**Лекарственные растения и сырье, содержащие гликозиды**

**Лекарственные растения и сырье, содержащие сердечные гликозиды**

Гликозиды – это природные соединения, состоящие из сахаров и несахаристой части. Сахарная часть гликозида называется гликоном, а несахарная – агликоном, или генином. Связь сахарного остатка с агликоном осуществляется через кислород азот, серу и углерод и соответственно: O-гликозиды, N-гликозиды, S-гликозиды, С-гликозиды.

O

H

O

-

R

O

H

N

H

-

R

O

H

S

-

R

O

H

O-гликозиды N-гликозиды S-гликозиды C-гликозиды

Если связь сахара с агликоном осуществляется через атом кислорода, то такие гликозиды называют О-гликозидами, если непосредственно через взаимодействие двух атомов углерода - C-гликозидами. C-гликозиды очень устойчивы к гидролизу. В зависимости от числа остатков моносахаридов гликозиды делятся на монозиды или моногликозиды (один остаток сахара), биозиды или дигликозиды (два остатка сахара), триозиды или тригликозиды (три остатка сахара) и олигозиды. Гликозиды с двумя остатками моносахаридов, которые соединены между собой цепочкой, называют биозидами, а в дигликозидах остатки сахара присоединены в разных положениях.

В зависимости от конфигурации гликозидной связи различают α- və β- гликозиды. (присоединение агликона к моносахариду)

C

H

2

O

H

H

O

H

H

H

O

H

H

O

H

O

C

H

3

H

O

C

H

2

O

H

H

O

H

H

H

O

H

H

O

H

H

O

-

C

H

3

O

Метил-α-D-глюкопиранозид Метил-β-D-глюкопиранозид

По размеру цикла углеводного остатка гликозиды делят на фуранозиды и пиранозиды:

O

C

H

O

H

O

-

R

H

H

O

H

H

O

H

C

H

2

H

O

C

H

2

H

O

H

H

H

O

H

H

O

H

H

O

-

R

O

α-глюкофуранозид β-глюкопиранозид

По названию моносахаридов, входящих в молекулу гликозида, бывают глюкозиды (глюкоза), галактуронозиды (галактуроновая кислота), галактозиды (галактоза) и др.

Гликозиды могут содержать дезоксисахара. В них группы OH замещены атомами водорода (напр., D-рамноза, дигитоксоза, цимароза).

Гликозиды классифицируют в зависимости от химического строения агликона. Согласно этой классификации они делятся на следующие группы:

алифитические гликозиды (гликозиды жирных кислот, жирных спиртов и глицерина) ;

алициклические гликозиды (карденолиды, буфадиенолиды, тритерпеновые и стероидные сапонины, моно-, ди- и сесквитерпеновые гликозиды, иридоиды, гликоалкалоиды);

ароматические гликозиды (фенологликозиды, кумарины, антрагликозиды, флавоноиды и др.)

гетероциклические гликозиды (нуклеотиды, нуклеозиды и др.).

В чистом виде гликозиды обычно кристаллические вещества. Они гидролизуются ферментами и кислотами.

Скорость кислотного гидролиза зависит от строения агликона, конфигурации сахарного остатка, места его присоединения к агликону и типа связи. Фуранозиды гидролизуются приблизительно в 100 раз быстрее пиранозидов. β-гликозиды более устойчивы к гидролизу, чем α-гликозиды.

Щелочной гидролиз характерен для некоторых фенольных гликозидов. Ферментативный гидролиз является специфическим и применяют для изучения строения гликозидов.

При заготовке растительного сырья для предотвращения ферментативного гидролиза гликозидов сырье необходимо сушить быстро при температуре 60°С. При этой температуре происходит коагуляция белка, гидролиз не происходит.

Фармакологическая активность гликозидов непосредственно связана с агликоном. Поэтому лекарственное растительное сырье классифицируют по типу агликона. Наличие сахарного компонента гликозидов приводит к возрастанию гидрофильности и увеличению биодоступности.

**Лекарственные растения и сырье, содержащие сердечные гликозиды**

Сердечные гликозиды (кардиотонические гликозиды, кардиотонизирующие гликозиды) – это органические соединения стероидной природы, имеющим в структуре агликона ядро циклопентанпергидрофенантрена. От других стероидов они отличаются наличием у С17 ненасыщенного лактонного кольца. По величине лактонного цикла разной степени насыщенности они классифицируются на карденолиды и буфадиенолиды.

Химическое строение средечных гликозидов установлено в 30-е годы ХХ в. работами американских ученых В.A.Джакобс, Р.Tschesche и др.

Большинство растений, продуцирующих стероидные лактоны, содержат карденолиды. Лишь в растениях семейства лилейных (родов бовиэя, пролески, морского лука), ирисовых (рода - гомерии), ), лютиковые (род морозник) и медовиковых содержатся буфадиенолиды.

В основе строения агликона (генина) сердечных гликозидов лежит циклопентанопергидрофенантрен.

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

D

C

H

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

1

1

1

2

A

B

Циклопентанпергидрофенантрен

Сердечные гликозиды – это соединения, состоящие из стероидного скелета и содержащие в положении C17 лактонное кольцо.

В зависимости от строения лактонного кольца они делятся на карденолиды (α, β- ненасыщенный пятичленный лактон) и буфадиенолиды (лактонное шестичленное кольцо с двумя ненасыщенными двойными связами).

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

O

O

H

H

O

H

O

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

O

H

O

H

H

O

O

2

4

1

2

3

4

5

6

10

9

8

7

11

12

1

2

3

4

5

6

10

9

8

7

11

12

Карденолид Буфадиенолид

Гликозильная часть сердечных гликозидов содержит от 1 до 5 моносвхвридов и присоединяется к агликону в положении C3. Наиболее часто встречаются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-арабиноза, также 6-дезоксисахар (L-рамноза), 2,6-дезоксисахар и их 3-O-метил эфиры (D-дигитоксоза, D-цимароза и др.):

C

H

3

H

O

C

H

3

H

H

O

H

O

H

H

O

H

O

C

H

3

H

H

H

O

H

H

H

O

H

O

H

O

H

H

C

H

3

H

H

H

O

C

H

3

H

H

O

H

O

H

O

H

β-D-дигиталоза β-D-дигитаксоза D-цимароза

**Биогенез сердечных гликозидов**

Изучение строения стероидного скелета, заместителей с различными положениями и различной фазой ориентацией позволяет понять биохимический процесс образования сердечных гликозидов в растительном организме. В растениях фитостерины образуются из сквалена, в результате процессов, происходящих в молекуле. Самым распространенным из них в растениях является β-ситостерин. Предполагают, что из β-ситостерина путем изменения структуры боковой цепи в молекуле у С17 образуются два типа сердечных гликозидов — карденолиды и буфадиенолиды.

Эти гликозиды оказывают тонизирующее действие на сердце, поэтому их называют кардиотоническими гликозидами. Кардиотоническое действие обусловлено лактонным кольцом, расположенным в положении С17. Разрыв или изомеризация лактонного кольца приводит к полной потере их биологической активности.

Кардиостероиды в отличие от других стероидов имеют специфическую пространственную ориентацию молекулы. Относительно кольца В кольцо С всегда занимает транс-положение. Кольца С/D всегда имеют циссочленение. Кольца А/В могут иметь какцис-,так и транспространственную ориентацию. Гликозиды сцис-сочленением колец А/В высоко активны.

Углеводный компонент в кардиотонических гликозидах присоединяется к гидроксильной группе в С3 стероидной части молекулы. Характерной особенностью кардиогликозидов является линейное строение углеводородной цепи. С агликонами связаны чаще всего специфические дезоксисахара, например дигитоксоза, ацетилдигитоксоза, цимароза и др.

При С10 может быть β--ориентированная метильная(группа наперстянки), альдегидная (группа строфанта), карбинольная или карбоксильная группы.

Химическое строение сердечных гликозидов оказывает влияние на их кардиотоническую активность. Наиболее биологически активны соединения с цис-положением колец А/B, C/D, b-ориентацией лактонного кольца и других функциональных групп (гидроксильная группа у С3).

Введение гидроксильной группы в С11, С12-положения повышает, а в С16-положение снижает активность, ацетилирование этой группы повышает токсичность. присутствие –СНО группы у С10 усиливает эффект гликозидов, ускоряет их действие и повышает токсичность гликозидов; присутствие метильной группы в этой позиции уменьшает действие сердечных гликозидов и происходит кумуляция в организме. На скорость и силу кардиотонического эффекта, кроме того, оказывает влияние характер углеводного компонента.  Наиболее сильное, но кратковременное воздействие вызывают монозиды; с удлинением углеводной цепочки действие становится более мягким и длительным

Чистые агликоны плохо удерживаются сердечной мышцей, поэтому действуют кратковременн. кроме того, они токсичны (за исключением буфадиенолидов)

Широко известные лекарственные растения, содержащие эти соединения: различные виды наперстянки, строфанта, морской лук, ландыш, желтушник, адонис, олеандр и др. У народов разных стран они в течение многих веков применялись для лечения сердечных и других заболеваний. Древние египтяне и римляне употребляли морской лук, греки и римляне пользовались желтушником, англичане и шотландцы использовали наперстянку для лечебных целей. Африканцы и азиаты использовали некоторые растения, содержащие сердечные гликозиды, для изготовления ядов для стрел и копий.

Количество гликозидов в растениях и действие соответствующих препаратов зависят от факторов внешней среды, возраста растения, времени сбора, способа сушки и хранения.

Сердечные гликозиды обнаружены у представителей семейства ландышевых, норичниковых, лютиковых, бобовых, кутровых, молочайных, лилейных, ирисовых, тутовых, капустных, стеркулиевых, бересклетовых, ластовневых и крестоцветных.

В настоящее время выделено более 400 сердечных гликозидов, из них большая часть (380) – карденолиды.

 Число известных буфадиенолидов в растениях невелико. Они в основном найдены в растениях семейства *Scilla*, *Drimia*, *Bowiea* и у видов рода *Helleborus.* Сердечные гликозиды соедржатся в растворенном виде в клеточном соке различных органов растений. Они встречаются в семенах строфанта, траве ландыша, подземных органах кендыря коноплевого и др.

Содержание сердечных гликозидов в растениях, произрастающих на высоте (в горах, на возвышенностях), значительно выше.

Большинство растений, содержащих сердечные гликозиды, произрастает в тропических местах (строфант) или в регионах с теплым климатом (наперстянка, желтушник, горицвет т др).

Присутствие марганца и молибдена в почве увеличивает содержание сердечных гликозидов на данной территории.

Химические свойства сердечных гликозидов обусловлены наличием гликозидной связи (гидролиз ферментами и кислотами), лактонного кольца (изомеризация под действием щелочей, образование окрашенных продуктов с ароматическими нитропроизводными в щелочной среде),  стероидной природой (образование окрашенных продуктов с кислотными реагентами: уксусный ангидрид, концентрированная серная кислота, трихлоруксусная кислота, и др.)

Сроки заготовки сырья, содержащего сердечные гликозиды, индивидуальны. Собирать растительное сырье необходимо в сухую погоду и быстро доставить к месту сушки, не допуская самонагревания сырья. Большинство растительного сырья, содержащего сердечные гликозиды, следует сушить быстро при температуре 50-70С, чтобы инактивировать ферменты, которые могут вызвать гидролиз сердечных гликозидов. Для некоторых видов сырья допустима воздушная сушка (виды ландыша, горицвет весенниц, морской лук и др.) Иногда для одного и того же вида сырья (наперстянка шерстистая) предусмотрены различные режимы сушки в зависимости от того, какой гликозид надо получить.

Биологическую активность сырья, содержащего сердечные гликозиды, проверяют ежегодно.

*Физико-химические свойства сердечных гликозидов*

Сердечные гликозиды- это бесцветные или белые кристаллические, реже аморфные вещества. Эти вещества без запаха, горькие на вкус, имеют определенную температуру плавления (100-270 0C), оптически активны. Большинство сердечных гликозидов малорастворимы в эфире диэтиловом, хлороформе, в воде, но хорошо растворяются в водных растворах метилового и этилового спиртов. Гликозиды с длинной углеводной цепью лучше растворяются в воде и водно-спиртовых растворах, агликоны – в органических растворителях.

С увеличением числа гидроксильных групп повышается полярность и растворимость в воде сердечных гликозидов.

Сердечные гликозиды легко гидролизуются кислотами и ферментами. Мягкое ступенчатое расщепление протекает при ферментативном гидролизе. Из первичных гликозидов при ферментативном гидролизе образуются вторичные, которые отличаются длиной углеводной цепи. Например, при ферментативном гидролизе пурпуреагликозида А образуется дигитоксин и молекула глюкозы, а затем образуется дигитоксигенин и 3 молекулы дигитоксозы. При кислотном гидролизе сразу происходит полное расщепление до агликона и сахарных компонентов.

В щелочной среде в сердечных гликозидах происходит разрушение агликона вследствие разрыва лактонного кольца, что приводит к потере кардиотонического действия.

Многие из сердечных гликозидов флюоресцируют в УФ-свете Например, ланатозиды наперстянки шерстистой флуоресцируют в УФ- свете следующим образом: А ланатозид желтовато-зеленый, В-ланатозид- сине-зеленый, С-ланатозид- синий цвет.

Карденолиды

Основной элемент карденолидов – это α, β пятичленное лактонное кольцо у C17, которое дает цветные реакции с пикриновой кислотой (реакция Бальетта) в щелочной среде, м-динитробензолом (реакция Раймонда), м-динитробензойной кислотой (реакция Кедде), нитропруссидом натрия (реакция Легаля) и др.

Для проведения реакции Легаля на гликозиды карденолидной группы к 1-2 мл спиртового раствора 3-5 мг гликозидов добавляют несколько капель свежеприготовленного 5%-ного раствора нитропруссида натрия и 1 мл расвора гидроксида натрия и образуется красный цвет, который быстро исчезает.

Для кличественного определения карденолидов используют реакцию Кедде и Бальетта с производными динитробензолсульфио, а реакцию Раймонда для обнаружения карденолидов на хроматограммах.

Для определения стероидного ядра карденолидов существует цветная реакция Либермана- Бурхарда. 1 г вещества растворяют в 2 каплях ледяной уксусной кислоты, затем добавляют 3 мл смеси уксусного ангидрида (5 частей) и концентрированной серной кислоты (1 часть). Образование розового окрашивания, изменяющаяся до красного, а затем до зеленого или сине-зеленого цвета показывает, что вещество стероидной природы.

Реакция с концентрированной серной кислотой и его 84%-ным раствором является специфической на сердечные гликозиды и агликоны. Они используются для идентификации индивидуальных веществ, а иногда для количественного определения отдельных гликозидов в смеси.

В качестве заместителей стероидного ядра в карденолидах встречаются оксигруппы в различных положениях: окси-группы, ацильные остатки, эпоксидные мостики, кетогруппы, альдегидная и карбоксильная группы. В ИК-спектре ОН-группы, неассоциированные водородными связями, обнаруживаются в области 3625—3600 см-1, ассоциированные межмоле-кулярными водородными связями — в области 3600—3200 см-1, а ассоциированные внутримолекулярными водородными связями — в области 3200—2500 см. Альдегидные и кетонные группы карденолидов легко обнаруживаются с помощью УФ-спектроскопии и дисперсии оптического вращения. Максимумы поглощения кетонов находятся в области 280—295 нм, альдегидной группы — в области 303—307 нм.

Величина частот карбонильных групп в ИК-спектре зависит от природы карбонила и места его в стероидном ядре.  Для карбонильных групп насыщенных кетонов она составляет 1750—1700 см-1, для альдегидных групп— 1719 см-1.

Карденолиды растений в основном представлены в виде гликозидов, сахарный компонент которых присоединен по гидроксилу у С-3 стероидного скелета.  Для определения сахарных компонентов гликозидов используют цветные реакции. После гидролиза гликозида образуется свободный сахар, который определяют с помощью реактива Фелинга или реакции образования серебряного зеркала.

2-дезоксисахара, содержащиеся в молекулах гликозидов, дают положительный результат на реакцию Келлер-Килиани. 5 мг гликозида растворяют в 1 мл ледяной уксусной кислоте, содержащей 0,01 мл 5% -ного хлорида железа и по стенке пробирки осторожно вливают 1 мл концентрированной серной кислоты. Верхний слой окрашивается ярко-голубой или сине-фиолетовый цвет. На границе двух слоев образуется темно-коричневый цвет.

Однако ди- и тригликозиды, содержащие 2-дезоксисахара, не дают эту реакцию. В подобном случае гликозиды гидролизуются трихлоруксусной кислотой, а свободные 2- дезоксисахара с нитрофенилгидразином и щелочью образуют голубую окраску. Для обнаружения 2-дезоксисахаров на бумаге рекомендуется использовать смесь спиртового раствора п-диметиламинобензальдегида и фосфорной кислоты или спиртового раствора ванилина с фосфорной кислоты на бумаге. Пятна гликозидов с 2-дезоксисахарами окрашиваются в голубой цвет. Идентификацию моносахаридов проводят с помощью хроматографии на бумаге с анилинфталатом.

Пятна пентоз окрашиваются в розовый цвет, а гексоз – в бурый цвет.

Буфадиенолиды

В молекуле буфадиенолида имеется шестичленное лактонное кольцо с двумя двойными связями в стероидном скелете у C17. Шестичленное лактонное кольцо дает положительную реакцию с насыщенным раствором хлорида сурьмы в хлороформе, а при нагревании появляется розово-фиолетовое окрашивание. Для идентификации в молекуле стероидного цикла используют реакции Либермана-Бурхарда, Розенгейма и др. Для определения буфадиенолидов используют УФ-спектроскопию, максимум поглощения при 300 нм (lg E=3,7). Поглощение в этой области использовано также для проявления хроматограммы при облучении УФ светом с длинами волн 290— 360 нм.

В ИК области спектра кумалиновое кольцо характеризуется 3 полосами поглощения: при 1730 см"1 (С0-группа); при 1640 и 1540 см^1 (сопряженные С-С-связи).

Сахарные компоненты, входящие в состав гликозидов буфадиенолидов, представлены 3 сахарами: D-глюкоза, L–рамноза и L–теветоза.

*Характеристика агликона*

В основе строения агликонов сердечных гликозидов лежит полностью или частично гидрированная. циклопентанпергидрофенантреновая система. Кольца А/В могут иметь как цис-, так и транс-сочленение. С кольцо всегда занимает транс-положение. А кольца С/D в отличие от других природных стероидов имеют всегда цис-сочленение.

У всех агликонов сердечных гликозидов в положениях C3 и C14 имеются гидроксильные группы, а в положении C13 - метильная группа.

У агликонов сердечных гликозидов могут быть заместители у углеродных атомов: 3, 5, 10, 12, 13, 14, 16, а в положении С17 находится ненасыщенное лактонное кольцо.

У агликонов сердечных гликозидов  в 1, 2, 5, 11, 12, 15 и 16 положениях могут присутствовать гидроксильные (-ОН) группы, которые могут быть ацилированы муравьиной, уксусной и изовалериановой кислотами. Выделены из растений также агликоны сердечных гликозидов, содержащие в стероидной части молекулы двойные С=С-связи, кетогруппы, эпоксидные кольца.

Заместители у С3 находятся в a-положении, у С5 и С14 — в цис- положении, лактонное кольцо находятся в а-положении; лактонное кольцо может находиться в a- и b-положениях.

Биологическая активность сердечных гликозидов зависит от стереохимического строения гликозидов.

Активны только те гликозиды, у которых кольца A/В имеют цис-сочленение. Специфическое действие сердечных гликозидов на сердечную мышцу обусловлено наличием в их молекуле ненасыщенного лактонного кольца. Любые изменения в структуре лактонного кольца ведут к потере этими веществами характерного сердечного действия. Такими изменениями могут быть: 1) расщепление лактонного кольца под действием щелочи; 2) образование при гидрировании гидролактона.

Строение сахарного компонента.

Сахарные компоненты присоединяются к агликону за счет спиртового гидроксила в положении З. Сердечные гликозиды содержит от 1 до 5 моносахаридов.

В составе различных сердечных гликозидов обнаружено до 30 различных моносахаридов, а большинство из них (кроме глюкозы, фруктозы и рамнозы) специфические для сердечных гликозидов, в других природных веществах растительного происхождения они не встречаются. Характерная особенность специфических сахаров, входящих в состав сердечных гликозидов, та, что они соединяются с помощью атома кислорода и относятся к дезоксисахарам. Это 6-дезокси- и 2,6-дидезокснгексозы, которые часто содержат метоксильные или ацетильные группы в различных положениях. Например дигитоксоза, цимароза, гапдроза, дигиноза и др.

Углеводные компоненты природных сердечных гликозидов расположены линейно, к агликону присоединяются сначала дезоксисахара, а концевым моносахаридом является глюкоза.

*Выделение сердечных гликозидов из растительного сырья*

Основная трудность при выделении сердечных гликозидов из растительного сырья заключается в их высокой лабильности, поэтому любое нарушение в температурном режиме приводит к их разрущению.

Экстракцию сердечных гликозидов из растительного сырья чаще всего проводят 70-80% этиловым или метиловым спиртами.

Экстракция сердечных гликозидов из растительного сырья является многоэтапным процессом. К нему относятся: подготовка растительного сырья, очистка от жиров петролейным эфиром или бензином (для семян), экстракция спирто - водной смесью, отгонка органических растворителей, осаждение липофильных веществ и фильтрация (хлорофилл и другие пигменты, смолы, воск, стерины и др.), проведение через слой оксида алюминия для отделения от фенольных соединений и затем провести фракционную экстракцию различными органическими растворителями с разной степенью полярности: диэтиловый эфир, хлороформ и смесь хлороформ-спирт (3:1 – 2:1).

Разделение суммы сердечных гликозидов на индивидальные вещества проводят чаще всего на хроматографических колонках, заполненных сорбентами (оксид алюминия, силикагель). В дальнейшем нужные зоны элюируют определенными растворителями. Полученные элюаты выпаривают под вакуумом досуха при температуре 50 °С, затем проводят перекристаллизацию до получения индивидуальных веществ. На всех этапах разделения кардиогликозидов должен быть строгий контроль pH среды и температуры. Потому что они очень чувствительны к воздействиям этих факторов. В слабощелочной среде образуются изосоединения, не обладающие фармакологической активностью. В кислой среде гликозиды могут гидролизоваться, а иногда происходит отделение третичных гидроксильных групп стероидного ядра с образованием ангидроформ. Ацетильные и формильные группы, присутствующие в агликонах некоторых кардиостероидов, отщепляются как в кислой, так и в щелочной среде. Альдегидная группа очень подвержена окислению, даже кислородом воздуха. Сердечные гликозиды чувствительны к нагреванию. До выделения нативных гликозидов необходимо инактивировать ферменты, присутствующие в сырье. Для этого используют высокую температуру, пары спирта, сульфат аммония и др. Для выделения вторичных гликозидов используют ферменты самих растений. Для этого обезжиренное сырье смачивают водой и оставляют на несколько дней при 25—37°С. Затем гликозиды экстрагируют спирто-водным раствором.

*Качественные реакции сердечных гликозидов.*

Несмотря на отсутствие строго специфических реакций, применение следующего комплекса проб позволяет определить подлинность сердечных гликозидов. Качественные реакции проводят либо с индивидуальными веществами, либо с очищенным извлечением из растительного сырья. Для этого несколько капель выделенного извлечения упаривают досуха на часовом стекле или в чашке.

 Для обнаружения сердечных гликозидов в растительных экстрактах часто используют цветные реакции. Они делятся на 3 группы: стероидное ядро; лактонное кольцо; углеводную часть молекулы.

*Реакции на стероидное ядро*

- Реакция Либермана-Бурхарда. Образование сине-зеленого окрашивания при добавлении смеси уксусного ангидрида и концентрированной кислоты (50 частей уксусного ангидрида и 1 часть кислоты серной концентрированной).

- Реакция с реактивом Чугаева (хлорид цинка и ацетилхлорид в кислоте уксусной). Образуется розовое окрашивание с максимумом поглощения при λ = 562 нм во время реакции.

- Реакция Розенгейма. Карденолиды, которые содержат диеновую группу или способны ее образовывать, под действием кислоты трихлоруксусной дают эту реакцию. Образуется розовая окраска (λ = 562 нм), которая переходит в фиолетовую или синюю. Реакции на пятичленное ненасыщенное лактонное кольцо. Эту реакцию проводят в щелочной среде с ароматическими нитропроизводными:

- Реакция Кедде. с кислотой 3,5-динитробензойной образуется фиолетово-красная окраска, специфическая на γ-лактонное кольцо карденолидов;

- Реакция Легаля. С натрия нитропруссидом образуется красный цвет.

- Реакция Раймонда. С *м*-динитробензолом в растворе бензола образуется фиолетовая окраска;

- Реакция Балье. Реакцию проводят с пикриновой кислотой.

На шестичленное дважды ненасыщенное лактонное кольцо специфические реакции не найдены*.*

Для идентификации буфадиенолидов снимают УФ-спектр, который имеет характерную полосу поглощения при длине волны 300 нм. Пятичленное лактонное кольцо в этих условиях проявляет интенсивное поглощение при 215–220 нм.

*Dezoksişəkərlərə aid reaksiyalar.*

- *Реакция Келлера-Килиани*. Эта реакция со смесью двух реактивов: кислоты уксусной ледяной, содержащей следы железа (III) сульфата, и кислоты серной концентрированной со следами железа (III) хлорида. Образуется темно-синее окрашивание.

К-строфантин и строфантозид (ди- и тригликозиды) не дают этой реакции**.** Belə hallarda daha həssas üsul tətbiq edilir. Гидролиз гликозида проводят трихлоруксусной кислотой, и свободный 2-дезоксисахар обнаруживают по голубому окрашиванию после реакции с *п*-нитрофенилгидразином в щелочной среде. Для определения строения сердечных гликозидов используют различные физико-химические методы:УФ-; ИК-; ЯМР-спектроскопию.

В УФ области спектра пятичленное лактонное кольцо вызывает интенсивное поглощение при 215 - 220 нм, а ИК область характеризуется расщепленной полосой при 1750 см-1 (‑С=О группа) и полосой при 1625 см-1 (–С=С-связь).

Отсутствие строго специфических реактивов на шестичленное лактонное кольцо требует снятия для этих веществ УФ спектров, где они показывают характерную полосу поглощения при 300 нм. Поглощение в этой области используют также для проявления хроматограммы с длинами волн 290-360 нм при облучении УФ светом. В ИК области спектра шестичленное лактонное кольце характеризуется полосой поглощения при 1730 см-1 (С=О-группа) и двумя полосами при 1640 и 1540 см-1 (сопряженные С=С-связи).

Большое значение для выяснения строения вещества имеет установление в нем числа спиртовых групп и числа ацетилирующихся из них, т. е. первичных и вторичных. Общее число ОН-групп можно определить методом Церевитинова (определение активного водорода) или с помощью ИК спектроскопии. Однако первый метод требует значительного количества вещества. При использовании второго метода достаточно 1—2 мг вещества.

К сожалению, применение этих методов в отношении сердечных гликозидов встречает препятствия. Карденолиды и буфадиенолиды, будучи высокомолекулярными многоатомными спиртами, дают сложные для идентификации спектры.

*Хроматографическое обнаружение.* В литературных источниках описаны многочисленные системы для разделения сердечных гликозидов с помощью ТСХ и БХ, которые можно разделить на следующие группы:

1. Для слабополярных гликозидов и агликонов; 2. Для полярных гликозидов и агликонов. Универсальными системами для ТСХ гликозидов является этилацетат–метанол–вода в различных соотношениях.

Сердечные гликозиды флуоресценцируют в УФ-свете. Поэтому для обнаружения их используют цветные реакции. Хроматограммы карденолидов можно обрабатывать реактивами Кедде, Легаля, Раймонда, Балье. Универсальными реактивами для карденолидов и буфадиенолидов являются: раствор сурьмы (III) хлорида с нагреванием; смесь хлорамина с кислотой трихлоруксусной; кислота серная концентрированная с нагреванием. Либермана–Бурхарда можно использовать для обнаружения любых стероидов, а также и сердечных гликозидов.

Фюржак и Лурже. Для обнаружения 2-дезоксисахара сначала проводят гидролиз, затем обрабатывают бумагу спиртовым раствором n-диметиламинобензальдегида с кислотой фосфорной или спиртовым раствором ванилина с кислотой фосфорной. Пятна сердечных гликозидов с 2-дезоксисахарами окрашиваются в голубой цвет.

*Количественное определение сердечных гликозидов*

Ни один из методов количественного определения сердечных гликозидов не является идеальным, каждый имеет свои недостатки. Количественное определение очень лабильных сердечных гликозидов нуждается в индивидуальном подходе в каждом случае.

Все методы количественного определения сердечных гликозидов можно разделить на 2 группы: биологические и физико-химические.

Биологические методы сердечных гликозидов основаны на определении биологической активности на лабораторных животных (кошках, лягушках, голубях и др.) и выражается в единицах действия (КЕД, ГЕД, ЛЕД). За единицу действия (1 КЕД, 1 ЛЕД, 1 ГЕД) принято наименьшее количество исследуемого объекта (1 мг вещества или 1 мл вытяжки из лекарственного растительного сырья), которая вызывает остановку сердца в систоле у животных в течение 1 ч.  Количество единиц действия в 1 г сырья называется валор.

Спектрофотометрический и колориметрический методы основаны на определении оптической плотности продуктов реакции сердечных гликозидов с различными хромогенными реактивами.

Полярографический метод основан на способности карденолидов и буфадиенолидов восстанавливаться на ртутно-капельном электроде.

Титриметрический метод основан на реакции гидроксиламина хлорида с карбонильной группой молекулы кардиогликозида, в результате чего выделяется соляная кислота, которая взаимодействует с диэтиламином, а избыток последнего оттитровывают раствором кислоты хлорной в метаноле.

Для количественного определения сердечных гликозидов хроматография в сочетании с спектрофотометрией, фотометрией, потенциометрией, полярографией, флюориметрией и др. методами считается перспективным.

Хорошие результаты получают при хроматографии на бумаге, пропитанный формамидом. В этом случае применяются бензол — хлороформ (9:1); (7:5); (3:7) пли толуол — к-бутанол (9:1); (4:1); (2:1); (1:1), этилаиетат— бензол — вода (84:16:50), хлороформ — бензол — н-бутанол (78:12:5) или просто хлороформа в качестве подвижной фазы. Эта система растворителей позволяет достичь четкого разделения сердечных гликозидов. В последние годы также широко используется тонкослойная хроматография. В качестве сорбента применяются силикагель, кизельгур, тальк и др. Системы растворителей используются вышеописанные

Для обнаружения гликозидов на хроматограммах применяют реактивы, вызывающие флуоресценцию или окрашивание. Наиболее часто применяют смесь 25%-ной трихлоруксусной кислоты и 3%-ного раствора хлорамина в этиловом спирте (15:1) . В УФ свете производные дигитоксигенина дают четкую золотисто-желтую флуоресценцию; гитоксигекина — голубую; дигоксигенина — серебряную.

Для количественного определения сердечных гликозидов наиболее простыми и доступными считаются фотометрические методы: спектрофотометрия и фотоколориметрия и их генинов в видимой области спектра. Эти методы основаны на цветных реакциях сердечных гликозидов с различными нитросоединениями (пикрат натрия, 3,5-динигробензол и др.) или ксантгидролом. Для приготовления эталонного раствора можно использовать кристаллические гликозиды, также возможно растворы дихромата калия и сульфита натрия.

Флуориметрическне методы основаны на способности сердечных гликозидов после кратковременного облучения УФ светомфпуоресцировать под действием сильных кислот (концентрированные серная, фосфорная кислоты) и окислителей (перхлорат железа, хлорид железа) В последние годы для количественного определения сердечных гликозидов применяется газожидкостная хроматография. При этом вначале из сердечных гликозидов путем ацетилирования и др. получают летучие производные (гептафторбутираты), а затем подвергают анализу. Нормативно-техническая документация на лекарственное растительное сырье, содержащее сердечные гликозиды, наряду с количественным определением требует обязательной стандартизации растительного сырья биологическими методами. По требованиям ГФ X биологическая стандартизация сердечных гликозидов проводится иа лягушках, кошках и голубях. Активность сердечных гликозидов оценивают по сравнению со стандартным кристаллическим препаратом и выражают в единицах действия (ЕД). Одна лягушачья единица действия (ЛЕД) соответствует наименьшей дозе стандартного препарата, вызывающей систолическую остановку сердца стандартной лягушки (лягушка-самец массой 28— 33 г) в течение 1 ч. Если испытывают сырье и препараты наперстянки, ландыша или горицвета – 1 ч, если испытывают сырье и препараты строфанта, желтушника и олеандра – 2 ч.

Под одной кошачьей или голубиной единицей действия (1 КЕД или 1 ГЕД) подразумевают дозу стандартного препарата из расчета на 1 кг массы животного.

В НТД на сердечные гликозиды, обязательно указывается валор. Валор сырья — это количество единиц действия в 1 г сырья. Наиболее часто используется стандартизация на лягушках. К основным недочетам этого метода относятся следующие: 1) исследования проводятся на холоднокровных животных, генетически далеко отстоящих от человека; 2) определяется смертельная доза, тогда как для клиники важно правильно определить терапевтические дозы; 3) лягушки используемых видов распространены не во нсех районах нашей страны и не во всех странах; 4) малая точность метода (± 20-25 %) ввиду резко изменяющейся чувствительности лягушек в зависимости от времени года и других условий.

Метод биологической стандартизации на кошках, принятый ГФ X, более точен (± 5—10 %), но также достаточно трудоемок.

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

D

C

H

1

2

3

4

5

6

7

8

9

1

0

1

1

1

2

A

B

Циклопентанпергидрофенантрен

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

O

O

H

H

O

H

O

1

2

3

4

5

6

10

9

8

7

11

12

Карденолид

1

3

1

4

1

5

1

6

1

7

1

8

1

9

2

0

2

1

2

2

2

3

O

H

O

H

H

O

O

2

4

1

2

3

4

5

6

10

9

8

7

11

12

Буфадиенолид

C

H

3

H

O

C

H

3

H

H

O

H

O

H

H

O

H

O

H

β-D-дигиталоза

C

H

3

H

H

H

O

H

H

H

O

H

O

H

O

H

β-D-дигитоксоза

C

H

3

H

H

H

O

H

3

H

H

O

H

O

H

O

H

D-цимароза

O

O

B

A

O

H

O

H

C

D

Дигитоксигенин

O

O

O

H

O

H

O

H

Дигоксигенин

O

O

O

H

O

H

O

H

Гитоксигенин

O

H

O

H

O

H

O

O

O

H

Дигинатигенин

O

H

O

O

O

D

i

g

O

D

i

g

O

D

i

g

O

G

l

c

Дигитоксигенин

Дигитоксин

Пурпуреагликозид A

O

H

O

O

O

D

i

g

O

D

i

g

O

D

i

g

O

G

l

c

O

H

1

6

Гитоксигенин

Гитоксин

Пурпуреагликозид B

O

H

O

H

H

H

O

H

H

C

H

2

O

H

O

H

O

O

H

H

H

H

O

H

H

C

H

3

O

C

O

-

C

H

3

O

H

H

H

H

O

H

H

H

C

H

3

O

O

H

H

H

H

O

H

H

H

C

H

3

O

O

O

O

H

1

4

H

Ланатозид A

O

H

O

O

O

D

i

g

S

i

m

D

O

O

β

G

l

c

C

O

H

O

H

D

G

l

c

α

Строфантидин

К-строфантин-β

Цимарин

К-Строфантозид

K-строфантозид-R=цимароза+β-глюкоза+β-глюкоза;

K-строфантин-R=цимароза+β-глюкоза

Цимарин – R = цимароза

O

H

3

O

H

O

H

C

H

2

H

O

H

H

O

O

5

1

0

1

1

1

4

1

6

1

7

Строфантидол

O

O

O

H

O

S

i

m

a

r

o

z

a

C

H

2

O

H

O

H

Цимарол

O

O

O

H

O

R

a

m

n

o

z

a

C

H

2

O

H

H

O

O

H

O

H

G-строфантин (уабаин)

R

3

O

O

O

H

O

H

R

2

R

1

Карденолиды

O

O

O

H

O

L

-

r

a

m

n

o

z

a

C

O

1

4

1

6

O

H

H

Адонитоксин

R1 = OH R2 = H R3 = CHO Строфантидин

R1 = H R2 = OH R3 = CHO Строфадогенин

R1 = H R2 = OH R3 = CH2OH Адонитоксол

R1 = R2 = OH R3 = CHO Адонитоксигенин

HCO

O

O

O

H

O

H

H

OH

Строфантидин

HCO

O

O

O

H

O

H

OH

H

Строфадогенин

H2CHO

O

O

O

H

O

H

OH

H

Адонитоксол

HCO

O

O

O

H

O

H

OH

OH

Адонитоксигенин

O

O

O

H

1

R

R

O

H

Агликон K-строфантина

Конваллотоксин R = CHO; R1 = L-рамноза.

Крнваллозид R = CHO; R1 = L-рамноза + D-глюкоза.

Конваллотоксол R = CH2OH; R1 = L-рамноза.

Гликоконваллозид R = CHO; R1 = L-рамноза –D-глюкоза + D-глюкоза.

Лекундозид R = CH3; R1 = L-рамноза

O

O

O

H

L-рамноза

CHO

O

H

Конваллотоксин

O

O

O

H

CHO

O

H

L-рамноза + D-глюкоза

Конваллозид

O

O

O

H

L-рамноза

H2CHO

O

H

Конваллотоксол

O

O

O

H

CHO

O

H

L-рамноза – D-глюкоза +D-глюкоза

Гликоконваллозид

O

O

O

H

L-рамноза

CH3

O

H

Лекундозид

O

O

O

H

O

R

C

O

H

C

H

3

O

H

Строфантидин – R = H

Эризимин – R = дигитоксоза

Эризимозид – R = дигитоксоза + глюкоза

Дезгликохейротоксин – R = гулометилоза + глюкоза

Хейротоксин – R = гулометилоза + глюкоза

Катестсеин – R = гулометилоза

Гликоканестсеин – R = гулометилоза + глюкоза

O

O

O

H

O

H

C

O

H

C

H

3

O

H

Строфантидин

O

O

O

H

O

Дигитоксоза–

C

O

H

C

H

3

O

H

Эризимин

O

O

O

H

O

C

O

H

C

H

3

O

H

Digitoksoza + qlükoza –

Эризимозид

O

O

O

H

O

Qulometiloza + qlükoza –

C

O

H

C

H

3

O

H

Дезгликохейротоксин

O

O

O

H

O

C

O

H

C

H

3

O

H

Qulometiloza + qlükoza –

Хейротоксин

O

O

O

H

O

Qulometiloza –

C

O

H

C

H

3

O

H

Канестеин

O

O

O

H

O

C

O

H

C

H

3

O

H

Qulometiloza + qlükoza –

Гликоканестеин

C

C

H

3

O

H

O

-

R

C

H

3

O

C

H

3

O

O

O

Олеандригенин

C

H

3

O

O

O

H

O

-

R

C

H

3

Адинеригени

Олеандрин = R -олеандроза Адинерин = R - дигиноза

C

C

H

3

O

H

O

-

Oleandroza

C

H

3

O

C

H

3

O

O

O

Олкандригенин

C

H

3

O

O

O

H

O

-

diginoza

C

H

3

Адинеригенин

O

H

O

O

O

-

R

O

H

Периплогенин

Периплосин R- цимароза + глюкоза

Периплоцимарин R- цимароза

O

H

O

O

O

-

simaroza + qlükoza

O

H

Периплосин

O

H

O

O

O

-

simaroza

O

H

Периплоцимарин

O

H

O

O

O

D

R

h

a

m

O

H

O

H

O

G

l

c

C

Корелборин К

Геллебригенин

Корелборин – P

R

3

O

O

O

H

O

H

R

2

R

1

Карденолиды

O

O

O

H

O

L

-

r

a

m

n

o

z

a

C

O

1

4

1

6

O

H

H

Адонитоксин

O

H

O

O

O

H

C

H

O

O

H

3

Геллебригенин

*Биологическое действие сердечных гликозидов.*

 Характерным признаком сердечных гликозидов является специфическое действие на сердечную мышцу, обусловленное ненасыщенным лактонным кольцом. В малых дозах они усиливают сердечные сокращения, в больших, наоборот, угнетают работу сердца и могут вызвать его остановку.  Действие сердечных гликозидов проявляется в изменении всех основных функций сердца.

Под действием кардиогликозидов наблюдается:

- усиление систолических сокращений сердца, длительность систолы уменьшается (положительное инотропное действие);

- удлинение диастолы, ритм сердца замедляется, улучшается приток крови к желудочкам (отрицательное хронотропное действие);

- повышение тонуса миокарда (положительное тонотропное действие);

- ухудшение проводимости миокарда (отрицательное дромотропное действие);

-  усиление возбудимости миокарда: удлиняется промежуток между сокращениями предсердий и желудочков (положительное батмотропное действие).

В диапазоне терапевтических доз возникают только первые три эффекта, именно они обусловливают клиническую ценность сердечных гликозидов.

Последние два эффекта проявляются при передозировке (эффект кумуляции).

Биологическая активность сердечных гликозидов зависит от числа групп СН3 и особенно ОН у углеродных атомов "скелета".   С увеличением числа гидроксильных групп повышается их полярность и соответственно растворимость в воде. По кардиотоническому действию агликоны мало отличаются от исходных сердечных гликозидов, но быстро инактивируется в печени.

Кроме кардиотонического действия сердечные гликозиды проявляют цитостатическое действие, успокаивают ЦНС

Агликоны сердечных гликозидов свободно не применяется в медицинской практике. Они плохо удерживаются сердечной мышцей, поэтому оказывают кратковременный эффект, кроме того токсичны (за исключением буфадиенолидов).

**Методы стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов, содержащих сердечные гликозиды.**

НТД (нормативно-технические документы) на сырье и препаратов, содержащее сердечные гликозиды проводится на лягушках (ЛЕД), кошках (КЕД), голубях (ГЕД). Несмотря на некоторые недостатки, этот метод незаменим при анализе лекарственного растительного сырья и галеновых препаратов, так как различные сопутствующие им вещества также могут взаимодействовать с химическими реактивами. Спектральные методы анализа используют для чистых препаратов, а сложные препараты анализируют хроматоспектрофотометрически. Количественное определение сердечных гликозидов проводят методом газожидкостной хроматографии после полного их гидролиза и получения агликона или хроматографией их триметилсилиловых эфиров . Во всех случаях, когда количественное определение препарата осуществляют физико-химическим методом, или биологической стандартизацией указаны в НТД.