

ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России
Кафедра фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии

Лекция 32.
ФЛАВОНОИДЫ.
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

19.05.2020г.

Разработчик: к.фарм.н., доцент Т.С. Полухина

Физические свойства.

Катехины, лейкоантоцианидины, флаванолы, изофлавоны - бесцветные;

флаваноны, флавоны, флавонолы - желтые;

халконы и ауроны - оранжевые;

антоцианидины в зависимости от реакции среды красные, синие или фиолетовые аморфные или кристаллические вещества, без запаха, горького вкуса, с определенной температурой плавления (гликозиды - 100-180 °С, агликоны - до 300 °С).

Гликозилированные формы флавоноидов, катехины и лейкоантоцианидины хорошо растворимы в воде, этаноле и метаноле различной концентрации, нерастворимы в органических растворителях (диэтиловом эфире, хлороформе, ацетоне).

Физические свойства.

Свободные агликоны, за исключением катехинов и лейкоантоцианидинов, нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в этаноле, метаноле и других органических растворителях (диэтиловом эфире, хлороформе, ацетоне).

Все флавоноиды хорошо растворимы в пиридине, диметилформамиде и щелочах.

Все флавоноиды оптически активны, способны флуоресцировать в УФ-свете, имеют характерные УФ-спектры, характеризующиеся наличием двух максимумов поглощения, и ИК-спектры.

Химические свойства.

Химические свойства обусловлены особенностью строения флавоноидов: наличием ароматических, пиранового или пиронового колец, функциональных групп.

1. Гликозиды подвергаются ферментативному и кислотному гидролизу до агликонов и сахаров. О-гликозиды гидролизуются более или менее легко при действии разбавленных минеральных кислот и ферментов.

С-гликозиды с трудом расщепляются только в жестких условиях при действии крепких кислот (кислоты концентрированные хлористоводородная или уксусная) или их смесей (смесь Килиани) при длительном нагревании.

2. Благодаря кольцам А и В флавоноиды способны:

- образовывать комплексные соединения с солями металлов (железа, алюминия, циркония). С солями железа - в зависимости от количества гидроксильных групп от зеленой и синей до коричневой окраски; с солями алюминия — желтой окраски, с желто-зеленой флуоресценцией;
- вступать в реакцию азосочетания с солями диазония с образованием азокрасителей.

3. Флавоноиды, содержащие пироновый цикл (флавоны и флавонолы), способны:

- восстанавливаться в кислой среде атомарным (свободным) водородом, полученным в результате реакции взаимодействия кислоты с металлическим магнием или цинком, до антоцианидинов (проба Шинода, или цианидиновая проба);
- растворяться в щелочах с образованием растворимых в воде фенолятов.

4. Флавоноиды, содержащие пирановый цикл (катехины, лейкоантоцианидины), способны легко окисляться до производных флавона и флавонола.

5. Флавоноиды при сплавлении в жестких условиях со щелочью распадаются на составные части, что используется для установления их структуры.

Физические и химические свойства используются в анализе сырья на подлинность и доброкачественность.

Способы получения.

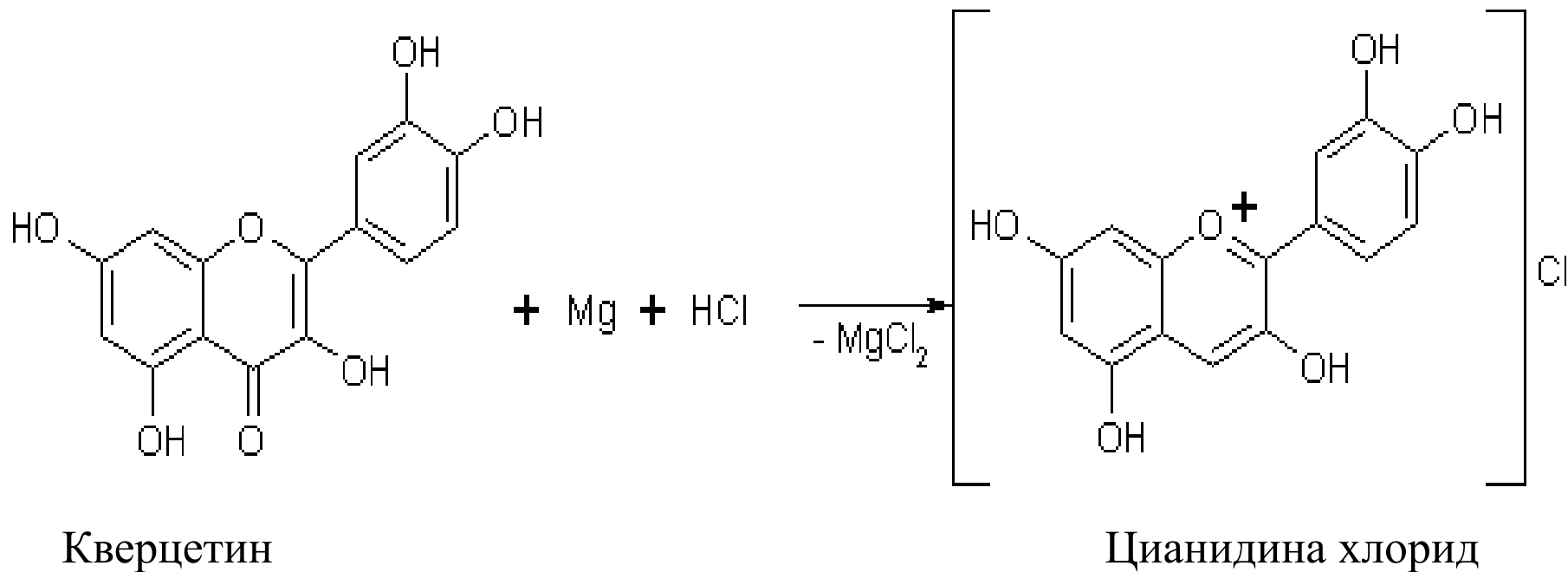
Для выделения флавоноидов проводят экстракцию растительного материала этанолом.

Спиртовое извлечение упаривают, к остатку добавляют горячую воду и после охлаждения удаляют неполярные соединения (хлорофилл, жирные и эфирные масла и др.) из водной базы хлороформом или четыреххлористым углеродом.

Для выделения отдельных флавоноидов существуют специфические методы.

Качественные реакции.

Цианидиновая проба (проба Шинода). Флавоноиды при восстановлении атомарным водородом в присутствии магния (или цинка) и кислоты концентрированной хлористоводородной образуют характерное окрашивание. Реакция очень чувствительна, основана на восстановлении карбонильной группы и образовании антоцианидинов.



• *Проба Брианта.*

Проводится при положительной цианидиновой реакции и является ее модификацией. Эта проба дает возможность сделать заключение о присутствии в сырье гликозидов и (или) агликонов.

В пробирку, где проводилась проба Шинода, добавляют октанол и встряхивают. Если:

- окраска перешла в органический слой - в сырье содержатся только агликоны, которые растворимы в октанолe;
- окраска осталась в водной фазе - в сырье присутствуют только гликозиды;
- окрасились оба слоя - в сырье присутствуют флавоноиды как в виде гликозидов, так и в виде агликонов.

3. *Реакция с солями железа (III).* С железа окисного хлоридом образуются комплексные соединения, окрашенные в черно-синий цвет, если флавоноиды – тригидроксипроизводные, и в зеленый - если дигидроксипроизводные.

4. *Реакция с 2-5 % спиртовым раствором алюминия хлорида.* Флавоноиды, имеющие две гидроксигруппы у C_3 и C_5 , образуют хелатные комплексы за счет водородных связей, возникающих между карбонильной и гидроксильными группами и ионом алюминия, имеющие желтый цвет с желто-зеленой флуоресценцией.

Эта реакция приведена в ГФ XIII для подтверждения подлинности сырья зверобоя, горца перечного и спорыша птичьего.

Аналогично образуются комплексы с солями циркония.

5. Реакция с 1 % раствором основного свинца ацетата.

Антоцианидины дают синий аморфный осадок.

Флавоны, халконы и ауруны - осадки ярко-желтого цвета.

6. Реакция с 10 % спиртовым раствором щелочи.

Флавоны, флавонолы, флаваноны и флаванололы растворяются в щелочах с образованием фенолятов желтого цвета, при нагревании окраска изменяется до оранжевой или коричневой.

Халконы и ауруны при взаимодействии со щелочами обычно дают красное или ярко-желтое окрашивание.

Антоцианидины образуют со щелочами соли от синего до оливково-зеленого цвета.

7. **Реакция азосочетания с диазосоединениями** (кислота сульфаниловая или *пара*-нитроанилин). Образуется азокраситель оранжевого, красного или вишнево-красного цвета.

8. **Борно-лимонная реакция с реактивом Вильсона** (по 0,5 г кислот борной и лимонной в метаноле).

Реакция отличия флавоноидов от фуранохромонов. Флавоноиды дают с кислотой борной комплексы желтой окраски с ярко-желтой флуоресценцией, которые не разрушаются кислотой лимонной.

Фуранохромоны со смесью кислот борной и лимонной не реагируют.

Хроматографическое исследование.

Для идентификации и разделения флавоноидов используют методы бумажной, колоночной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента.

Используют различные системы растворителей:

- для БХ чаще всего БУВ (бутанол – кислота уксусная - вода) 4:1:5; 4:1:2;
- для ТСХ - хлороформ-метанол 8:3; 8:2.

Идентифицируют флавоноиды по характерному свечению на хроматограммах в УФ-свете до и после проявления хромогенными реактивами.

Катехины и лейкоантоцианидины не флуоресцируют. Гликозиды флавонов и изофлавонов флуоресцируют голубым или синим цветом, флавонолов - темно-коричневым или черным, агликоны флавонов - коричневым, флавонолов - желтым, халконы и ауроны имеют желтую или оранжевую флуоресценцию.

Для проявления флавоноидов на хроматограммах используют:

1) пары аммиака 25 %. Происходит усиление окраски пятен в УФ-свете или изменение окраски на желтую.

2) 2-5 % спиртовой раствор алюминия хлорида. Наблюдается желто-зеленая флуоресценция в УФ-свете, в видимом свете - желтое окрашивание пятен.

3) Катехины проявляют 1 % раствором ванилина в кислоте концентрированной хлористоводородной, в видимом свете наблюдается красное окрашивание.

Количественное определение.

Фотоэлектроколориметрический (ФЭК) метод.

ФЭК-метод основан на измерении оптической плотности окрашенных растворов, полученных по реакции флавоноидов с солями металлов или азосочетания с солями диазония.

ГФ XIII приводит ФЭК-метод для определения содержания суммы флавоноидов в листьях вахты трехлистной.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному образцу рутина.

Спектрофотометрический метод (СФМ).

СФМ основан на способности флавоноидов или их окрашенных комплексов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны.

1. Получают спиртовое извлечение и измеряют собственное поглощение:
2. Получают спиртовое извлечение, затем проводят реакцию образования комплекса с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и измеряют оптическую плотность.

Хроматоспектрофотометрический метод.

1. Предварительное разделение флавоноидов в тонком слое сорбента (цветки боярышника).

Стадии определения:

- получение спиртового извлечения;
- очистка извлечения;
- хроматографическое разделение флавоноидов на пластинке «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол 8:2 вместе со свидетелем ГСО гиперозида;
- идентификация гиперозида и свидетеля на пластинках в УФ-свете;
- элюирование гиперозида и ГСО смесью диоксана и воды 1:1;
- измерение оптической плотности испытуемого раствора и ГСО при длине волны 365 нм;
- расчет содержания гиперозида.

2. Предварительное разделение на колонке с полиамидом (плоды боярышника).

Стадии определения:

- получают спиртовое извлечение;
- отгоняют спирт и обрабатывают остаток 10 % раствором натрия хлорида;
- полученный раствор наносят на колонку с полиамидом;
- элюируют флавоноиды с колонки 95 % этанолом, собирают окрашенный в желтый цвет элюат в мерную колбу на 25 мл;
- измеряют оптическую плотность элюата при длине волны 365 нм;
- параллельно измеряют оптическую плотность элюата ГСО гиперозида, полученного аналогично элюату флавоноидов;
- пересчитывают на гиперозид с учетом оптической плотности элюата ГСО гиперозида.