Лекция № 13 Современные методы качественного и количественного анализа основных БАВ

План лекции:

1. Физические, химические и биологические свойства БАВ
2. Методы качественного и количественного анализа БАВ
3. **Физические, химические и биологические свойства БАВ**

Физические свойства.

*По агрегатному состоянию* эфирные масла, жирные масла и безкисло родные алкалоиды представляют собой жидкости.

Эфирные масла - летучие жидкости, представляющие собой смеси органических веществ различной природы, вырабатываемые растениями и обусловливающие их запах.

Жирные масла - сложные нелетучие органические вещества растительного и животного происхождения, представляющие собой смеси различных глицеридов.

*По цвету* эфирные и жирные масла - чаще всего бесцветные или желтоватые. Эфирные масла могут быть и окрашенными: например, красное - масло тимьяна, синее - от присутствия азуленов масло цветков ромашки и травы тысячелистника. Жирные масла при нагревании оставляют жирное пятно на бумаге, эфирные - испаряются без остатка.

*Запах масел*, особенно эфирных, ароматный, характерный, плотность колеблется от 0,8 до 1,19, но большей частью меньше единицы.

*Безкислородные алкалоиды* (анабазин, кониин, пахикарпин, никотин) бесцветные или окрашенные маслянистые жидкости с неприятным запахом. Все указанные жидкости не растворимы в воде, но хорошо растворяют в спиртах, жирах, неполярных органических растворителях (хлороформ, ди-этиловый и петролейный эфиры), обладают оптической активностью, масла способны к рефракции.

При охлаждении, а иногда при комнатной температуре эфирные масла застывают в кристаллическую массу - стеароптен, оставшаяся жидкая часть на зывается элеоптеном. Эфирные масла и безкислородные алкалоиды способны перегоняться с водяным паром.

К твердым кристаллическим или аморфным веществам относятся: горечи, полисахариды, сердечные гликозиды, сапонины, простые фенольные соединения, кумарины, хромоны, лигнаны, флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества, кислородсодержащие алкалоиды, водорастворимые витамины.

*Цвет.*

Бесцветные или слегка желтоватые - горечи (монотерпеноидные иридоиды), полисахариды, сердечные гликозиды, сапонины, простые фенольные соединения, кумарины, хромоны, лигнаны, флавоноиды группы флавана, аскорбиновая кислота, большинство кислородсодержащих алкалоидов. Флавоноиды, производные флавонов, витамин К - желтые; халконы, ауроны и каротиноиды - оранжевые; антоцианы - красного или синего цвета в зависимости от реакции среды (кислая или щелочная); антраценпроизводные - желтого, оранжевого или красного цвета; дубильные вещества - желтые или желто-бурые.

*Вкус.*

Большинство БАВ без запаха, горького вкуса: горечи, сердечные гликозиды, кумарины, хромоны, некоторые флавоноиды, антраценпроизвод­ные, алкалоиды. Гомогликозиды без запаха и вкуса. Дубильные вещества вя­жущего вкуса, аскорбиновая кислота - кислого.

*Растворимость.*

БАВ в растениях встречаются в виде гликозидов и агликонов: иридоиды, полисахариды, сердечные гликозиды, сапонины, простые фенольные соединения, кумарины, хромоны, лигнаны, флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества.

*Гликозиды* растворимы в воде и водных растворах низших спиртов (метиловом и этиловом) и плохо растворимы в органических растворителях (бензоле, эфире хлороформе).

*Полисахариды* не растворяются в спирте и неполярных органических растворителях. Растворимость полисахаридов в воде варьирует: некоторые линейные гомополисахариды не растворяются в воде, сложные и разветвленные полисахариды либо растворяются в воде, либо образую гели.

Гидрофильные *сердечные гликозиды* хорошо растворяются в воде, плохо - в липидах, липофильные - легко растворяются в липидах, плохо - в воде.

*Агликоны* нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в неполярных органических растворителях (эфире, хлороформе), спиртах, ацетоне.

*Катехины и лейкоантоцианидины* растворимы в воде, спиртах и ацетоне, плохо растворяются в других органических растворителях.

*Дубильные вещества* хорошо растворяются в воде с образованием колло­идных растворов, растворимы также в этиловом и метиловом спирте, ацетоне, этилацетате, бутаноле, пиридине, не растворимы в хлороформе, бензоле, диэтиловом эфире и других неполярных растворителях.

*Алкалоиды* в растениях встречаются в виде солей и виде оснований.

*Алкалоиды-соли* хорошо растворимы в воде и этиловом спирте (особенно в разбавленном), плохо или совсем не растворимы в органических растворителях (хлороформ, этиловый эфир, дихлорэтан и др.).

Исключения: хинина сульфат плохо растворяется в воде; скополамина гидробромид растворяется в хлороформе.

*Алкалоиды-основания* обычно плохо растворяются в воде, но легко рас­творяются в органических растворителях.

Исключения: цитизин, кофеин, кодеин хорошо растворяются и в воде и в органических растворителях.

Все гликозиды и алкалоиды оптически активны.

Возгоняются при высокой температуре: кумарины, антраценпроизводные, отдельные алкалоиды (кофеин, никотин).

Флюоресцируют в УФ-свете:

- сердечные гликозиды - оттенками желтого, зеленого и голубого цветов;

- простые фенолы, кумарины - голубым, синим, фиолетовым, зеленым и желтым цветом;

- большинство хромонов и лигнанов - желтым или желто-зеленым цветом;

- флавоны, флавонол-3-гликозиды, флаваноны, халконы - коричневым цветом;

- флавонолы и их 7-гликозиды - желтым или желто-зеленым цветом;

- ксантоны - оранжевым цветом;

- катехины - бесцветным и голубым цветом;

- антраценпроизводные - розовым, красным, оранжевым, желтым цветом;

- некоторые алкалоиды: цитизин - фиолетовым, берберин - желто-зеленым цветом;

- витамин К - красным, но под действием УФ-лучей быстро разрушается, флуоресценция переходит в зеленую.

*Специфическим свойством сапонинов* является их способность снижать поверхностное натяжение жидкостей (воды) и давать при встряхивании стойкую обильную пену. Такая поверхностная активность связана с наличием в молекулах сапонинов одновременно как гидрофильного, так и липофильного остатков.

Химические свойства

Химические свойства *гликозидов* многообразны и обусловлены наличием гликозидной связи и строением сахаров и агликона. Под действием ферментов при наличии воды гликозиды гидролизуются. Возможен гидролиз ферментативный, кислотный и щелочной. Оптимальной для ферментативного гидролиза является температура 30-50 °С, при температуре свыше 50°С ферменты денатурируют.

Химические свойства *сердечных гликозидов* обусловлены наличием стероидного ядра, лактонного кольца, углеводной цепи и присутствием гликозидной связи. Самыми нестойкими в молекулах сердечных гликозидов являются лактонное кольцо и гликозидная связь.

В случае, когда на конце углеводной цепи находятся глюкоза или рамноза, сердечные гликозиды легко обрывают конечную молекулу моносахарида и образуют вторичные гликозиды.

Реакции *на стероидную структуру* основаны на способности стероидного ядра сердечных гликозидов и стероидных сапонинов под­вергаться дегидратации под действием кислотных реагентов (уксусный ангид­рид, конц. серная кислота, трихлоруксусная кислота) с образованием ок­рашенных комплексных соединений (реакция Либермана-Бурхарда).

Реакции *на ненасыщенное лактонное кольцо* сердечных гликозидов основаны на способности ненасыщенного лактонного кольца легко окисляться полинитросоединениями (нитропруссид натрия, пикриновая кислота) в щелочной среде с образованием окрашенных в желтый или красный цвет продуктов реакции.

Реакции *на углеводную часть* молекулы гликозида основаны на способности моносахаридов углеводной цепи образовывать окрашенные комплексы с различными реактивами. Моносахара, входящие в состав гликозида вступают во все цветные реакции, свойственные углеводам (с раствором Феллинга, серебряного зеркала).

*Фенольные гликозиды* дают:

- растворимые в воде феноляты с гидроксидом натрия: флавоноиды и кумарины - желтого; антрагаикозиды - вишнево-красного цвета;

- окрашенные комплексные соли с хлоридом окисного железа или железоаммонийными квасцами от зеленой до фиолетовой окраски (простые фенолы, кумарины, лигнаны, флавоноиды, дубильные вещества);

- с хлоридом алюминия - желтую окраску с желто-зеленой флюоресценцией (флавоноиды);

- с ацетататом свинца и магния, солями меди, молибдена, циркония (все фенольные соединения);

- реакцию азосочетания с солями диазония с образованием азокрасителя в

зависимости от структуры от желтого до вишнево-красного цвета.

*Флавоноиды* способны восстанавливаться (проба Синода),

*простые фе*нольные соединения – (гидрохинон) окисляться раствором йода.

*Дубильные вещества* легко окисляются кислородом воздуха, перманганатом калия и другими окислителями. Они способны образовывать прочные межмолекулярные связи с белками и другими полимерами (пектиновые вещества, целлюлоза), легко адсорбироваться на кожном порошке, целлюлозе, клетчатке.

Из водных растворов дубильные вещества осаждаются желатином, алкалоидами - основным ацетатом свинца, бихроматом калия, сердечными гликозидами.

*Алкалоиды* образуют нерастворимые (или слабо растворимые) осадки с комплексными йодидами металлов, высокомолекулярными неорганическими кислотами, высокомолекулярными органическими веществами кислого характера (общеалкалоидные осадочные реакции).

Алкалоиды вступают в реакции, зависящие от наличия в их молекулах различных функциональных групп. Например, морфин содержит фенольный гидроксил, поэтому он со щелочами образует феноляты, дает реакции с хлоридом окисного железа и другими реактивами.

**2) Методы качественного и количественного анализа БАД**

Биологически активные добавки к пище могут быть разрешены к применению без проведения клинических испытаний на основании экспертизы необходимой документации:

а) при наличии представленных фирмой-изготовителем материалов, свидетельствующих о клинических испытаниях эффективности предлагаемой БАД; клинические испытания должны быть выполнены в уполномоченных на проведение таких исследований учреждениях в Республике Казахстан и/или стране-изготовителе;

б) если БАД содержит отдельные нутриенты и их комплексы в дозировке уже установленной и апробированной для этого вида БАД в Казахстане;

в) если парафармацевтики содержат изученные и уже использующиеся в клинической практике растительные компоненты в дозах, установленных для БАД в Казвхстане.

Решение о необходимости проведения клинических испытаний принимаются, если:

а) фирмой-заявителем направляется на сертификацию БАД без соответствующей документации, подтверждающей ее эффективность результатами проведенных клинических испытаний;

б) БАД содержит новые действующие ингредиенты;

в) требуется разрешение к применению в связи с новыми показателями, новой дозировкой, изменением состава, а также в случае изменения в технологическом регламенте.

**Клинические испытания биологически активных** добавок к пище осуществляются, как правило, в контролируемых условиях стационара или в амбулаторных условиях в специализированных учреждениях, которые располагают квалифицированными специалистами в области науки о питании или в соответствующей области медицины, современным научным оборудованием, хорошей многопрофильной клинической базой и аккредитованных на проведение подобных исследований в порядке, установленном МЗ РК.

Образцы биологически активных добавок к пище предоставляются фирмой в том количестве, которое предусматривается программой испытания.

Схема проведения испытаний биологически активных добавок к пище включает следующие этапы:

- экспериментальную и/или аналитическую оценку основных компонентов БАД к пище на основании представленной фирмой-производителем документации и результатов);

- разработку программ клинических испытаний биологически активных добавок к пище, которая определяется, с одной стороны, особенностями химического состава и предполагаемого биологического действия исследуемых БАД на организм, применительно к тем нозологическим формам заболевания, при которых использование добавок с профилактической целью представляется наиболее адекватным и перспективным, а с другой стороны, типом функциональных и метаболических нарушений, свойственных данной патологии;

- определение методики проведения клинических испытаний. Для получения достоверных данных о профилактическом действии БАД к пище необходимым условием является наличие двух групп: основной (опытной) и контрольной. Они могут формироваться из здоровых лиц или больных с определенной патологией. Группы сравнения должны быть максимально сходными по половозрастному признаку, массе тела, пищевому статусу. В случае проведения испытаний на больных, помимо этого учитывается степень тяжести основного заболевания, характер сопутствующей патологии.

Оценка эффективности БАД к пище осуществляется на фоне идентичных режимов питания в опытной и контрольной группах. Предпочтительным при этом является использование двойного слепого метода испытаний с применением плацебо в контрольной группе. В процессе проведения клинических испытаний определяются органолептические свойства БАД и их переносимость, осуществляется оценка их эффективности, выявление возможных побочных эффектов;

- помимо общих клинических показателей в план исследований включаются гематологические и специальные функциональные тесты, биохимические, микробиологические, иммунологические и другие показатели. Выбор критериев оценки эффективности апробируемых БАД к пище определяется характером испытуемых БАД и клинико-патогенетическими особенностями нозологических форм, при которых они применяются;

- продолжительность клинической апробации устанавливается в зависимости от типа БАД к пище и по согласованию с фирмой-заявителем;

- в заключении по итогам испытания БАД должны быть представлены результаты изучения переносимости БАД, ее эффективности, рекомендуемая дозировка БАД, показания к применению, возможные побочные эффекты.

Изучение органолептических свойств БАД осуществляется с использованием анкетно-опросного метода. Оценивается вкус, запах, цвет, консистенция БАД, наличие посторонних запахов и т. д.

Переносимость БАД оценивается путем клинического наблюдения по субъективным и объективным признакам. Исследуется:

- состояние кожных покровов;

- системы пищеварения;

- сердечно-сосудистой системы и других органов и систем организма.

Все исследования осуществляются в динамике, как минимум 2 раза, до применения БАД и после завершения курса лечения.

В этой связи нутрицевтики - источники витаминов, полиненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, пищевых волокон, других пищевых веществ в большем числе случаев не нуждаются в оценке их профилактической эффективности в эксперименте или в клинических наблюдениях, поскольку при экспертной оценке рецептур этих продуктов, заключение о возможной их эффективности эксперт может строить на основе общеизвестных литературных данных и учете рекомендованных доз компонентов нутрицевтика в сравнении с физиологической суточной потребностью в них здорового человека. Нутрицевтики подвергаются полной схеме исследований на определение в них декларируемых величин пищевых веществ и показателей безопасности.

При проведении оценки безопасности и эффективности необходимо определить долю (в процентах) от суточной потребности, которая обеспечивается нутриентами, входящими в состав предлагаемой биологически активной добавки к пище при рекомендуемой дозе приема. Этикетка маркируется лишь теми величинами, значения которых превышают 5% (витамины и макро- и микроэлементы) или 2% (другие пищевые вещества и энергия). Содержание витаминов не должно превышать суточную потребность более чем в три раза для витаминов А, Д, В1, В2, В6, В12, ниацина, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты, биотина и не более чем в 10 раз - для витаминов Е и С.

Все растения, входящие в состав парафармацевтика, должны быть проверены по отечественной и международной нормативной документации в плане разрешения их применения в пищевой промышленности, а также в составе лекарственных чаев и сборов в соответствии с требованиями: РКазахстанской Фармакопеи; зарубежных Фармакопей; Методических указаний о порядке доклинического и клинического изучения препаратов природного происхождения и гомеопатических лекарственных средств.

Физиологический уровень содержания действующих начал многих парафармацевтиков в клетках и тканях организма не известен (например, биогенные амины, олигопептиды, гликозиды, органические кислоты, сапонины и др.), равно как и не известна физиологическая потребность в них взрослого здорового человека. Более того, у достаточно большого количества таких БАД вообще не идентифицированы активные компоненты, т.е. действующие начала. Примером таких соединений могут служить экстракты, получаемые из сложных комплексов пищевых и лекарственных растений и других видов природного сырья. Отсутствие нормы количественного содержания в организме действующих веществ парафармацевтиков, а также физиологической потребности в них, в ряде случаев вызывает необходимость оценки их действия на организм в целом или отдельные его системы и органы, т.е. возникает задача исследования функциональной активности парафармацевтиков.

**Основные методические подходы к экспериментальной оценке эффективности БАД-парафармацевтиков**

- радиопротекторного действия БАД-парафармацевтиков - мышей облучают сублетальными дозами рентгеновского излучения (200-300 Рад) и изучают влияние БАД на показатели иммунной системы, с добавлением методов оценки пролиферативной и антителообразующей активности клеток селезенки и ОАО системы;

- иммуномодулирующего действия БАД-парафармацевтиков - мышам вводят циклофосамид или циклоспорин А (применение того или иного иммунодепрессанта определяется преимущественным действием БАД на конкретное звено иммунной реакции) и изучают влияние БАД на показатели иммунной системы с добавлением методов определения пролиферативной и антителообразующей активности клеток селезенки мыши;

- антиоксидантного действия - мышам вводят раствор четыреххлористого углерода и изучают показатели ОАО системы, с добавлением методов определения диеновой коньюгации ПНЖК и гидроперекиси липидов;

- резистентности к инфекциям - мышей заражают штаммом S.typhi и изучают показатели иммунной системы с добавлением метода определения неспецифической резистентности к инфекциям;

- изучение адаптогенного действия парафармацевтиков проводят на стандартных моделях различных экстремальных условий (повышенная физическая нагрузка, гиподинамия), а также исследуют эмоциональные поведенческие реакции животных.

При изучении эффективности БАД, основными компонентами которых являются витамины, критерием оценки служит динамика изменения витаминной обеспеченности организма под влиянием этих БАД к пище по содержанию витаминов в сыворотке крови и выделению их с мочой.

Биологически активные добавки к пище с эубиотическим действием на основе чистых культур микроорганизмов исследуются по их влиянию на микробиоценоз кишечника.

При исследовании воздействия парафармацевтиков, оказывающих влияние на функциональное состояние организма в целом и отдельных его систем, используются методы врачебного контроля, характеризующие клиническое состояние пациентов, и соответствующие инструментально-лабораторные показатели.

Парафармацевтики, обладающие общеукрепляющим и противовоспалительным действием проверяют по изучению состояния гуморального и клеточного иммунитета, интенсивность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантной защиты организма.

Оценка биологически активных добавок к пище анорексигенного действия осуществляется по степени выраженности специфического эффекта и динамике массы тела.

Основные вопросы:

1) В каких случаях биологически активные добавки к пище могут быть разрешены к применению без проведения клинических испытаний;

2) Что такое клиническое испытание БАД

3) Из каких этапов состоит схема проведения испытаний биологически активных добавок к пище

4) Как осуществляется изучение органолептических свойств БАД

5) Как определяется переносимость БАД

6) Основные методические подходы к экспериментальной оценке эффективности БАД

7) Физические и химические свойства БАВ

1. Методы анализа, основанные на физических и химических свойствах БАВ