

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Учебно-методическое пособие

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2017

Утверждено научно-методическим советом фармацевтического факультета 31 мая 2017 г., протокол № 1500-08-05

Составители: И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, О.А. Колосова, А.А. Мальцева

Рецензент – канд. фарм. наук, доц. П.М. Карлов

Подготовлено на кафедре управления и экономики фармации и фармакогнозии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета.

Рекомендовано для студентов фармацевтического факультета Воронежского государственного университета при изучении дисциплины «Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья».

Для специальности: 33.05.01 – Фармация

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Предисловие..... | 4 |
| ТЕМА 1. Качественный анализ и количественное определение витаминов и полисахаридов в лекарственном растительном сырье..... | 5 |
| ТЕМА 2. Качественный анализ эфирных и жирных масел. Количественное определение эфирного масла в лекарственном растительном сырье..... | 14 |
| ТЕМА 3. Качественный и количественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего алкалоиды | 35 |
| ТЕМА 4. Качественный и количественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего сердечные гликозиды и сапонины | 44 |
| ТЕМА 5. Качественное и количественное определение антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье..... | 54 |
| ТЕМА 6. Качественный и количественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего простые фенолы и дубильные вещества..... | 61 |
| ТЕМА 7. Качественное и количественное определение флавоноидов, кумаринов и хромонов в лекарственном растительном сырье | 69 |
| Библиографический список..... | 77 |

Предисловие

Учебно-методическое пособие разработано в помощь студентам ВО для самостоятельной работы при подготовке к лабораторным занятиям по дисциплине «Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья».

Цель курса: формирование у студентов знаний, умений и практических навыков по вопросам фитохимического анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья, в основу которых положены теоретические сведения по отдельным группам биологически активных веществ, включая их определение, классификацию, физико-химические свойства, способы получения, очистки и разделения, методы идентификации, качественного и количественного определения, с использованием рациональных и современных методов исследования.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения курса

1. Общепрофессиональные (ОПК)

студент должен обладать:

– готовностью решать стандартные задачи профессиональной деятельности с использованием информационных, библиографических ресурсов, медико-биологической и фармацевтической терминологии, информационно-коммуникационных технологий и учетом основных требований информационной безопасности (ОПК-1);

2. Профессиональные (ПК)

студент должен обладать:

– способностью к организации заготовки лекарственного растительного сырья с учетом рационального использования ресурсов лекарственных растений (ПК-5);

– способностью к проведению экспертизы лекарственных средств с помощью химических, биологических, физико-химических и иных методов (ПК-10).

Этапы освоения курса

I. Самостоятельная внеаудиторная работа:

- 1) изучение теоретического материала по вопросам;
- 2) работа на компьютерах с тестами-тренажерами;
- 3) решение ситуационных задач по темам дисциплины.

II. Аудиторная работа:

1) выполнение лабораторных заданий по фитохимическому анализу лекарственного растительного сырья;

2) заполнение «Рабочей тетради по фитохимическому анализу»;

- 3) отчет студента о результатах освоения темы.

ТЕМА 1. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Цель занятия: овладеть методиками качественного анализа и количественного определения витаминов и полисахаридов в лекарственном растительном сырье.

ЧАСТЬ 1. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего ВИТАМИНЫ

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение группе БАВ «витамины».
2. Рассмотрите классификации витаминов.
3. Охарактеризуйте физико-химические свойства витаминов.
4. Рассмотрите методы обнаружения витаминов в лекарственном растительном сырье.
5. Перечислите методики количественного определения витаминов в растительном сырье.
6. Используя материалы учебных и справочных пособий, заполните предложенную таблицу.

| Витамины | Биологическая роль | Примеры ЛРС, продуктов, содержащих витамины |
|------------------------|--------------------|---|
| Витамин А | | |
| Витамин С | | |
| Витамин В ₁ | | |
| Витамин В ₆ | | |
| И т.д. | | |

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Экстракция аскорбиновой кислоты из лекарственного растительного сырья

Выделите аскорбиновую кислоту из растительного сырья для проведения качественных реакций и хроматографического исследования.

Методика

1. Взвешивают 5 г растительного сырья (плоды шиповника).
2. Измельчают в фарфоровой ступке и добавляют 50 мл дистиллированной воды.

3. Полученную смесь настаивают 10 мин, затем фильтруют через бумажный фильтр.

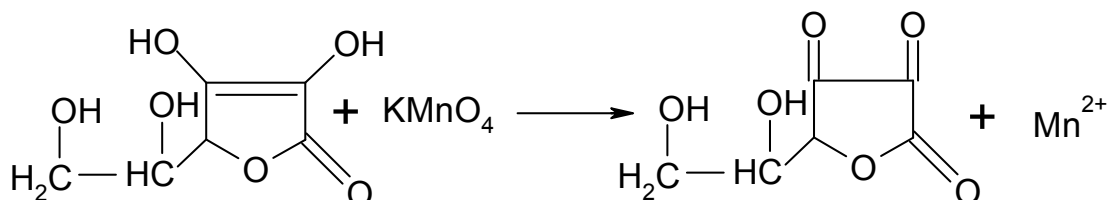
4. Фильтрат используют для проведения качественных реакций.

Задание 2. Качественное определение аскорбиновой кислоты в извлечении из растительного сырья

Определение аскорбиновой кислоты основано на ее высокой восстановительной способности. Проведите качественные реакции на присутствие аскорбиновой кислоты в извлечении из лекарственного растительного сырья и сделайте вывод.

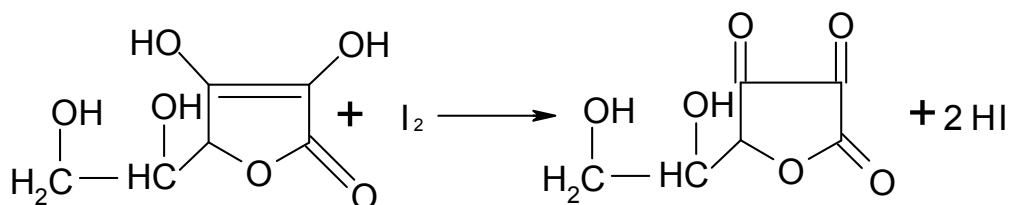
1. Реакция с калия перманганатом

К 1 мл реактива раствора перманганата калия по каплям добавляют извлечение из сырья, содержащее аскорбиновую кислоту. Наблюдают обесцвечивание раствора перманганата калия вследствие восстановления марганца до Mn^{2+} .



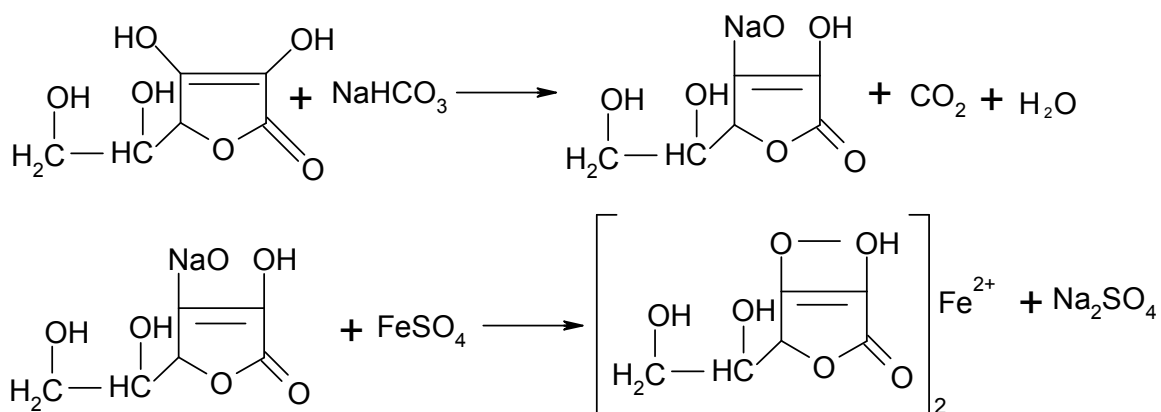
2. Реакция с раствором йода

К 1 мл реактива раствора йода по каплям добавляют извлечение из сырья, содержащее аскорбиновую кислоту. Наблюдают обесцвечивание раствора.



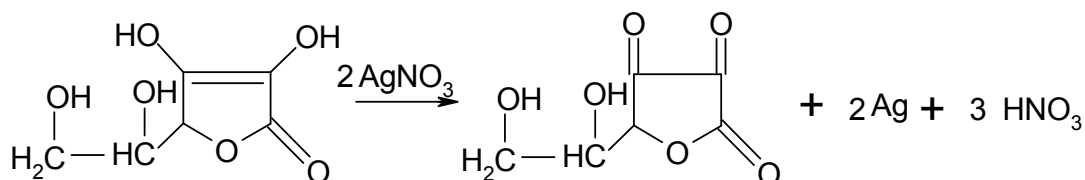
3. Реакция с солью железа (II)

К 1 мл извлечения добавляют 1 мл раствора гидрокарбоната натрия и 1 мл сульфата железа (II). Наблюдают образование аскорбината железа фиолетового цвета.



4. Реакция с раствором нитрата серебра

К извлечению прибавляют 1 мл раствора нитрата серебра, при этом выпадает осадок металлического серебра. При этом происходит восстановление серебра, а аскорбиновая кислота окисляется в кетоформу.



Задание 3. Хроматографическое определение аскорбиновой кислоты в плодах шиповника

Методика

1. В ступке измельчают 0,5 г плодов шиповника, заливают 5 мл воды, перемешивают, оставляют на 15 мин и фильтруют.
2. Полученное извлечение наносят капилляром на пластинку (один капилляр), рядом как свидетель наносят чистую аскорбиновую кислоту. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей *этилацетат – ледяная уксусная кислота* (80:20).
3. Хроматографирование ведут 20 мин, после чего хроматограмму высушивают на воздухе и обрабатывают парами йода.
4. Рассчитывают значение Rf исследуемого вещества и свидетеля и делают вывод о содержании аскорбиновой кислоты в исследуемом извлечении.

Задание 4. Хроматографическое определение каротиноидов в плодах рябины обыкновенной

Методика

1. 1 г измельченных плодов рябины заливают 5 мл хлороформа в колбе вместимостью 25 мл, экстрагируют 1,5 часа.

2. Фильтруют и полученное извлечение наносят капилляром на пластинку.

3. Пластинку высушивают и помещают в одну из систем: бензол – этиловый спирт (80:20) или циклогексан – эфир (80:20).

4. Хроматограмму высушивают на воздухе и обрабатывают 10%-м раствором фосфорномолибденовой кислоты в этиловом спирте. После прогревания пластинки при температуре 60–80 °С каротиноиды проявляются в виде пятен синего цвета на желто-зеленом фоне.

5. Рассчитывают значение R_f исследуемого вещества и свидетеля и делают вывод о содержании каротиноидов в исследуемом извлечении.

Задание 5. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Определите количественное содержание кислоты аскорбиновой в плодах шиповника по методу, предложенному в Государственной Фармакопее XI издания (ФС 38).

Методика

Из грубо измельченной аналитической пробы плодов берут навеску массой 20 г, помещают ее в фарфоровую ступку и тщательно растирают со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивают 10 мин. Затем смесь размешивают и извлечение фильтруют.

В коническую колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2%-го раствора хлористоводородной кислоты, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30–60 секунд. Титрование продолжают не более 2 мин.

Содержание аскорбиновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{V \cdot 0,000088 \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)},$$

где 0,000088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), г;

V – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, мл;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

* В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты [расход раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) более 2 мл], обнаруженного пробным титрованием, исходное извлечение разбавляют водой в 2 раза или более.

Примечания. Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л): 0,22 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия растворяют в 500 мл свежeproкипяченной и охлажденной воды при энергичном взбалтывании (для растворения навески раствор оставляют на ночь). Раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки. Срок годности раствора не более 7 суток при условии хранения в холодном, темном месте.

Сделайте вывод о соответствии исследуемого сырья НД

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия витамин.
2. Перечислите и охарактеризуйте классификации витаминов.
3. Напишите химические формулы витаминов (аскорбиновая кислота, ретинол, β -каротин, токоферол, филлохинон).
4. Охарактеризуйте физико-химические свойства витаминов.
5. Перечислите методы обнаружения витаминов на примере кислоты аскорбиновой и каротиноидов.
6. Обоснуйте метод количественного определения кислоты аскорбиновой в плодах шиповника. Укажите, как влияет количественное содержание кислоты аскорбиновой в сырье на его применение?

ЧАСТЬ 2. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего ПОЛИСАХАРИДЫ

Вопросы для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение понятия полисахариды как группы биологически активных веществ.
2. Перечислите физико-химические свойства полисахаридов.
3. В каких областях медицины находят применения лекарственные средства, содержащие полисахариды?

4. Напишите формулы глюкозы, фруктозы, глюкуроновой кислоты.

5. Используя справочные материалы, заполните ниже представленную таблицу.

| Основные группы полисахаридов | Сырьевые источники | Характеристика свойств | Использование в медицине |
|-------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| Крахмал | | | |
| Целлюлоза | | | |
| Инулин | | | |
| Пектины | | | |
| Камеди | | | |
| Слизи | | | |
| Альгиневые кислоты | | | |

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Качественные реакции на полисахариды, проводимые на сухом сырье

Проведите предложенные качественные реакции, результаты экспериментов запишите в «Рабочую тетрадь» в виде предложенной таблицы.

| № | ЛРС | Реактив | Результат реакции |
|---|-----|---------|-------------------|
| | | | |

1. Реакция на крахмал с раствором йода

Нанесите на порошок или срез корня алтея 2–3 капли раствора йода. При наличии крахмала должно наблюдаться сине-фиолетовое окрашивание.

2. Реакция на целлюлозу с раствором йода

На порошок целлюлозы (или кусок марли) наносят 1–2 капли раствора йода. Целлюлоза окрашивается раствором йода в коричневый цвет.

3. Реакция на слизи со щелочью

Нанесите на порошок или срез корня алтея 2–3 капли раствора едкого натра. Наличие слизей подтверждается появлением желтого окрашивания.

4. Реакция на слизи с тушью (с порошком семян льна)

Семена льна измельчают и помещают на предметное стекло в каплю туши (разведенную водой 1:10), тщательно перемешивают и накрывают покровным стеклом. На темно-сером (почти черном) фоне слизь выделяется белыми пятнами.

5. Реакция на инулин

а) проводят реакцию с раствором йода для доказательства отсутствия крахмала, о чем свидетельствует оранжевое, а не синее окрашивание сырья;

б) на поперечный срез корня или корневища (одуванчика, девясила, цикория) наносят пипеткой 2–3 капли 20%-го спиртового раствора α -нафтола и каплю концентрированной серной кислоты. Присутствие инулина обнаруживается по фиолетовой окраске сырья.

Задание 2. Качественные реакции на полисахариды, проводимые с извлечением из растительного сырья

Приготовление извлечения А: 10 г измельченного сырья (листья подорожника) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды и нагревают на электрической плитке в течение 30 мин, поддерживая слабое кипение. Извлечение фильтруют через 5 слоев марли или через вату.

1. Осаждение слизи этанолом из водного извлечения

К 2 мл извлечения из подорожника прибавляют 6 мл 95%-го этилового спирта и перемешивают. Появляются хлопьевидные сгустки, со временем выпадающие в осадок при стоянии – полисахариды.

2. Реакция с ацетатом свинца

К 2 мл извлечения из подорожника прибавляют 2 мл раствора ацетата свинца. Выпадает объемный осадок слизи.

Приготовление извлечения Б: 10 г измельченного сырья (корни алтея) помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл холодной воды и настаивают в течение 20 мин, периодически помешивая. Извлечение фильтруют через 5 слоев марли.

1. Реакция с раствором щелочи (аммиака)

К 1–2 мл 10%-го водного извлечения, приготовленного на холодной воде, прибавляют несколько капель раствора гидроксида натрия (или аммиака). Раствор приобретает лимонно-желтую окраску.

2. Реакция с хлористоводородной кислотой

В пробирку наливают 1 мл 10%-го настоя корня алтея и прибавляют несколько капель концентрированной хлористоводородной кислоты. Образуется желтовато-зеленое окрашивание. К смеси приливают 2 мл 95%-го этанола. Слизь коагулирует в пористый осадок.

Задание 3. Количественное определение полисахаридов в листьях подорожника большого

Изучите количественное определение содержания полисахаридов в листьях подорожника большого (ГФ XIII издания, ФС.2.5.0032.15).

Методика

1. Измельчите аналитическую пробу сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм.

2. Около 10 г сырья (точная навеска) поместите в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавьте 200 мл воды и прокипятите сырье с обратным холодильником в течение 30 мин. Экстракцию повторите еще два раза, используя 200 и 100 мл воды.

3. Объединенные извлечения после центрифугирования профильтруйте в мерную колбу 500 мл через 5 слоев марли, вложенную в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытую водой, и доведите объем раствора водой до метки (раствор А).

4. 25,0 мл раствора А помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96%-го, перемешивают, подогревают на водяной бане в течение 30 мин.

5. Содержимое колбы фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора спирта 96%-го в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96%-го (1:1).

6. Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы.

7. Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах рассчитайте по формуле

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра, г; m_2 – масса фильтра с осадком, г; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия полисахариды.
2. Приведите классификацию полисахаридов с подробной их характеристикой.
3. Приведите примеры гомо- и гетерополисахаридов.
4. Напишите формулы: глюкозы, галактозы, фруктозы, рибозы, галактурановой кислоты, глюкуроновой кислоты.
5. Приведите примеры выделения полисахаридов из растительного сырья.
6. Перечислите физико-химические свойства полисахаридов.
7. Приведите примеры качественных реакций на полисахариды.
8. Как устанавливают качественный моносахаридный состав полисахаридов?
9. Перечислите используемые методы количественного определения полисахаридов в лекарственном растительном сырье.

ТЕМА 2. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭФИРНЫХ И ЖИРНЫХ МАСЕЛ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Цель занятия: овладеть методиками анализа доброкачественности эфирных и жирных масел, а также количественного определения содержания эфирных и жирных масел в лекарственном растительном сырье.

ЧАСТЬ I. Анализ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение понятия эфирные масла.
2. Рассмотрите классификацию терпеноидов, эфирных масел.
3. Напишите структурные формулы компонентов эфирных масел в «Рабочей тетради».
4. Охарактеризуйте физико-химические свойства эфирных масел.
5. Перечислите способы получения эфирных масел из лекарственного растительного сырья. Как получают эфирные масла для использования в медицинской практике?
6. Назовите метод получения эфирного масла, используемый для стандартизации данного растительного лекарственного сырья. От чего зависит выбор метода получения эфирного масла?
7. Сформулируйте законы Дальтона–Рауля о парциальных давлениях. Почему смесь воды и эфирного масла закипает при температуре ниже 100 °С?
8. Перечислите показатели подлинности и доброкачественности эфирных масел и охарактеризуйте методики определения этих показателей.
9. Охарактеризуйте методы количественного определения эфирного масла, предложенные в ГФ XIII (ОФС.1.5.3.0010.15).

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Определение количественного содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье

Определите количественное содержание эфирного масла в лекарственном растительном сырье методом 1 или 2 (ГФ XIII издания, ОФС .1.5.3.0010.15).

Заполните «Рабочую тетрадь», зарисуйте схемы аппаратов для перегонки эфирного масла.

Методика

Навеску измельченного сырья (масса сырья указывается в фармакопейной статье или нормативной документации на данный вид сырья) помещают в круглодонную колбу вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл горячей дистиллированной воды (если нет других рекомендаций по объему воды) и встряхивают, чтобы смочить сырье водой.

Метод 1. В верхней части колбы укрепляют градуированный приемник (приемник Гинзберга). Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенок и отстоять от уровня воды не менее чем на 50 мм. Колбу соединяют с вертикальным шариковым холодильником, нагревают до кипения и выдерживают при слабом кипении в течение времени, указанного в соответствующей ФС.

Метод 2. Колбу соединяют с паропроводной трубкой, заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резинового шланга, оканчивающегося воронкой (приемник Клевенджера), нагревают до кипения и выдерживают при слабом кипении в течение времени, указанного в соответствующей ФС.

После окончания перегонки и охлаждения колбы с сырьем измеряют объем слоя эфирного масла, рассчитывают его содержание в анализируемом объекте.

Сделайте заключение о соответствии ЛРС требованиям НД по содержанию эфирного масла, занесите результат в «Рабочую тетрадь».

Задание 2. Анализ эфирного масла

Эфирные масла испытывают на подлинность, доброкачественность и чистоту. Для этого проводят органолептический анализ и определение числовых показаний.



Кроме этого при необходимости также определяют: содержание свободных спиртов; содержание фенолов.

Задание 3. *Определение органолептических признаков эфирного масла*

Проведите органолептический анализ образца эфирного масла (по заданию преподавателя). Запишите наблюдения в «Рабочую тетрадь».

1. Определение цвета и прозрачности

Цвет и прозрачность определяют, поместив 5 мл масла в цилиндр из прозрачного стекла диаметром 2–3 см, наблюдая в проходящем свете.

1. Определение запаха

Запах определяют, нанося 2 капли эфирного масла на полоску фильтровальной бумаги длиной 12 см и шириной 5 см так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и сравнивают запах испытуемого образца через каждые 15 мин с запахом контрольного образца, нанесенного таким же образом на фильтровальную бумагу. В течение одного часа запах должен быть одинаков с запахом контрольного образца.

2. Определение вкуса

Вкус определяют, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей масла, или смешивают 1 каплю эфирного масла с 1 г сахарной пудры и пробуют на язык.

Задание 4. *Определение содержания посторонних примесей в образце эфирного масла*

Запишите наблюдения и заключение о чистоте исследуемого образца в «Рабочую тетрадь».

1. Определение примеси спирта

1 способ: 2–3 капли эфирного масла наносят на воду, налитую на часовое стекло, и наблюдают на черном фоне. Не должно быть заметного помутнения вокруг масла.

2 способ: 1 мл масла наливают в пробирку, закрывая ее рыхлым комочком ваты, в середину которого помещен кристаллик фуксина, и подогревают до кипения. Не должно быть фиолетово-розового окрашивания ваты (пары спирта растворяют фуксин, окрашиваясь в малиновый цвет).

2. Определение примесей жирных и минеральных масел

1 мл эфирного масла взбалтывают в пробирке с 3 мл спирта. Не должно наблюдаться помутнения и капель жирного масла.

Задание 5. Определение числовых показателей эфирного масла

Используя предложенные методики, определите плотность, показатель преломления, угол вращения плоскости поляризации, кислотное и эфирное число образца эфирного масла. Сравните полученные результаты с показателями НД, сделайте вывод о качестве исследуемого масла.

1. Определение плотности эфирного масла

Взвесьте сухой и чистый пикнометр с точностью 0,0002 г. Заполните дистиллированной водой немного выше метки, закройте пробкой и выдержите в термостате при 20 °С в течение 20 мин. Доведите уровень воды до метки (с помощью свернутой в трубку фильтровальной бумаги) и выдержите в термостате еще 10 мин. Взвесьте пикнометр на аналитических весах с той же точностью (предварительно вытрите его и подержите под стеклом аналитических весов 10 мин). Освободите пикнометр от воды, высушите (для этого пикнометр промойте сначала спиртом, а затем эфиром), заполните исследуемой жидкостью и проведите те же операции, что и с дистиллированной водой. Плотность рассчитайте по формуле

$$P = \frac{(m_2 - m) \cdot 0,99703}{m_1 - m} + 0,0012,$$

где m – масса пустого пикнометра;

m_1 – масса пикнометра с дистиллированной водой;

m_2 – масса пикнометра с эфирным маслом;

0,99703 – плотность воды при 20 °С;

0,0012 – плотность воздуха при 20 °С и атмосферном давлении 760 мм рт. ст.

2. Определение угла вращения плоскости поляризации

Эфирные масла способны вращать плоскость поляризации при прохождении через них поляризованного света. Измерение угла вращения проводят на поляриметре (рис. 1).

Заполните кювету эфирным маслом. Вставьте в поляриметр и определите угол вращения. Шкалу перед измерением образца проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Оптическое вращение растворов должно быть измерено в течение 30 мин. При

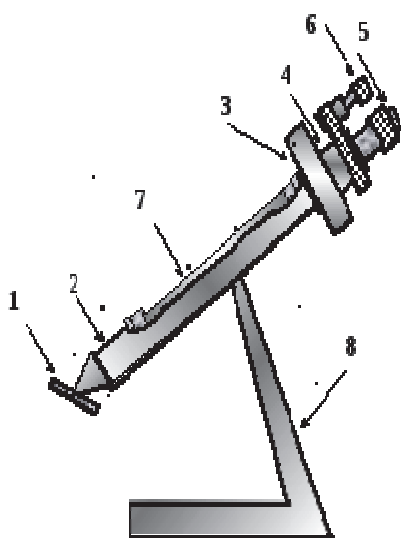


Рис. 3

1 – зеркало, 2 – система, состоящая из светофильтра, объектива, поляризатора и кварцевой пластинки; 3 – анализатор, 4 – объектив зрительной трубы; 5 – окуляр зрительной трубы; 6 – окуляр отсчетного устройства; 7 – кювета с оптически активным веществом; 8 – штатив.

Рис. 1. Поляриметр

измерении сначала следует установить нулевую точку прибора с пустой трубкой. После установки прибора на нулевую точку проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз (рис. 2).

Поскольку эфирные масла представляют собой смеси оптически активных веществ, то определяемая константа является алгебраической суммой вращения данной смеси, что не всегда может служить надежным признаком для характеристики эфирного масла. Однако, если в составе эфирного масла определенно преобладает тот или иной компонент, эта константа может свидетельствовать о качестве масла.

Результаты запишите в «Рабочую тетрадь».

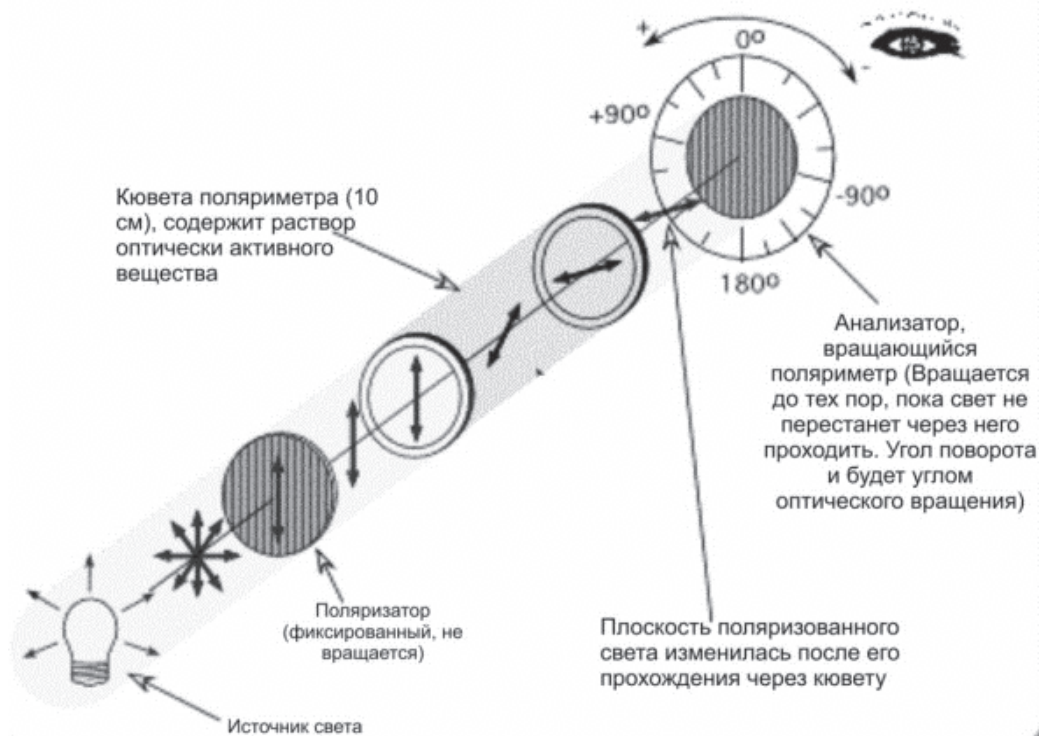


Рис. 2. Принцип работы поляриметра

3. Определение показателя преломления (рефракция)

Показателем преломления называют отношение скорости распространения света в вакууме к скорости распространения света в испытуемом веществе. Это абсолютный показатель преломления. На практике определяют так называемый относительный показатель преломления, т.е. отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Рефрактометрия применяется для установления подлинности и чистоты вещества. Приборы, применяемые для определения показателя преломления, называются рефрактометрами (рис. 3). Рефрактометр имеет две призмы, одна из которых (верхняя) приподнимается. Перед проведением измерения на нижнюю призму наносят 1–2 капли жидкости, после чего опускают верхнюю призму и плотно ее прижимают. Пучок света с помощью зеркала направляют в верхнее окошко призмы. Наблюдая в окуляр, совмещают границу светотени со штрихом сетки (рис. 4).

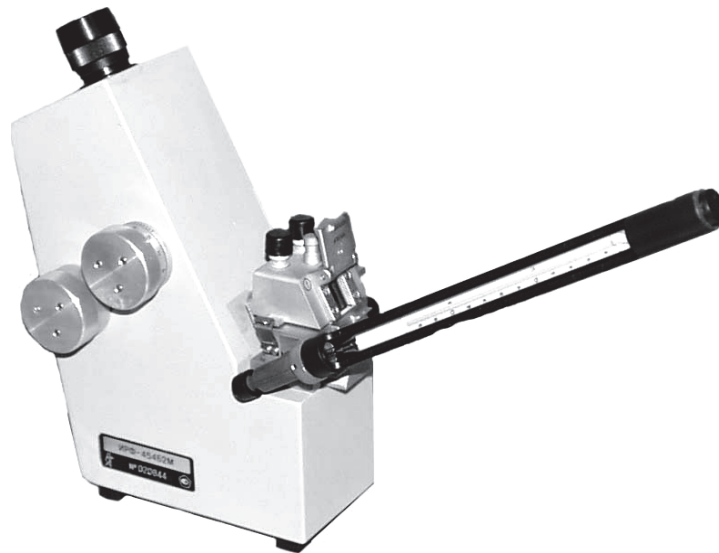


Рис. 3. Рефрактометр Аббе

Методика

Для ахроматизации границы светотени служит компенсатор дисперсии. Отсчет показателя преломления производится с точностью до четвертого знака.

Перед каждым опытом рефрактометр необходимо проверять с помощью дистиллированной воды, имеющей показатель преломления 1,3330.

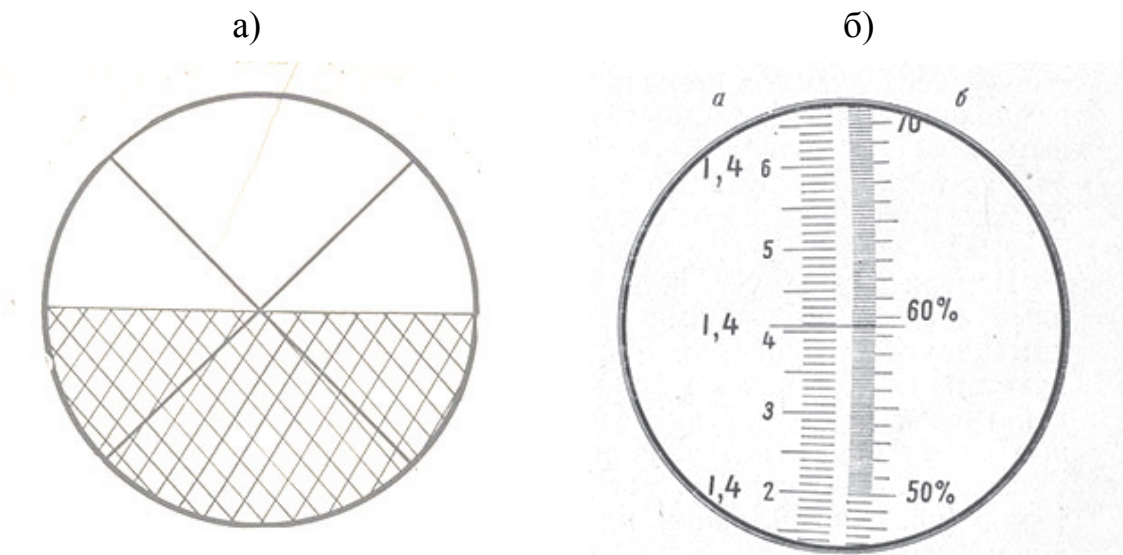


Рис. 4. Поле зрения: а) установочной лупы рефрактометра;
б) отсчетной лупы рефрактометра

Высокая рефракция, как и высокая плотность, обычно характеризует богатство исследуемого эфирного масла кислородными соединениями, что может свидетельствовать, в частности, о несвоевременности сбора сырья. Точно так же и при длительном хранении ввиду окисления, полимеризации или других процессов, протекающих в масле, рефракция его увеличивается.

4. Определение кислотного числа

Кислотное число – количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Обычные значения его составляют у эфирных масел от 0,5 до 5.

При хранении кислотное число увеличивается в результате разложения сложных эфиров.

Методика

Отвесьте 2 г эфирного масла (с точностью 0,01 г). Растворите его в 5 мл нейтрализованного спирта и поместите в колбу объемом 250 мл. Добавьте к полученному раствору масла 50 мл смеси из равных объемов 95%-го спирта и эфира (предварительно нейтрализованной по фенолфталеину раствором едкого натра 0,1 моль/л). Добавьте несколько капель фенолфталеина и титруйте раствором едкого натра (0,1 моль/л) до появления розового окрашивания (не исчезающего в течение 30 мин). Кислотное число рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A}{B} \cdot 5,61,$$

где A – количество мл едкого натра, пошедшее на титрование;

B – навеска сырья, г;

$5,61$ – количество мг едкого кали, соответствующее 1 мл едкого натра.

5. Определение эфирного числа

Эфирное число – количество мг едкого кали, пошедшее на омыление сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

К раствору, полученному после определения кислотного числа, прибавляют 20 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л) и нагревают на водяной бане в колбе с воздушным холодильником (диаметр трубки 1 см, длина 100 см) в течение 1 часа, считая с момента закипания. Затем раствор разбавляют 100 мл воды, и избыток едкого кали титруют

раствором серной кислоты (0,25 моль/л) (индикатор – фенолфталеин). Параллельно проводят контрольный опыт.

Эфирное число (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{28,05 \cdot (V - V_1)}{m},$$

где V_1 – объем раствора серной кислоты (0,25 моль/л), израсходованного на титрование после проведения эксперимента, мл;

V – объем раствора серной кислоты (0,25 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

m – навеска масла, г;

28,05 – количество мг едкого кали, содержащихся в 1 мл спиртового раствора едкого кали.

Все данные, полученные при анализе эфирного масла, занесите в протокол анализа, приведенный в «Рабочей тетради». Сделайте вывод о качестве данного образца эфирного масла.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия эфирные масла.
2. Приведите классификацию терпеноидов, эфирных масел, монотерпеноидов, сесквитерпеноидов.
3. Назовите места локализации эфирных масел в растениях.
4. Охарактеризуйте роль эфирных масел в жизни растений.
5. Охарактеризуйте способы получения эфирных масел.
6. Охарактеризуйте влияние онтогенетических факторов и условий внешней среды на накопление эфирных масел в растениях.
7. Приведите методики определения органолептических свойств эфирных масел.
8. Приведите методики определения физических констант эфирных масел.
9. Дайте определение понятия «кислотное число» и приведите методику определения.
10. Дайте определение понятия «эфирное число» и приведите методику определения.
11. Напишите структурные формулы следующих соединений: изопрен, изовалериановая кислота, линалоол, гераниол, цитраль, цитранеллол, ментол, цинеол, карвон, камфора, борнеол, борнилизовалерианат, пинен, туйон, туйол, анетол, тимол, хамазулен, акарон, леодол.
12. Перечислите возможные варианты использования эфирных масел в медицине и промышленности.

13. Какой метод получения эфирных масел используется в методиках количественного определения эфирных масел? Чем вы можете объяснить применение этого метода?

14. Охарактеризуйте методы количественного определения эфирных масел, предложенные в ГФ XIII.

15. От чего зависит выбор метода количественного определения эфирных масел?

16. Как часто определяют содержание эфирного масла при хранении лекарственного сырья?

ЧАСТЬ II. Анализ ЖИРНЫХ МАСЕЛ

Цель занятия: изучить классификацию, свойства жирных масел, овладеть методиками проведения анализа качества жирных масел.

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение понятия жиры. Приведите общую формулу жира.

2. Приведите классификацию жиров.

3. Охарактеризуйте кислоты, входящие в состав жиров.

4. Перечислите способы получения жиров и жирных масел.

5. Охарактеризуйте физико-химические свойства жиров.

6. Перечислите показатели качества жирных масел. Дайте им определение. Биологическая роль жирных масел в растениях.

7. Приведите основные этапы метода количественной оценки жирного масла в лекарственном растительном сырье.

8. Используя материалы учебных и справочных пособий, заполните ниже представленную таблицу.

| Жирное масло | Источники получения | Краткая характеристика масла | Использование в медицинской практике |
|--------------|---------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Персиковое | | | |
| И т.д. | | | |

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Анализ жирного масла

Для определения подлинности и доброкачественности жирного масла проводят следующие испытания (запишите схему в «Рабочую тетрадь»).

1. Определение органолептических свойств: цвет, прозрачность, запах, вкус.
2. Растворимость (в воде, спирте, хлороформе).
3. Определение числовых показателей:
 - а) физические константы (плотность, показатель преломления);
 - б) химические константы (кислотное число, число омыления, эфирное число).

Жирные масла на бумаге оставляют жирное пятно, не исчезающее при нагревании, в отличие от пятен эфирных масел. Для подтверждения данного утверждения проведите следующий опыт. На лист фильтровальной бумаги стеклянной палочкой нанесите одну каплю жирного масла и нагрейте бумагу над электрической плиткой. Пятно жирного масла при нагревании увеличивается в диаметре.

Задание 2. Количественное определение липидов в образце лекарственного растительного сырья

Ознакомьтесь с методами количественного определения липидов в образце лекарственного растительного сырья. Законспектируйте методику проведения эксперимента.

Методы количественного определения липидов сводятся к выделению их путем обработки сырья органическим растворителем. В качестве растворителя используют гексан, этиловый или петролейный эфир, хлороформ, хлористый метилен и другие низкокипящие растворители.

Извлечение липидов проводят в аппарате Сокслета (рис. 1), который состоит из трех частей: приемной колбы (4), собственно экстрактора (1) и холодильника (2). На экстракторе имеются две трубки: одна служит для отвода паров растворителя из приемника; вторая – является сифоном, по которому экстракт, содержащий липиды, переливается в приемную колбу.

Методика

На аналитических весах взвешивают пакет из фильтровальной бумаги и заворачивают в него 5,0 г предварительно взвешенного на ручных весочках измельченного сырья. Пакет с сырьем взвешивают на аналитических весах, а затем помещают в экстрактор. Перед тем как собрать прибор, необходимо также взвесить на аналитических весах приемную колбу, высушенную до постоянной массы.

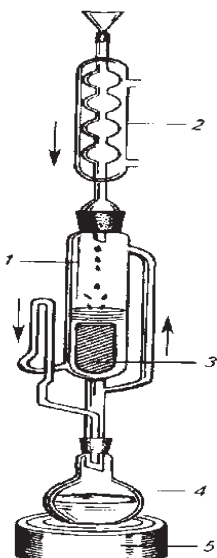


Рис. 5. Аппарат Сокслета: 1 – экстрактор, 2 – холодильник, 3 – патрон с сырьем, 4 – приемная колба, 5 – водяная баня

После соединения всех частей аппарата через холодильник наливают растворитель, пока жидкость не перельется через сифон в приемник, а затем в экстрактор еще доливают растворитель примерно на 1/3 объема.

Приемник с растворителем нагревают на кипящей водяной бане. Пары растворителя поднимаются по трубке в холодильник, конденсируются и стекают в экстрактор на пакет с сырьем. Когда экстрактор наполняется жидкостью до высоты сифона, жидкость сливается в приемник. Весь этот процесс продолжается до полноты извлечения жирного масла. Полноту извлечения жиров определяют по отсутствию жирного пятна на фильтровальной бумаге от нескольких капель извлечения.

Важно! Извлечение необходимо проводить осторожно, не нагревая растворитель выше 60 °С. Он должен кипеть равномерно, так как при сильном нагревании часть паров растворителя не успевает конденсироваться в холодильнике и улетучивается.

По достижении полноты извлечения растворитель отгоняют. Приемную колбу с содержимым высушивают в сушильном шкафу при 90—95°С до постоянной массы и взвешивают. Зная массу пустого приемника и приемника с жиром, вычисляют содержание липидов в сырье по формуле

$$X = \frac{(A - B) \cdot 100}{B},$$

где A – масса приемника с жиром, г; B – масса пустого приемника, г; B – навеска сырья, г.

Задание 3. Органолептический контроль жирных масел

Проведите органолептический анализ образца жирного масла (по заданию преподавателя), испытания на подлинность и чистоту. Запишите в лабораторном журнале ваши наблюдения и сделайте вывод по результатам анализа.

Органолептический контроль жирных масел осуществляется по общей фармакопейной статье «Масла жирные – *Olea pinguis*». При исследовании жирных масел определяют цвет, запах, вкус, растворимость и числовые показатели.

1. Определение цвета и прозрачности

Цвет и прозрачность определяют, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного стекла диаметром 2–3 см, и наблюдают образец жирного масла в проходящем свете.

2. Определение запаха

Запах определяют, нанося 2 капли масла на полоску фильтровальной бумаги так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и сравнивают запах испытуемого образца с запахом контрольного образца.

3. Определение вкуса

Вкус определяют, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей масла.

Жирные масла прозрачные, обычно более или менее окрашенные маслянистые жидкости без запаха или со слабым характерным запахом.

Задание 4. Определение растворимости жирных масел

Определите растворимость образца жирного масла и сравните полученный показатель со значением фармакопейной статьи.

Методика

Навеску 1,0 г жирного масла вносят в отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при 20 ± 2 °С.

Для медленно растворимых препаратов, требующих для своего растворения более 10 мин, допускается также нагревание на водяной бане до 30 °С. Наблюдения производят после охлаждения раствора до 20 ± 2 °С и энергичного встряхивания в течение 1–2 мин.

Препарат считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются капли масла.

Жирные масла практически нерастворимы в воде, мало растворимы в спирте, легко – в эфире, хлороформе, петролейном эфире.

Исключение составляет касторовое масло, легко растворимое в спирте, трудно – в петролейном эфире. Эта особенность используется как показатель подлинности и доброкачественности касторового масла.

Задание 5. Определение подлинности и чистоты касторового масла по растворимости

Установите подлинность касторового масла по растворимости и определите наличие посторонних масел в касторовом масле по ГФ Х.

Опыт 1. В пробирку наливают 2 мл петролейного эфира, 4 мл касторового масла и перемешивают в течение 10 мин. Должен образоваться прозрачный раствор, который мутнеет при дальнейшем прибавлении избытка петролейного эфира.

Опыт 2. Смешивают в пробирке равные объемы касторового масла и 96%-го спирта при температуре 20 °С. Полное растворение касторового масла указывает на отсутствие посторонних масел.

Задание 6. Определение чистоты образца жирного масла

1. Определение примеси парафина, воска, смолы

1 мл масла нагревают с 10 мл 0,5 м спиртового раствора калия гидроксида при непрерывном взбалтывании. При этом омыление наступает очень быстро. Полученный прозрачный раствор не должен мутнеть от добавления 25 мл воды.

2. Определение примеси перекиси, альдегидов (проба Крейса)

1 мл масла взбалтывают в течение 1 мин с 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, прибавляют 1 мл эфирного раствора флороглюцина (1:1000) и перемешивают. Появление розового или красного окрашивания указывает на наличие разложившегося масла, присутствие которого не допускается.

3. Определение примеси мыла

Для жирных масел, не применяемых для приготовления инъекционных растворов, реакцию на присутствие мыла проводят следующим образом: 50 мл воды, смешанной с 10 каплями раствора фенолфталеина, кипятят в конической колбе вместимостью 250 мл в течение 1 мин, при этом раствор должен оставаться бесцветным. Затем к горячей воде приливают 5 г масла и кипятят еще 5 мин, после чего жидкость охлаждают до комнатной температуры, ставят на лист белой бумаги и прибавляют еще 10 капель раствора фенолфталеина. Полученный раствор должен быть бесцветным, что указывает на отсутствие мыла или содержание его не более 0,01 %.

4. Определение примесей цианидов, синильной кислоты

В небольшую колбу вносят 5 мл масла и 5 мл разведенной серной кислоты. Колбу неплотно закрывают корковой пробкой с щелью в нижней части пробки по диаметру. В щель вставляют полоску фильтровальной бумаги шириной 1 см и такой же длины, чтобы нижний край полоски находился на 1–1,5 см над уровнем жидкости. Нижний конец полоски смачивают 1 каплей едкого натра. Колбу закрывают пробкой со вставленной полоской и ставят на горячую водяную баню на 15 мин. Затем колбу снимают, кончик полоски, смоченной раствором едкого натра, отрезают и помещают в фарфоровую чашку. На бумагу в чашке наносят 1 каплю насыщенного раствора сульфата железа закисного и нагревают на водяной бане 1 мин. На бумагу в чашке наносят 1 каплю 5%-го раствора железа окисного и 1 каплю концентрированной соляной кислоты. Не должно наблюдаться синего или голубого окрашивания жидкости или бумаги.

Задание 7. *Определение подлинности жирных масел с помощью качественных реакций*

Проведите качественные реакции на семенные и косточковые масла и реакции подлинности рыбьего жира. Запишите наблюдения и вывод в лабораторный журнал.

1. Реакция на семенные масла (реакция Беллиера)

В пробирку наливают 2 мл исследуемого масла, осторожно настилают по 1 мл кислоты азотной (плотность 1,4) и 0,15%-го раствора резорцина в бензоле. Содержимое энергично перемешивают. Жирные масла, полученные из семян, в течение 5 с дают красное или синефиолетовое окрашивание, которое быстро исчезает. При разделении слоев окраска переходит в бензольный слой.

2. Реакция на косточковые масла (реакция Бибберга)

В пробирку помещают 2,5 мл масла, осторожно добавляют 1 мл охлажденной смеси равных объемов воды и кислот серной и азотной.

Слабо-желтая окраска образовавшегося раствора указывает на миндальное масло, красноватый цвет — на персиковое или абрикосовое масло.

3. Реакции на рыбий жир

а) 0,1 г жира растворяют в 1 мл хлороформа и прибавляют 5 мл раствора сурьмы (III) хлорида; появляется нестойкое голубое окрашивание (витамин А).

б) раствор 1 капли жира в 1 мл хлороформа при взбалтывании с 1 каплей кислоты серной концентрированной окрашивается в синефиолетовый цвет, скоро переходящий в бурый (липохром).

Задание 8. Определение плотности жирного масла

Проведите определение плотности жирного масла (см. часть I: Анализ эфирных масел).

Задание 9. Определение показателя преломления

Проведите определение показателя преломления (индекс рефракции) при помощи рефрактометра (см. часть I: Анализ эфирных масел).

Задание 10. Определение химических показателей качества жирного масла

Проведите определение химических показателей качества образца жирного масла. Расчет результатов приведите в лабораторном журнале, сравните их с данными в таблице и сделайте заключение о доброкачественности жирного масла.

Химическими показателями качества жирных масел являются: *кислотное число, число омыления, эфирное, йодное в миллиграммах, гидроксильное и перекисное числа.*

1. Определение кислотного числа

Кислотное число – количество калия гидроксида в миллиграммах, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г масла. Оно показывает *количество свободных кислот* в исследуемом жире. По величине кислотного числа судят о доброкачественности жира. Свежий жир свободных кислот почти не содержит. Смотри методику выше (часть I. Анализ эфирных масел).

2. Определение числа омыления

Число омыления – количество калия гидроксида в миллиграммах, необходимое для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого жира.

Методика

Точную навеску жира (в соответствии с предложенной таблицей) смешивают в колбе вместимостью 200–250 мл с 25 мл спиртового раствора калия гидроксида 0,5 моль/л.

К колбе присоединяют обратный холодильник и погружают ее в кипящую водяную баню на 30 мин, поддерживая легкое кипение. Конец омыления определяют по образованию совершенно прозрачного и однородного раствора, не изменяющегося при разведении водой. Параллельно в тех же условиях ставят контрольный опыт: в другой колбе нагревают 25 мл спиртового раствора калия гидроксида 0,5 моль/л без добавления жира.

К растворам сразу же после прекращения нагревания прибавляют 25 мл свежепрокипяченной горячей воды, прибавляют 5 капель раствора фенолфталеина и титруют раствором кислоты хлористоводородной 0,5 моль/л до обесцвечивания.

1 мл раствора калия гидроксида 0,5 моль/л содержит 28,05 мг калия гидроксида. Число омыления I_S вычисляют по формуле

$$I_S = \frac{28,05 \cdot (n_1 - n_2)}{m},$$

где n_1 – количество раствора кислоты хлористоводородной 0,5 моль/л, израсходованное на титрование контрольного опыта, мл; n_2 – количество раствора кислоты хлористоводородной 0,5 моль/л, израсходованное на титрование испытуемого образца, мл; m – масса навески жира, г.

| Предполагаемое значение числа омыления | Масса навески вещества (г) |
|--|----------------------------|
| 3–10 | 12–15 |
| 10–40 | 8–12 |
| 40–60 | 5–8 |
| 60–100 | 3–5 |
| 100–200 | 2,5–3 |
| 200–300 | 1–2 |
| 300–400 | 0,5–1 |

3. Определение эфирного числа

Эфирное число – количество калия гидроксида, в миллиграммах, необходимое для омыления эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества. Эфирное число I_E вычисляют по формуле

$$I_E = I_S - I_A,$$

где I_S – число омыления; I_A – кислотное число.

4. Определение йодного числа

Йодное число — количество галогена в пересчете на йод, в граммах, которое присоединяется по месту двойных связей ненасыщенных жирных кислот в 100 г испытуемого вещества в описанных условиях. Йодное число показывает содержание *ненасыщенных жирных кислот* в 100 г жира.

Методика

Навеску вещества (в соответствии с предложенной таблицей) помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, растворяют в 15 мл хлороформа, если нет других указаний в частной

статье. К полученному раствору медленно прибавляют 25 мл раствора йода бромида.

Колбу закрывают пробкой и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л калия йодида, 100 мл воды и титруют раствором натрия тиосульфата 0,1 моль/л при интенсивном перемешивании до светло-желтой окраски, затем прибавляют 5 мл раствора крахмала и титруют раствором натрия тиосульфата 0,1 моль/л по каплям до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Йодное число I_i вычисляют по формуле

$$I_i = \frac{1,269 \cdot (n_2 - n_1)}{m},$$

где n_2 – количество раствора натрия тиосульфата 0,1 моль/л, израсходованное на титрование в испытуемом растворе, мл; n_1 – количество раствора натрия тиосульфата 0,1 моль/л, израсходованное на титрование в контрольном опыте, мл; m – масса навески вещества, г.

| Предполагаемое значение | Масса навески вещества, г |
|-------------------------|---------------------------|
| менее 20 | 1,0 |
| 20–60 | 0,5–0,25 |
| 60–100 | 0,25–0,15 |
| более 100 | 0,15–0,10 |

5. Определение перекисного числа

Перекисное число – количество миллиэквивалентов активного кислорода, соответствующее количеству перекисей, содержащихся в 1000 г испытуемого вещества.

Методика

Около 5,0 г (точная навеска) вещества помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл смеси хлороформ – кислота уксусная ледяная (2:3). Колбу встряхивают до растворения вещества, прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора калия йодида, перемешивают в течение 1 мин и прибавляют 30 мл воды. Полученный раствор титруют раствором натрия тиосульфата 0,01 моль/л, непрерывно перемешивая почти до полного

исчезновения желтой окраски. Затем прибавляют 5 мл раствора крахмала и продолжают титровать, интенсивно перемешивая до обесцвечивания раствора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Объем раствора натрия тиосульфата 0,01 моль/л, израсходованный на титрование в контрольном опыте, не должен превышать 0,1 мл.

Перекисное число I_p рассчитывают по формуле

$$I_p = \frac{10 \cdot (n_1 - n_2)}{m},$$

где n_1 – объем раствора натрия тиосульфата 0,1 моль/л, израсходованный на титрование исследуемого вещества, мл; n_2 – объем раствора натрия тиосульфата 0,1 моль/л, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл; m – масса навески вещества, г.

Задание 12. Определение количества неомыляемых веществ

Определите количество неомыляемых веществ в образце исследуемого масла.

Термин «неомыляемые вещества» применяется к веществам, нелетучим при температуре от 100 до 105 °С, которые экстрагируются органическим растворителем из испытуемого образца после его омыления. Содержание неомыляемых веществ вычисляется в % (мас. д.).

NB! Следует использовать стеклянную посуду со шлифами без смазки.

Методика

Навеску испытуемого вещества, указанную в частной статье, помещают в колбу вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником. Прибавляют 50 мл раствора калия гидроксида спиртового 2 моль/л и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, периодически перемешивая круговыми движениями. Затем охлаждают до температуры ниже 25 °С и содержимое колбы с помощью 100 мл воды переносят в делительную воронку. Полученный раствор осторожно встряхивают с тремя порциями эфира, свободного от пероксидов, по 100 мл каждая. Все эфирные извлечения собирают в другую делительную воронку, в которую предварительно помещают 40 мл воды, осторожно встряхивают в течение нескольких минут и оставляют до полного разделения слоев, после чего отбрасывают водный слой. Эфирный слой промывают двумя порциями воды, по 40 мл каждая. Затем тщательно отмывают поочередно 40 мл раствора 30 г/л калия гидроксида и 40 мл воды, повторяя данную процедуру 3 раза. Затем эфирный слой отмывают водой порциями по 40 мл до отсутствия щелочной реакции в водном слое

по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в доведенную до постоянной массы колбу при помощи эфира, свободного от пероксидов. Эфир отгоняют и к остатку прибавляют 6 мл ацетона. Растворитель тщательно удаляют в потоке воздуха. Остаток в колбе высушивают при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание неомыляемых веществ, %, вычисляют по формуле

$$H.B. = \frac{100 \cdot a}{m},$$

где a – масса остатка, г; m – масса навески вещества, г.

Остаток растворяют в 20 мл спирта, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют спиртовым раствором натрия гидроксида 0,1 моль/л. Если израсходованный объем раствора натрия гидроксида спиртового 0,1 моль/л превышает 0,2 мл, разделение двух слоев было неполным; при этом взвешенный остаток не может рассматриваться как «неомыляемые вещества». В данном случае испытание следует повторить.

Задание 13. Проведение элаидиновой пробы

Элаидиновая проба – реакция на невысыхающие масла. Олеиновая кислота под действием HNO_2 переходит в стереоизомет – элаидиновую кислоту, которая при комнатной температуре имеет твердую консистенцию.

Вышеперечисленные показатели являются важнейшими показателями качества жирных масел, и нормативные документы требуют проведения анализа по всем вышеперечисленным параметрам.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию жиры, приведите общую формулу и классификацию жиров и жирных масел.
2. Охарактеризуйте кислоты, входящие в состав жиров и жирных масел.
3. Перечислите способы получения жиров и жирных масел.
4. Перечислите установления подлинности жиров. Приведите примеры физических и химических методов.
5. Охарактеризуйте метод количественного определения жиров в растительных объектах.
6. Перечислите физико-химические свойства жиров и жирных масел.
7. Охарактеризуйте физические и химические показатели жирных масел, их аналитическое значение и методики определения.

8. Какие вещества относятся к сопутствующим веществам жирных масел (неомыляемому остатку жира)?

9. Перечислите невысыхающие, полувывсыхающие и высыхающие жирные масла.

10. Охарактеризуйте химический состав касторового масла и льняного масел и укажите их применение.

11. Приведите пример твердого растительного жира, особенности его химической структуры и пути использования в медицинской практике.

12. Охарактеризуйте витамин F, его биологическую активность и применение.

13. Приведите примеры жиров животного происхождения, которые используются в медицинской практике.

ТЕМА 3. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО АЛКАЛОИДЫ

Цель занятия: овладеть методиками выделения суммы алкалоидов из растительного лекарственного сырья; изучить методы качественного анализа суммы алкалоидов в полученном извлечении; познакомиться с методиками количественного определения содержания алкалоидов в лекарственном растительном сырье.

Вопросы для самоподготовки к занятию

1. Дайте определение группе БАВ – алкалоиды.
2. Изучите классификацию алкалоидов, предложенную акад. А. П. Ореховым. Напишите формулы основных соединений.
3. Перечислите физико-химические свойства алкалоидов.
4. Перечислите способы получения алкалоидов из сырья.
5. Перечислите методы качественного и количественного анализов алкалоидов в растительном сырье. Используя данные учебных и справочных пособий, ГФ XI и ГФ XIII, заполните нижепредставленную таблицу в «Рабочей тетради».

| ЛРС, содержащее алкалоиды | Метод количественного анализа | Содержание алкалоидов, % |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | | |

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Выделение алкалоидов из лекарственного растительного сырья в виде солей

Используя предложенную методику, выделите алкалоиды в форме солей из ЛРС (по заданию преподавателя) для проведения качественных осадочных реакций.

| | Этап | Теоретическое обоснование этапа |
|---|--|---|
| I | <i>Извлечение алкалоидов из лекарственного растительного сырья в виде солей</i> Измельчите растительное сырье (по заданию преподавателя) и просейте через сито с диаметром 2 мм. Отвесьте 2,0 г измельченного растительного сырья и поместите в колбу вместимостью 100 мл. | Так как соли алкалоидов хорошо растворимы в воде, они перейдут из растительного сырья в водный слой |

| | | |
|---|---|---|
| | <p>Залейте 25 мл 1%-й соляной кислоты и нагрейте на кипящей водяной бане в течение 10 мин.</p> <p>После охлаждения извлечение профильтруйте через бумажный фильтр</p> | |
| II | <p><i>Очистка извлечения*</i></p> <p>1. Получение алкалоидов-оснований К полученному извлечению добавьте концентрированный раствор аммиака до создания щелочной среды (<i>при этом наблюдается помутнение раствора, т.к. алкалоиды-основания нерастворимы в воде</i>)</p> | <p>В щелочной среде алкалоиды из солей переходят в основания, нерастворимые в воде.</p> |
| | <p>2. Извлечение алкалоидов-оснований органическим растворителем Перелейте полученный раствор в делительную воронку. Добавьте 20 мл хлороформа и тщательно перемешайте слои. После расслоения жидкости слейте хлороформный слой, а водный слой отбросьте</p> | <p>Алкалоиды-основания растворяются в органическом растворителе, при этом примеси остаются в водном слое</p> |
| <p>Внимание! Для проведения качественных осадочных реакций используют водный раствор, который получают следующим образом. К хлороформному извлечению добавьте 15 мл 1%-го раствора соляной кислоты и тщательно перемешайте. Полученную смесь перелейте в делительную воронку. После расслоения жидкости отбросьте хлороформный слой, а водный слой, содержащий алкалоиды, слейте в колбу и используйте для проведения качественных реакций</p> | | |
| III | <p><i>Получение суммы алкалоидов в виде сухого остатка **</i></p> <p>К хлороформному извлечению добавьте 2 г безводного натрия сульфата, хорошо взболтайте и профильтруйте. Отгоните хлороформ до объема 2 мл. Перенесите остаток хлороформного извлечения в фарфоровую чашку и выпарите досуха на водяной бане</p> | <p>При этом натрия сульфат поглощает оставшуюся в хлороформе воду В чашке останется сухой остаток, содержащий сумму алкалоидов из растительного сырья</p> |

* Операцию очистки, при необходимости, повторяют несколько раз.

** III этап работы выполняют по специальному заданию преподавателя, в ином случае работу заканчивают получением раствора для проведения качественных реакций.

Задание 2. Выделение алкалоидов в виде оснований и их последующая очистка от сопутствующих веществ

Используя предложенную методику, выделите алкалоиды в форме оснований из образца ЛРС (по заданию преподавателя) для проведения общих осадочных реакций.

| | Этап | Теоретическое обоснование этапа |
|----|--|--|
| I | <p><i>Извлечение алкалоидов из лекарственного растительного сырья в виде оснований</i></p> <p>Отвесьте 2 г измельченного растительного сырья и поместите в колбу объемом 100 мл.</p> <p>Добавьте 1 мл 10%-го раствора аммиака и 20 мл хлороформа.</p> <p>Оставьте на один час при периодическом перемешивании.</p> <p>Хлороформное извлечение отфильтруйте через вату.</p> | <p>Алкалоиды в растительном сырье обычно находятся в виде солей, поэтому для извлечения необходимо перевести соли алкалоидов в свободные основания. Для этого сырье обрабатывают различными щелочами</p> |
| II | <p><i>Очистка извлечения*</i></p> <p>1 этап</p> <p>К хлороформному извлечению добавьте 1%-й хлороводородной кислоты (≈ 15 мл). Полученный раствор должен иметь кислую среду.</p> <p>Перелейте полученную смесь в делительную воронку и тщательно перемешайте.</p> <p>После расслоения жидкостей аккуратно слейте водный слой, а хлороформный отбросьте.</p> | <p>Извлечение алкалоидов обрабатывают раствором кислоты, при этом основания образуют соответствующие соли, которые растворяются в воде. А основная масса сопутствующих веществ (каротиноиды, хлорофилл и др.) остается при этом в органическом растворителе.</p> |
| | <p><i>Полученное очищенное извлечение суммы алкалоидов в виде солей используйте для проведения качественного анализа на занятии</i></p> | |

| | | |
|-----|--|--|
| | <p>2 этап ** (проводят, если необходимо получить сумму алкалоидов в виде сухого остатка)</p> <p>К полученному извлечению добавьте концентрированный раствор аммиака до создания щелочной среды.</p> <p>Перелейте получившийся раствор в делительную воронку.</p> <p>Добавьте 20 мл хлороформа и тщательно перемешайте слои.</p> <p>После расслоения жидкости слейте хлороформный слой, а водный слой отбросьте</p> | |
| III | <p><i>Получение суммы алкалоидов в виде сухого остатка</i></p> <p>Хлороформное извлечение взболтайте с 2 г безводного натрия сульфата, профильтруйте и отгоните хлороформ до объема 2 мл.</p> <p>Полученный остаток хлороформного извлечения перенесите в фарфоровую чашку и выпарите досуха на водяной бане.</p> | <p>При этом натрия сульфат поглощает оставшуюся в хлороформе воду</p> <p>В чашке останется сухой остаток, содержащий сумму алкалоидов из растительного сырья</p> |

* При необходимости операции очистки повторяют два раза и более, с тем чтобы как можно полнее отделить алкалоиды от сопутствующих веществ.

** Данный этап работы выполняют по специальному заданию преподавателя.

Задание 3. Осадочные (общее алкалоидные) реакции

Проведите осадочные реакции с полученными извлечениями суммы алкалоидов, используя следующую методику.

Поместите в пробирку 1 мл полученного извлечения, добавьте несколько капель реактива и оцените результат реакции. Запишите наблюдения в лабораторный журнал и по совокупности полученных результатов сделайте заключение о присутствии алкалоидов в сырье.

| № | Реактив Методика приготовления реактива | Эффект реакции |
|---|--|--|
| 1 | <p><i>Драгендорфа</i></p> <p>Приготовить два раствора: <i>раствор А: 0,85 г нитрата висмута</i> основного растворить в 40 мл воды, а затем</p> | <p>Многие алкалоиды в кислых растворах дают оранжево-красные или</p> |

| | | |
|---|---|--|
| | <p>добавить 10 мл уксусной кислоты; <i>раствор Б</i>: 20 г <i>йодида калия</i> растворить в 50 мл воды. Смешать равные объемы растворов А и Б. К 10 мл смеси добавить 100 мл воды и 20 мл <i>уксусной кислоты</i></p> | кирпично-красные осадки |
| 2 | <p><i>Вагнера и Бушарда</i> 1,27 г <i>йода</i> растворяют в 100 мл 2%-го водного <i>раствора йодида калия</i></p> | С большинством алкалоидов эти реактивы образуют оранжево-красные или кирпично-красные осадки |
| 3 | <p><i>Марме</i> 10 г <i>йодида кадмия</i> растворить в 100 мл 20%-го горячего водного <i>раствора йодида калия</i></p> | С алкалоидами реактив Марме дает белые или желтоватые осадки, часто растворимые в избытке реактива |
| 4 | <p><i>Пикриновая кислота</i> 1,23 г пикриновой кислоты растворить в 100 мл воды</p> | Пикриновая кислота образует с рядом алкалоидов осадки (пикраты) желтого цвета |
| 5 | <p><i>Танин</i> 10 г танина растворить в 90 мл воды и добавить 10 мл этилового спирта</p> | В подкисленных растворах алкалоиды дают с танином беловатые или желтоватые аморфные осадки |
| 6 | <p><i>Зоннеништейна</i> 1 г фосфорно-молибденовой кислоты растворить в 100 мл воды</p> | С алкалоидами образуются желтоватые осадки, которые приобретают через некоторое время синее или зеленое окрашивание вследствие восстановления молибденовой кислоты |

| | | |
|---|--|---|
| 7 | <i>Шейблера</i> 1 г фосфорно-вольфрамовой кислоты растворить в 100 мл воды | С алкалоидами реактив дает беловатые осадки |
| 8 | <i>Бертрана</i> 1 г кремнево-вольфрамовой кислоты растворить в 100 мл воды | С алкалоидами реактив дает беловатые осадки |

Задание 4. Специфические реакции с алкалоидами (реакции окрашивания)

Запишите в лабораторный журнал специфические реакции на алкалоиды, используемые в фармакопейном анализе. Проведите реакции с барбарисом обыкновенным и чемерицей Лобеля и сделайте заключение о наличии алкалоидов в сырье.

В фармакопейном анализе цветные реакции используются для сырья чемерицы, спорыньи и барбариса.

ФС 42-1152-78 – Корень барбариса обыкновенного

При нанесении на излом корня барбариса

а) концентрированной азотной кислоты наблюдается красновато-бурое окрашивание,

б) концентрированной серной кислоты – оранжево-красное окрашивание, которое при слабом подогревании переходит в оливково-зеленое,

в) раствора перекиси водорода – фиолетовое окрашивание.

Данные реакции свидетельствуют о присутствии в корне алкалоида берберина.

ВФС 42-1051-76 – Корневища с корнями чемерицы

Проводят на извлечение суммы алкалоидов из корней чемерицы:

0,1 г измельченного сырья смачивают раствором аммиака и извлекают алкалоиды 5 мл хлороформа.

Хлороформное извлечение фильтруют и выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане.

К сухому остатку прибавляют 5 капель концентрированной серной кислоты, при этом появляется желто-бурое окрашивание, которое при добавлении 0,5 мл воды и последующем нагревании переходит в розово-красное.

ВФС 42-249-75 – Рожки спорыньи эрготаминового штамма

0,05 г порошка спорыньи помещают в пробирку, сюда прибавляют 2 мл 4%-го раствора винной кислоты в 50%-м растворе метилового спирта. Смесь нагревают на водяной бане при температуре 50–60 °С в течение 3 мин, хорошо перемешивая. К 1 мл охлажденного извлечения

добавляют 2 мл реактива Ван-Урка, при этом жидкость окрашивается в фиолетовый цвет. Реакция на алкалоиды спорыньи.

Задание 5. Детектирование хинина в УФ-лучах

Пронаблюдайте флюоресценцию алкалоидов на сырье и в извлечениях. Заполните таблицу, представленную в «Рабочей тетради».

В Европейской Фармакопее описан следующий опыт для подтверждения подлинности коры хинного дерева.

Реакция Грахе: 0,5 г порошка хинной коры помещают в пробирку и осторожно нагревают на открытом огне. Появляются малиновые пары, оседающие на холодных стенках пробирки в виде ярко-красных капель. Конденсат собирают в пробирку с 10 мл 70%-го спирта и просматривают раствор в УФ-свете с длиной волны 365 нм. Хинные алкалоиды имеют голубую флюоресценцию.

Задание 6. Хроматографический анализ алкалоидов

Проведите хроматографический анализ ЛРС (по заданию преподавателя).

Схема хроматографического анализа

Для опыта используют бумажную или тонкослойную хроматографию.

На линию старта хроматографической пластинки (или фильтровальной бумаги) нанесите раствор извлечения из ЛРС и раствор свидетеля.

Поместите пластинку (или бумагу) в хроматографическую камеру, в которую налита одна из предложенных систем растворителей: *хлороформ – ацетон – концентрированный аммиак (40:20:1); н-бутанол – хлороформ (1:9); этанол – бензол (1:9); ацетон – вода – концентрированный раствор аммиака (90:7:3).*

После прохождения фронта пластинку просушите в сушильном шкафу при температуре 40–45 °С.

Детектирование хроматограммы проводят реактивом Драгендорфа, парами йода, в УФ-свете.

Для проявившихся пятен алкалоидов рассчитайте значения R_f по формуле

$$R_f = \frac{A}{B},$$

где A – расстояние от линии старта до пятна,

B – расстояние от линии старта до фронта подвижной жидкости.

**Примечание:* если разделение алкалоидов проводят на пластинке «Силуфол», то перечисленные йодосодержащие реактивы не используют,

так как носитель на пластинке закреплен с помощью крахмала. В данном случае используют УФ-излучение.

Зарисуйте схему хроматограммы в «Рабочую тетрадь» и рассчитайте величину R_f пятна в извлечении и в образце. Сделайте вывод о содержании алкалоидов в образце ЛРС.

Задание 7. Количественное определение алкалоидов в листьях красавки обыкновенной (ГФ XIII, ФС.2.5.0020.1) и белены черной, дурмана обыкновенного (ГФ XI, том 2, ФС 17, ФС 19)

В листьях красавки и белены содержатся алкалоиды, производные тропана. В этом виде сырья преобладает гиосциамин, переходящий под влиянием щелочей в оптически неактивный атропин. Кроме того, содержится скополамин и другие близкие по строению алкалоиды.

Количественное определение содержания суммы алкалоидов производится титрометрическим методом (обратное титрование).

Методика количественного определения суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, приливают 150 мл эфира, 7 мл раствора аммиака и взбалтывают смесь в течение 1 ч. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в колбу вместимостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату приливают 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют до просветления эфирного слоя, после чего отмеривают с помощью мерного цилиндра 90 мл эфирного извлечения в делительную воронку вместимостью 200 мл. Цилиндр дважды ополаскивают эфиром порциями по 10 мл, которые присоединяют к отмеренному эфирному извлечению.

Из эфирного извлечения алкалоиды максимально извлекают 1%-м раствором хлористоводородной кислоты порциями по 20, 15, 10 мл (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя через смоченный водой бумажный фильтр диаметром 5 см во вторую делительную воронку такой же вместимости. Фильтр промывают дважды 1%-м раствором хлористоводородной кислоты по 5 мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению.

Кислотное извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 20, 15, 10 мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Хлороформные извлечения фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4–5 г свежепрокаленного безводного натрия

сульфата, смоченного хлороформом. Фильтр дважды промывают хлороформом по 5 мл. Хлороформ отгоняют на водяной бане до объема 1–2 мл, остаток хлороформа в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха растворителя.

Сухой остаток растворяют в 15 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,02 моль/л) при подогревании на водяной бане, прибавляют 2 капли спиртового раствора метилового красного и 1 каплю раствора метиленового синего и избыток хлористоводородной кислоты оттитровывают раствором натра едкого (0,02 моль/л) до появления зеленой окраски.

Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0,005780 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)},$$

где 0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,02 моль/л), г;

V – объем раствора натра едкого (0,02 моль/л), израсходованного на титрование, мл;

m – масса сырья, соответствующая отмеренному объему эфирного извлечения, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия алкалоиды.
2. Перечислите классификацию алкалоидов, предложенную акад. А.П. Ореховым. Приведите примеры.
3. Расскажите о распространении алкалоидов в растительном мире и их локализации в органах и тканях растений.
4. Охарактеризуйте влияние онтогенетических факторов и условий среды на накопление алкалоидов.
5. Охарактеризуйте физико-химические свойства алкалоидов.
6. Обоснуйте методы выделения и очистки алкалоидов из растительного сырья.
7. На каких свойствах основана очистка растительных экстрактов алкалоидов?
8. Перечислите типы качественных реакций на алкалоиды. Приведите примеры.
9. Обоснуйте фармакопейный метод количественного определения алкалоидов тропанового ряда в растениях семейства Пасленовые.

ТЕМА 4. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ И САПОНИНЫ

ЧАСТЬ I. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ

Цель занятия: изучить химическое строение и классификацию кардиогликозидов; познакомиться со свойствами кардиогликозидов и методами их выделения из лекарственного растительного сырья; овладеть методиками их качественного и количественного анализа.

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение понятия сердечные гликозиды.
2. Перечислите классы и группы сердечных гликозидов.
3. Охарактеризуйте физико-химические свойства сердечных гликозидов.
4. Какие качественные реакции используются для обнаружения сердечных гликозидов в ЛРС?
5. Охарактеризуйте метод стандартизации ЛРС, содержащего сердечные гликозиды.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Приготовление извлечения из лекарственного растительного сырья

Выделите кардиогликозиды из предложенного лекарственного растительного сырья для проведения качественных реакций.

Методика

1. Отвесьте 1,0 г измельченного растительного сырья (по заданию преподавателя), поместите в колбу объемом 100 мл, прибавьте 20 мл 50%-го этанола и оставьте на 24 часа.
 2. Прибавьте 10 мл 10%-го раствора ацетата свинца (для осаждения сопутствующих балластных веществ) и прокипятите полученную смесь в течение 2 мин на водяной бане и профильтруйте.
 3. К полученному фильтрату прибавьте 10 мл хлороформа и перемешайте слои в течение 1–2 мин.
 4. Полученный раствор центрифугируют. Верхний слой отбрасывают, а нижний хлороформный пропускают через фильтр, на который предварительно насыпан безводный натрия сульфат.
- Полученное извлечение используют для качественного анализа.

Задание 2. Качественные реакции на сердечные гликозиды

Проведите качественные реакции обнаружения кардиогликозидов в образце сырья, полученном для анализа.

| <i>Реакции на углеводную часть молекул</i> | | |
|---|--|--|
| 1. Реакция Келлера–Килиани | | |
| Реактив | Методика проведения опыта | Наблюдения |
| Готовят 2 раствора: <i>1-й раствор</i> Ледяная уксусная кислота, содержащая следы $Fe_2(SO_4)_3$ <i>2-й раствор</i> Концентрированная серная кислота также со следами $Fe_2(SO_4)_3$ | 1 мл извлечения выпаривают на водяной бане. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в 1 мл раствора 1, переливают в пробирку и осторожно по стенке пробирки вливают 1 мл раствора 2 | При наличии дезоксисахара на границе слоев появляется оранжевое (бурое) кольцо, а через некоторое время над этим кольцом появляется зелено-синее окрашивание |
| <i>Реакции на стероидную часть кардиогликозидов</i> | | |
| 2. Реакция Либермана–Бурхарда | | |
| Смесь уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (50:1) | 1 мл извлечения выпаривают на водяной бане. Сухой остаток очищенного извлечения растворяют в ледяной уксусной кислоте и добавляют реактив | Через некоторое время развивается окраска от розовой к зеленой и синей |
| 3. Реакция Розенгейма | | |
| 90%-ный спиртовой раствор трихлоруксусной кислоты | 1 мл извлечения выпаривают на водяной бане. Сухой остаток очищенного извлечения смешивают с реактивом | Появляются сменяющие друг друга окраски от розовой до лиловой и сине-зеленой |
| <i>Реакции на пятичленное ненасыщенное лактонное кольцо</i> Эти реакции основаны на способности пятичленного ненасыщенного кольца образовывать окрашенные комплексы в щелочной среде с различными ароматическими нитропроизводными | | |
| 4. Реакция Балье | | |
| Свежеприготовленная смесь гидроксида натрия и пикриновой кислоты (среда | 1 мл извлечения выпаривают на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 1 мл | Постепенно появляется оранжевое, розовое или красное |

| | | |
|---|--|--|
| раствора щелочная) | этанола. Полученный раствор переливают в пробирку и добавляют 1 мл свежеприготовленного раствора пикрата натрия | окрашивание |
| 5. Реакция Легалья | | |
| Готовят 2 раствора: <i>1-й раствор:</i> 5%-й раствор нитропрусида натрия <i>2-й раствор:</i> 10%-й раствор едкого натра | 1 мл извлечения выпаривают на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 1 мл этанола. Полученный раствор переливают в пробирку и добавляют 1 мл раствора 1. Затем осторожно, не взбалтывая, по стенкам пробирки приливают 1 мл раствора 2 | В присутствии карденолидов появляется постепенно исчезающее красно-фиолетовое окрашивание в верхней части раствора |

Задание 3. Детектирование кардиогликозидов в УФ-лучах

Проведите обнаружение сердечных гликозидов в извлечении из лекарственного растительного сырья с помощью УФ-спектроскопии. Запишите наблюдения и сделайте вывод.

Методика

К 1 мл извлечения прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и через 20 мин наблюдают флюоресценцию в УФ-лучах.

Задание 4. Количественное определение сердечных гликозидов

Проведите количественное определение сердечных гликозидов в препарате «Адонизид» из травы горицвета весеннего. Сделайте вывод о его доброкачественности.

Количественное определение кардиогликозидов в препарате Адонизид» (ГФ X, стр. 61)

Методика

0,5 мл очищенного препарата адонизида (из травы горицвета весеннего) помещают в пробирку, прибавляют 1 мл нейтрального раствора пикрата натрия, 3 мл воды, 0,5 мл 2%-го раствора едкого натра и перемешивают.

Через 10 мин определяют оптическую плотность раствора на фотоколориметре при $\lambda=490-500$ нм в кювете толщиной 10 мм.

В качестве контрольного раствора используют смесь, состоящую из 1 мл нейтрального раствора пикрата натрия, 0,5 мл 2%-го раствора гидроксида натрия, 3,5 мл воды.

Параллельно определяют оптическую плотность эталонного раствора.

Приготовление эталонного раствора. К 1 мл нейтрального раствора пикрата натрия прибавляют 0,5 мл очищенного нейтрального препарата (к препарату прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и 0,1 н раствора едкого натра до изменения окраски), 2,2 мл 1%-го водно-глицеринового раствора сульфита натрия и 1,3 мл воды.

Содержание сердечных гликозидов в пересчете на цимарин в 1 мл препарата в миллиграммах вычисляют по формуле

$$X = \frac{D_1 \cdot a \cdot 0,027}{D_0 \cdot 0,5},$$

где D_1 – оптическая плотность исследуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность эталонного раствора;

a – содержание безводного сульфита натрия в эталонном растворе в миллиграммах (в 2,2 мл содержится 11 мг);

0,027 – количество цимарина, соответствующее 1 мг безводного сульфита натрия, в мг;

1 ЛЕД соответствует 0,024 мг цимарина.

1 мл препарата должен содержать 0,55–0,65 мг цимарина, что соответствует 23–27 ЛЕД.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия сердечные гликозиды.
2. Напишите формулу циклопентанпергидрофенантрена.
3. Расскажите о классификации кардиогликозидов в зависимости от строения лактонного кольца и заместителя, стоящего при C_{10} ?
4. Чем обусловлено специфическое действие кардиогликозидов на сердечную мышцу?
5. Как строение заместителей влияет на фармакологические свойства кардиогликозидов?
6. К какому углероду ядра циклопентанпергидрофенантрена присоединяется углеводный компонент?
7. Какую характерную особенность имеют специфические сахара, входящие в состав кардиогликозидов? Напишите формулы дигитоксозы, циморозы, олеандрозы.

8. Какое влияние оказывают сахара, входящие в состав молекул кардиогликозидов, на их фармакологические свойства?

9. Какова зависимость между химическим строением и биологическими свойствами сердечных гликозидов.

10. Охарактеризуйте физико-химические свойства сердечных гликозидов.

11. Охарактеризуйте основные этапы выделения сердечных гликозидов из растительного сырья.

12. Перечислите качественные реакции на сердечные гликозиды. Охарактеризуйте методики проведения качественных реакций.

13. Какие физико-химические методы используются для количественного определения сердечных гликозидов? Охарактеризуйте методику определения цимарина в «Адонизиде».

14. Охарактеризуйте метод биологической стандартизации сердечных гликозидов. Что такое валор?

15. Напишите формулы сердечных гликозидов, содержащихся в изучаемых лекарственных растениях (виды наперстянок, ландыш, горицвет, строфант, морской лук, морозник).

ЧАСТЬ II. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего САПОНИНЫ

Цель занятия: изучить химическое строение, классификацию, физико-химические свойства сапонинов; овладеть методиками выделения и очистки сапонинов; качественного анализа сапонинов; познакомиться с методами количественного определения сапонинов в лекарственном растительном сырье.

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение группе БАВ-сапонины.
2. Перечислите классификацию сапонинов.
3. Перечислите физико-химические свойства сапонинов.
4. Перечислите способы получения сапонинов из растительного сырья.
5. Перечислите методы качественного и количественного анализов сапонинов в растительном сырье.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 5. Выделение суммы сапонинов из растительного сырья для проведения качественных реакций

Получите извлечение из растительного сырья, содержащего сапонины (по заданию преподавателя). Для проведения качественных реакций готовят водные (1:10) или водно-спиртовые растворы.

Методика (приготовление водного извлечения)

1. Отвесьте 5,0 г измельченного растительного сырья (по заданию преподавателя).
2. Поместите в коническую колбу вместимостью 100 мл и прилейте 50 мл воды.
3. Нагрейте содержимое колбы на водяной бане в течение 10 мин.
4. Полученное извлечение охладите и профильтруйте.

Методика (приготовление водно-спиртового извлечения)

1. Отвесьте 5,0 г измельченного растительного сырья (по заданию преподавателя).
2. Поместите в коническую колбу вместимостью 100 мл и прилейте 50 мл 50%-го спирта.
3. Нагрейте содержимое колбы на водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин.
4. Полученное извлечение охладите и профильтруйте.

Задание 6. Качественные реакции на сапонины

Проведите качественные реакции, позволяющие обнаружить сапонины в извлечении из растительного сырья и сделайте заключение о присутствии сапонинов в данном извлечении.

| № | Качественные реакции | Результаты реакций |
|---|--|------------------------------------|
| 1 | <i>Проба на пенообразование</i> 2–3 мл водного извлечения энергично встряхивают в течение 1 мин <i>(Это не только чувствительная проба, но и довольно характерная, т.к. других веществ, обладающих такой способностью к пенообразованию, в растениях не встречается)</i> | Образуется обильная и стойкая пена |
| 2 | <i>Осаждение сапонинов солями бария (магния)</i> В пробирку к 2 мл водного извлечения прибавляют несколько капель раствора соли бария | Образуется осадок |
| 3 | <i>Осаждение сапонинов ацетатом свинца</i> В пробирку к 2 мл водного извлечения прибавляют несколько капель 10%-го ацетата свинца | Образуется осадок |

| | | |
|--|--|--|
| 4 | <i>Осаждение сапонинов холестерином</i> В пробирку к 1 мл спиртового извлечения прибавляют 1%-й спиртовой раствор холестерина | Образуется осадок |
| Цветные реакции (реакции выполняются под тягой) | | |
| 5 | <i>Реакция Либермана–Бурхарда (характерна для стероидных сапонинов)</i> Извлечение испаряют на водяной бане, полученный сухой остаток растворяют в ледяной уксусной кислоте, добавляют смесь уксусного ангидрида с концентрированной серной кислотой (50:1) | Через некоторое время появляется окраска – от розовой до зеленой и синей |
| 6 | <i>Реакция с концентрированной серной кислотой</i> В пробирку к 2 мл водно-спиртового извлечения прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты | Появляется красное или красно-фиолетовое окрашивание |
| 7 | <i>Проба Лафона на сапонины</i> В пробирку к 2 мл водно-спиртового извлечения прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, несколько капель 10%-го сульфата железа | Появляется зеленоватое или сине-зеленое окрашивание |
| 8 | <i>Реакция Сальковского</i> К 2 мл водного извлечения в пробирке прибавляют 1 мл хлороформа и несколько капель кислоты серной концентрированной. Не перемешивать слои! | Органический слой окрашивается в оранжевый цвет |

Задание 7. Определение химической природы сапонинов (реакция Фонтан–Кендаля)

Методика

Возьмите две пробирки одинакового диаметра и в одну из них налейте 5 мл 0,01 н раствора HCL, в другую – 5мл 0,01 н раствора NaOH.

Добавьте в каждую из пробирок по 0,5 мл исследуемого извлечения и встряхивайте с одинаковой интенсивностью в течение 1 мин.

Проанализируйте результат:

1) при наличии стероидных сапонинов в пробирке со щелочью столб пены будет выше, чем в пробирке с кислотой;

2) при наличии тритерпеновых сапонинов образуется пена, примерно равная по объему и стойкости или в пробирке с кислотой столб пены будет выше, чем в пробирке со щелочью.

Сделайте предположение о химической природе сапонинов в извлечениях, занесите результат в «Рабочую тетрадь».

Задание 8. Определение пенного числа водного извлечения

Определите пенное число и отнесите исследуемое сырье к одной из трех групп: *свыше 5000* – высокое пенное число; *2000–5000* – среднее; *меньше 2000* – низкое.

Пенное число – наименьшая концентрация сапонинов, вызывающая образование стойкой пены в течение 1 мин.

Методика проведения опыта

Приготовление 1%-го настоя из сырья, содержащего сапонины: 1 г порошкообразного сырья залейте 100 мл воды и нагрейте на водяной бане 15 мин, охладите полученный настой в течение 45 мин и профильтруйте. Доведите объем полученного раствора до 100 мл.

Проведите серию разбавлений полученного настоя:

- в 2 раза (берут 2 мл исходного раствора и 2 мл воды);
- в 5 раз (берут 2 мл исходного раствора и 8 мл воды);
- в 10 раз (берут 1 мл исходного раствора и 9 мл воды);
- в 20 раз (берут 1 мл исходного раствора и 19 мл воды);
- в 30 раз (берут 1 мл исходного раствора и 29 мл воды);
- в 40 раз (берут 1 мл исходного раствора и 39 мл воды);
- в 50 раз (берут 1 мл исходного раствора и 49 мл воды); и т.д.

Отмерьте равные объемы разбавлений в пробирки с соответствующей маркировкой. Энергично встряхните каждую серию разбавлений в течение 1 мин. Определите значение наименьшей концентрации настоя сапонинов, которая дает пену, не исчезающую в течение 1 мин и рассчитайте пенное число.

Пример расчета. Исследуемый 1%-й раствор разбавили в 30 раз (1 мл первичного настоя и 29 мл воды). Общее разбавление составляет:

$100 \times 30 = 3000$. Следовательно, пенное число – 3000.

Задание 9. Количественное определение глицирризиновой кислоты в корнях солодки

Методика определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки приведена в ГФ XIII издания (ФС.2.5.0040.15). Выполните определение глицирризиновой кислоты в корнях солодки и сделайте вывод о соответствии сырья НД.

Методика количественного определения

I этап. Извлечение глицирризиновой кислоты из корней солодки

Измельчите сырье до 0,2 мм. Отвесьте 2 г сырья и поместите в колбу ($V = 100$ мл). Прибавьте 20 мл 3%-го ацетонового раствора азотной кислоты и оставьте на 1 час при частом и сильном взбалтывании. Профильтруйте извлечение в цилиндр ($V = 100$ мл). Порошок с корнем промойте ацетоном и слейте фильтрат в тот же цилиндр (пока объем жидкости в цилиндре не достигнет 100 мл). Жидкость из цилиндра перелить в химический стакан ($V = 200$ мл).

II этап. Осаждение глицирризиновой кислоты. По каплям при интенсивном перемешивании добавьте концентрированный раствор аммиака до появления обильного светло-желтого творожистого осадка (до рН 8,3–8,6 определяют по порозовению фенол-фталеиновой бумаги или по позеленению универсальной индикаторной бумаги). Жидкость отфильтруйте и промойте фильтр 50 мл ацетона в 3–4 приема.

III этап. Получение раствора глицирризиновой кислоты (получение исходного раствора – раствора А). Осадок с фильтром перенесите в стакан и растворите осадок в 50 мл воды. Полученный раствор количественно перенесите в мерную колбу ($V = 250$ мл), фильтр промойте водой и присоедините ее к основному раствору. Доведите объем раствора до метки (250 мл) (раствор А).

IV этап. Разбавление исходного раствора. 30 мл раствора А поместите в мерную колбу ($V = 500$ мл) и доведите объем раствора водой до метки (раствор Б).

V этап. Измерение оптической плотности полученного раствора. На спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя в 1 см. Измерьте оптическую плотность полученного раствора. Контрольным раствором является вода.

VI этап. Расчет содержания глицирризиновой кислоты в сырье. Содержание глицирризиновой кислоты в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{D \cdot 822 \cdot 250 \cdot 500 \cdot 100}{a \cdot b \cdot 11000 \cdot 1000},$$

где D – оптическая плотность раствора;

a – навеска сырья, г;

b – количество раствора А, используемого для приготовления раствора Б;

822 – молекулярный вес глицирризиновой кислоты;

11000 – молярный показатель поглощения.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятия сапонины.
2. Приведите классификацию сапонинов.
3. Охарактеризуйте особенности химического строения сапонинов.
4. Напишите структурные формулы β -амирина, даммарана, панаксадиола, панаксатриола, кислоты глицирризиновой, аралозида, диосцина.
5. Перечислите физико-химические свойства сапонинов.
6. Назовите методы выделения и очистки сапонинов из ЛРС.
7. Перечислите качественные реакции обнаружения сапонинов.
8. Какие методы количественного определения сапонинов в ЛРС вы знаете?
9. Дайте определения понятия гемолитический индекс. Перечислите недостатки количественного определения сапонинов этим методом.
10. Дайте определения понятия пенное число, приведите методику его определения. Перечислите недостатки количественного определения сапонинов этим методом.
11. Перечислите этапы определения содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки.
12. Почему лекарственные препараты, содержащие сапонины, нельзя использовать для внутривенного введения?

ТЕМА 5. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Цель занятия: изучить строение, классификацию, физико-химические свойства антраценпроизводных, овладеть методиками качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные.

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение группе биологически активных веществ антраценпроизводные.
2. Что лежит в основе классификации антраценпроизводных, на какие группы их разделяют?
3. В каком виде находятся антраценпроизводные в растениях? Укажите факторы, влияющие на накопление антраценпроизводных в растениях?
4. Перечислите физико-химические свойства свободных антраценпроизводных и их гликозидов.
5. Чем обусловлена растворимость свободных антраценпроизводных в водных растворах щелочи?
6. Какими методами проводят экстракцию антрагликозидов из растительного сырья?
7. Перечислите качественные реакции для определения антраценпроизводных в растительном сырье.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

Задание 1. Реакция Борнтрегера

Проведите реакцию Борнтрегера, заполните таблицу и сделайте вывод о содержании и типе антраценпроизводных в предложенном лекарственном растительном сырье.

| № | Этап реакции | Наблюдения | Сущность этапа реакции |
|---|--------------|------------|------------------------|
| 1 | | | |

Методика проведения реакции Борнтрегера

1. Измельчите 0,2 г сырья (по заданию преподавателя) и прогрейте его в течение 2 мин с 5 мл 10%-го едкого натра. После остывания разбавьте смесь 5мл воды и профильтруйте.
2. Полученный фильтрат поместите в делительную воронку, добавьте 10%-й соляной кислоты до появления осадка. В ту же воронку прилейте 10 мл хлороформа. Осторожно перемешайте и после расслоения

жидкости слейте хлороформный слой, фильтруя его через небольшой комочек ваты.

3. Встряхните хлороформный фильтрат с 10 мл 10%-го раствора аммиака и оцените появившееся окрашивание.

При наличии *1,8-диоксиантрахинонов* аммиачный слой принимает вишнево-красное окрашивание, *1,4-диоксиантрахинонов* – пурпурное окрашивание, *1,2-диоксиантрахинонов* – фиолетовое окрашивание.

Сущность реакции заключается в следующем: при кипячении растительного материала со щелочью происходит гидролиз антрагликозидов с образованием свободных агликонов. Одновременно антрон- и антранолпроизводные окисляются до антрахинонов. Образовавшиеся оксиантрахиноны за счет фенольных гидроксильных групп дают феноляты (антрахиноляты), растворимые в воде. При подкислении водно-щелочного раствора диссоциация фенольных гидроксильных групп подавляется, и соединения становятся липофильными, в результате чего при встряхивании с хлороформом они из водного слоя переходят в хлороформный, хлороформный слой при этом принимает желтую окраску оксиантрахинонов. При встряхивании хлороформного слоя с раствором аммиака вновь происходит образование фенолятов, окрашивающих аммиачный слой.

Феноляты оксиантрахинонов имеют яркий вишнево-красный, пурпурный или фиолетовый цвет в зависимости от положения оксигрупп.

Задание 2. Реакция с 1%-м спиртовым раствором ацетата магния

Проведите реакцию и сделайте вывод о наличии и группе антраценпроизводных в исследуемом сырье.

Реакция основана на способности антраценпроизводных образовывать окрашенные комплексы с ацетатом магния; при этом *1,2-диоксиантрахиноны* образуют фиолетовое окрашивание; *1,4-диоксиантрахины* – пурпурное; *1,6-* и *1,8-диоксиантрахинонов* – оранжево-красное.

Методика проведения реакции

1. 1,0 г измельченного сырья поместите в колбу объемом 50 мл со шлифом, добавьте 10 мл 95%-го этилового спирта и нагрейте на водяной бане с обратным холодильником 10 мин. Охладите полученное извлечение.

2. К 1 мл 1%-го спиртового раствора ацетата магния прибавить несколько капель извлечения из сырья. По образовавшейся окраске сделайте вывод о строении антропопроизводных.

Задание 3. Сублимация антраценпроизводных

Проведите реакцию и сделайте вывод о содержании антраценпроизводных в исследуемом сырье.

Методика проведения реакции сублимации

1. Поместите на дно сухой пробирки небольшое количество измельченного сырья и осторожно нагрейте, держа пробирку почти горизонтально. Сублимат конденсируется на холодных верхних участках пробирки в виде желтых капель или желтых игольчатых кристаллов.

2. После остывания пробирки к сублимату добавьте 1 каплю 5%-го NaOH в этиловом спирте; по появившейся окраске сделайте заключение о составе антрацепроизводных.

Сущность реакции: содержащиеся в растительном материале антрагликозиды при высокой температуре расщепляются с образованием свободных агликонов; одновременно производные антрацена и антронола окисляются до антрахинонов, которые возгоняются.

Задание 4. Хроматографическое определение антраценпроизводных в растительном сырье

Выделите антраценпроизводные из лекарственного растительного сырья (кора крушины). Проведите обнаружение их методом тонкослойной хроматографии. Зарисуйте схему хроматограммы. Рассчитайте величину R_f обнаруженных зон. Сделайте заключение о качественном составе антраценпроизводных исследуемого сырья. Напишите схему превращения антрапроизводных в коре крушины ломкой при хранении или прогревании при 100 °С.

Методика проведения эксперимента

1. 0,3 г измельченного растительного сырья нагрейте с 3 мл этилового спирта в течение 5 мин на водяной бане. После остывания полученное извлечение профильтруйте.

2. 0,1 мл извлечения нанесите на линию старта хроматографической пластинки. Хроматографирование проводят в системе *этилацетат : метиловый спирт : вода (100:17:13)*, на пластинках «Силуфол». Одновременно, по возможности, хроматографируют стандартные образцы антраценпроизводных, нанося их рядом с исследуемым извлечением.

3. После окончания хроматографирования извлеките пластинку из камеры, отметьте линию финиша пробега растворителя, высушите и просмотрите в видимом и УФ-свете до и после проявления парами аммиака или 5%-го NaOH в этиловом спирте.

Преобразование антрапроизводных в коре крушины ломкой при хранении или прогревании при 100 °С

В первичной коре крушины содержится первичный гликозид франгуларозид, который проявляет рвотное действие.

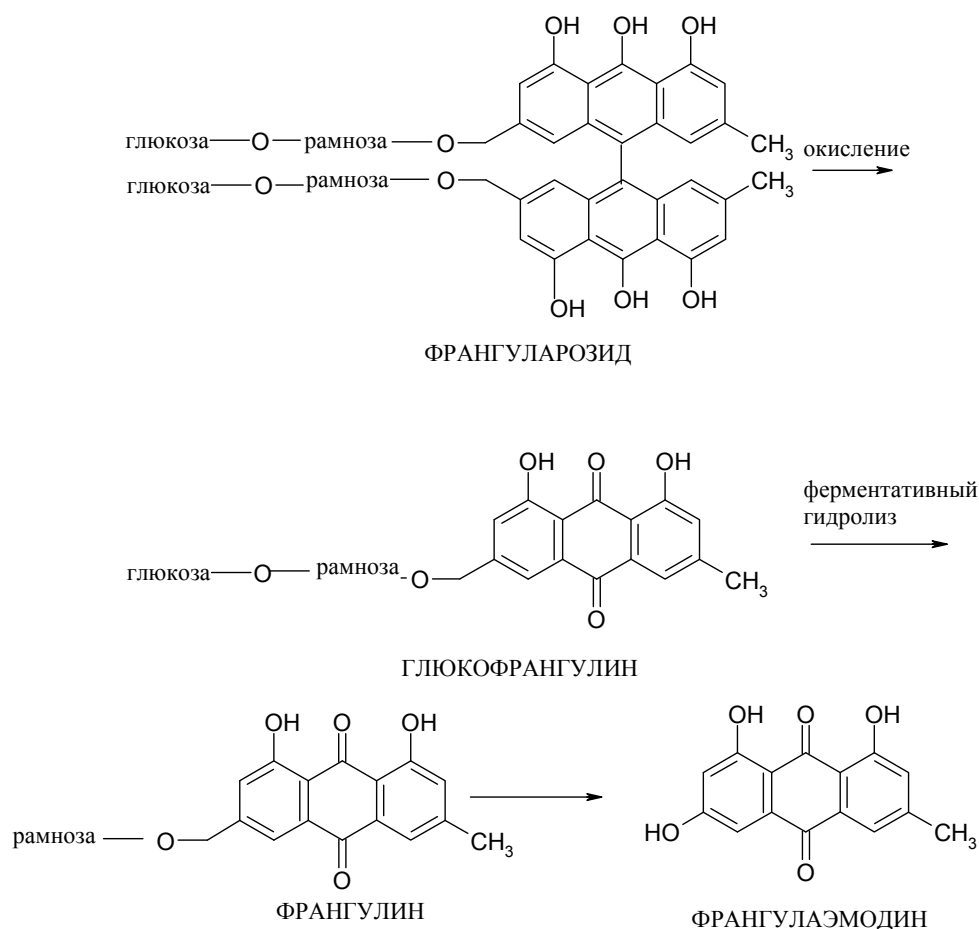


Рис. 6. Схема превращения франгуларозидов из коры крушины ольховидной

Антранолы являются мобильными соединениями и способны к окислению. Поэтому кору крушины применяют или после годичного хранения или процесс окисления франгуларозидов ускоряют нагреванием при 100 °С в течение 1 часа. В итоге франгуларозид превращается в глюкофрангулин. Далее при ферментативном гидролизе от глюкофрангулина отщепляется глюкоза, биозид превращается в монозид – франгулин. В дальнейшем франгулин расщепляется на франгулаэмодин и рамнозу.

Таким образом, в коре крушины, готовой к медицинскому применению, могут одновременно находиться глюкофрангулин, франгулин, франгулаэмодин. В литературе приводятся различные данные о структуре франгуларозидов. Здесь франгуларозид рассматривается как биозид франгулаэмодина в восстановленной форме антрона.

Задание 5. Количественное определение антраценпроизводных в сырье: Крушины ольховидной кора

Количественное определение проводят фотоколориметрическим методом (ГФ XIII, ФС.2.5.0021.15). Метод основан на способности окисленных форм производных антрацена при взаимодействии со щелочами окрашиваться в вишнево-красный цвет. Определяется сумма всех агликонов, содержащихся после гидролиза антрагликозидов ледяной уксусной кислотой.

Запишите основные этапы метода в таблицу в «Рабочей тетради».

| № | Этап работы | Сущность этапа |
|---|-------------|----------------|
| 1 | | |
| 2 | и т.д. | |

Проведите количественное определение антраценпроизводных в коре крушины, сравните полученные результаты с данными НД и сделайте вывод о качестве данного лекарственного растительного сырья.

Внимание! Работу по экстракции проводят под тягой!

Методика

1. Измельчите аналитическую пробу сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 0,05 г (точная навеска) измельченного сырья поместите в колбу вместимостью 100 мл, прибавьте 7,5 мл ледяной уксусной кислоты, после чего смесь нагрейте на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин.

2. Добавьте в колбу через холодильник 30 мл хлороформа и кипятите на водяной бане 15 мин. Затем извлечение охладите, профильтруйте через вату в делительную воронку вместимостью 300 мл; вату промойте 10 мл хлороформа (при необходимости вату с частичками сырья вновь помещают в колбу и кипятят с 30 мл хлороформа в течение 10 мин, профильтрованное и охлажденное хлороформное извлечение помещают в ту же делительную воронку).

3. К полученному извлечению осторожно, по стенкам прибавьте 100 мл щелочно-аммиачного раствора и аккуратно взболтайте в течение 5–7 мин, охлаждая воронку под струей холодной воды (в результате реакции со щелочно-аммиачным раствором происходит нагревание полученного раствора).

4. После полного расслоения прозрачный красный слой, не фильтруя, слейте в мерную колбу вместимостью 250 мл, а хлороформный слой повторно обработайте порциями по 20 мл щелочно-аммиачного раствора до прекращения его окрашивания. Полученные окрашенные

растворы слейте в ту же мерную колбу и заполните колбу до метки щелочно-аммиачным раствором.

5. 25 мл полученного раствора поместите в колбу объемом 25 мл и нагрейте 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником.

6. После охлаждения измерьте оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны около 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор (при получении слишком интенсивной окраски раствор перед колориметрированием разбавьте щелочно-аммиачным раствором).

7. Концентрацию производных антрацена в колориметрируемом растворе определите *по калибровочному графику*, построенному по растворам хлорида кобальта, методика изложена в соответствующей ФС (график получают у преподавателя).

8. Содержание производных антрацена в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычислите по формуле

$$X = \frac{C \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)},$$

где C – содержание производных антрацена в 1 мл колориметрируемого раствора, найденное по калибровочному графику, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Контрольные вопросы

1. Перечислите качественные реакции, используемые для обнаружения антраценпроизводных.
2. Почему при обнаружении антраценпроизводных в сырье нельзя ограничиться только реакцией со щелочью в водном или спиртовом извлечении?
3. Назовите основные этапы реакции Борнтредера.
4. Чем обусловлена растворимость свободных антраценпроизводных в водных растворах щелочи?
5. Расскажите о сущности реакции микросублимации.
6. Каким образом проводят хроматографическое исследование сырья, содержащего антраценпроизводные?
7. Какие реакции можно использовать для проявления хроматограммы?
8. Напишите схему гидролиза франгулярозида.

9. Объясните на примере антрахинонов зависимость «химическая структура – биологическая активность».

10. Назовите основные этапы колориметрического метода количественного определения антраценпроизводных. Что позволяет определить этот метод?

ТЕМА 6. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ПРОСТЫЕ ФЕНОЛЫ И ДУБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Цель занятия: изучить строение, классификацию, физико-химические свойства простых фенолов и дубильных веществ, овладеть методиками качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья, содержащего простые фенолы и дубильные вещества.

Вопросы и задания для самостоятельной подготовки к занятию

1. Дайте определение понятиям фенольные соединения, дубильные вещества.
2. На чем основано «дубильное» свойство танинов? Вещества какой молекулярной массы оказывают наиболее сильное «дубящее» действие? Почему?
3. Назовите локализацию фенольных соединений в растениях.
4. Охарактеризуйте факторы, оказывающие влияние на накопление дубильных веществ в растениях.
5. Охарактеризуйте биологическую роль дубильных веществ для растений.
6. Охарактеризуйте классификации простых фенолов и дубильных веществ.
7. Охарактеризуйте физико-химические свойства дубильных веществ. Почему лекарственное растительное сырье, содержащее дубильные вещества, предназначенное для хранения, нельзя сильно измельчать? С какими химическими соединениями дубильные вещества не совместимы в лекарственных формах?
8. Расскажите о методах выделения дубильных веществ из лекарственного растительного сырья.
9. Перечислите реакции, используемые для обнаружения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье.
10. Перечислите методы, используемые для определения количественного содержания дубильных веществ в растительном сырье.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

ЧАСТЬ I. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего ПРОСТЫЕ ФЕНОЛЫ

Задание 1. Экстракция простых фенолов из растительного сырья

Выделите простые фенолы из растительного сырья для проведения качественных реакций.

Методика

1. Отвесьте 1 г сырья (листья толокнянки), измельченного до частиц размером 1 мм, и поместите его в колбу.
2. Залейте сырье 20 мл воды и прокипятите в течение 2–3 мин.
3. Профильтруйте извлечение через бумажный фильтр и полученное извлечение используйте для проведения качественных реакций.

Задание 2. Качественные реакции на простые фенолы

Запишите в «Рабочую тетрадь» методику проведения опытов и их результаты. И на основе результатов проведенных реакций сделайте заключение о составе толокнянки листьев и брусники листьев.

Для определения арбутина в растительном сырье используют цветные качественные реакции.

| № | Методика проведения опыта | Наблюдения |
|---|--|---|
| 1 | К 1 мл фильтрата прибавляют небольшой кристаллик железа сульфата закисного (FeSO_4) | Появляется красновато-фиолетовое, затем темно-фиолетовое окрашивание и, наконец, темно-фиолетовый осадок (арбутин). |
| 2 | К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 4 мл раствора аммиака и по каплям 1 мл 10%-го раствора натрия фосфорномолибденовокислого в хлористоводородной кислоте | Появляется синее окрашивание (арбутин) |
| 3 | К 2–3 мл фильтрата прибавляют 2–3 капли раствора железомонийных квасцов | Появляется темно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества) |

Задание 3. Определение количественного содержания арбутина в лекарственном растительном сырье (ГФ XI издания, Т. 2)

Арбутин в растительном сырье определяется методом йодометрии.

Метод основан на гидролизе арбутина с образованием гидрохинона, который определяется йодом в щелочной среде. Щелочная среда создается гидрокарбонатом натрия.

Методика

0,5 г (точная навеска) листьев, измельченных и просеянных сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в колбу на 100 мл, заливают 50 мл воды и кипятят на плитке 30 мин. Для уменьшения испарения в колбу вставляют воронку. Горячее извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, избегая попадания растительного материала на фильтр. Растительный материал в колбе вновь заливают 25 мл воды и кипятят 20 минут. После этого горячее извлечение вместе с сырьем переносят на фильтр и остаток на фильтре промывают дважды горячей водой (по 10 мл).

Ко всему фильтрату прибавляют 3 мл ацетата свинца основного для осаждения балластных веществ, перемешивают, охлаждают и доводят объем фильтрата водой до метки. Колбу помещают в кипящую баню и выдерживают до полной коагуляции осадка. Горячую жидкость переносят полностью в сухую колбу через бумажный фильтр, прикрывая воронку чашкой Петри или часовым стеклом (во избежание испарения).

Затем проводится гидролиз арбутина: после охлаждения к фильтрату приливают 1 мл концентрированной серной кислоты, колбу взвешивают с погрешностью 0,01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на плитке в течение 1,5 часов, поддерживая равномерное и слабое кипение.

После охлаждения и доведения до первоначальной массы жидкость фильтруют в сухую колбу, к фильтрату прибавляют 0,1 г цинковой пыли и встряхивают в течение 5 мин для восстановления хинонов, которые могут образоваться из гидрохинона в процессе нагревания пробы на плитке в присутствии серной кислоты. Затем жидкость нейтрализуют по лакмусу гидрокарбонатом натрия (около 1–1,5 г), прибавляют еще 2 г гидрокарбоната натрия, после его растворения жидкость фильтруют в сухую колбу через бумажный фильтр.

50 мл фильтрата (брать пипеткой), что соответствует половине навески, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 1 мл раствора крахмала, 200 мл дистиллированной воды и немедленно титруют из полумикробюретки раствором йода (0,1 моль/л) до появления синего окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Содержание арбутина в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{V \cdot 0,1361 \cdot 2 \cdot 100}{m} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где 0,01361 – количество арбутина, соответствующего 1 мл раствора йода (1 моль/л), г;

V – объем раствора йода (0,1 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, мл;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

ЧАСТЬ II. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего ДУБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Задание 4. Экстракция дубильных веществ

Выделите дубильные вещества из растительного сырья (по заданию преподавателя) для проведения качественных реакций.

Методика

1. 5 г измельченного сырья поместите в колбу вместимостью 250 мл.
2. Залейте 100 мл кипящей воды и кипятите на плитке 5 мин.
3. Профильтруйте полученное извлечение через складчатый фильтр и используйте фильтрат для проведения качественных реакций.

Задание 5. Качественное определение дубильных веществ в растительном сырье

Проведите необходимые реакции, позволяющие обнаружить дубильные вещества в растительном экстракте, запишите их результаты в «Рабочую тетрадь» в виде таблицы и сделайте вывод о наличии дубильных веществ в полученном извлечении.

| № | Название реактива | Наблюдения (рисунок) | Выводы |
|---|-------------------|----------------------|--------|
| | | | |

1. Реакция с желатином

К 1–3 мл извлечения добавляют 2–3 капли 1%-го раствора желатина в 10%-й раствор натрия хлорида.

При наличии таннидов образуется белый осадок или помутнение раствора от образовавшихся желатинтаннатов, которые растворимы в избытке реактива. Результаты анализа наблюдают на черном фоне,

сравнивая с исходным извлечением. Реакция с желатином является специфической.

2. Реакция с солями алкалоидов

К 1–3 мл извлечения добавляют 2–3 капли 1%-го раствора солей хинина или другого алкалоида.

При наличии таннидов выпадает осадок или наблюдается помутнение раствора.

3. Реакция с калия бихроматом

К 1–3 мл извлечения добавляют 3–5 капель 5%-го раствора калия бихромата.

При наличии таннидов наблюдается потемнение раствора или выпадение желто-коричневого осадка.

4. Реакция со свинцом основным уксуснокислым

К 2–3 мл извлечения добавляют раствор свинца основного уксуснокислого.

При наличии таннидов выпадает осадок.

Задание 6. Обнаружение дубильных веществ при совместном присутствии обеих групп (групповые реакции)

Запишите результаты реакций в таблицу (смотри задание 2) и сделайте заключение о характере дубильных веществ в анализируемом сырье.

1. Реакция с солями железа (III)

К 1–3 мл извлечения добавляют 3 капли 1%-го раствора железозаммонийных квасцов.

Гидролизуемые дубильные вещества дают при этом черно-синее окрашивание, а *конденсированные* – черно-зеленое.

2. Реакция с бромной водой

К 5 мл извлечения добавляют несколько капель бромной воды и жидкость доводят до кипения (под тягой).

Конденсированные дубильные вещества сразу образуют желто-оранжевый осадок, а *гидролизуемые* – выпадают в осадок только при добавлении избытка бромной воды (постепенно).

3. Реакция с ацетатом свинца средним в уксусной среде

К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 10%-й уксусной кислоты и 1 мл 10%-го раствора свинца ацетата среднего.

При наличии *гидролизуемых* дубильных веществ выпадает осадок.

Осадок отфильтровывают и к фильтрату добавляют 10 капель 1%-го раствора железоаммониевых квасцов и несколько кристалликов натрия ацетата (не встряхивать!).

При наличии в сырье *конденсированных* дубильных веществ вокруг кристаллов фильтрат окрашивается в черно-зеленый цвет.

4. Реакция с формальдегидом и концентрированной хлористоводородной кислотой (реакция Стиасни)

К 25 мл извлечения прибавляют 5 мл 40%-го раствора формальдегида и 3 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Смесь кипятят на водяной бане 30 мин в колбе с обратным холодильником.

При наличии *конденсированных* дубильных веществ образуется осадок кирпично-красного цвета.

После охлаждения осадок отфильтровывают; к 10 мл фильтрата в пробирке добавляют 1 мл 1%-го раствора железоаммониевых квасцов и несколько кристалликов натрия ацетата (не взбалтывать!).

При наличии в сырье дубильных веществ *гидролизуемой* группы и свободной галловой кислоты образуется сине-фиолетовое окрашивание около кристаллов натрия ацетата.

5. Реакция с нитритом натрия в кислой среде

К 2 мл извлечения прибавляют несколько кристалликов натрия нитрита и 0,5 мл хлористоводородной кислоты.

При наличии *гидролизуемых* дубильных веществ в извлечении образуется красно-коричневое окрашивание раствора.

6. Реакция с раствором ванилина в кислой среде

К 2 мл извлечения прибавляют несколько капель раствора ванилина в кислой среде.

При наличии *конденсированных* дубильных веществ (катехинов) образуется красное окрашивание раствора.

Задание 7. Хроматографическое определение дубильных веществ (определение катехинов листа чая)

Изучите методику хроматографического обнаружения дубильных веществ в листьях скумпии кожевенной. Проведите исследования и сделайте вывод.

Методика

1. 0,1 г измельченного сырья залейте 2 мл 95%-го этилового спирта и нагрейте на водяной бане до кипения, затем охладите и профильтруйте.

2. Нанесите с помощью капилляра на стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол» полученный этанольный экстракт из листьев и спиртовой раствор танина, используемого в качестве «свидетеля».

3. После высыхания капель извлечения и свидетеля пластинку поместите в хроматографическую камеру с системой растворителей: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (40:12:28).

4. Хроматограмму высушите на воздухе, обработайте 1%-м раствором железоаммонийных квасцов, рассчитайте R_f полученных пятен и зарисуйте схему хроматограммы.

5. Сделайте вывод о содержании танина в извлечении из ЛРС.

Задание 8. Количественное определение дубильных веществ в растительном сырье

Фармакопейный метод количественного определения дубильных веществ в растительном сырье (метод Левенталья-Нейбауера в модификации А. Л. Курсанова) основан на их легкой окисляемости калия перманганатом в присутствии индигосульфокислоты при комнатной температуре. Индигосульфокислота является индикатором и регулятором реакции. Титрование ведут медленно, при сильном разбавлении экстракта до появления золотисто-желтого окрашивания.

Проведите количественное определение дубильных веществ в растительном сырье. Рассчитайте процентное содержание и сравните с данными НД. Сделайте заключение о соответствии анализируемого образца требованиям НД.

Методика

1. В коническую колбу вместимостью 500 мл поместите 2 г (точная навеска) измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм сырья и залейте 250 мл нагретой до кипения воды, затем взвесьте колбу на электронных весах и прокипятите с обратным воздушным холодильником на электрической плитке 30 мин при периодическом перемешивании.

2. Охладите колбу до комнатной температуры и вновь взвесьте, недостающий вес восполните свежепрокипяченной водой.

3. Профильтруйте около 100 мл полученного извлечения в коническую колбу вместимостью 200–250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу.

4. 25 мл профильтрованного извлечения перенесите в другую коническую колбу вместимостью 750–1000 мл, добавьте 500 мл воды, 25 мл индигосульфокислоты и титруйте при постоянном перемешивании

раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания. Параллельно проведите контрольный опыт.

5. Содержание дубильных веществ x в процентах в пересчете на абсолютно-сухое сырье рассчитайте по формуле

$$X = \frac{(V - V_1) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{M \times 25 \times (100 - W)},$$

где V – объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, мл;

V_1 – объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) в пересчете на танин, г;

M – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

250 – общий объем извлечения, мл;

25 – объем извлечения, взятого для титрования, мл.

Контрольные вопросы

1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций?

2. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье дубильных веществ?

3. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье гидролизуемых таннидов? (Приведите методики проведения реакций).

4. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье конденсированных таннидов? (Приведите методики проведения реакций).

5. Расскажите о методике хроматографического определения дубильных веществ в растительном сырье (на примере листа чая).

6. На каком методе основано количественное определение дубильных веществ в растительном сырье, описанное в ГФ XI?

7. Назовите основные этапы этого метода. Укажите его преимущества и недостатки.

8. Почему титрование калия перманганатом нужно проводить медленно и при большом разведении?

9. Для чего ставится контрольный опыт при количественном определении дубильных веществ по ГФ XI?

ТЕМА 7. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ, КУМАРИНОВ И ХРОМОНОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Цель занятия: изучить строение, классификацию, физико-химические свойства флавоноидов, кумаринов и хромонов, овладеть методиками качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, кумарины и хромоны.

Вопросы для самоподготовки к занятию

1. Дайте определение группам биологически активных веществ: флавоноиды, кумарины, хромоны.
2. Охарактеризуйте классификации флавоноидов, кумаринов, хромонов.
3. Напишите формулы следующих соединений: флавона, апигенина, лютеолина, изофлавона, ононина, флаванола, кемпферола, гиперозида, кверцетина, рутина, флавонона, нарингенина, ликвиритина, флаванонола, аромандрина халкона, аурана, катехина, лейкоцианидина, антоцианидина, виснагина, келлина, псоралена, бергаптена.
4. Когда и кем началось изучение флавоноидов? Какой флавоноид был выделен впервые? Какое растение послужило источником?
5. Укажите места локализации флавоноидов в растениях и факторы, влияющие на их накопление.
6. Охарактеризуйте физико-химические свойства, методы выделения флавоноидов, кумаринов, хромонов.
7. Перечислите качественные реакции на флавоноиды, кумарины и хромоны.
8. Охарактеризуйте сущность цианидиновой реакции.
9. Какие методы используются для количественного определения флавоноидов?

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ НА ЗАНЯТИИ

ЧАСТЬ I. Анализ лекарственного растительного сырья, содержащего ФЛАВОНОИДЫ

Задание 1. Экстракция флавоноидов из растительного сырья

Выделите флавоноиды из растительного сырья для проведения качественных реакций.

Методика

1. Отвесьте 3,0 г сырья и поместите в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл.
2. Добавьте 30 мл 70%-го этанола.

3. Проведите экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 10–15 мин.

4. Охладите и профильтруйте полученное извлечение.

Задание 2. Качественные реакции на флавоноиды

Качественные реакции проводят с двумя спиртовыми извлечениями: спиртовое извлечение из цветков василька и спиртовое извлечение из бессмертника.

| Методика проведения опыта | Возможные результаты реакции |
|---|--|
| <p><i>1. Цианидиновая реакция</i> Возьмите 2 пробирки (одна контрольная) и налейте в каждую их них по 1 мл фильтрата. В одну из пробирок добавьте щепотку порошка магния. В каждую их пробирок затем добавьте несколько капель концентрированной соляной кислоты. Пронаблюдайте за изменением окраски</p> | <p>Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием в присутствии хлористоводородной кислоты дают розовое, красное или оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов. Появление розового или красного окрашивания в пробирке без магния указывает на присутствие в ней антоциановых пигментов, халконов или ауранов, которые при добавлении только одной HCl образуют красное окрашивание за счет образования оксониевых солей</p> |
| <p><i>2. Реакция с хлоридом алюминия</i> К 1 мл фильтрата добавляют 2–3 капли 5%-го спиртового раствора хлорида алюминия</p> | <p>При наличии флавоноидов, имеющих две оксигруппы в C₃ и C₅ положениях, появляется лимонно-желтое окрашивание</p> |
| <p><i>3. Реакция с хлоридом железа (III)</i> К 1 мл фильтрата добавляют 2–3 капли 1%-го раствора хлорида железа (III)</p> | <p>Образуются окраски от зеленой (флавонолы) до коричневой (флаваноны, халконы, аураны) и красновато-бурой (флавоны). При наличии веществ с рядовой три-оксигруппировкой в кольце В появляется черно-синее окрашивание и осадок. Эту реакцию дают и другие фенольные соединения</p> |

| | |
|---|--|
| <p>5. <i>Реакция с раствором аммиака</i> К 1 мл фильтрата добавляют 3–5 капель раствора аммиака</p> | <p>Флавоны, флавонолы, флаваноны приобретают желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное. Халконы и ауроны – оранжевое или красное окрашивание. Антоцианы образуют синее или фиолетовое окрашивание</p> |
| <p>6. <i>Реакции с ацетатом свинца средним</i> К 1 мл фильтрата добавляют 3–5 капель раствора ацетата свинца среднего</p> | <p>Флавоны, халконы, ауроны, содержащие свободные орто-гидроксильные группы в кольце В, образуют осадки, окрашенные в <i>ярко-желтый или красный цвета</i>. Антоцианы образуют осадки, окрашенные в <i>красный или синий цвета</i></p> |

Задание 3. Хроматографическое исследование флавоноидов

Проведите хроматографический анализ извлечения из бутонов или софоры японской (методика получения извлечения – см. задание 1). Рассчитайте значение R_f для всех обнаруженных зон. Зарисуйте схему хроматограммы в «Рабочей тетради».

Сделайте заключение о качественном составе флавоноидов в извлечении.

Методика

Хроматографирование проводят в чашках Петри.

1. Упарьте спиртовое извлечение до половины объема.
2. На круглый диск хроматографической бумаги на расстоянии 0,5 см от центра нанесите исследуемое извлечение и растворы свидетелей (спиртовой раствор рутина, кверцетина или других веществ). Диаметр пятна не должен превышать 5 мм.
3. В центр диска поместите «ножку» из хроматографической (или фильтровальной) бумаги.
4. Поместите в чашку Петри хроматографическую систему: *15%-й раствор уксусной кислоты*.
5. Полученную хроматограмму высушите и просмотрите в УФ-свете без предварительного проявления, а затем после проявления алюминия хлоридом или парами аммиака.

Задание 4. Количественное определение флавоноидов в растительном сырье

Определите количественное содержание суммы флавоноидов в траве горца птичьего (спорыша) (ГФ XI издания, Т. 2, ФС 56) и суммы антоцианов в цветках василька синего (ГФ XI издания, Т. 2, ФС 6).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве спорыша (метод 1)

1. Измельчите аналитическую пробу сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм.

2. Поместите в колбу со шлифом вместимостью 100 мл около 1 г сырья (точная навеска) и прибавьте 30 мл 70%-го спирта, колбу присоедините к обратному холодильнику и нагрейте на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

3. Колбу охладите до комнатной температуры под струей холодной воды и профильтруйте содержимое через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл (*для полного извлечения флавоноидов экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом, полученные извлечения фильтруют в ту же мерную колбу через тот же фильтр).

4. Фильтр промойте 70%-м спиртом и доведите объем фильтрата тем же спиртом до метки. Полученный раствор будет иметь название «раствор А».

5. 4 мл «раствора А» поместите в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавьте 2 мл 2%-го раствора алюминия хлорида в 95%-м спирте и доведите объем раствора до метки 95%-м спиртом.

6. Через 20 мин измерьте оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете толщиной слоя 10 мм.

7. *Приготовление раствора сравнения:* 4 мл «раствора А» поместите в мерную колбу, объемом 25 мл, прибавьте 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доведите объем раствора 95%-м спиртом до метки.

8. Вычислите содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин в процентах (X) по формуле

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{330 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

*Методика количественного определения суммы антоцианов
в цветках василька синего (метод 2)*

1. Измельчите аналитическую пробу сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

2. Около 0,3 г (точная навеска) измельченного сырья поместите в колбу вместимостью 250 мл, прибавьте 100 мл 1%-го раствора хлористоводородной кислоты и нагрейте колбу с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин.

3. Извлечение отфильтруйте через вату в мерную колбу объемом 250 мл (*для полного извлечения антоцианов экстракцию повторяют еще 3 раза указанным выше способом, полученное извлечение фильтруют в ту же мерную колбу через тот же фильтр).

4. Сырье на фильтре промойте 40 мл 1%-го раствора хлористоводородной кислоты. После охлаждения фильтрата доведите объем извлечения до метки.

5. Полученное извлечение отфильтруйте через бумажный фильтр, отбросив первые 10 мл фильтрата, и измерьте оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используйте 1%-й раствор хлористоводородной кислоты.

6. Вычислите содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно сухом сырье в процентах по формуле

$$X = \frac{D \cdot 250 \cdot 100}{453 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора;

453 – удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозид в 1%-м растворе хлористоводородной кислоты;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

**ЧАСТЬ II. Анализ лекарственного растительного сырья,
содержащего КУМАРИНЫ И ХРОМОНЫ**

Задание 5. Извлечение кумаринов из растительного сырья

Методика 1 (используют для травы)

1. Поместите 3,0 г измельченного сырья в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, залейте 30 мл 95%-го спирта и нагрейте на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15–20 мин.

2. Содержимое колбы профильтруйте, к горячему раствору добавьте по каплям при постоянном перемешивании 10%-й раствор ацетата свинца.

При этом большая часть веществ фенольного характера, обладающая способностью к азотосочетанию, осаждается.

3. Горячую массу перенесите на фильтр для отделения осадка свинцовых солей, фильтр с осадком промойте 3 мл спирта. После охлаждения добавьте к фильтрату 5 мл воды.

4. Кумарины из спиртового извлечения переведите в хлороформ, взбалтывая в делительной воронке с 20 мл хлороформа.

5. Хлороформ отгоните, а остаток в колбе растворите 6 мл 95%-го спирта.

6. Этот раствор используйте для дальнейшего анализа.

Методика 2 (используют для плодов)

Залейте 2 г измельченного сырья 20 мл этилового спирта и прокипятите 15 мин на водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения полученное извлечение профильтруйте.

Примечание. При необходимости сырье предварительно очищают от липофильных веществ петролейным эфиром.

Задание 6. Качественные реакции на кумарины

Проведите качественные реакции на обнаружение кумаринов в полученном извлечении.

1. Лактонная проба

Реакция основана на способности кумаринов при нагревании в щелочной среде образовывать соли желтого цвета, растворимые в воде, которые при подкислении превращаются в исходные продукты, не растворимые в воде.

Методика

В пробирку к 2 мл извлечения налейте 0,5 мл 10%-го раствора гидроксида натрия или калия, нагрейте на кипящей бане. В присутствии кумаринов появляется желтое окрашивание.

Охладите содержимое пробирки и добавьте 10%-й раствор соляной кислоты до кислой реакции по лакмусу. Появление осадка или помутнение раствора будет указывать на возможное присутствие кумаринов в сырье.

Проанализируйте в УФ-свете флуоресценцию растворов после добавления щелочи и после соляной кислоты.

2. Реакция азосочетания

Реакция основана на способности кумаринов образовывать с ароматическими аминопроизводными окрашенные продукты.

Методика

К 1 мл исходного раствора добавьте 3 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), нагрейте на водяной бане в течение 3–5 мин.

Полученный раствор охладите и смешайте с 1 мл свежеприготовленного диазотированного раствора сульфаниловой кислоты.

В присутствии кумаринов в зависимости от их химической структуры появится окрашивание от красно-оранжевого до вишнево-красного.

3. Флуоресценция в УФ-свете

Нанесите на полоску фильтровальной бумаги небольшое количество полученного извлечения. Обработайте раствором щелочи или аммиака и оцените флуоресценцию в УФ-свете.

4. Микросублимация кумаринов

Поместите на дно сухой пробирки 0,2 г измельченного сырья и осторожно нагрейте, держа пробирку почти горизонтально.

Сублимат конденсируется на холодных участках пробирки в виде желтых капель или желтых игольчатых кристаллов.

После остывания пробирки к сублимату прибавьте 1 каплю 10%-го NaOH в этиловом спирте и оцените флуоресценцию в УФ-свете.

Задание 7. Получение хромонов из лекарственного растительного сырья

Методика 2 (используют для плодов)

Залейте 2 г измельченного сырья 20 мл этилового спирта и прокипятите 15 мин на водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения полученное извлечение профильтруйте.

Примечание. При необходимости сырье предварительно очищают от липофильных веществ петролейным эфиром.

Задание 8. Качественные реакции на хромоны

Проведите качественные реакции на обнаружение хромонов в полученном извлечении.

Методика

В пробирку к 2 мл извлечения, содержащего хромоны, налейте 0,5 мл 10%-го раствора гидроксида натрия или калия, нагрейте на кипящей бане.

Содержимое пробирки охладите и добавьте 10%-й раствор соляной кислоты до кислой реакции по лакмусу. При наличии в извлечении

хромонов желтое окрашивание раствора не исчезает. Оцените флуоресценцию смеси с раствором щелочи и после прибавления соляной кислоты.

Запишите наблюдения в «Рабочей тетради».

Контрольные вопросы

1. Приведите методику получения извлечения из сырья для проведения качественных реакций.
2. Приведите методики качественных реакций для флавоноидов. Какая реакция является наиболее специфической?
3. Охарактеризуйте сущность цианидиновой реакции. Для чего при проведении цианидиновой реакции делают контрольную пробу?
4. Расскажите о хроматографическом исследовании флавоноидов.
5. Какую флуоресценцию развивают флавоноиды в УФ-свете?
6. Какие методы используются для количественного определения флавоноидов в ЛРС?
7. Назовите основные этапы количественного определения флавоноидов в траве спорыша.
8. Дайте определение понятия «флавоноиды».
9. Что лежит в основе классификации флавоноидов? Приведите классификацию флавоноидов.
10. Когда и кем началось изучение флавоноидов? Какой флавоноид был выделен впервые? Какое растение послужило источником?
11. Кто впервые установил строение рутина?
12. В каких органах растений в основном накапливаются флавоноиды? Укажите факторы, влияющие на накопление флавоноидов.
13. Охарактеризуйте физико-химические свойства флавоноидов.
14. Расскажите о методах выделения, очистки и разделения флавоноидов на индивидуальные вещества.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основная литература

1. Фармакогнозия : гриф Минобрнауки России / И.В. Гравель, Я.Н. Шойхет, Г.П. Яковлев. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970426128.html> >
2. Самылина И. А. Фармакогнозия / И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970430712.html> >
3. <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/>

Дополнительная литература

4. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик [в 2 вып.] / Мин-во здравоохранения СССР. –11-е изд. – М. : Медицина, 1987. – Вып. 1 : Общие методы анализа. – 1987. – 333 с.
5. Химический анализ лекарственных растений : учеб. пособие для фармацевтических вузов / под ред. Н.И. Гринкевича, Л.Н. Сафронович. – М. : Высш. школа, 1983. – 176 с.
6. Практикум по фармакогнозии : учеб. пособие для студентов вузов / под общей ред. В.Н. Ковалева. – Харьков : Изд-во НФАУ Золотые страницы : МТК – книга, 2004. – 512 с.

Информационные электронно-образовательные ресурсы

7. www.lib.vsu.ru – ЗНБ ВГУ, ЭБС МЕДФАРМ, ЭБС Университетская библиотека

Учебное издание

**ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Учебно-методическое пособие

Составители:

Коренская Ирина Михайловна,
Ивановская Наталья Петровна,
Колосова Ольга Александровна,
Мальцева Алевтина Алексеевна

Корректор *М. С. Римская*

Компьютерная верстка *Л. О. Мещеряковой*

Подписано в печать 14.12.2017. Формат 60×84/16.
Уч.-изд. л. 5,3. Усл. п. л. 4,5. Тираж 50 экз. Заказ 421

Издательский дом ВГУ
394018 г. Воронеж, пл. Ленина, 10

Отпечатано в типографии Издательского дома ВГУ
394018 г. Воронеж, ул. Пушкинская, 3