происходит от латинского слова “sapo” – мыло или мылоподобное. Сапонины растительного происхождения представлены в основном гликозидами и обладают рядом характерных свойств – гемолитической и поверхностной активностью и токсичностью для холоднокровных животных. В зависимости от природы агликона сапонины делятся на 2 группы: стероидные ( тетрациклические) и тритерпеновые (пентациклические). Оба типа имеют гликозидную связь у С3 и имеют сходны по биогенетическому происхождению, образуются из мевалоновой кислоты.

Термин "сапонин", или "сапонизид", был впервые предложен в 1819г. Мэлоном для вещества, выделенного Шрайдером в 1811г. из мыльнянки.  Сапонины представляют собой сложные органические соединения гликозидного характера.

При кислотном и ферментативном гидролизе сапонины расщепляются на сапогенин (агликон) и углеводную часть.

По количеству молекул моносахаридов (пентоз и гексоз) сапонины подразделяются на монозиды, биозиды, триозиды, тетразиды, пентазиды и олигозиды-при числе моноз от шести и выше. Сапонины с двумя углеводными остатками при агликоне относятся к дигликозидам.

Так как углеводная часть сапонинов чаще всего состоит из нескольких молекул моносахаридов, то гидролиз в определенных условиях может протекать ступенчато, с постепенным, отщеплением сахаров.  Образующиеся при этом продукты частичного гидролиза называются просапогенинами.

В состав углеводной части молекулы сапонинов входят следующие сахара: D-глюкоза, D-галактоза, L-рамноза, L-арабиноза, D-ксилоза, L-фруктоза, а также D-глюкуроновая и D-галактуроновая кислоты.

Стероидные сапонины менее богаты сахарами. Обычно в их состав входят 1-5 сахаров. Наиболее богаты сахарами тритерпеновые сапонины (до 10 и более).

Сапонины с 1-4 моносахаридами в воде растворяются плохо, однако с увеличением количества моносахаридов повышается растворимость сапонинов в воде.

Углеводная часть тритерпеновых сапонинов может присоединяться в одном или нескольких положениях различными связами. Моносахариды сапонинов могут присоединяться в различных положениях по гидроксильной или карбоксильной группам. Моносахариды чаще присоединяются к гидроксильной группе при углеродном атоме C3 кольца А углеродного скелета. У некоторых тритерпеновых гликозидов углеводная цепь присоединяется к углеродному атому C28 посредством О-ацетилгликозидной связи. Сахарный компонент бывает линейной и разветвленной.

Сахарные компоненты у стероидных гликозидов находятся преимущественно в положении 3, а в фуростаноловых - в положении 3 и 26. Возможно присоединение компонентов сахара и в других положениях.

Вне зависимости от биологических и физических свойств сапонины целесообразно классифицировать по структурно-химическим признакам. В зависимости от химической природы сапонины делят на 2 группы, а они в свою очередь подразделяются на несколько групп.

Стероидные сапонины спиростанового ряда относятся к группе природных гликозидов, распадающихся при гидролизе на агликоны, содержащие 27 углеродных атомов в молекуле, и моносахариды.

Известны гликозиды спиростанолового ряда или монодесмозиды с шестью циклами в агликоновой части и гликозиды фуростаноловые – бисдесмозиды, где кольцо F раскрыто.

O

H

R

R

O

O

A

B

C

D

E

F

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

1

1

1

2

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

2

4

2

5

2

6

2

7

O

H

2

6

C

H

2

O

H

O

O

A

B

C

D

E

F

Спиростаноловый тип Фуростаноловый тип

В процессе гидролиза фуростаноловых гликозидов глюкоза у С-26 отщепляется и за счет освободившейся оксигруппы происходит замыкание цикла в спирокеталь. То есть в результате гидролиза фуростаноловые гликозиды могут быть преобразованы в спиростаноловые.

Описаны стероидные сапогенины с пятичленным кольцом F и первичной гидроксильной группой у С-26, сапогенин с раскрытым кольцом Е.

В настоящее время известно 35 стероидных сапогенинов и около 150 стероидных гликозидов.

Стероидные сапонины имеют генетическую связь со стеринами, поэтому  "скваленовая" гипотеза применима и в отношении их биогенеза.

Стероидные сапонины встречаются в растениях семейств лилейных, диоскорейных, бобовых, лютиковых, норичниковых, агавовых и др.

Известно около 150 стероидных гликозидов, из них 100 спиростаноловых и 50 фуростаноловых.

Тритерпеновые сапонины являются пентациклическими или тетрациклическими терпеноидами, в которых изопреновая структурная единица (C5H8) повторяется 4 или 5 раз.

Пентациклические тритерпеновые сапонины подразделяются на 4 группы: β-амирин, α-амирин, лупеол, фриделин (серин).

A

B

C

D

E

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

2

7

2

8

3

0

2

9

O

H

O

H

3

0

2

9

 β-Амирин α-Амирин

O

H

1

9

2

1

2

2

2

9

3

0

R

O

2

4

2

5

Лупеол Фриделин R = OH

Серин R = OH

Тетрациклические агликоны подразделяют на производные даммарана (даммарандиол), циклоартан (циклоартенол), зуфана.

O

H

2

8

2

9

3

0

1

9

1

8

1

7

2

1

2

0

2

2

2

3

2

4

2

6

2

5

2

7

Циклоартенол

2

1

2

2

2

0

2

4

2

3

1

5

1

6

2

6

2

5

1

7

2

7

1

1

1

2

1

3

1

4

8

9

7

6

3

0

1

8

1

9

9

2

2

8

5

1

0

3

4

1

2

Даммаран

*Физико-химические свойства.* Тритерпеновые сапонины – это бесцветные или желтоватые вещества без четкой температуры плавления (с разложением).

У производных β-[амирина](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%90%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD&action=edit&redlink=1" \o "Амирин (страница отсутствует)), α-амирина и [лупеола](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9B%D1%83%D0%BF%D0%B5%D0%BE%D0%BB&action=edit&redlink=1" \o "Лупеол (страница отсутствует)), если имеется одна гидроксильная группа, то он находится у С-3, у фриделина в положении 3 — карбонильная группа.

Карбоксильная группа у производных β-[амирина](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%90%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD&action=edit&redlink=1" \o "Амирин (страница отсутствует)) и α-амирина чаще всего бывает у С-28 (олеаноловая и урсоловая кислота), но может быть и при других углеродных атомах.

Тритерпеновые сапонины это соединения нейтральной или кислой реакции. Кислотный характер обусловливается наличием в сапогенине карбоксильной группы или присутствием уроновых кислот в углеводном компоненте.

Кислые сапонины образуют растворимые соли с одновалентными металлами, и нерастворимые – с двухвалентными и многовалентными.

Сапогенины- это кристаллические вещества с четкой температурой плавления.

Отдельные сапогенины имеют одновременно разные функциональные группы, например, в глицерритиновой кислоте в положении C3 находится ОН, в C11-О и C30- СООН группы.

Физико-химические свойства сапонинов зависят от строения сапогенинов и углеводных компонентов. Обычно сапонины – бесцветные или желтоватые аморфные вещества без характерной температуры плавления. В кристаллическом виде получены сапонины, которые имели в своем составе 4 моносахаридных остатков. Сапонины обладают высокой поверхностной активностью, что связано с наличием в одной молекуле гидрофильной и гидрофобной группы. Прибавление этилового эфира или ацетона к спиртовым растворам сапонинов вызывает их осаждение, что используется в качестве метода очистки. Из водных растворов различные группы тритерпеновых гликозидов могут осаждаться различными солями свинца и гидроксидом бария.

Тритерпеновые сапонины это соединения нейтральной или кислой реакции. Они бывают нейтральными или кислыми, что обусловлено карбоксильной группой в агликоне или присутствием уроновых кислот в углеводной цепи.

Все сапонины неустойчивы по отношению к кислым агентам, под действием которых расщепляются гликозидные связи. Сапонины, для которых характерно наличие О-ацилгликозидных связей, неустойчивы к действию щелочей.  Тритерпеновые гликозиды, этерифицированные карбоновыми кислотами, легко омыляются щелочами.

Следует отметить, что многие сапонины обладают способностью образовывать устойчивые комплексы между собой и с другими природными соединениями, и поэтому их физико-химические свойства достаточно разнообразны. Водные растворы стероидных сапонинов имеют нейтральную рН среду.

Тритерпеновые гликозиды нерастворимы в петролейном эфире, хлороформе, ацетоне, растворимы в этиловом и метиловом спиртах. Растворимость сапонинов в воде увеличивается с возрастанием числа углеводных остатков. Гликозиды с 1-4 моносахаридными остатками обычно плохо растворимы в воде.

Одно из важных химических свойств тритерпеновых сапонинов – способность образовывать комплексы с фенолами, высшими спиртами и стеринами.

Сапонины образуют комплексы с холестеролом мембран эритроцитов, их липидная оболочка растворяется, и гемоглобин из эритроцитов переходит в плазму крови, делает ее ярко-красной и прозрачной. Сапогенины не проявляют гемолитическую активность.

*Выделение сапонинов из растительного сырья.* Выделение сапонинов из растительного сырья включает в себя получение суммарного экстракта, его очистку от балластных веществ (липидов, эфирные масла, пигменты и др.) и последующее разделение смеси на индивидуальные соединения. Для очистки от балластных веществ сырье предварительно экстрагируют хлороформом. В зависимости от вида растительного сырья и его химического состава можно модифицировать последующие операции.

Выделение сапонинов из растительного сырья включает следующие стадии: 1) получение экстракта; 2) выделение из него суммы сапонинов и их очистка от сопутствующих веществ; 3) разделение сапонинов на индивидуальные гликозиды.

Обычно суммарный экстракт для выделения сапонинов получают обработкой сырья полярными растворителями: метиловым, этиловым спиртом или водой. Растительное 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 водно-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. В настоящее время наиболее распространенным методом выделения тритерпеновых гликозидов является экстракция водным метанолом, этанолом или изопропанолом. Сырье предварительно обезжиривают петролейным, диэтиловым эфиром, гексаном, метиленхлоридом, тетрахлорметаном или хлороформом. Необходимость этой операции связана с удалением из растительного сырья жироподобных веществ (прежде всего стеринов, с которыми большинство тритерпеновых гликозидов способны образовывать нерастворимые в водноспиртовых растворах комплексные соединения).

Из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины осаждают этиловым эфиром, ацетоном, хлороформом (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 переосаждецием. Для очистки сапонинов от сопутствующих веществ используют метод, основанный на способности сапонинов образовывать нерастворимые в воде или водном спирте соли с гидроксидом бария или ацетатом свинца и комплексы с холестерином, танинами, белками. Полученные соли затем разлагают серной кислотой, холестериновые комплексы — извлечением холестерина бензолом или эфиром или пиридином, таниновые — извлечением водной суспензией оксида цинка, белковые — разлагают органическими растворителями. Эти методы дают более чистую сумму сапонинов.

С помощью диализа и электролиза, образующие коллоидные растворы сапонины очищают от примесей, дающих истинные растворы (моносахариды, минеральные вещества). Хорошие результаты очистки сапониновых фракций от растительных пигментов и восстанавливающих сахаров получены при гельфильтпации на сефа-дексах У-25, У-50, А-25.

Значительное распространение нашли хроматографические методы очистки суммы сапонинов.  Гликозиды, содержащие свободные карбоксильные группы, могут быть отделены от сопутствующих веществ, в том числе и от минеральных примесей, с помощью ионообменной хроматографии.

Фракции сапонинов представляют собой смеси близких по строению и свойствам гликозидов. Разделение стало возможным только в последнее время благодаря хроматографическим методам.

При выделении и разделении сапонинов методом колоночной хроматографии в качестве сорбента используют алюминия оксид, силикагель, активированный уголь, полиамид.

В отличие от других классов природных соединений (углеводов, аминокислот и др.) для элюирования сапонинов нет универсальных систем. Для нейтральных сапонинов наиболее подходящие системы: н-бутиловый спирт—этиловый спирт — вода; н-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода (в различных соотношениях, верхний слой); хлороформ — метиловый спирт — вода (65:35:10).

Для обработки хроматограмм можно использовать те же реактивы, что и при проведении цветных реакций на сапонины. Так, для обнаружения стероидных сапонинов хроматограмму сначала опрыскивают 1%-вым спиртовым раствором SbCl3, а затем после высушивания 20% раствором H2S04 с уксусным ангидридом образуются желтые пятна.

Для обнаружения стероидных гликозидов в растительном сырье получают спиртовое извлечение и проводят тонкослойную хроматографию на силикагеле в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (65:30:10). Хроматографическую пластинку (сликагелевая пластинка) опрыскивают реактивом Санье (5% спиртовый раствор ванилина) с нагреванием при 110°С в течение 10 мин, обрабатывают 50% раствором серной кислоты и высушивают. В результате стероидные гликозиды - проявляются в виде желтых пятен. Фуростаноловые гликозиды проявляют в виде розовых пятен после обработки реактивом Эрлиха (1 г п-диметиламинобензальдегида в 98 мл этилового спирта и 2 мл концентрированной HCl).

Для обнаружения тритерпенових сапонинов применяют раствор 20%-ной серной кислоты. После обработки хроматограммы этим раствором с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 120°С в течение 15 мин появляются фиолетовые пятна. Используют также насыщенный хлороформный раствор SbCl3 со следами SbCl5. Тритерпеновые сапонины дают розово-фиолетовое окрашивание.

При выяснении структуры сапонинов, как и других гликозидов, определяется строение агликона и углеводной части, а также выясняется место и присоединения углеводного остатка к агликону.

При установлении строения санонинов помимо традиционных методов (элементарный анализ, определение молекулярной массы) широко используются методы УФ спектроскопии, ИК спектроскопии, ПМР спектроскопии.

При исследовании тритерпенов ИК-спектроскопия применяется для обнаружения и характеристики двойных связей, гидроксильных групп, О-ацильных группировок, карбонильных, карбоксильных, геминальных и ангулярных метильных групп. По характерным полосам поглощения СН3-групп в области 1245 -1392 см отличают тетрациклические тритерпены от пентациклических, а также групп а-амирина от β -амирина.

Принадлежность сапонинов к стероидным соединениям может быть определена на основании ИК-спектроскопии. Наличие полос поглощения при 853 (866), 900 (900), 922 (922), 987 (982) см-1 (спирокетальная группировка нормального и изо-рядов) позволяет однозначно отнести сапонины к стероидному ряду.

В последнее время при исследовании структур пентациклических тритерпенов получила распространение масс-спектрометрия и методы ПМР спектроскопии.

Определение строения углеводного остатка тритерпенових и стероидных сапонинов осуществляется с помощью методов структурной химии олигосахаридов и полисахаридов.  Сюда входит: 1) определение качественного и количественного состава моносахаридов; 2)установление последовательности моносахаридных остатков в углеводной цепи; 3) определение положения гликозидных связей в моносахаридных остатках; 4) определение размеров оксидных циклов моносахаридов; 5) установление конфигурации гликозидных центров.

*Качественные реакции*. Для обнаружения сапонинов в растительном сырье используют реакции, которые подразделяются на три группы:

- основанные на физических свойствах сапонинов (реакции пенообразования и установления химической природы сапонинов)

- основанные на химических свойствах сапонинов (цветные и осадочные реакции)

- основанные на биологических свойствах сапонинов (гемолиз).

К первой группе относится реакция пенообразования. Это характерная проба на сапонины, так как других веществ, обладающих такой способностью к пенообразованию, в растениях не встречается.

Ко второй группе относятся реакции осаждения сапонинов и цветные реакции. В качестве реактивов, предложенных для большинства цветных реакций, используют концентрированную серную кислоту, вещества альдегидной природы и  концентрированную серную кислоту со следами металлов (табл.). Большинство тритерпеновых и стероидных сапонинов осаждается раствором холестерола, бромной водой, гидроксидом бария и магния, солями ртути, меди, цинка, свинца. Тритерпеновые сапонины осаждаются свинца ацетатом средним, а стероидные — ацетатом свинца основным.

Тритерпеновые сапонины обнаруживаются реакцией с уксусным ангидридом и серной кислотой. Вещество растворяют в хлороформе, добавляют 10 капель уксусного ангидрида и 2-3 капли концентрированной серной кислоты. Нижний слой жидкости окрашивается в оранжевый цвет.

Для определения сапонинов применяют реактив Либермана — Бурхарда, хлорсульфоновая кислота и хлорид сурьмы (III).

Хлорсульфоновая кислота окрашивает олеаноловую кислоту в различные оттенки коричневого цвета, а бетулиновую кислоту — в светлоголубой цвет.  С целью обнаружения сапоиннов применяют фосфорную и серную кислоту, без добавок или с ванилином и анисовым альдегидом. Реакцию с серной кислотой используют для количественного определения сапонинов.

Наличие сапонинов в растительном сырье устанавливают методом тонкослойной хроматографии. Хроматограмму опрыскивают 20%-ным раствором серной кислоты, затем сушат при температуре 110 °C в течение 10 мин в сушильном шкафу.

Для обнаружения сапонинов используются методы УФ-спектроскопии. Область поглащения света сапонинов находится в интервале 240— 260 нм. Сапонины оптически активны.

Реакция с холестерином дает возможность определить стероидную природу гликозидов (5 мл 1%-ного раствора сапонина смешивают с 1,5 мл 0,3% -ного спиртового раствора холестерина, добавляют 1,5 мл воды и образуется белый осадок).

Реакцию на сапонины проводят с формальдегидом в серной кислоте. К раствору сапонина в метиловом спирте прибавляют 5—7 капель раствора формальдегида в серной кислоте; появляется сине-фиолетовая окраска, быстро переходящая в коричневую или зеленовато-коричневую.

 Таблица. Цветные реакции на сапогенины

|  |  |
| --- | --- |
| Реактив | Окрашивание |
| H2SO4 концентрированная | желтое→красно-фиолетовое |
| Либермана-Бурхарда (уксусный ангидрид, конц. H2SO4, хлороформ)  | на границе слоев красное кольцо→фиолетовое → изумрудно-зеленое |
| формальдегид, конц. H2SO4 | желтое →малиновое |
| Лафона (конц. H2SO4, Cu2+ соли, > t0C) | сине-зеленое |
| Сальковского (конц. H2SO4, хлороформ) | нижний слой окрашен в оранжевый цвет |
| Растворы Sb (III), Sb (V) хлоридов в хлороформе | красное→фиолетовое |
| Санье (ванилин, конц. H2SO4, , > t0C) | тритерпеновые сапонины: →красное;стероидные сапоинны →желтое |
| Эрлиха (p-диметиламинобензальдегид, конц. HCl) | фуростаноловые →розовое |
| Хлорсульфоновая кислота | β-амирин →коричневое, фиолетовое;бетулиновая кислота→голубое |

*Количественное определение сапонинов.* Для количественного определения сапонинов в растительном сырье применяют методы, основанные на использовании биологических и физических свойств сапонинов, то есть определении гемолитического, рыбьего индексов и пенного числа. Также применяют химические методы. Общих химических методов количественного определения сапонинов в лекарственном растительном сырье нет.  Чаще всего используют гравиметрический, титриметрический и фотометрический методы. Наиболее часто для количественного определения сапонинов (стероидные сапонины и их препараты) используют колориметрические и спектрофотометрические методы анализа. Тритерпеновые сапонины определяют потенциометрическим титрованием. Агликоны после гидролиза в растворе метанола—бензола титруют натрия гидроксидом (индикатор — стеклянный электрод, электрод сравнения — каломельный). Эсцин определяют методом обратного потенциометрического титрования.

Количественное определение сапонинов гемолитическим методом основано на предположении, что гемолитическое действие прямо пропорционально количеству вещества в растворе.

Гемолитическим индексом (HI) называется наименьшая концентрация настоя (1:10), которая вызывает полный гемолиз эритроцитов, рассчитанная на единицу исследуемого вещества. HI для некоторых видов растительного сырья составляет: корни солодки — 250—300; корни женьшеня — менее 100; семена каштана —6000 (эсцин 9500—12 500); листья плюща— 1000—1500; корни мыльнянки — 2600—3900; корни сенеги — 2500—4500; корни сарсапариллы — 3500— 4200; кора мыльного дерева— 3500—4500.

Из-за того, что различные сапонины при одинаковой концентрации имеют разный гемолитический индекс (механизм гемолиза также различен), каждый раствор должен иметь свой стандарт — раствор чистого сапонина.

Однако положительный результат гемолитической пробы еще не является доказательством наличия сапонинов. Так как гемолиз дают и другие растительные вещества (некоторые эфирные масла, кислоты, спирты).  А также сапонины могут находиться в растении в виде комплекса со стеролами и не проявлять гемолитической активности до разрушения этого комплекса.

Методы определения сапонинов, основанные на повышенной токсичности этих соединений для холоднокровных животных (рыб, головастиков, червей, жаб,), не имеют преимущества по сравнению с гемолитическим индексом и сохраняют его главный недостаток — невысокую надежность, невозможность строгого отнесения исследуемых веществ к классу сапонинов.

*Качественные реакции на сапонины.*

5,0 г измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, приливают 50 мл 50 %-ного спирта, нагревают содержимое колбы с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин.  Извлечение охлаждают и фильтруют. 20 мл фильтрата упаривают на водяной бане до 10 мл для удаления спирта. Полученное водное извлечение используют для проведения реакции пенообразования, некоторых осадочных реакций и определения химической природы сапонинов, спирто-водное извлечение — для других качественных реакций и хроматографического анализа.

Проба пенообразования

1. 2—3 мл водного извлечения энергично встряхивают в течение 1 мин. Образуется обильная и стойкая пена.

Реакции осаждения

2. К 1 мл водного извлечения в пробирке прибавляют 3—4 капли бромной воды. Наблюдается выпадение осадка.

3. К 1 мл водного извлечения прибавляют 3—4 капли 10 %-ного раствора свинца ацетата. Наблюдается выпадение осадка.

4. К 1 мл спирто-водного извлечения прибавляют 1 мл 1 %-ного спиртового раствора холестерола. Наблюдается выпадение осадка.

Цветные реакции.

5. Реакция Лафона. К 2 мл спирто-водного извлечения в пробирке прибавляют 1 каплю 10 %-ного раствора меди сульфата, 1 мл кислоты серной концентрированной и осторожно нагревают. Образуется сине-зеленое окрашивание.

6.  Реакция Сальковского. К 2 мл спирто-водного извлечения в пробирке прибавляют 1 мл хлороформа и 5—6 капель концентрированной серной кислоты. Органический слой окрашивается в оранжевый цвет.

7. Реакция с хлоридом сурьмы (V). К 1 мл спирто-водного извлечения в пробирке прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора сурьмы (V) хлорида в хлороформе. Образуется красное окрашивание, переходящее в фиолетовое.

8. Реакция Санье. К 2 мл спирто-водного извлечения в пробирке прибавляют 1 мл 0,5 %-ного спиртового раствора ванилина, 3—4 капли концентрированной серной кислоты и нагревают на водяной бане с температурой 60 °С. Наблюдают образование красного или желтого окрашивания.

*Определение химической природы сапонинов.* Берут 2 мерные пробирки одинакового диаметра с притертыми пробками. В одну из них наливают 5 мл хлороводородной кислоты 0,1 моль/л, в другую — 5 мл раствора гидроксида натрия 0,1 моль/л. В обе пробирки прибавляют по 0,5 мл водного извлечения и встряхивают их с одинаковой интенсивностью в течение 1 мин. При наличии тритерпеновых сапонинов высота столбика пены в обеих пробирках будет примерно одинаковой. Стероидные сапонины образуют больше пены в пробирке со щелочью.

*Определение сапонинов хроматографическим методом.* Для обнаружения и идентификации сапонинов широко используют бумажную (БХ) и тонкослойную (ТСХ) хроматографию. В качестве проявляющих реактивов используют сильнокислые реагенты: насыщенный хлороформный раствор Sb (III) и Sb (V) хлоридов, 25 %-ный спиртовый раствор кислоты фосфорно-вольфрамовой, кислоту серную и другие. Серная кислота обычно реагирует с сапогениновой частью. Однако чем больше сахарная цепь, тем меньше относительная доля генина и, следовательно, чувствительность реакции. В качестве проявляющего реактива используют также раствор бараньей крови в фосфатном буфере для гемолиза эритроцитов.

*Обнаружение сапонинов методом ТСХ.* 2,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл 70 %-ного спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане 15 мин. Извлечение фильтруют и упаривают в 2 раза. Затем наносят 25—40 мкл на линию старта пластинки, покрытой слоем силикагеля. Параллельно наносят растворы стандартных образцов сапонинов (например, эсцин). Для разделения сапонинов пластинку помещают в камеру с системой растворителей хлороформ—метанол—вода (65:50:10). Когда фронт системы растворителей пройдет расстояние 10—11 см, пластинку вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу, просматривают хроматограмму в видимом и УФ-свете. Затем пластинку обрабатывают 5 %-ным раствором серной кислоты в этаноле и сразу же 1 %-ным спиртовым раствором ванилина. Хроматограмму выдерживают в сушильном шкафу 5—10 мин при температуре 110 °С. Отмечают окраску пятен стандартных образцов и экстракта.

Определение пенного числа в образце лекарственного растительного сырья, содержащего сапонины

По величине пенного числа лекаственное растительное сырье, содержащее сапонины, разделяют на три группы: свыше 5000 — высокое пенное число; 2000—5000 — среднее пенное число; меньше 2000 — низкое пенное число.

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

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

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

Определение гемолитического индекса растительного сырья, содержащего сапонины.

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

1—2 г крупного порошка растительного сырья (масса навески зависит от гемолитического действия) взвешивают на весах и помешают в колбу Эрленмейера, добавляют 0,9 г хлорида натрия и 100 мл кипящей воды. Взвешивают колбу с содержимым на технических весах с точностью до 0,01 г, настаивают в течение 15 мин на кипящей водяной бане. Затем добавляют воду до первоначальной массы и фильтруют. Опыт проводят в серии из 9 пробирок.  Пипеткой с еденицей деления 0,01 мл отмеряют в первую пробирку 0,9 мл исследуемого настоя, в следующую соотвественное 0,8, 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 мл. После этого содержимое каждой пробирки доводят изотоническим раствором до 1 мл.  В каждую пробирку добавляют по 1 мл суспензии красных кровяных телец и взбалтывают. Через 24 часа наблюдают, в каких пробирках произошел гемолиз.  Если гемолиз произошел в последней пробирке, то часть основного настоя разбавляют изотоническим раствором с точностью до 10 раз и готовят из него новую серию разбавлений.

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

Гемолитический индекс рассчитывают по формуле:

$$HI=\frac{2∙100}{a∙б}$$

Где, a – начальная концентрация раствора, в %;

 b – бъем первичного раствора в пробирке, содержимое которой вызывает полный гемолиз, мл.

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

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

Фактор F вычисляют делением 25 000 на фактическую концентрацию.

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

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

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

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

O

H

R

R

O

O

A

B

C

D

E

F

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

1

1

1

2

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

2

4

2

5

2

6

2

7

Спиростанового типа (монодесмозиды)

O

H

2

6

C

H

2

O

H

O

O

A

B

C

D

E

F

Фуростанолового типа (бисдесмозиды)

O

O

O

D

-

q

l

ü

k

o

z

a

L

-

r

a

m

n

o

z

a

L

-

r

a

m

n

o

z

a

Диосцин

O

O

O

H

1

9

1

8

2

1

2

0

2

2

2

3

2

4

2

5

2

7

2

6

Тигогенин

O

H

O

H

O

O

C

H

3

H

Юккагенин

A

B

C

D

E

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

2

7

2

8

3

0

2

9

O

H

β-амирин

O

H

3

0

2

9

α-амирин

O

H

1

9

2

1

2

2

2

9

3

0

Лупеол

R

O

2

4

2

5

Фриделтн R = OH

Серин R = OH

HO

O

2

4

2

5

Фриделин

HO

O

2

4

2

5

Серин

O

H

2

8

2

9

3

0

1

9

1

8

1

7

2

1

2

0

2

2

2

3

2

4

2

6

2

5

2

7

Циклоартенол

2

1

2

2

2

0

2

4

2

3

1

5

1

6

2

6

2

5

1

7

2

7

1

1

1

2

1

3

1

4

8

9

7

6

3

0

1

8

1

9

9

2

2

8

5

1

0

3

4

1

2

Даммаран

O

H

C

O

O

H

2

9

3

0

Урсоловая кислота

O

H

O

H

O

H

O

H

O

H

O

H

Мезоинозит

O

-

a

z

o

n

i

b

a

r

a

-

a

z

o

n

m

a

R

C

O

O

-

q

l

u

k

o

z

a

-

q

l

u

k

o

z

a

-

r

a

m

n

o

z

a

C

H

2

O

.

.

.

.

C-хедеросапонин

O

C

O

O

H

3

O

O

C

O

O

H

O

H

O

O

C

O

O

H

O

H

O

H

O

H

O

H

1

2

Глицирризиновая килота

O

1

R

O

O

O

R

2

R1 = R2 = H – Ликвиритигени

R1 – H, R2 = Glc – Ликвиритин

R1=qlikoza; R2=H - Неоликвиритин

O

H

O

O

OH

Ликвиритигенин

O

H

O

O

O - Glc

Ликвиритин

Qlikoza – O

O

O

OH

Неоликвиритин

O

1

R

O

O

H

O

R

2

R1 = R2 = H – Изолтквиритигенин

R1 – H, R2 = Glc – Изоликвиритин

R1=H; R2=ramnoza – Рамноизоликвиритин

O

H

O

O

H

OH

Изоликвиритигенин

O

H

O

O

H

O - Glc

Изоликвиритин

O

H

O

O

H

O - ramnoza

Рамноизоликвиритин

O

H

O

O

O

C

H

3

Формононетин

O

O

H

O

O

H

c

l

G

i

p

A

Ликуразид

C

O

H

C

H

3

C

H

3

C

O

O

H

3

H

C

C

H

3

C

3

H

3

1

1

1

2

1

8

3

0

O

H

O

O

H

O

H

C

O

O

H

O

O

C

O

O

N

H

4

O

H

O

H

6

"

6

'

1

'

1

"

2

Глицирам

R

1

C

H

2

O

H

R

2

R

3

C

H

2

O

H

R

4

Лонгиспиогенол:

R = R1 = R3 = R4 = H; R2 = OH

AR1-барригенол:

R = R1 = R2 = OH; R3 = R4 = H

R1-барригенол:

R = R1 = R2 = R3 = OH; R4 = H

Камеллиагенин E:

R = R1 = R2 = OH; R3 = H; R4 = CHO

O

H

O

H

O

H

O

3

6

1

9

1

8

1

2

2

6

2

7

Панакстриол

2

7

O

H

O

H

O

3

6

1

9

1

8

1

2

2

6

Панаксдиол

2

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

2

4

2

5

2

6

2

7

2

8

2

9

20S-протопанаксдиол: R1 = H; R2 = OH

20S-протопанакстриол: R1 = R2 = OH

O

1

R

C

O

O

R

2

R1, R2 = H олеаноловая кислота

Аралозид A – R1 = глюкуроновая кислота (4 → 1) арабиноза

R2 = глюкоза

Аралозид B – R1 = глюкуронава кислота (4 → 1) арабиноза

 (3 → 1) арабиноза

 R2 = глюкоза

C

O

O

O

O

O

H

O

A

r

C

O

O

H

O

r

A

O

O

H

O

H

H

O

H

2

C

O

H

2

9

2

8

2

7

2

6

2

5

2

4

3

2

3

3

0

Аралозид B

C

O

O

O

O

O

H

O

G

a

l

C

O

O

H

O

l

y

X

O

O

H

O

H

H

O

H

2

C

O

H

2

9

2

8

2

7

2

6

2

5

2

4

3

2

3

3

0

Аралозид C

C

O

O

O

O

O

H

O

H

C

O

O

H

O

r

A

O

O

H

O

H

H

O

H

2

C

O

H

2

9

2

8

2

7

2

6

2

5

2

4

3

2

3

Аралозид A

O

O

H

O

O

H

O

H

O

a

z

o

t

k

u

r

F

O

A

r

a

b

i

n

o

z

a

Эквизетрин

*Биологическая активность*. Сапонины стимулируют и тонизируют ЦНС и регулируют водно-солевой обмен. Для лекарственного растительного сырья и препаратов, содержащих сапонины, характерно адаптогенное, отхаркивающее, мочегонное, нейролептическое, седативное, противовоспалительное, противовирусное действия. Во избежание гемолиза, все препараты сапонинов применяют перорально. Эмульгирующие свойства сапонинов используют для стабилизации эмульсий, суспензий и других дисперсных лекарственных форм.

Токсичность сапонинов в отношении холоднокровных животных обусловлена нарушением функции жабр. Это свойство используется для рыбной ловли.

В пищевой промышленности сапонины применяют для изготовления кондитерских изделий, и шипучих напитков.

*Биологическое действие стероидных сапонинов.*

Сапонинам присуще подавлять жизнедеятельность некоторых низших организмов. Особенно сильное воздействие сапониновые гликозиды оказывают на грибы. Наибольшую активность проявляют гликозиды спиростанолового ряда и некоторые стероидные алкалоиды. Противогрибковая активность сапониновых гликозидов используется в сельском хозяйстве.

Гликозиды спиростанового ряда обладают противоопухолевой активностью. Стероидные сапонины оказывают противосклеротическое действие. Они снижают количество холестерина в крови.

Стероидные сапонины используются также как сырье для синтеза стероидных гормонов.

 *Биологическое действие тритерпеновых сапонинов.*

Большинство тритерпеновых сапонинов обладают гемолитическим действием. При попадании сапонинов в кровь, оказывают очень сильное токсическое действие, вызывая гемолиз и паралич центральной нервной системы (в первую очередь дыхательного центра).

При приеме сапонинов внутрь их резорбтивное действе не проявляется. Сапонины увеличивают секрецию бронхиальных желез, разжижают мокроту, понижают ее вязкость и поэтому употребляют при бронхите, а также при сухом кашле.

Некоторые тритерпеновые сапонины обладают гормоноподобным, стимулирующим и адаптогенным действием.

Сапонины и пыль сапонинсодержащего сырья вызывают раздражение слизистой оболочки глаз, носа, горла и глотки. Они обладают жгучим горьким вкусом, раздражают слизистую оболочку желудка и кишечника, вызывая рефлекторное возбуждение центра рвоты.

Соединения с адаптогенным и стимулирующим действием включают уникальную группу тритерпеновых сапонинов из растений семейства аралиевых (женьшень, заманиха, аралия, элеутерококк. Все эти соединения обладают схожей биологической активностью и не относятся к стеролам. детали и степень которой варьируют. Для всей этой химически довольно разноцветной группы гликозидов характерно несколько видов активности:

1. Повышение неспецифической резистентности к широкому кругу неблагоприятных, в том числе экстремальных воздействий: гипоксия, стресс, изменение климата, разнообразие токсических агентов, инфекции и т.д. В основе феномена лежит, видимо, оптимизация энергетики (улучшение трансмембранного переноса глюкозы, включение в энергетический обмен липидов, усиление глюконеогенеза из шлаков обмена), адаптивных синтезов РНК и энзимов, для усиления функций защитных систем в нужное время. Действие гликозидов реализуется, прежде всего, на клеточном уровне, а также через центральную нервную и эндокринную системы. Повышение резистентности наблюдается после приема соответствующих препаратов.

2. Повышение физической и умственной работоспособности организма можно четко увидеть при повторном приеме этих видов лекарств и повторной нагрузке организма. В результате объем и качество работы постепенно увеличиваются , а усталость уменьшается. Способность адаптогенов растительного происхождения повышать работоспособность выгодно отличается от действия стимуляторов типа фенамина. За счет оптимизации энергетического обмена и повышения его коэффициента полезного действия растительные адаптогены делают биохимические процессы более экономными. Они потенцируют действие инсулина, улучшают поступление глюкозы в клетки за счет активации реакции гексокиназы. Усиливают глюконеогенез из шлаков обмена и увеличивает коэффициент использования в энергетическом обмене.

3. Улучшение функций эндокринных желез – одно из фармакодинамических свойств растительных адаптогенов, которая связана с повышением адаптации и работоспособности.  Под влиянием гликозидов ослабляется инволюция надпочечников и гипергликемизирующее действие глюкокортикоидов (противоположный эффект кортикостероидов на инсулин). Лучше изучены действия препаратов женьшеня и элеутерококка при нетяжелом диабете.

4. Стимуляция иммунитета (наряду с повышением неспецифической резистентности к инфекциям) представляет большой практический интерес при инфекционных заболеваниях, а также при проявлении других гипоиммунных и дисиммунных состояний. Влияние гликозидов на отдельные звенья иммунной системы мало изучено.