

**АНАЛИЗ ПОДЛИННОСТИ И ХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ
ГРУПП БАВ В СЫРЬЕ И ФИТОПРЕПАРАТАХ**
(групповой анализ)

Вещества первичного и вторичного синтеза, присутствующие в различном сочетании во всех растениях, по-разному извлекают из сырья с учетом их химической природы и растворимости. Ниже представлена растворимость основных групп веществ растений.

Растворимость основных групп БАВ растений

Группы веществ	H ₂ O	H ₂ O + t ⁰	H ₂ O- орг. р-ли	Орг. р-ли полярные	Орг. р-ли неполярные
Клетчатка	-	-	-	-	-
Целлюлоза	-	-	-	част.	-
Пектины	-	+	-	-	-
Слизы	колл.	+	+	част.	-
Крахмал	-	колл.	-	-	-
Инулин	+	+	+	част.	-
Углеводы	+	+	+	+	-
Белковые вещества	-	огр.	+	+	част.
Жирные масла	-	-	+	+	++
Пигменты	-	огр.	+	+	+
Органические кислоты					
- алифатические	+	+	+	+	-
- ароматические	огр.	+	+	+	част.
Эфирные масла	-	-	+	+	+
Смолы	-	-	+	+	+
Липиды	-	-	огр.	+	+
Воск	-	-	огр.	+	+
Каротиноиды	-	-	+	+	+
Гликозиды	огр.	+	+	+	-
Фенолы	огр.	+	+	+	-
Фенолокислоты	+	+	+	+	-
Флавоноиды					
- агликоны	-	огр.	+	+	+
- гликозиды	огр.	+	+	+	-
Дубильные вещества					
- гидролизуемые	+	+	+	+	-
- конденсированные	-	+	+	+	огр.
Антоцианы	-	+	+/НС1	+/НС1	-
Антраценовые					
- агликоны	-	-	+	+	+
- гликозиды	огр.	+	+	+	-
Ксантоны	-	-	+	+	-
Кумарины	-	огр.	+	+	-
Аминокислоты	+	+	+	+	-
Терпеноиды	-	-	огр.	+	+
Сердечные гликозиды	-	+	+	+	-
Сапонины	огр.	+	+	+	-

Част. = частично; колл. = коллоид; огр. = ограниченно

Как видно из таблицы, в воду без нагревания переходят органические кислоты, аминокислоты, гидролизуемые дубильные вещества, частично кислоты и гликозиды ароматического ряда, а слизи образуют коллоидные растворы.

Нагревание водных настоев позволяет извлечь пектины, слизи, полисахара, все кислоты, гликозиды, дубильные вещества, сердечные гликозиды, сапонины. Не извлекаются при этом терпеноиды без функциональных групп, ксантоны, агликоны антраценов и флавоноидов, смолы, эфирные масла, липиды, каротиноиды, жирные масла.

Неполярными органическими растворителями извлекают жирные масла, пигменты, эфирные масла, смолы, липиды, каротиноиды, терпеноиды, агликоны ароматического ряда.

Использование показателя «растворимость» позволяет проводить фракционное разделение БАВ или фракционную экстракцию лекарственных растений, а также разделять органические и минеральные вещества растений.

Максимальное извлечение всех основных БАВ растения достигается водно-спиртовыми или водно-ацетоновыми растворами, метанолом и изопропиловым спиртом.

Использование названных экстрагентов позволяет вести процесс при температурах ниже 100⁰С, причем непродолжительная по времени кратность нагревания позволяет сохранить даже термолабильные вещества.

Максимальную информацию о качественном составе, как правило, дает использование экстрагентов по 2 и более признакам химического сродства, т.е. это вода, водный спирт (30-70%), ацетон (50%), диоксан (50%).

Реакции и реактивы для качественного обнаружения различных групп природных соединений в сырье и фитопрепаратах

№	Реактивы, реакции	Группы анализируемых веществ природных соединений (окрашивание)
1	р. Келлер-Килиани	дезоксисахара (бурое → васильково-синее)
2	р. Либермана-Бурхарда	стероидные сапонины (розовое → зеленое → синее), тритерпены, фитостерины, все стерины, наличие 5С=C; аралозиды, ланатозиды (яркое)
3	р. Розенхейма	стероидные сапонины, стероидное ядро, белковые комплексы (розовое → синее)
4	р. Легалья	5-ти членное лактонное кольцо, гликозиды ландыша, наперстянки (красное), пахикарпин, сферофизин (вишневое); фурукумарины (оранжевое)
5	р. Раймонда	дигитоксин, гликозиды (красно-фиолетовое)
6	H ₂ SO ₄ (конц)	строфантиновые гликозиды (зеленое), п-оксиантрахиноны (синее), отличие кодеина и морфина (оранжевое → желтое); фурукумарины (изумрудно-зеленое); изофлавоны (желтое → коричневое → красно-коричневое); аралозиды (коричневое); гликозиды (панаксозиды) (кирпично-красное → фиолетовое → красно-фиолетовое)
7	H ₂ SO ₄ (конц), 100 ⁰ С, 0.5% ванадат аммония	иридоиды (синее → обесцвечивание)
8	1% ванилин в H ₂ SO ₄ (конц)	гликозиды (яркое), терпены с 5-ОН (красно-фиолетовое), ментол (желтое → +H ₂ O → малиново-красное); тимол эту реакцию не дает
9	р. Запрометова 1% ванилин в HCl (конц)	любые фенольные соединения с мета-ОН (красное), пирокатехиновый фрагмент фенольных соединений (оранжевое), флороглюциновый фрагмент (красно-фиолетовое), флавоны (ярко-желтое), флаван-3,4-диолы

		(малиновое), эфиры катехинов (розовое), галлокатехины, катехины, дубильные вещества (красное)
10	п-диметиламинобенз-альдегид в H ₂ SO ₄ (конц)	гликозиды, терпены, фурастаноловые гликозиды (яркое), ментол (желтое → малиново-красное)
11	п-диметиламинобенз-альдегид (1% винная кислота)	алкалоиды спорыньи (сине-фиолетовое)
12	р. Эрлиха	эргокристин, алкалоиды (яркое)
13	р. Кедде	гликозиды, терпены (яркое)
14	р. Бальетта	5-ти членное лактонное кольцо (красное), альдозы, аскорбиновая кислота (яркое), алкалоиды (желтое, осадки), кроме кофеина, морфина, колхицина, теобромина
15	р. Таттье	дигитоксин, карденолиды (яркое)
16	SbCl ₃ (нас) в CH ₃ OH или CHCl ₃	гликозиды ландыша (розово-фиолетовое), 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы (желто-оранжевое, красное), каротиноиды (зеленое, синее, бурое), тритерпены (зелено-бурое)
17	NH ₂ OH (1% + KOH до pH=8)	кетосоединения, терпены (фиолетовое)
18	«Гидроксамовая проба»	платифилин (красно-фиолетовое), карбонилсодержащие соединения
19	10% PbAc ₂ / 10% HCl или HAc	сапонины (осадок), фенолы, фенолокислоты, флавоноиды, антрахиноны и др. с орто-оксигруппировками (желтое), антоцианы (красное, синее), дубильные вещества (черно-зеленое)
20	р. Лафона	сапонины (сине-зеленое)
21	1% холестерин / спирт	сапонины (осадок)
22	10% NaNO ₃ / H ₂ SO ₄ (конц) + 0,1N HCl	сапонины (кроваво-красное) гидролизуемые дубильные вещества (коричневое)
23	2% изотонический раствор эритроцитов	сапонины (гемолиз)
24	р. Борнтрегера	оксиантрахиноны (красное → бурое), слизи (лимонно-желтое)
25	NaOH (конц) / 10% Pb ²⁺	S-содержащие белки и аминокислоты (белый → коричнево-черный осадок)
26	NH ₃	флавоноиды, фенольные соединения (желтое), оксиантрахиноны (розовое → карминово-красное), слизи (лимонно-желтое), флаваноны (желто-зеленое), халконы, ауроны (желтое, оранжевое → красное), антоцианы (розовое, красное → серо-синее, фиолетовое), изофлавоны (темное)
27	3% MgAc ₂	1,6-; 1,8-диоксиантрахиноны (оранжево-красное), 1,2-диокси-антрахиноны (фиолетовое), 1,4-диоксиантрахиноны (пурпурное), карбоновые кислоты (белое, желтое)
28	циркония нитрат или хлорид	5-оксифлавоноиды (желтое), орто-диоксиантрахиноны (красно-фиолетовое)
29	HAc (лед.)	антрахиноны, флавоноиды (флуоресценция)
30	0,5N KOH / спирт	димерные формы антрахинонов и флавоноидов (желтое, зеленое), окси-(метокси)кумарины (желтое), фурукумарины (красное)
31	0,1% п-нитрозодиметиланилин / пиридин	антроны, антронолы (болотно-зеленое)

32	бромтимоловый голубой	фенолокислоты (желтое)
33	бромкрезоловый зеленый	алифатические и фенолокислоты (желтое)
34	1% AgNO ₃ / NH ₃ р. Бейт-Смита и Уэстолла	феноло- и карбоновые кислоты (желтое, темно-коричневое), альдозы, восстанавливающие сахара (черное)
35	1% ЖАК р. Робертса и Вуда	орто-диоксигруппировка любых фенольных соединений (зеленое), 3-рядовое расположение ОН-фенольных соединений, гидролизуемые дубильные вещества (синее → фиолетовое → черное), конденсированные дубильные вещества (черно-зеленое → черное), арбутин (темно-синее)
36	5% фосфорно- молибденовая кислота	аскорбиновая кислота (синее → обесцвечивание), флороглюциды (синее)
37	1-5% FeCl ₃	все фенольные соединения кроме тимола (зеленое, синее, фиоле-товое – от расположения ОН-групп), кумарины, изокумарины (синее, фиолетовое), флавонолы (коричневое), 5-оксифлавоно-иды (зеленое), терпин гидрат (окрашивание + бензол → синее)
38	FeSO ₄ (1-3%)	флороглюциды (сиреневое → темно-фиолетовое), арбутин (красно-фиолетовое → темно-фиолетовое)
39	р. Мартини-Беттоло	флавоны, изофлавоны, флаваноны (желтое, оранжевое)
40	2,4,5-тринитрофенол / КОН	катехины (красное)
41	п-толуолсульфо-кислота	лейкоантоцианидины (красное, оранжевое)
42	Диазосульфаниламид	7-ОН (флавоны, флавонолы, изофлавоны) (быстро оранжево-красное), 7-ОН флаваноны (окрашивание через 1-2 минуты)
43	Боргидрид натрия/ AlCl ₃	флавонолы (красное)
44	Цианидиновая проба	флавоны, флаваноны, флавонолы (оранжево-красное), кроме халконов, ауронов
45	Zn / 18% HCl	флавоноиды, дигидрофлавонолы (оранжево-красное), флаволигнаны (малиновое)
46	3-5% H ₃ BO ₃	орто-диоксигруппировка всех фенольных соединений (осадок, чаще белый), 5-оксифлавоны (желтое)
47	70% церия сульфат / H ₂ SO ₄ (конц)	бифлавоноиды (желто-коричневое → темное и осадок)
48	10% щавелевая кислота	антоцианы, антоцианидины (яркое)
49	р. Хайса	свободные о- и п- положения, относительно фенольных ОН (желтое → коричневое)
50	1% хинин (антипирин)	дубильные вещества, полифенолы других типов (окрашивание и осадок)
51	1% желатин	дубильные вещества (муть → осадок)
52	нитрозометилуретан	дубильные вещества, пирокатехиновые фрагменты (осадок), пирогаллоловые фрагменты (фиолетовое)
53	«Мурексидная проба»	ксантины, аминокислоты, кетокислоты
54	р. Бушарда-Вагнера- Люголя	алкалоиды (бурое)
55	р. Майера	алкалоиды (белый, желтый осадок), кроме кофеина, колхицина
56	р. Драгендорфа	стероидные алкалоиды (оранжевое), кислые соли алкалоидов (оранжевое, красное, кирпичное), кумарины (коричневое)

57	р. Зонненштейна	алкалоиды (желтое, оранжевое → синее, зеленое), каротиноиды (синее)
58	р. Шейблера	алкалоиды (белые, окрашенные осадки)
59	10% танин	алкалоиды (осадок)
60	HCl / H ₂ O ₂ , NH ₃	кофеин (пурпурно-красное)
61	р. Бертрана	алкалоиды (белый осадок)
62	р. Витали-Морена	тропановые алкалоиды (фиолетовое)
63	р. Марме	алкалоиды (белый, желтый осадок), кроме кофеина, атропина, колхицина, вератрина
64	Br ₂ / H ₂ O	каротиноиды (обесцвечивание), сесквитерпены (голубое → синее), конденсированные дубильные вещества (осадок), хининовые алкалоиды (зеленое), сольсолин (ярко-красное), пахикарпин, хинолиновые алкалоиды (зеленое)
65	1% KMnO ₄	кокаин (фиолетовое), каротиноиды (обесцвечивание)
66	3% FeCl ₃ , t ⁰ , + HNO ₃ (конц)	морфиновые алкалоиды, апоморфин (зелено-фиолетовое → синее → красное)
67	HNO ₃ (конц), t ⁰ , + 0,5N KOH	атропиновые алкалоиды (фиолетовое)
68	р. Брэди	дигидрокодеинон, алкалоиды (желтый осадок), в отличие от морфина, кофеина, теобромина
69	5% Mo(NH ₄) ₂ / H ₂ SO ₄ (конц)	морфин (фиолетовое → синее → зеленое)
70	р. Альберта	морфин (пурпурное → фиолетовое), кодеин (фиолетовое), дубильные вещества (синее, фиолетовое → осадок)
71	1% FeCl ₃ / 1% K ₂ Cr ₂ O ₇ / HNO ₃ (конц)	все фенольные соединения (зеленое → бурый осадок)
72	р. Паули по Кутачеку	флороглюциды, арбутин (вишневое, желтое, оранжевое), флавоноиды, гликозиды, аминокислоты (красное)
73	р. Либермана	полифенолы, алкалоиды, амины со свободными о- и п-положениями (окрашенные осадки)
74	I ₂ (пары или в растворе)	ненасыщенные кислоты (коричневое), крахмал (синее, сине-фиолетовое), кроме слизи и инулина, кумарины (коричневое), ксантоны (желто-коричневое)
75	1% K ₂ Fe(CN) ₆ / ЖАК	окси-, диокси-, триоксикарбоновые кислоты, фенолокислоты (темно-синее), фенилпропаноиды (сине-фиолетовое)
76	0,03% о-фенилендиамин / 10% HAc	кетокислоты, кетозы, невосстанавливающие сахара (синее, зеленое)
77	0,1-1% нингидрин	аминокислоты, аминсахара, алкалоиды с NH ₂ и NH-группами, амины (розовое, сиреневое, синее, фиолетовое, желтое)
78	Резорцин / H ₂ SO ₄ (конц)	аминокислоты, аминсахара, амины, алкалоиды (зелено-коричневое) + NH ₃ → (красно-фиолетовое), инулин, крахмал (красное)
79	β-нафтол / 0,1M NaNO ₂ , 10% HCl	ароматические аминокислоты, ароматические амины (вишнево-красное → осадок)
80	5% NaNO ₂ / HAc	эллаготаннины, гидролизуемые дубильные вещества (коричневое)
81	р. Фелинга	одно-, двухосновные аминокислоты, углеводы (зеленое, бурое)
82	(NH ₄) ₂ SO ₄	белки, белковые комплексы (осадок)

83	Биуретовая реакция	пептиды, белки, белковые комплексы, многоатомные спирты (сине-фиолетовое)
84	р. Миллона, t ⁰	белки, аминокислоты (осадок → t ⁰ → кирпично-красное), поли- и метоксифенолы (меняется цвет)
85	HNO ₃ (конц) «ксанто-протеиновая проба»	ароматические аминокислоты (белое → ярко-желтое)
86	CuSO ₄ / NaOH / эфир	алкалоиды с NH-группой, эфедрин (эфирный слой фиолетово-красный)
87	4% винная кислота, t ⁰ р. Ван-Урка	алкалоиды спорыньи (фиолетово-синее)
88	NaAc	наркотин, папаверин (белый осадок)
89	H ₂ SO ₄ (конц) / 3% FeCl ₃ , t ⁰ , HNO ₃	кодеиновые алкалоиды (синее → красное)
90	Co(NO ₃) ₂	цитизин (голубовато-зеленый осадок)
91	р. Эрдмана	алкалоиды (разноокрашенные осадки)
92	1% пикролоновая кислота	алкалоиды с вторичной или третичной аминогруппой (желтое)
93	р. Бояркина	альдозы, восстанавливающие сахара (желто-коричневое)
94	Мочевина	кетозы, невосстанавливающие сахара (желто-коричневое)
95	Толуидиновый синий	полисахариды со свободной COOH-группой (красное)
96	Муцикармин	нейтральные и кислые полисахара (красное)
97	Аминофенол	инулин, полисахара, альдозы, кетозы (яркое)
98	HCl (конц)	халконы, ауруны (красное), слизи (желто-зеленое)
99	95-96% C ₂ H ₅ OH	полисахара (осадок быстро), слизи (осадок при стоянии)
100	α-нафтол / H ₂ SO ₄ (конц)	инулин, крахмал (розово-фиолетовое), дисахара (вишневое)
101	20% тимол / H ₂ SO ₄	инулин, крахмал (розово-малиновое), ксантоны (желтое)
102	Анилинфталат	гликопротеиды, поли- и аминсахара
103	«Лактонная проба»	кумарины (помутнение или осадок)
104	Бромтимоловый синий, пиридин, 0.1N NaOH	окси- и дикумарины (желтое → зеленое → синее)
105	Диазосульфокислота, t ⁰ , NaOH	фурукумарины (красное), пиранокумарины (желто-оранжевое)
106	Диазосульфаниламид	кумарины (оранжевое, красное, фиолетовое)
107	Молибдат натрия	все типы фенольных соединений с орто-оксигруппами (желтое)
108	р. Гейдж	флавоны (желтое), халконы (красное), ауруны (оранжевое), флавоны (коричнево-желтое)
109	р. Фолина	флавоноиды, аминокислоты (синее → желтое)
110	бис-дiazобензидин	все типы фенольных соединений со свободными о- и п-положениями (красно-коричневое)
111	5% AlCl ₃	Ксантоны (зелено-голубое), флавоноиды, все типы полифенольных соединений с тремя рядовыми OH-группами, или OH...C(O)...OH-фрагментом (ярко-желтое)
112	р. Шталя	иридоиды (малиновое), катехины, дубильные вещества
113	р. Трима и Хилла	иридоиды (синее)

10 обязательных реакций на основные группы БАВ:

1. NH₃ (в парах или в растворе) – C=O содержащие соединения, флавоноиды, пигменты, антоцианы;
2. NaOH (КОН) – антрацены, халконы, ауруны;
3. FeCl₃ (1-5% водные или спиртовые) – фенольные соединения;

4. $AlCl_3$ (1-3% водные или спиртовые) – флавоноиды и фенольные соединения с рядовым расположением ОН-групп;
5. ЖАК (1% водный раствор) – дубильные вещества;
6. ванилин в концентрированных соляной или серной кислотах – катехины, конденсированные дубильные вещества;
7. о-толуидин – альдозы (углеводы);
8. нингидрин – аминокислоты, аминсахара, алкалоиды с NH_2 и NH -группами;
9. реактив Драгендорфа (или фосфорно-вольфрамовая кислота) – алкалоиды;
10. «Лактонная» проба – кумарины.

* В растворе делается проба на «пенообразование» - сапонины.

МЕТОДЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И СУММАРНЫХ ФИТОПРЕПАРАТОВ

Алкалоиды

В связи с разнообразием химического строения алкалоидов и их состоянием в сырье, используют различные методы их извлечения. Если алкалоиды присутствуют в виде солей, их можно извлекать водой с последующим переводом в основания под действием аммиака и органического растворителя.

Если алкалоиды присутствуют в виде оснований, их переводят в солеобразное состояние добавлением кислоты, например, хлороводородной с последующим титрованием избытка кислоты натрием гидроксидом или основания извлекают дихлорэтаном, хлороформом, бензолом, эфиром и др.

Гликозидированные формы алкалоидов предварительно гидролизуют добавлением кислот при нагревании.

При выделении алкалоидов, имеющих сложноэфирную группировку (атропин, гиосциамин, скополамин и др.) используют аммиак, т.к. более сильные щелочи могут вызвать разложение алкалоидов. Нельзя использовать щелочи и при выделении алкалоидов из семян, содержащих жирные масла, вследствие их омыления и образования эмульсий.

Метод 1. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 25% раствора натрия гидроксида, перемешивают стеклянной палочкой до получения увлажненной массы и оставляют при комнатной температуре на 2 часа. Затем прибавляют 50 мл хлороформа, осторожно перемешивают и оставляют на 30 минут.

Не взмучивая раствора, пипеткой отбирают 15 мл извлечения в делительную воронку вместимостью 100 мл и трижды извлекают алкалоиды 2% раствором кислоты серной порциями 20, 10 и 10 мл до отрицательной реакции с кремневольфрамовой кислотой.

Объединенные кислотные извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки 2% раствором кислоты серной и измеряют оптическую плотность при длине волны 420 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 2% раствор кислоты серной.

Содержание алкалоидов в пересчете на берберина бисульфат в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{50 \cdot 50 \cdot D \cdot 100 \cdot [100]}{15 \cdot 128 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где 50 - объем хлороформного извлечения, в миллилитрах; 50 - объем сернокислотного извлечения, в мл; 15 - объем хлороформного извлечения, взятого для анализа, в мл; D – оптическая плотность сернокислотного извлечения при λ_{max} 420 нм; 128 – удельный

показатель поглощения берберина бисульфата при λ_{\max} 420 нм; W - потеря в массе при высушивании сырья в %; m - масса навески сырья, в г.;

* *Возможно использование других СО и других длин волн, например: 646 – удельный показатель поглощения берберина бисульфата при λ_{\max} 345 нм; 434 – удельный показатель поглощения цитизина при λ_{\max} 311 нм (если алкалоиды анализируемого растения содержат или близки по структуре цитизину).*

Метод 2. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья или порошка растертых таблеток помещают в коническую колбу, прибавляют 10 мл 2% раствора кислоты лимонной и 30 мл хлороформа, выдерживают при перемешивании в течение 1 часа. Хлороформный слой сливают в делительную воронку, а сырье еще раз экстрагируют хлороформом в тех же условиях.

Хлороформные извлечения объединяют, обрабатывают 10 мл 1% раствора натрия гидрокарбоната, фильтруют через слой безводного натрия сульфата в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки хлороформом и перемешивают.

20 мл полученного хлороформного извлечения помещают в колбу, хлороформ отгоняют досуха при температуре около 40°C.

Сухой остаток переносят 4 мл спирта этилового 95% в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл раствора 0.25М кислоты серной, 2 мл свежеприготовленного 0.3% раствора натрия нитрита, выдерживают 30 минут при температуре водяной бани 55±5°C.

Раствор охлаждают, добавляют 1 мл свежеприготовленного 5% раствора кислоты сульфаминовой, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 95% и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 390 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор из 2 мл 0.25М раствора кислоты серной, 1 мл 5% раствора кислоты сульфаминовой в мерной колбе вместимостью 25 мл с доведенным до метки объемом спиртом этиловым 95%.

Содержание алкалоидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на резерпин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot (b) \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot [100]}{402 \cdot m \cdot 20 \cdot [(100 - W)]}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 390 нм; m - масса навески сырья, в г.; (b) – средняя масса препарата (таблетки, драже, капсулы...), в г.; 402 – удельный показатель поглощения резерпина при λ_{\max} 390 нм; W - потеря в массе при высушивании сырья в %.

Примечания. Приготовление 2% раствора кислоты лимонной. 2 г кислоты лимонной растворяют в воде очищенной в мерной колбе на 100 мл, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Раствор годен в течение 6 месяцев.

Приготовление 1% раствора натрия гидрокарбоната. 1 г натрия гидрокарбоната растворяют в воде очищенной в мерной колбе на 100 мл, доводят объем до метки водой очищенной и перемешивают. Раствор годен в течение месяца.

Приготовление 0.3% раствора натрия нитрита. 0.3 г натрия нитрита растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают.

Приготовление 5% раствора кислоты сульфаминовой. 5 г кислоты сульфаминовой растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем до метки водой очищенной и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление 0.25М раствора кислоты серной. 50 мл 0.5М раствора кислоты серной помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Раствор годен в течение 6 месяцев.

Метод 3. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл хлороформа или этилацетата, 5 мл раствора аммиака, выдерживают с обратным холодильником при перемешивании в течение 1 часа, затем при нагревании на водяной бане при температуре 50-60⁰С в течение 2 часов. Охлаждают, фильтруют и трижды экстрагируют алкалоиды 1% раствором кислоты хлороводородной порциями по 20, 15 и 10 мл.

Кислотные извлечения объединяют, подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и алкалоиды извлекают хлороформом порциями по 20, 15 и 10 мл до отрицательной реакции с реактивом Майера или раствором кислоты кремневольфрамовой. Объединенные хлороформные извлечения фильтруют через слой прокаленного натрия сульфата и отгоняют досуха на водяной бане. (*)

Сухой остаток растворяют при нагревании на водяной бане в 15 мл 0.02М раствора кислоты хлороводородной, прибавляют 2 капли метиленового красного, 1 каплю метиленового синего и избыток кислоты хлороводородной оттитровывают 0.02М раствором натрия гидроксида до появления зеленой окраски. (**)

Содержание алкалоидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на гиосциамин в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(15 - V) \cdot 0.00578 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где V - объем 0.02М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование, в мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья в %; 0.00578 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 мл 0.02М раствора кислоты хлороводородной в г.;

* Методику можно видоизменить: на отмеченной стадии сухой остаток высушивают до постоянного веса и рассчитывают содержание суммы алкалоидов весовым методом от взятой навески с учетом влажности сырья.

** Можно использовать другие СО и, соответственно, использовать другие коэффициенты пересчета, например: 0.0122 – количество суммы алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0.05М раствора кислоты хлороводородной в граммах; 0.0244 – количество алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0.1н раствора кислоты хлороводородной в граммах.

*** Сухой остаток растворяют в 10 мл кислоты уксусной, прибавляют 2 капли раствора кристаллического фиолетового и титруют 0.02М раствором кислоты перхлорной до изменения окраски на голубую, если в сырье присутствуют алкалоиды типа цитизина, соласодина. 4.09 – количество алкалоидов в пересчете на метилцитизин, соответствующее 1 мл 0.02М раствора кислоты перхлорной, в мг. 0.04137 – количество алкалоидов в пересчете на соласодин, соответствующее 1 мл 0.1М раствора кислоты хлороводородной, в мг.

Метод 4. (при наличии СО любых алкалоидов). Точную навеску сырья или 5 мл испытуемого раствора (препарата, извлечения или элюата) помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют 20 мл спирта этилового 95%, перемешивают в течение 15 минут, доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки, перемешивают.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора СО хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях, например:

- колонка 150x4.6 мм, сорбент Зорбакс, размер частиц 5 мкм или аналогичная;
- подвижная фаза: ацетонитрил – 0.1М раствор аммония карбоната (55:45), дегазированная любым способом;
- скорость потока – 1 мл/мин;

- температура колонки 45⁰С;
 - детектирование при длине волны 225 нм.
- Содержание алкалоидов в мг вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot P \cdot [100]}{S_0 \cdot m \cdot 5 \cdot [(100 - W)]}$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков анализируемого раствора соответствующих алкалоидам; S_0 – среднее значение площадей пиков СО алкалоида; m_0 – масса навески СО алкалоида, в мг; m – масса навески сырья, в мг; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; P – содержание алкалоида в СО алкалоида, в %.

Примечание. Приготовление 0.1М раствора аммония карбоната. 7.8 г аммония карбоната помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 700 мл воды очищенной, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают.

Метод 5. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в аппарат Сокслета или в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 10 мл 8% раствора аммония гидроксида, 50 мл хлороформа и экстрагируют на кипящей водяной бане в течение 3 часов. Хлороформ отгоняют до объема 10-15 мл и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем хлороформом до метки и перемешивают (раствор А).

На хроматографическую пластинку наносят 0.2 мл полученного раствора в виде полосы 4 см. На расстоянии 2 см от испытуемого раствора в качестве свидетеля наносят 0.005 мл 1% раствора СО, например колхамин, пластинку подсушивают на воздухе. Затем помещают в камеру и хроматографируют в системе растворителей хлороформ – спирт метиловый (24:1) восходящим способом.

Хроматограмму просматривают в УФ-свете, отмечая пятно СО и пятно, совпадающее по положению и цвету в анализируемом растворе. Вырезают пятна СО, испытуемого раствора и пустого слоя, помещают в стаканы, элюируют 15% раствором кислоты хлороводородной, отфильтровывают в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем элюатов доводят тем же раствором до метки и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 364 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО при той же длине волны.

Содержание алкалоидов в сырье, в пересчете на СО в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot P \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot V_2 \cdot [(100 - W)]}$$

где V_1 - объем хлороформного извлечения А, в мл; V_2 - объем извлечения А, нанесенного на пластинку, в мл; V_3 - объем раствора Б, в мл; D_1 – оптическая плотность раствора СО при λ_{\max} 364 нм; D_0 – оптическая плотность раствора Б при λ_{\max} 364 нм; m - масса навески сырья, в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах; P – содержание алкалоида в 1 мл раствора СО, в граммах.

* - если СО – колхамин, $P=0.00002$ при λ_{\max} 364 нм.

Количественный анализ **гликоалкалоидов** осуществляют методами титрования кислотой хлороводородной, потенциометрией, весовым и колориметрическим методами. Ниже приведены наиболее воспроизводимые методики анализов.

Метод 1. Около 3 г сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 5% раствора кислоты уксусной, нагревают при перемешивании на кипящей водяной бане в течение 4 часов, охлаждают и фильтруют.

20 мл фильтрата помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 6 мл 25% раствора аммиака, нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов, быстро охлаждают льдом. При этом сумма гликоалкалоидов осаждается. Осадок отфильтровывают, высушивают на воздухе. Фильтр с осадком гликоалкалоидов помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 95% и экстрагируют при нагревании на водяной бане с обратным холодильником 30-40 минут. Экстрагирование повторяют до отрицательной реакции с раствором формальдегида в кислоте серной или с йодом. Спиртовые извлечения отгоняют досуха.

К сухому остатку прибавляют 5-10 мл 1% раствора кислоты уксусной и растворяют гликоалкалоиды при слабом нагревании на водяной бане.

К уксуснокислому раствору гликоалкалоидов прибавляют 5-10 мл 25% раствора аммиака, нагревают до 60-65⁰С, затем охлаждают на льду. Выпавшие гликоалкалоиды отфильтровывают через предварительно высушенный фильтр, промывают 1% раствором аммиака до обесцвечивания фильтрата, высушивают в сушильном шкафу при температуре 80-90⁰С до постоянной массы и взвешивают.

Метод 2. Полученный сухой остаток суммы гликоалкалоидов растворяют в 100 мл спирта этилового 95% при нагревании на водяной бане в течение 30-40 минут. При наличии значительного количества гликоалкалоидов экстракцию спиртом повторяют еще 2-3 раза.

Полноту извлечения гликоалкалоидов определяют по отсутствию окрашивания с парами йода или раствором формальдегида в кислоте серной.

Спиртовые извлечения отгоняют досуха, сухой остаток промывают 1% раствором аммиака до его обесцвечивания, высушивают при температуре 80-90⁰С. Сухой остаток растворяют в 100 мл спирта этилового 95% и титруют потенциометрически 0.1н раствором кислоты хлороводородной.

1 мл 0.1н раствора кислоты хлороводородной соответствует 0.04137 г соласодина.

Содержание гликоалкалоидов в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0.04137 \cdot V_1 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot V_2 \cdot [(100 - W)]}$$

где V - объем 0.1н раствора кислоты хлороводородной, израсходованной на титрование в мл; V₁ - объем 5% раствора кислоты уксусной, пошедшей на экстракцию гликоалкалоидов в мл; V₂ - объем фильтрата, взятый для осаждения гликоалкалоидов аммиаком в мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья в %.

Антраценовые вещества

Выбор метода количественного определения содержания антраценпроизводных определяется природой доминирующих производных антрахинона и сопутствующих веществ.

Чаще всего проводят предварительное расщепление антрагликозидов нагреванием с серной, хлороводородной или уксусной кислотами. Выделившиеся в процессе гидролиза агликоны экстрагируют органическим растворителем и определяют различными методами. Чаще других используется метод Аутерхоффа, который предложил соединить описанные выше две стадии в одной методике, описанной в ГФ Х1 для антраценсодержащего сырья.

Различные модификации этой методики касались использования различных СО и, соответственно, длин волн, при которых проводилось определение оптической плотности.

Поскольку производные антрахинона дают оттенки красного цвета со щелочью, вместо СО антрахинонового типа, которые, как правило, мало доступны, для построения калибровочных графиков используют растворы кобальта хлорида и этот метод включен в фармакопеи многих стран.

Лемли предложил извлекать димерные антрагликозиды из сырья водой при нагревании, затем окислять их железом хлорным и гидролизовать кислотой хлороводородной, полученные агликоны экстрагировать эфиром. Аликвотную часть эфирного извлечения упаривать, остаток растворять в 1н растворе калия гидроксида и измерять оптическую плотность красного раствора.

Бэтс предложил методику раздельного определения свободных антрахинонов, О- и С-гликозидов в американской крушине и фитопрепаратах на ее основе. Свободные антрахиноны отделяют растиранием свежей коры с песком и водой с последующей экстракцией четыреххлористым углеродом. О-гликозиды определяют после кислотного гидролиза и экстракции четыреххлористым углеродом, а С-гликозиды после обработки коры раствором железа хлорного и кислоты с последующей экстракцией четыреххлористым углеродом. 3 полученных органических извлечения обрабатывают растворами 1н натрия гидроксида и определяют оптическую плотность полученных растворов.

Для раздельного определения сеннозидов А и Б в листьях и стручках кассии, для определения каскароза и алоина в американской крушине, для определения сеннозидов и реинидинов в ревене, для разделения антраценов в европейской и американской крушине предложены также хроматографические варианты (ТСХ и колоночный) в различных системах с последующим определением плотности окраски пятен денситометрическим методом. Эти методы удобны для научно-исследовательских работ, но трудоемкие и длительные во времени.

Ниже приведены некоторые примеры хорошо воспроизводимых методик, используемых в ГФ X, XI и некоторых частных статьях.

Метод 1 предполагает извлечение антраценов после гидролиза гликозидов. Около 1.0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл 10% кислоты серной (7.5 мл кислоты уксусной ледяной) и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Охлаждают, через холодильник добавляют 50 мл хлороформа (этилацетата) и кипятят еще в течение 1 часа.

Охлаждают, извлечение фильтруют в делительную воронку, прибавляют 20 мл щелочно-аммиачного раствора, взбалтывают 5-7 минут. После полного расслоения прозрачный красный нижний слой сливают. Обработку повторяют до прекращения окрашивания щелочно-аммиачного слоя.

Измеряют оптическую плотность полученных щелочно-аммиачных извлечений при длине волны 525 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения щелочно-аммиачный раствор.

Содержание производных антрахинона в пересчете на хризофановую кислоту (эмодин, истизин, ализарин, гиперин и др.) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где С - содержание производных антрахинона в 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, в г.; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят по растворам кобальта хлорида, высушенного до постоянной массы, исходя из того, что 1% раствор кобальта хлорида по оптической плотности при длине волны 525 ± 5 нм соответствует 4.3 мг хризофановой кислоты или 3.6 мг истизина в 1 л щелочно-аммиачного раствора.

Приготовление щелочно-аммиачного раствора: 50 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды очищенной. После охлаждения раствора прибавляют 80 мл раствора аммиака концентрированного, перемешивают. Раствор годен в течение суток.

** Вместо щелочно-аммиачного раствора, годность которого ограничена 1 сутками, вследствие летучести аммиака, извлечение антрахинонов возможно 0.5M раствором натрия гидроксида.*

*** Если в сумме антрахинонов преобладает эмодин, калибровочный график строят по растворам эмодина при λ_{\max} 483 нм, если хризофанол – при 515 нм, глюкофрангулин – 475 нм, франгулин – 500 нм.*

Метод 2. Около 0.2 г (точная навеска) препарата (мазь, суппозиторий и др.) растворяют в 10 мл диоксана в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем до метки щелочно-аммиачным раствором, перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем до метки тем же щелочно-аммиачным раствором, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 530 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Далее, как в методе 1.

Содержание производных антрахинона в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot 10 \cdot [(100 - W)]}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 530 ± 5 нм; m - масса навески сырья или препарата, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

** Вследствие малого срока годности щелочно-аммиачного раствора, можно использовать 3-5% водные растворы натрия гидроксида.*

*** Метод пригоден для анализа сырья и фитопрепаратов.*

При наличии в сырье и препаратах димерных форм пригоден **метод 3.** Около 0.2 г (точная навеска) препарата (мази, суппозитории, свечи) в колбе вместимостью 50 мл растворяют в 10 мл ацетона (или спирта) при нагревании на водяной бане при $30-40^{\circ}\text{C}$. Охлаждают, фильтруют в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 590 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения ацетон.

Содержание димерных производных антрахинона в пересчете на гиперицин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot b \cdot 100}{m \cdot 513}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 590 нм; 513 – удельный показатель поглощения гиперицина в ацетоне при λ_{\max} 590 нм; m – масса навески препарата, в г.; b – средняя масса препарата (таблетка, суппозиторий и т.д.).

** 718 - удельный показатель поглощения гиперицина в спирте этиловом при λ_{\max} 590 нм.*

Модификация этой методики для сырья: 1 г (точная навеска) измельченного лекарственного сырья экстрагируют в приборе Сокслета хлороформом до тех пор, пока обратно не начнет стекать бесцветный хлороформ. Жидкость упаривают под вакуумом досуха, остаток растворяют в спирте метиловом, переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. [5 мл этого раствора разбавляют спиртом метиловым до объема 25 мл.] (*)

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 590 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт метиловый.

Содержание гиперицина (X) в процентах определяют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 0.174 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 590 нм; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

** Разбавление проводят при необходимости.*

При наличии в сырье и препаратах димерных гликозидированных форм антрахинонов пригоден **метод 4**. Около 0.3 г (точная навеска) препарата помещают в колбу, прибавляют 20 мл 10% раствора железа окисного хлорида, 0.1 г натрия бикарбоната, 10 мл воды очищенной и кипятят с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Прибавляют 1.5 мл кислоты хлороводородной концентрированной, 10-20 мл воды очищенной и кипятят еще 20-30 минут до прозрачности раствора. Охлаждают, переносят в делительную воронку и экстрагируют 40 мл хлороформа. Хлороформное извлечение упаривают досуха. К остатку прибавляют 25 мл 0.5% раствора магния ацетата, появляется розовое окрашивание, встряхивают до полного растворения и фильтруют.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 515 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Содержание антрагликозидов в процентах (X) в пересчете на СО сеннозида вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 10 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot 25}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 515 нм; 240 – удельный показатель поглощения СО сеннозида при λ_{\max} 515 нм; m – масса навески препарата, в г.

Ниже приведена методика, позволяющая определить содержание компонентов в сумме производных антрахинона.

Метод 5. Точную навеску измельченного сырья (0.5-1.0 г) помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70% и кипятят на водяной бане 1 час. Экстракт декантируют, а экстракцию повторяют еще раз.

Объединенные экстракты концентрируют на роторном испарителе до 2-3 мл (точный объем).

0.2-0.3 мл микропипеткой наносят на линию старта пластинки Силуфол UV₂₅₄ или силикагель LS 5/40 для ТСХ. Высушивают на воздухе, помещают в камеру и хроматографируют в системе толуол(бензол)-этиловый эфир муравьиной кислоты-муравьиная кислота (75:24:1) до половины пластинки. Пластинки вынимают, высушивают на воздухе и хроматографируют в системе петролейный эфир-этилацетат-уксусная кислота 90:5:5 до конца пластинки. (*)

Пятна индивидуальных антрахинонов вместе с силикагелем переносят в стеклянные колонки высотой 6-7 см, диаметром 0.6-1 см или на фильтры Шота. Элюируют антрахиноны с силикагеля спиртом этиловым 95-96%.

Измеряют оптическую плотность элюатов на спектрофотометре при длине волны 430 нм (если в сырье доминируют хризофановая кислота, алоэ-эмодин и реин), 440 нм (если - эмодин и фисцион), 248 нм (если - ализарин).

В качестве раствора сравнения используют спиртовой элюат с чистого слоя силикагеля этой пластинки.

Калибровочные графики для СО антрахинонов строят для спиртовых растворов (96%), концентрации 1 мг/мл.

Содержание индивидуальных антрахинонов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot [100]}{m \cdot V_3 \cdot [(100 - W)] \cdot 1000}$$

где C - содержание антрахинона в 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, в мг; V₁ – объем экстракта, в мл; V₂ – объем элюата, в мл; V₃ – объем экстракта, нанесенный на хроматограмму, в мл; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; m – масса навески сырья в г.

** В системе 1, хризофанол и фисцион не разделяются, хорошо делятся алоэ-эмодин, ализарин, реин, эмодин; в системе 2 – разделяются хризофанол и фисцион.*

*** Содержание антрахинонов в сырье определяют суммированием содержания индивидуальных антрахинонов.*

**** Если в сырье одновременно присутствуют заметные количества гликозидов антрахинонов, проводят гидролиз аликвоты экстракта кислотой серной 10% в течение часа на кипящей водяной бане.*

В препарате «Кофранал» и в коре крушины ломкой содержание антрахинонов определяют по **методике 6**. 0.2-0.3 г препарата (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 200-250 мл, добавляют 100 мл хлороформа, 25 мл 25% кислоты серной, нагревают с обратным холодильником 2.5 часа. Хлороформный слой фильтруют во взвешенную сухую колбу с 2 г безводного натрия сульфата. К остывшей кислой жидкости добавляют 100 мл хлороформа и экстрагируют повторно. Охлаждают и фильтруют в ту же колбу через слой осушителя.

Хлороформные извлечения упаривают досуха, остаток сушат при 80°C до постоянного веса, добавляют 20 мл ДМФА, количественно переносят в сосуд для потенциометрического титрования, добавляют 10 мл криоскопического бензола и титруют 0.1н раствором натрия гидроксида в смеси бензол/метанол 4:1.

Электродная система: катоднополяризованный платиновый / насыщенный водный каломельный электроды.

Расчет содержания антрахинонов проводят по разнице между количеством мл 0.1н раствора натрия гидроксида, соответствующих второму и первому скачку потенциалов.

1 мл 0.1н раствора натрия гидроксида = 0.0270 г эмодина.

** Содержание антрахинонов можно определять методом потенциометрического титрования в растворе диметилформамида в присутствии тимолового синего, если 1 мл экстракта сырья нанести полосой на пластину силикагеля и хроматографировать в любой подходящей системе растворителей. Затем каждое пятно отдельно переносят в колбы, добавляют 25 мл ДМФА, нейтрализованного по тимоловому синему и проводят потенциометрическое титрование, как описано выше.*

*** Если состав экстрактов анализируют методом БХ, то содержание каждого компонента можно оценить по плотности окраски (с проявителем и без) методом денситометрии (если проявитель 10% NaOH, светофильтр 510 нм, если щелочно-аммиачный раствор – 525-540 нм).*

Различные варианты методик описаны в монографии «Природные антрахиноны. Биологические свойства и физико-химические характеристики», Москва, 1998.

Гликозиды

Сапонины

Метод 1. Около 2 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл 3% ацетонового раствора кислоты азотной и настаивают в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Извлечение отфильтровывают в цилиндр вместимостью 100 мл. В колбу с сырьем приливают еще 20 мл ацетона, которым

одновременно смывают порошок с фильтра, и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. Аналогичную экстракцию горячим ацетоном повторяют еще 2 раза. Объединенные извлечения отфильтровывают через тот же фильтр в тот же цилиндр. Жидкость из цилиндра выливают в стакан вместимостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 10 мл спирта этилового, который затем выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном помешивании добавляют концентрированный раствор аммиака до появления обильного светло-желтого творожистого осадка (рН 8.3-8.6 устанавливают по порозовению влажной фенолфталеиновой бумаги).

Осадок отделяют на воронке Бюхнера, стакан и фильтр с осадком промывают 30 мл ацетона в 2-3 приема. Осадок с фильтром переносят в стакан, в котором проводилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды очищенной.

Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывают небольшими порциями воды очищенной, присоединяя их к основному раствору. Доводят объем раствора водой очищенной до метки.

[30 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.] *

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектро-фотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Содержание сапонинов в абсолютно сухом сырье, в пересчете на кислоту глицирризиновую в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 822 \cdot 100 \cdot [100] \cdot 100 \cdot [100]}{11000 \cdot m \cdot [30] \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 258 нм; 11000 – удельный показатель поглощения раствора кислоты глицирризиновой при λ_{\max} 258 нм; 822 – молекулярная масса кислоты глицирризиновой; m – масса навески сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

* При необходимости испытуемый раствор разбавляют.

Метод 2. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 95%, нагревают и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 часа с момента закипания растворителя. Затем охлаждают, фильтруют.

10 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводят до метки спиртом этиловым 95%, перемешивают.

5 мл раствора переносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 5 мл 1% п-диметиламинобензальдегида в 4М спиртовом растворе кислоты хлороводородной.

Пробирку закрывают пробкой и нагревают в ультратермостате при температуре $58 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в течение 2 часов. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл рабочего раствора и 5 мл 4М спиртового раствора кислоты хлороводородной. Смесь выдерживают в термостате при $58 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Содержание фурастаноловых гликозидов в абсолютно сухом сырье (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 0.0101 \cdot 50 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot 10 \cdot [(100 - W)]}$$

где C – количество CoCl_2 найденное по калибровочному графику, в г.; 0.0101 – коэффициент пересчета концентрации CoCl_2 ; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Построение калибровочного графика по растворам CoCl_2 . 0.1 г CoCl_2 , высушенного при температуре 130-135⁰С растворяют в 10 мл воды очищенной и готовят 5 растворов методом разбавления.

Гликозиды тритерпеновые

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70% и нагревают с обратным холодильником в течение 2 часов. Затем извлечение охлаждают, отфильтровывают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают.

[Около 0.1 г субстанции препарата растворяют в 100 мл спирта этилового 95%]. (*)

10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем спиртом этиловым 70% до метки.

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2 мл рабочего раствора, 5 мл свежеприготовленного 0.7% раствора ванилина в кислоте серной 65%, выдерживают в термостате 1 час при 60⁰С. Содержимое колбы охлаждают в ледяной воде в течение 10 минут.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектро-фотометре при длине волны 560 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения прогретый в течение 1 ч раствор ванилина.

Содержание тритерпеновых гликозидов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) определяют в пересчете на СО дазиантозида А или другого сапонина по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 10 \cdot 100 \cdot [100]}{E \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{max} 560 нм; $E=200$ – удельное поглощение раствора дазиантозида А с ванилином и кислотой серной при λ_{max} 560 нм; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %; m – масса навески сырья, в г.

** При низком содержании тритерпеновых гликозидов увеличивают навеску сырья или субстанции.*

Методика определения суммы тритерпеновых гликозидов в субстанции из астрагала. Около 0.1 г субстанции растворяют в 100 мл спирта этилового 96%. [10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят спиртом этиловым 96% до метки]. Готовят спиртовой раствор с содержанием дазиантозида А 0.1 мг/мл. В 3 колбы вместимостью 10 мл помещают по 2 мл рабочего раствора, а в 2 колбы - по 2 мл раствора дазиантозида А и упаривают досуха в сушильном шкафу при 100⁰С. В каждую из колб добавляют по 5 мл свежеприготовленного 0.7% раствора ванилина в кислоте серной 65% и выдерживают в термостате 1 ч при 60⁰С. Содержимое колб охлаждают в ледяной воде в течение 10 мин. В качестве раствора сравнения используют прогретый в течение 1 ч раствор ванилина.

Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 560 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы тритерпеновых гликозидов определяют в пересчете на дазиантозид А путем сравнения оптических плотностей и навесок с учетом потерь в массе при высушивании.

β-ситостерол. Точную навеску сырья (около 2 г) экстрагируют в аппарате Сокслета 50 мл неполярного растворителя в течение 2-3 часов, фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. [навеску препарата растворяют в н-гексане](*). Доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают на ультразвуковой бане в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют (испытуемый раствор).

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора СО β-ситостерола попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ - детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях:

- колонка [250x2.6 мм], заполненная сорбентом Силика А, с размером частиц 5 мкм, или аналогичная;
- подвижная фаза: н-гексан - 2-пропанол - спирт метиловый (96:3.5:0.5), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин;
- детектирование при длине волны 210 нм.

Содержание β-ситостерола (X) в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 1 \cdot 100 \cdot b}{S_0 \cdot m_1 \cdot 20 \cdot 10 \cdot 100}$$

где S_1 - среднее значение площадей пиков β-ситостерола, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора; S_0 - среднее значение площадей пиков β-ситостерола, вычисленное из хроматограмм раствора СО β-ситостерола; m_0 - масса навески СО β-ситостерола, в мг; m_1 - масса навески препарата, в мг; b - средняя масса содержимого капсулы, в мг; P - содержание β-ситостерола в СО β-ситостерола, в %.

Примечания. Приготовление раствора СО β-ситостерола. Около 20.0 мг (точная навеска) β-ситостерола помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в н-гексане, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

1.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора н-гексаном до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади и времени выхода пика β-ситостерола на хроматограммах раствора СО β-ситостерола должно быть не более 2.0% (ГФ XI, вып. 1, с. 199);

Гликозиды сердечные

Метод 1. 10 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют спирт этиловый 96% и доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают.

К 5 мл полученного раствора прибавляют 4 мл спирта этилового 96%, 5 мл раствора натрия пикрата, на 15 минут оставляют в темном месте, после этого измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 495 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 5 мл спирта этилового 96% и 5 мл раствора натрия пикрата.

Параллельно измеряют плотность раствора СО коргликона.

Содержание гликозидов (X) в 1 мл препарата в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{D_0 \cdot 10 \cdot 5}$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 495 нм; D_0 – оптическая плотность раствора СО коргликона при λ_{\max} 495 нм; m_0 – масса навески СО коргликона, в г.; P – содержание суммы гликозидов в СО коргликона, в %.

Примечания. Приготовление раствора СО коргликона. 0.0298 г коргликона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте этиловом 96%, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают.

К 1 мл полученного раствора прибавляют 4 мл спирта этилового 96%, 5 мл раствора натрия пикрата и на 15 минут оставляют в темном месте.

Приготовление раствора натрия пикрата. 1 г кислоты пикриновой помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл воды очищенной, 5 мл 10% раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Метод 2. К 0.5 г (точная навеска) препарата без оболочки в круглодонной колбе на 100 мл добавляют 50 мл спирта этилового 50%, нагревают с обратным холодильником 30 минут. Горячий экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр, (*) дважды промывают 5 мл спирта. Маточник упаривают досуха на ротаторном испарителе, затем количественно переносят остаток спиртом этиловым 50% в мерную колбу на 100 мл, доводят объем до метки тем же растворителем (*).

К 5 мл полученного раствора в мерной колбе на 10 мл добавляют 2 мл раствора динитробензойной кислоты, 2 мл 2% раствора натрия гидроксида и доводят до метки спиртом этиловым 50%.

В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл спирта этилового 50%, 2 мл раствора динитробензойной кислоты и 2 мл 2% раствора натрия гидроксида в мерной колбе на 10 мл, доводя объем раствора до метки спиртом этиловым 50%.

Измеряют оптическую плотность обоих растворов в течение 10 минут с 0.5 минутным интервалом при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве контрольного раствора спирт этиловый 50%.

Содержание гликозидов в мг/г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 1000 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 10}{40.42 \cdot m \cdot 100 \cdot 10 \cdot 5}$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора, при λ_{\max} 540 нм; D_2 – оптическая плотность раствора сравнения, при λ_{\max} 540 нм; 40.42 – удельное поглощение 1% раствора СО дигитоксина или узарина в смеси с реактивом Кедде (2 мл раствора динитробензойной кислоты, 2 мл 2% раствора натрия гидроксида) и доведением объема до 10 мл спиртом этиловым 50%; m – масса навески препарата, в мг.

Методика может быть использована для растительного сырья и субстанций. Коэффициент корреляции дигитоксина – 0.9962, узарина – 0.9957.

** При низком содержании гликозидов, горячий экстракт фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем тем же растворителем до метки. Далее по тексту.*

*** Описано много других методов количественного анализа сердечных гликозидов, предполагающих использование СО для построения калибровочных графиков, хроматоспектрографические методы в сравнении и денситометрические со стандартными образцами.*

Феноловые гликозиды

Феноловые гликозиды наиболее многообразны, что связано с природой агликонов. Ниже приведена методика определения арбутина в сырье.

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной, кипятят в течение 1 часа, фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Извлечение повторяют 30 мл воды очищенной в течение 30

мин, фильтруют в ту же мерную колбу, добавляют 10 мл раствора свинца ацетата, перемешивают, охлаждают, доводят объем раствора до метки водой очищенной.

Колбу нагревают на кипящей водяной бане до полного осаждения, фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 150-200 мл, добавляют 2 мл кислоты серной концентрированной и кипятят с обратным холодильником в течение 1.5-2 часов. Охлаждают, фильтруют в колбу вместимостью 200-250 мл, добавляют 0.2 г цинковой пыли, перемешивают в течение 10 минут.

Жидкость нейтрализуют по лакмусовой бумаге раствором натрия гидрокарбоната, добавляют еще 2 г натрия гидрокарбоната и после его растворения фильтруют в сухую колбу.

К 50 мл фильтрата прибавляют 200 мл воды очищенной и быстро титруют 0.1н раствором йода до синего окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. (индикатор - крахмал). 1 мл 0.1н раствора йода соответствует 0.01361 г арбутина.

Содержание феноловых гликозидов в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0.01361 \cdot 2 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где V - объем 0.1н раствора йода, израсходованного на титрование, в мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Флороглюциды

Около 10 г измельченного сырья (точная навеска) экстрагируют в аппарате Сокслета этиловым эфиром (или хлороформом, петролейным эфиром) до тех пор, пока экстрагент не будет стекать бесцветным.

Извлечение фильтруют, концентрируют до объема около 20 мл и экстрагируют равным объемом насыщенного раствора бария гидроксида в течение 5 мин. После разделения слоев, водный слой отделяют в делительной воронке, фильтруют, прибавляют 4 мл кислоты хлороводородной концентрированной и экстрагируют эфиром (петролейным эфиром, хлороформом) 3 раза по 10 мл. Органические экстракты объединяют, фильтруют во взвешенную колбу через слой безводного натрия сульфата, отгоняют на водяной бане досуха. Остаток в колбе высушивают в течение 1 часа при температуре 100-105⁰С.

Содержание флороглюцидов (филицина) в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где C – количество сырого остатка флороглюцидов (филицина), полученного после отгонки растворителя, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %; m – масса навески сырья, в г.

Дубильные вещества

Перманганатометрическое титрование по ГФ Х1 дает завышенные результаты за счет окисления всех ненасыщенных сопутствующих веществ (каротиноиды, коричные и оксикислоты, спирты, альдегиды, фенолы и т.д.).

Различия в химической природе дубильных веществ учтены в методике, описанной Н.И.Гринкевич, где введены коэффициенты пересчета на гидролизуемые и на конденсированные дубильные вещества.

Более точные результаты могут быть получены после разделения дубильных и сопутствующих веществ.

Метод 1. Около 3 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл горячей воды и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Водное извлечение декантируют, к сырью в колбе прибавляют еще 50 мл горячей воды и повторно экстрагируют сырье, как указано выше.

Объединенные извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

10 мл полученного раствора переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл, добавляют 100 мл воды очищенной, 10 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании 0.02М раствором калия перманганата до появления золотисто-желтого окрашивания. Параллельно титруют 10 мл индигосульфокислоты в 100 мл воды очищенной.

1 мл 0.02М раствора калия перманганата соответствует 0.004157 г гидролизуемых дубильных веществ или 0.00582 г конденсированных дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание дубильных веществ (X) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot D \cdot V \cdot 100 \cdot [100]}{V_3 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где V_1 - объем 0.02М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование экстракта, в мл; V_2 - объем 0.02М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование в контрольном опыте, в мл; V_3 - объем экстракта, взятого на титрование, в мл; V - объем экстракта, в мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; D - коэффициент пересчета на соответствующие дубильные вещества.

Примечания. Приготовление 0.02М раствора калия перманганата. 3.3 г калия перманганата помещают в колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора до 1 литра, кипятят в течение 10 мин, закрывают пробкой, оставляют на 2 суток в темном месте.

Приготовление раствора индигосульфокислоты. 1 г индигокармина растворяют в 25 мл кислоты серной концентрированной и осторожно доводят объем раствора водой очищенной до 1 л.

** В научной литературе описаны гравиметрический, фотоколориметрический, спектрофотометрический, титрометрический и другие методы, основанные на способности дубильных веществ к комплексо- или хелато-образованию, к осаждению солями железа, свинца, реактивом Фолина-Дениса, фосфорновольфрамовой кислотой, нефелометрический, хромато-спектрофотометрический и другие методы.*

Метод 2. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 30% и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа, охлаждают. Извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Повторяют процесс экстракции еще 2 раза с использованием 30 и 20 мл спирта, извлечения фильтруют в ту же колбу и доводят объем раствора спиртом этиловым 30% до метки. (*)

20 мл полученного раствора наливают в пробирку для центрифугирования, прибавляют 20 мл реактива осаждения, перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 минут смесь центрифугируют в течение 10 минут с частотой вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 20 мл 0.25% раствора аммиака. Перемешивают той же палочкой и снова центрифугируют в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, осадок в пробирке растворяют в 5 мл 30% раствора кислоты уксусной и переносят количественно в колбу на 250 мл с помощью 70-100 мл воды очищенной.

Полученный раствор нейтрализуют 25 мл 5% раствора натрия гидрокарбоната, прибавляют 0.5 мл ксиленового оранжевого и титруют 0.01М раствором трилона Б до изменения красновато-фиолетовой окраски раствора в желтую.

1 мл 0.01М раствора трилона Б соответствует 0.0013 г танина.

Содержание дубильных веществ, в пересчете на абсолютно сухое сырье, в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{K \cdot V \cdot 0.0013 \cdot 100 \cdot 100 \cdot [100]}{20 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где V - объем трилона Б, израсходованный на титрование, в мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; K – поправка к титру 0.01М раствора трилона Б (динатриевой соли кислоты этилендиамина тетрауксусной).

** При анализе препаратов точную навеску (около 0.2 г) растворяют в спирте этиловом 30% в мерной колбе на 100 мл, доводят объем до метки тем же растворителем. Далее по тексту.*

Примечания. Приготовление реактива осаждения. 1 г цинка оксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в смеси 10 мл 25% водного аммиака и 2.5 г аммония хлорида, доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Приготовление 0.01М раствора трилона Б. 3.9 г трилона Б растворяют в 250 мл воды очищенной, фильтруют в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Установление титра 0.01М раствора трилона Б. 5 мл 0.01М раствора цинка помещают в колбу вместимостью 150-200 мл, прибавляют 100 мл воды очищенной, 0.5 мл ксиленового оранжевого и нейтрализуют по каплям 5% раствором натрия гидрокарбоната до появления красно-фиолетового окрашивания. Затем прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора (pH=5.5) и титруют 0.01М раствором трилона Б до изменения цвета раствора в желтый.

$$K = \frac{5 \cdot T}{0.0006538 \cdot 500 \cdot V}$$

где T – масса навески цинка, в граммах; V – объем 0.01М раствора трилона Б, пошедшего на титрование в миллилитрах.

Приготовление раствора цинка. Около 0.3 г (точная навеска) металлического цинка растворяют в 5 мл 16% кислоты серной в мерной колбе вместимостью 500 мл, объем доводят до метки водой очищенной.

Приготовление ацетатного буфера pH=5.5. 6 г натрия ацетата растворяют в 25 мл воды очищенной, прибавляют 1 мл 30% раствора кислоты уксусной, доводят объем до 100 мл водой очищенной и перемешивают.

Определение содержания дубильных веществ железометодом основано на реакции комплексообразования с железометодом в присутствии фосфатного буфера pH=8. Методика универсальна, т.к. комплексообразование характерно для любых дубильных веществ. Однако, результат может быть частично завышен за счет возможного присутствия фенолов и фенолокислот, но только тех, которые способны к комплексообразованию.

Метод 3. Около 1 г измельченного и просеянного сырья (точная навеска) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 150-200 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 30%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически смывая частицы сырья со стенок встряхиванием. Затем смесь отстаивают, охлаждая до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу

вместимостью 200 мл. Извлечение повторяют еще раз указанным способом, отфильтровывая в ту же мерную колбу.

После охлаждения полученного извлечения, объем в колбе доводят до метки спиртом этиловым 30%.

Из мерной колбы отбирают аликвоты, согласно стандартного графика и анализируют по методике построения стандартной кривой.

** Извлечение пригодно и для второго метода, комплексонометрического титрования с трилоном Б.*

*** Методика пригодна и для анализа препаратов, содержащих дубильные вещества любого типа, тогда количество анализируемого препарата может быть около 0.1-0.2 г, а количество спирта этилового - 100 мл.*

Примечания. Приготовление железо-тарtratного реактива: 1.25 г сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый) и 0.25 г железа сернокислого закисного б/в растворяют в 250 мл воды очищенной.

Приготовление фосфатного буфера pH=8. Смешивают 3.1 мл раствора А (9.073 г KH_2PO_4 в 1 л воды очищенной) с 96.9 мл раствора Б (11.866 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды очищенной).

Построение стандартной кривой. В качестве стандартного дубильного вещества можно использовать танин, пирокатехин, пирогаллол или другое чистое дубильное вещество из растения.

Около 0.2 г дубильного вещества (точная навеска) помещают в колбу на 100 мл и растворяют в воде очищенной или спирте этиловом 30% и доводят до метки тем же растворителем. В мерные колбы вместимостью 25 мл отбирают пробы: 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 и 1 мл исходного раствора, затем в каждую колбу добавляют по 3 мл железо-тарtratного реактива и по 3 мл фосфатного буфера pH=8. Раствор доводят до метки водой очищенной или спиртом этиловым 30% и через 10 минут измеряют оптическую плотность каждого раствора на фотоколориметре в кювете 10 мм, светофильтр №5.

Раствор сравнения - 3 мл железо-тарtratного реактива, 3 мл фосфатного буфера довести до метки в колбе на 25 мл водой очищенной или спиртом этиловым 30%. По результатам измерения оптической плотности 5-ти растворов строят стандартный калибровочный график.

Сумму конденсированных дубильных веществ в комплексном фитопрепарате «Алхидин» и в траве верблюжьей колючки предложено определять спектрофотометрическим методом.

Метод 4. Точную навеску фитопрепарата помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл 6% раствора кислоты хлороводородной в спирте этиловом 96%, нагревают на водяной бане при температуре 70°C в течение 20 минут.

[Точную навеску сырья заливают спиртом этиловым 96%, нагревают 2 раза по 2 часа на кипящей водяной бане, извлечение фильтруют.] (*)

Горячий раствор количественно переносят с помощью 6% раствора кислоты хлороводородной в спирте этиловом 96% в мерную колбу вместимостью 100 мл. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора в колбе тем же растворителем до метки и перемешивают.

* 1 мл полученного раствора разбавляют спиртом этиловым 96% до 10 мл (при необходимости!).

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 96%.

Содержание полифлаванов в препарате (X_1) или в сырье (X_2) в % вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{V \cdot 1 \cdot 1000}$$

$$X_2 = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где С – концентрация полифлаванов, найденная по калибровочному графику, построенному по спиртовым растворам 0.05 г цианокобаламина при λ_{max} 550 нм, в мг/мл; V - объем анализируемого препарата, в мл; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; m - масса навески сырья, в г.

Гравиметрический метод определения содержания дубильных веществ основан на количественном осаждении последних желатиной, ионами тяжелых металлов или адсорбцией на гольевом порошке (весовой единый метод ВЕМ).

Метод 5. Точную навеску экстракта (сухого 1-2 г, жидкого 3-5 г, субстанции, настойки) помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной, 30 мл 10% раствора меди ацетата, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30-40 минут до полного осаждения дубильных веществ. Охлаждают, фильтруют через точно взвешенный фильтр. Осадок на фильтре промывают водой очищенной до отрицательной реакции на медь с раствором желтой кровяной соли и сушат до постоянного веса при температуре 100-105⁰С.

Фильтр с осадком сжигают, зольный остаток смачивают кислотой азотной и прокаливают до постоянного веса.

Содержание дубильных веществ в навеске определяют по разнице между весом танната меди после высушивания фильтра с осадком и весом меди оксида после прокаливания.

Иридоиды

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в мерную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 50% и настаивают, периодически помешивая при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр, и доводят объем извлечения спиртом этиловым 50% до метки.

10 мл полученного раствора пропускают через стеклянную колонку диаметром 10 мм с 2 г алюминия оксида для хроматографии второй степени активности. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл элюата, прибавляют 5 мл 10% раствора гидроксилamina основного и оставляют на 20 минут. Через 20 мин прибавляют 10 мл 1М кислоты хлороводородной, доводят объем раствора до метки 1% раствором железа окисного хлорида в 0.1М кислоте хлороводородной, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 512 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, приготовленную в колбе вместимостью 25 мл: к 5 мл воды очищенной прибавляют 5 мл раствора кислоты хлороводородной, доводят объем раствора 1% раствором железа окисного хлорида в 0.1 М кислоте хлороводородной до метки и перемешивают.

Содержание иридоидов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 100 \cdot [100]}{E \cdot m \cdot 10 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 512 нм; E - удельный показатель поглощения СО иридоида при λ_{\max} 512 нм; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Растворы, используемые при проведении анализа, должны быть свежеприготовленными.

Приготовление 1% раствора железа окисного хлорида в 0.1М кислоте хлороводородной. 1 г железа окисного хлорида растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 30 мл 0.1М кислоты хлороводородной, доводят объем раствора этой кислотой до метки, перемешивают. Раствор устойчив в течение недели.

** Методика пригодна для анализа лекарственного растительного сырья и для анализа препаратов.*

*** Возможно использование любого доступного СО иридоида. Например, если СО неонифлорин, $E = 16.2$, если СО гарпагида ацетат $E = 56$.*

Каротиноиды

Как отмечалось выше, в извлекаемой сумме каротиноидов, как правило, преобладает β -изомер, поэтому в описанных методах количественного определения расчет содержания ведут с пересчетом на доминирующий изомер.

Метод 1. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, приливают 50 мл смеси гексан – спирт этиловый 96% (1:1), выдерживают в течение 2 часов при постоянном перемешивании, фильтруют.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 15 мл фильтрата и доводят объем до метки смесью гексан – спирт этиловый 96% (1:1).

[Около 1 г (точная навеска) препарата растворяют в смеси указанных растворителей в мерной колбе на 50 мл, доводят объем раствора до метки той же смесью, перемешивают].
(*)

Измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения смесь гексан – спирт этиловый 96% (1:1). Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО калия бихромата.

Содержание каротиноидов в пересчете на β -каротин в мг% (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot 0.00208 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot 15 \cdot [(100 - W)]}$$

где D_1 – оптическая плотность исследуемого раствора при λ_{\max} 450 нм; D_0 - оптическая плотность раствора СО калия бихромата при λ_{\max} 450 нм; 0.00208 – количество β -каротина в мг, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечание. Приготовление раствора (СО) калия бихромата. 0.0036 г (точная навеска) СО калия бихромата растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. По окраске раствор соответствует раствору, содержащему 0.00208 мг β -каротина в 1 мл.

** Методика пригодна и для анализа препаратов.*

Метод 2. Около 0.5 г препарата (плоды, цветки, масла, суппозитории) (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл смеси гексан – спирт этиловый 96% (1:1), растворяют при перемешивании, фильтруют. (Для растворения

также можно использовать смесь гексана со спиртом этиловым 96% (3:1), гексан, хлороформ, спирт этиловый 96%, петролейный эфир) (*).

Содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора соответствующим растворителем или смесью до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения смесь гексан – спирт этиловый 96% (1:1) или другой растворитель.

Содержание каротиноидов в препарате, в пересчете на β-каротин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot [100]}{E \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора при λ_{\max} 450 нм; m – масса навески препарата, в г.; W – потеря в массе при высушивании, в %; E=2550 – удельный показатель поглощения β-каротина в смеси гексан – 96% спирт (1:1) при λ_{\max} 450 нм; E=2500 – удельный показатель поглощения β-каротина в абсолютном спирте этиловом при λ_{\max} 450 нм; E=2592 – удельный показатель поглощения β-каротина в гексане при λ_{\max} 450 нм.

** При низком содержании каротиноидов, можно измерять оптическую плотность фильтрата, доведенного в мерной колбе на 50 мл использованным растворителем.*

Ксантоны

Ксантоны в растениях чаще встречаются в виде гликозидов, поэтому для определения суммы в методике учтен гидролиз кислотой.

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 50% водного ацетона, 5 мл кислоты хлороводородной концентрированной, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Гидролизат охлаждают, фильтруют, концентрируют до объема 2-3 мл и хроматографируют на пластинках силикагеля или целлюлозы в присутствии СО мангиферина, используя в качестве подвижной фазы 15% раствор кислоты уксусной.

Пятна, соответствующие мангиферину ($R_f=0.38-0.42$) и другим ксантоновым соединениям (ярко-оранжевые в УФ свете) соскабливают с пластинки и элюируют в колбе 15 мл 50% водного ацетона настаиванием в течение 15-17 часов. Экстракт фильтруют и определяют оптическую плотность при длине волны 372 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание ксантонов в абсолютно сухом сырье, в пересчете на мангиферин в процентах (X), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V_2 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot [100]}{D_1 \cdot V_1 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 372 нм; D₁– оптическая плотность раствора СО при λ_{\max} 372 нм; m – масса навески сырья, в г.; m₁ – масса навески СО, в г.; V₁ – объем раствора СО, в мл, нанесенного на хроматограмму; V₂ – объем испытуемого раствора в мл, нанесенного на хроматограмму; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Другие методики, специфичные для конкретного растительного сырья, описаны в научных статьях.

Кумарины

Метод 1. Около 2 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл хлороформа и нагревают при перемешивании в

течение 2 часов на кипящей водяной бане с обратным холодильником, фильтруют через бумажный фильтр.

20 мл фильтрата помещают в делительную воронку, прибавляют 1 г натрия хлорида, встряхивают в течение 5 минут, фильтруют.

Хлороформное извлечение упаривают на кипящей водяной бане досуха.

Сухой остаток растворяют в 10 мл спирта этилового 96%, количественно переносят при помощи 10 мл спирта этилового 96% в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

[5 мл анализируемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 96% спиртом до метки, перемешивают.] (при необходимости!)*

Измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 272 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 96%.

Содержание производных кумарина в абсолютно сухом сырье в пересчете на СО в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot [50] \cdot 100 \cdot [100]}{734 \cdot 20 \cdot m \cdot [5] \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 272 нм; 734 – удельный показатель поглощения СО кумарина при λ_{\max} 272 нм; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Метод 2. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 100 мл (или в аппарат Сокслета), и экстрагируют 50 мл хлороформа (петролейного эфира; 50% водного ацетона) в течение 3 часов.

Извлечение фильтруют, концентрируют до объема 2-3 мл, отбирают 0.1 мл (25 мкг) и наносят на хроматографическую пластинку Silufol UV₂₅₄ размером 15x15 см.

Хроматографируют восходящим способом в системе петролейный эфир – этилацетат 2:1 (н-гептан – бензол 4:1).

Когда фронт растворителя дойдет до края пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до исчезновения паров растворителей, просматривают в УФ-свете, вырезают пятна фиолетового свечения и чистого слоя.

** При наличии СО кумаринов, их хроматографируют в тех же условиях, на той же пластинке и вырезают пятна на уровне веществ-стандартов.*

Вырезанные пятна и зону чистого сорбента помещают в колбы вместимостью 50 мл, заливают 20 мл спирта этилового 95% и элюируют в термостате при температуре 50-60⁰С в течение 3 часов. После охлаждения, элюаты фильтруют и определяют оптическую плотность в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 246 нм для псоралена, изопсоралена, 298 нм для псоберана, 311 нм для бергаптена, 313 – для изопимпинеллина.

В качестве раствора сравнения используют элюат чистого кусочка хроматограммы (или раствор СО в спирте этиловом 95%).

Содержание кумаринов в сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 1,045 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot [E] \cdot V_2 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D₁– оптическая плотность элюата при λ_{\max} 246 (298, 311 или 313) нм; D₀ - оптическая плотность раствора СО при соответствующей длине волны; или E – удельный коэффициент поглощения изопимпинеллина – 518 при λ_{\max} 313 нм, бергаптена – 651 при λ_{\max} 311 нм, псоралена 0,00005 г при λ_{\max} 246 нм; V₁ – объем извлечения, в миллилитрах; V₂ – объем извлечения, нанесенного на хроматограмму, в мл; V₃ – объем элюата, в мл; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Приготовление раствора стандартного образца псоралена. 0.05 г (точная навеска) СО псоралена растворяют при встряхивании в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки, перемешивают (раствор А). 0.5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки (раствор Б). Растворы хранят в темном месте в колбах с притертыми пробками. Срок хранения растворов - 6 месяцев. 1 мл полученного раствора содержит 0.00005 г псоралена (или другого СО).

* В препаратах (настойки, отвары, экстракты) содержание кумаринов можно определять по методу 3.

Метод 3. 50 мл препарата фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата. 20 мл фильтрата помещают в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл хлороформа, 1 г натрия хлорида и экстрагируют в течение 5 мин. После разделения слоев хлороформное извлечение сливают в химический стакан. Процедуру извлечения хлороформом повторяют еще дважды порциями по 20 мл, экстракты объединяют. Водное извлечение оставляют для определения подлинности. Хлороформное извлечение упаривают в вакууме досуха.

Сухой остаток растворяют в 10 мл спирта этилового 96%, количественно переносят при помощи 10 мл спирта этилового 96% в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% и перемешивают.

[5 мл анализируемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивают.] (при необходимости!)

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при λ_{\max} 272 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 96%.

Содержание суммы производных кумарина в препарате, в пересчете на кумарин, в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot [50]}{734 \cdot 20 \cdot [5]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора препарата при λ_{\max} 272 нм; 734 – удельный показатель поглощения СО кумарина при λ_{\max} 272 нм.

Полисахариды

Для оценки содержания полисахаридов в фитопрепаратах воспроизводимые результаты дает метод 1.

Метод 1. Около 1 г препарата (точная навеска) помещают в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл кислоты хлороводородной 10% и кипятят с обратным холодильником в течение 1 часа. Колбу с содержимым охлаждают, опускают в нее небольшой кусочек бумаги конго и прибавляют по каплям 40% раствор натрия гидроксида до покраснения бумаги; затем прибавляют несколько капель разведенной кислоты хлороводородной до посинения бумаги, а затем 10% раствор натрия гидроксида до покраснения бумаги. Раствор переносят количественно в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывают колбу водой очищенной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют, отбрасывая первые 15-20 мл фильтрата.

В две плоскодонные колбы вместимостью 50 мл отмеривают пипеткой 2.5 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 7.5 мл 20 % раствора карбоната натрия. В одну колбу прибавляют 5 мл испытуемого, в другую - 5 мл раствора СО глюкозы. Колбы с содержимым погружают на 10 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают до комнатной

температуры, содержимое количественно переносят в мерные колбы вместимостью 50 мл и доводят объем растворов водой очищенной до метки.

Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную.

Содержание полисахаридов в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 0,0004 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 5}$$

где D_1 - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 540 нм; D_0 - оптическая плотность раствора СО глюкозы при λ_{\max} 540 нм; m – масса навески препарата, в г.

Примечания. Приготовление 1% раствора кислоты пикриновой. 1 г кислоты пикриновой растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Приготовление 20% раствора безводного натрия карбоната. 20 г безводного натрия карбоната растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. 0.1 г (точная навеска) глюкозы, высушенной до постоянной массы, растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 1 мл раствора стандартного образца содержит 0.0004 г глюкозы. Хранить в холодильнике в течение 10 дней.

** При смешивании реактивов и испытуемого раствора необходимо строго придерживаться порядка прибавления, указанного при количественном определении.*

Метод 2. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на водяной бане течение 1 часа, охлаждают. Экстракцию водой повторяют дважды в течение 30 мин в тех же условиях. Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 250 мл через 3 слоя марли. Фильтр промывают водой очищенной и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

25 мл полученного раствора помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл спирта этилового 95%, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом через высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл спирта этилового 95%. Фильтр с осадком высушивают при температуре 100-105°C до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 250 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot 25 \cdot [(100 - W)]}$$

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

Метод 3. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Извлечение фильтруют через

бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

15 мл полученного извлечения переносят в центрифужную пробирку, прибавляют 45 мл спирта этилового 95%, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 70°C в течение 5 мин.

Через 1 час содержимое пробирки центрифугируют с частотой вращения 3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отделяют, осадок количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл водой очищенной при нагревании, доводя объем до метки водой очищенной.

К 1 мл полученного раствора прибавляют 2 мл 0.2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной, охлаждают при температуре 10-15°C в течение 5 минут, затем нагревают на кипящей водяной бане 15 минут и снова охлаждают до 10-15°C.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют смесь 1 мл воды очищенной и 2 мл 0.2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной, выдержанную в тех же условиях, что и анализируемый раствор.

Содержание полисахаридов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot 10^6 \cdot 5 \cdot [(100 - W)]}$$

где С – количество глюкозы, определенное по калибровочному графику, мкг/мл; m – масса навески сырья, в г.; 10⁶ – пересчет микрограммов в граммы; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Приготовление 0.2% раствора антрона. 0.05 г антрона (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем кислотой серной концентрированной до метки. Срок годности раствора 1 сутки!

Построение калибровочного графика по растворам глюкозы. 0.14 г (точная навеска) глюкозы, высушенной до постоянной массы при температуре 100-105°C, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в воде очищенной и доводят объем до метки водой очищенной.

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем водой очищенной до метки. 1 мл полученного раствора содержит 0.000056 г глюкозы (56 мкг).

К 0.8 мл раствора прибавляют 0.2 мл воды очищенной, полученный раствор содержит 44.8 мкг глюкозы. К 0.6 мл раствора прибавляют 0.4 мл воды очищенной, полученный раствор содержит 33.6 мкг глюкозы и т.д.

Определение моно- и олигосахаридов проводят титриметрическим методом раствором Фелинга в присутствии метиленового синего до появления красного окрашивания или спектрофотометрическим методом особенно для жидких лекарственных форм и сиропов.

Например, 1 г сиропа (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды очищенной, перемешивают, доводят объем водой очищенной до метки. [При необходимости 1 мл этого раствора разводят водой очищенной до 100 мл] (*).

В качестве раствора сравнения используют раствор: 0.01 г сахарозы растворяют в мерной колбе на 250 мл водой очищенной. К 1 мл полученного раствора прибавляют 1 мл раствора фенола (50 г/л) и 5 мл кислоты серной концентрированной.

Берут 3 одинаковые пробирки (1 – испытуемый раствор, 2 – раствор сравнения, 3 – контрольная проба) помещают в кипящую водяную баню на 15 мин, охлаждают и через 20

мин измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 435 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контролем.

Количество сахарозы в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 0.01 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 125}{D_0 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 250}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 435 ± 2 нм; D_0 - оптическая плотность стандартного раствора при λ_{\max} 435 ± 2 нм; 0.01 – масса навески СО сахарозы.

В экстракте алтейного корня определяют сумму восстанавливающих сахаров весовым или спектрофотометрическим методом.

Метод 1. Около 0.6 г препарата (точная навеска) помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды очищенной и перемешивают в течение 5 мин. К полученному раствору прибавляют 20 мл спирта этилового 95%, колбу подсоединяют к обратному холодильнику и выдерживают на водяной бане при температуре $80\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 10 мин; выпадает волокнистый осадок серо-коричневого цвета (полисахариды).

Колбу с осадком охлаждают под струей воды, выдерживают 30 мин при комнатной температуре и фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок на фильтре и колбе промывают 15 мл спирта этилового 95% порциями по 3 мл, высушивают под вакуумом в течение 5 мин, затем растворяют в 10 мл кислоты хлороводородной 10% порциями по 1-2 мл. Фильтрацию ведут при слабом разряжении, собирая фильтрат в ту же колбу, где осаждали полисахариды. Полученный раствор кипятят с обратным холодильником в течение часа, охлаждают и количественно переносят в стакан вместимостью 50 мл четырьмя миллилитрами 30% раствора натрия гидроксида порциями по 1 мл, сливая в стакан к основному раствору. Полученный раствор нейтрализуют потенциметрически до pH 6.5-7.0 30% раствором натрия гидроксида и 10% раствором кислоты хлороводородной и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл небольшими порциями воды очищенной, доводят объем до метки водой очищенной, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр (раствор А).

К 10 мл раствора А прибавляют 5 мл реактива Фелинга и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин; появляется красно-коричневый осадок (восстанавливающие моносахара). Осадок высушивают до постоянного веса, взвешивают.

Метод 2. В плоскодонную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл 1% раствора кислоты пикриновой, 3 мл 20% раствора натрия карбоната и 1 мл раствора А. Колбу с содержимым погружают в кипящую водяную баню на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры, содержимое количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл 1% раствора кислоты пикриновой, 3 мл 20% раствора натрия карбоната и 1 мл воды очищенной, которую нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, и доводят объем раствора водой очищенной до 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл СО глюкозы, приготовленного аналогично испытуемому раствору, начиная со слов "В плоскодонную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл 1 % раствора кислоты пикриновой...".

Содержание суммы восстанавливающих сахаров, в пересчете на глюкозу и сухое вещество в процентах (X), рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 460 нм; D₀ - оптическая плотность стандартного образца глюкозы при λ_{\max} 460 нм; m - масса навески СО глюкозы, в г.; m₀ - масса навески препарата, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0.1400 г (точная навеска) высушенной до постоянной массы глюкозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. Хранить при комнатной температуре в течение 10 дней.

Приготовление 1% раствора кислоты пикриновой. 1 г кислоты пикриновой растворяют в 60 мл горячей воды очищенной, охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. Сохраняют в склянках с притертой пробкой в защищенном от света месте, в течение месяца.

Приготовление 20% раствора натрия карбоната. 20 г натрия карбоната безводного растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. Срок годности 1 месяц.

* Аналогичным представляется метод определения восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом при разных длинах волн и метод титрования.

Метод 3. Около 0.05 г (точная навеска) препарата помещают в ампулу, прибавляют 2.5 мл кислоты хлороводородной разведенной, ампулу запаивают и нагревают при температуре 100-105⁰С в течение 3 ч. После чего содержимое ампулы при помощи 3 мл воды очищенной количественно переносят в стакан, помещают в стакан кусочек бумаги конго, нейтрализуют сначала 30% раствором натрия гидроксида до покраснения бумаги, затем кислотой хлороводородной разведенной до посинения бумаги и 10% раствором натрия гидроксида до покраснения бумаги.

Раствор фильтруют через бумажный фильтр "синяя лента", переносят количественно при помощи 5 мл раствора в градуированную пробирку вместимостью 10 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). Далее как в методе 2.

Содержание восстанавливающих сахаров (X) в препарате в пересчете на глюкозу и сухое вещество, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 460 нм; D₀ - оптическая плотность глюкозы при λ_{\max} 460 нм; m - масса навески СО глюкозы, в г.; m₀ - масса навески препарата, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Метод 4. Около 1 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл кислоты хлороводородной разведенной и 20 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, охлаждают, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

20 мл раствора Бенедикта помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 мл воды очищенной, нагревают до кипения при перемешивании. Титруют испытуемым раствором до желтовато-зеленого цвета.

Содержание углеводов (X), в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{F \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V}$$

где F – фактор D-глюкозы; m – масса навески препаратах, в г.; V – объем испытуемого раствора, израсходованный на титрование, в мл.

Примечания. Приготовление раствора Бенедикта. 100 г натрия карбоната растворяют в 600 мл воды очищенной, нагревая на водяной бане, прибавляют 200 г натрия-калия тартрата и 125 г калия роданида (необходимо добиться полного растворения), полученный раствор фильтруют (раствор 1). 18.0 г меди сульфата растворяют в 100 мл воды очищенной, нагревая на водяной бане, фильтруют (раствор 2). Смешивают раствор 1 и раствор 2 в мерной колбе вместимостью 1 л, прибавляют 5 мл 5% раствора натрия ферроцианида, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают. Приготовленный раствор оставляют на ночь.

Стандартизация раствора Бенедикта. 1.2 г D-глюкозы (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 20 мл кислоты хлороводородной разведенной, прибавляют 50 мл воды очищенной, нагревают до кипения на водяной бане и выдерживают еще в течение 30 мин. Охлаждают, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 20 мл раствора Бенедикта помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 мл воды очищенной, нагревают до кипения при перемешивании. Титруют раствором D-глюкозы в течение 2 мин до точки эквивалентности, при которой раствор должен быть бесцветным.

$$\text{Коэффициент D-глюкозы} = \frac{m \cdot 4 \cdot 4.75 \cdot V}{5.01 \cdot 1000}$$

где m – масса навески D-глюкозы, в г.; V - объем раствора D-глюкозы, израсходованный на титрование в мл.

Приготовление кислоты хлороводородной разведенной. 20 мл кислоты хлороводородной концентрированной разбавляют водой очищенной до объема 100 мл.

Содержание фруктозанов в препарате удобно определять **по методу 5**: 5 мл препарата помещают в пробирку для центрифугирования, прибавляют 25 мл спирта этилового 96%, перемешивают, нагревают на водяной бане при температуре 30⁰С в течение 5 мин, оставляют на 1 ч, затем центрифугируют со скоростью вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок количественно переносят на тот же фильтр и последовательно промывают 15 мл спирта этилового 96%, 10 мл ацетона и 10 мл этилацетата. Осадок на фильтре растворяют в 10 мл горячей воды очищенной при перемешивании, раствор фильтруют под вакуумом. Фильтр промывают еще два раза горячей водой очищенной порциями по 10 мл, фильтруют в тех же условиях, фильтраты объединяют, охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят при помощи 10 мл воды очищенной в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 0.1% раствора резорцина спиртового, доводят объем раствора кислотой хлороводородной концентрированной до метки, перемешивают. (*) Полученный раствор помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, нагревают на водяной бане при температуре 80⁰С в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и перемешивают (раствор Б).

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 485 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл воды очищенной, 5 мл 0.1% раствора резорцина спиртового, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл, доведенный кислотой хлороводородной до метки и обработанный аналогично испытуемому раствору, начиная со слов "Полученный раствор помещают в пробирку для центрифугирования..." (*).

Содержание суммы фруктозанов (X) в препарате, в пересчете на фруктозу, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{475 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 100}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 485 нм; 475 - удельный показатель поглощения продукта реакции взаимодействия фруктозы с резорцином в кислой среде при λ_{\max} 485нм.

Флавоноиды

Метод 1. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 90%, содержащего 1% кислоты хлороводородной концентрированной или 10% раствора кислоты серной (для гидролиза гликозидов), колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа, охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажной фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом, фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают спиртом этиловым 90% и доводят объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 1 мл 1% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95% и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Через 20 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного спиртом этиловым 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot [100]}{764.6 \cdot m \cdot 2 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 430 нм; 764.6 - удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с 1% алюминия хлоридом при 430 нм; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; m - масса навески сырья, в г.

Метод 2 для сырья и препаратов, где доминируют гликозидирован-ные формы флавоноидов.

А) Если имеется СО любого гликозида, его используют в качестве раствора сравнения с определением оптической плотности при одинаковых λ_{\max} (указаны в таблице), либо строят калибровочный график по растворам СО.

Около 3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 50%, нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов, охлаждают, фильтруют.

25 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем спиртом этиловым 50% до метки, перемешивают.

Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 365 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 50%.

Параллельно измеряют оптическую плотность 0.1% раствора СО гиперозида при длине волны 365 нм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot 25 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность исследуемого раствора при λ_{\max} 365 нм; D₀ - оптическая плотность раствора СО гиперозида при λ_{\max} 365 нм; m - масса навески сырья, в г.; m₀ - масса СО гиперозида, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Б) Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта этилового 50% и нагревают на водяной бане при температуре 60⁰С в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр, предварительно смоченный тем же спиртом, в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию указанным выше способом повторяют еще 4 раза. Извлечения фильтруют в ту же мерную колбу и доводят их объем спиртом этиловым 50% до метки (раствор А); 5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 315 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 95%. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца изосалипурпоза.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot 50 \cdot C \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot 5 \cdot [(100 - W)]}$$

где C - количество суммы флавоноидов, найденное по калибровочному графику, в г/мл; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

В) если СО нет, можно воспользоваться величиной E^{1%}_{1см}, с добавлением AlCl₃ или без него.

Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70%, колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин; охлаждают, фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше методом, фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают спиртом этиловым 70% и доводят объем фильтрата тем же растворителем до метки (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95% и доводят объем раствора тем же растворителем до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю кислоты хлороводородной разведенной и доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot [100] \cdot 25}{330 \cdot 5 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 410 нм; 330 – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с 2% алюминия хлоридом при 410 нм; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %; m - масса навески сырья, в г.

Г) Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 30% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин; охлаждают, фильтруют в мерную колбу вместимостью 150 мл. Извлечение повторяют еще 3 раза указанным выше методом, и объединенные извлечения доводят до метки спиртом этиловым 30% (раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% водного раствора алюминия хлорида и доводят объем водой очищенной до метки. Через 30-40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной и спирта этилового 30% до 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на 3-О-рамнозид мирицетина и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot [100] \cdot 25}{380 \cdot 2 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 415 нм; 380 – $E^{1\%}_{1\text{см}}$ продукта взаимодействия 3-О-рамнозида мирицетина с 2% алюминия хлоридом в воде очищенной при λ_{\max} 415 нм; m - масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

* Для сравнения может быть взята величина $E^{1\%}_{1\text{см}}$ для любого другого гликозида, соответственно должны быть взяты другие λ_{\max} .

В таблице приведены наиболее распространенные СО флавоноидов, удельные коэффициенты поглощения и коэффициенты пересчета.

СО	λ , нм	$E^{1\%}_{1\text{см}}$	К, г/мл
Авикулярин, 95% спирт этиловый	364	374	
-/- + 1% (2%) AlCl_3	395±5	280	
-/- + 2% AlCl_3 (90% спирт)	410	330	
Кверцетин, 95% спирт этиловый	370	646	0.000008
-/- + 1% (2%) AlCl_3	430	764.5	0.00004
Кемпферол, 95% спирт этиловый	372	545	
-/- + 1% AlCl_3	425±5	850	
Апигенин, 95% спирт этиловый	326±2	785	
Мирицетин, 95% спирт этиловый	377	618	
-/- + 1% AlCl_3	435±5	840	
Морин + 1% AlCl_3	425±5	810	
Гомориентин, 95% спирт этиловый	353	381.4	1.01
Рутин, 95% спирт этиловый	363	268.4	0.667
-/- + 10% AlCl_3 70% спирт	407		0.00002
-/-, вода очищенная	258	336.9	
-/-, -/-, 1% раствор	425	315	
Изосалипурпозид, 95% спирт этиловый	370	564	
Гиперозид, 95% спирт этиловый	368	366	
-/- + 1% AlCl_3	405±5	380	
-/- + 5% AlCl_3	425	500	1.25

Изокверцетрин + 5% AlCl ₃	425	500	1.03
Гнафалозид А, 95% спирт этиловый	338		0.202 K ₂ Cr ₂ O ₇
Ононин (изофлавоон), 95% спирт этиловый	260		0.02
Цианидин-3,5-дигликозид	510	453	

Флавоноиды и фенилпропаноиды (оксикоричные кислоты). Метод 1. Около 1 г (точная навеска) измельченного растительного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 95% и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 3 часов. Охлаждают, фильтруют, спирт отгоняют под вакуумом досуха или до небольшого объема и переносят с помощью буферного раствора рН 9.0 в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем тем же буферным раствором до метки, перемешивают.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют при длине волны 310 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения буферный раствор с рН 9.0. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО лютеолина (или другого СО).

Содержание суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в процентах (X) в абсолютно сухом сырье, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot [(100 - W)]}$$

где D₁ – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{max} 310 нм; D₀ – оптическая плотность раствора СО лютеолина при λ_{max} 310 нм; m₁ – масса навески сырья, в г.; m₀ – масса навески СО лютеолина, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Примечания. Приготовление буферного раствора рН 9.0. К 900 мл 0.05M раствора натрия тетрабората прибавляют 100 мл 0.1M раствора кислоты хлороводородной, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора СО лютеолина. 0.050 г (точная навеска) СО лютеолина, высушенного при температуре 105-110⁰С в течение 2 часов, растворяют в 85 мл буферного раствора рН 9.0 в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки, перемешивают. Раствор стабилен в течение 7 суток.

* *Вместо лютеолина может быть использован другой СО флавоноида.*

Метод 2. 10 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем спиртом этиловым 70% до метки, перемешивают (раствор А).

5 мл полученного раствора помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл 5% раствора алюминия хлорида, помещают на 3 минуты в кипящую водяную баню, быстро охлаждают, количественно переносят при помощи 10 мл спирта этилового 70% в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл буферного раствора с рН 3.8, доводят объем раствора 70% спиртом до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 409 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 2 мл буферного раствора с рН 3.8, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом этиловым 70% до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл раствора СО (рутина, или другого) отобранного аналогично испытуемому раствору, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл раствора СО и 2 мл буферного раствора с рН 3.8, помещенный в мерную колбу вместимостью 25 мл и доведенный спиртом этиловым 70% до метки.

Содержание флавоноидов (X) в препарате, в пересчете на СО в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 100}{D_0 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 25}$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 409 нм; D_0 – оптическая плотность раствора СО при λ_{\max} 409 нм; m_0 – масса навески СО, в г.

Примечания. Приготовление раствора СО рутина. Около 0.05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135⁰С в течение 3 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового 70% при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают. Раствор годен в течение 1 месяца.

Приготовление 5% раствора алюминия хлорида. 5 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового 70%, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца.

Приготовление буферного раствора с рН 3.8. 10 мл 1М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 84.3 мл 1М раствора кислоты уксусной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 месяц.

Антоцианы. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья (цветков и/или плодов), помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 1% кислоты хлороводородной и выдерживают на водяной бане в течение 1 часа при температуре 50-60⁰С.

Извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл и сырье экстрагируют еще раз в тех же условиях. Охлаждают и второе извлечение фильтруют в ту же мерную колбу, доводят раствор до метки 1% раствором кислоты хлороводородной, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность фильтрата при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 1% раствор кислоты хлороводородной.

Содержание антоцианов, в абсолютно сухом сырье в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

где D – оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 510 нм; 453 – удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозида в 1% растворе кислоты хлороводородной при λ_{\max} 510 нм; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %; m – масса навески сырья, в г.

Содержание изофлавоноидов в корнях стальника предложено определять после экстракции около 2 г сырья 40 мл спирта этилового 70% в течение 2 часов с последующим настаиванием в течение 1 часа. Полученный экстракт фильтруют, отбирают 0.5 мл фильтрата, переносят в мерную колбу, доводят объем до метки спиртом этиловым 70% и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 260 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый 70%. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца ононина.

Содержание изофлавоноидов (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 40 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m \cdot 0.5 \cdot 25 \cdot 10 \cdot [(100 - W)]}$$

где D - оптическая плотность анализируемого раствора при λ_{\max} 260 нм; D₀ - оптическая плотность раствора стандарта олонина при λ_{\max} 260 нм; m - масса навески сырья, в г.; m₀ - масса навески СО олонина, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Определение рутина в сырье возможно после экстракции точной навески сырья спиртом этиловым 95% в течение 1.5 часов на кипящей водяной бане.

После охлаждения экстракт фильтруют, взвешивают. Аликвоту полученного экстракта упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 5 мл спирта, фильтруют. 0.03-0.05 мл экстракта наносят на тонкослойные пластинки силикагеля, рядом наносят пятно СО рутина и хроматографируют в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:2. После прохождения фронта растворителя 11-12 см, пластинку вынимают, сушат, отмечают в УФ-свете пятна, соответствующие СО рутина, флуоресцирующие темно-коричневым светом. Отмеченные зоны силикагеля с рутином и зону холостого опыта количественно переносят в колбы на 25 мл, элюируют 10 мл смеси диоксан-вода 1:1 при встряхивании в течение 1 часа, фильтруют. Оптическую плотность полученного извлечения измеряют в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 363 нм на фоне элюата холостого опыта.

Процентное содержание рутина в сырье (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot D \cdot [100] \cdot 1.195}{V_2 \cdot 268.4 \cdot m \cdot 0.667 \cdot [(100 - W)]}$$

где V₁ – объем этанольного экстракта после растворения сухого остатка, в мл; V₂ – объем этанольного экстракта, взятый для нанесения на хроматограмму, в мл; V₃ – объем элюата, в мл; D - оптическая плотность анализируемого раствора при λ_{\max} 363 нм; 268.4 – удельный показатель поглощения СО рутина при λ_{\max} 363 нм; 0.667 – коэфф. пересчета на аликвоту; 1.195 - коэффициент элюирования; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Определение суммы флавоноидов и оксикоричных кислот – действующих веществ прополиса проводят измерением оптической плотности спиртовых растворов (96%) при длине волны 289 нм на фоне спирта этилового 96%.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО пиностробина.

$$X = \frac{D \cdot V \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot V_0 \cdot m}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 289 нм; D₀ - оптическая плотность раствора стандарта пиностробина при λ_{\max} 289 нм; V – объем исследуемого раствора, в мл; V₀ – объем раствора СО пиностробина, в мл; m - масса навески прополиса, в г.; m₀ – масса навески СО пиностробина, в г.

* В отсутствие СО пиностробина можно использовать его удельный показатель поглощения при длине волны 289 нм, равный 660-710.

** Если определение проводить по комплексу с 1% раствором алюминия хлорида, оптическую плотность определяют при длине волны 308 нм.

Определение суммы флавоноидов в соцветиях пижмы проводят из точной навески сырья экстракцией в аппарате Сокслета хлороформом в течение 3 часов, а затем метиловым

спиртом в течение 3 часов. Метанольный экстракт и извлечение отгоняют досуха, сухой остаток растворяют в воде, количественно переносят в делительную воронку и очищают дважды по 15 мл CCl_4 .

Очищенный водный экстракт пятикратно обрабатывают этилацетатом. Объединенные этилацетатные извлечения упаривают в вакууме досуха и сушат остаток в течение 1 часа в сушильном шкафу при температуре $65^{\circ}C$. Высушенный остаток растворяют в небольшом объеме этилового спирта и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем до метки спиртом этиловым (раствор А). При необходимости 0.5 мл этого раствора разбавляют еще раз спиртом этиловым в мерной колбе на 50 мл (раствор Б).

Определяют оптическую плотность раствора Б в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 330 нм. Содержание суммы флавоноидов вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 100 \cdot [100]}{560.8 \cdot m \cdot [(100 - W)]}$$

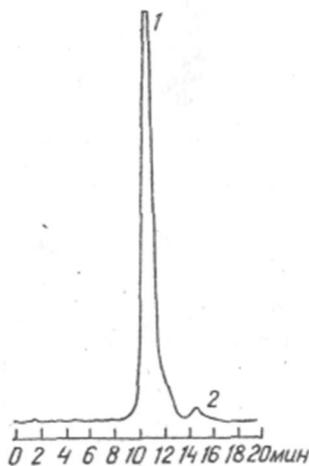
где D - оптическая плотность анализируемого раствора при λ_{\max} 330 нм; m - масса навески сырья, в г.; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %; 560.8 – удельный показатель поглощения при λ_{\max} 330 нм.

Определение содержания суммы катехинов проводят из точной навески измельченного сырья после исчерпывающего экстрагирования этилацетатом до отрицательной реакции на ванилиновый реактив. Полученный экстракт концентрируют в мягких условиях до небольшого объема, измеряют его.

Аликвоты (по 0.1 мл) концентрата помещают в мерные колбы на 10 или 25 мл, прибавляют 2 мл 50% спирта метилового. В одну колбу приливают 4 мл ванилинового реактива, в другую - 4 мл 70% кислоты серной. Колбы встряхивают и помещают в баню с холодной водой на 15 минут. После этого перемешивают и измеряют оптическую плотность при длине волны 500 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор 4 мл ванилинового реактива с 2 мл воды очищенной и 47% кислоты серной (4 мл 70% кислоты серной + 2 мл воды очищенной).

Содержание катехинов определяют по калибровочной кривой, построенной для катехина или флороглюцина (2.2 мг в 10 мл 50% спирта метилового).

Предложена методика количественного определения дигидрокверцетина (ДКВ) с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ, которая может быть использована в целях стандартизации препарата на основе ДКВ.



Стандартный и анализируемые растворы ДКВ концентрации 10 мг/мл готовили в ацетонитриле и разводили в 100 раз подвижной фазой. Для построения калибровочной кривой готовили растворы ДКВ концентрации от 10 до 100 мкг/мл путем разбавления исходного стандартного раствора подвижной фазой.

Анализ проводили на колонке Lichrosorb 10 RP-2 или Separon C_{18} [250 x 4.6 мм] с УФ-детектором при длине 290 нм. Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил - 2 % уксусная кислота 3:7.

С помощью разработанной методики количественно определяли ДКВ в стандартном образце и в опытно-промышленных партиях, в которых удается обнаружить примесь дигидрокемпферола (время выхода 15 мин) в количестве не более 1.5% (см. рисунок). Время выхода ДКВ

составляло 11 мин.

В жидком экстракте пассифлоры инкарнатной количественно определяют **содержание О- и С-гликозидов флавоноидов** с использованием СО рутина и витексина методом УФ-спектроскопии в присутствии 2% спиртового раствора алюминия хлорида или циркония хлорида. Например, точную навеску экстракта и 30 мл спирта этилового 96% помещают в мерную колбу на 100 мл и выдерживают в течение 15 минут при перемешивании. Затем объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.

2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96%, перемешивают и выдерживают 25 минут. В качестве раствора сравнения используют 2 мл испытуемого раствора, разбавленного в мерной колбе на 25 мл спиртом этиловым 96% до 25 мл.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 395 нм.

Содержание суммы С-гликозидов в процентах рассчитывают в пересчете на витексин по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 100}{270 \cdot 2 \cdot m}$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора при λ_{\max} 395 нм; 270 – $E^{1\%}_{1\text{см}}$ витексина с 2% алюминия хлоридом при λ_{\max} 395 нм; m - масса навески препарата, в г.

* При построении калибровочного графика по растворам СО витексина используют коэффициент пересчета 4.63.

** Методика пригодна и для анализа лекформ.

Другие варианты методик анализа описаны в книге «Природные флавоноиды», Новосибирск, 2007.

Эфирные масла

В зависимости от их химической природы и содержания, определяют различными методами.

Метод 1 (метод Гинзберга). Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 300 мл, приливают 100 мл горячей воды, присоединяют обратный холодильник с градуированной насадкой и нагревают 2-4 ч, в зависимости от содержания эфирных масел в сырье, которые накапливаются по мере их отгонки с паром в градуированной пробирке. Объем масла измеряют после охлаждения прибора до комнатной температуры.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot [100]}{m \cdot [(100 - W)]}$$

где V – объем эфирного масла, в мл; m – масса навески сырья, в г.; W – потеря в массе при высушивании сырья в %.

* Для извлечения эфирных масел из сырья предложено использовать ксилен, пентан, гептан, хлороформ, четыреххлористый углерод.

** Если масло в процессе отгонки загустевает или образует эмульсию или неустойчиво при нагревании, более пригодным является прибор с внешней градуированной пробиркой (метод Клевенджерера).

Содержание доминирующего компонента в масле определяют **по методу 2**. В колбу вместимостью 100 мл с шейкой, градуированной на 10 мл с точностью до 0.1 мл, вносят 3

мл испытуемого препарата и 75 мл 3% раствора резорцина. Смесь взбалтывают в течение 15 мин и после отстаивания доливают такое количество 3% раствора резорцина, чтобы оставшееся масло собралось в градуированную часть колбы. Спустя 1 час отсчитывают объем непрореагировавшего масла. Отмеривание масла для анализа и отсчет непрореагировавшего масла производят при одинаковой температуре.

Содержание доминирующего компонента в масле в объемных процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(3 - a) \cdot 100}{3}$$

где а – количество непрореагировавшего масла, в мл.

Содержание эфирных масел в препарате «Настойка мяты перечной» определяют аналогично описанной выше методике, но вместо резорцина используют смесь натрия хлорида и кислоты серной.

10 мл препарата помещают в колбу для определения эфирного масла вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл кислоты серной разведенной и 60 мл насыщенного раствора натрия хлорида. Колбу закрывают пробкой, энергично встряхивают в течение 5 мин и дают отстояться в течение 1-2 часов при 25-30⁰С. Когда все эфирное масло выделится на поверхности жидкости, осторожно добавляют насыщенный раствор натрия хлорида до тех пор, пока слой эфирного масла не окажется в пределах градуированной части колбы, дают отстояться до полного отделения масла от водного слоя и замеряют объем.