

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

Факультет химии и химической технологии

Кафедра химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров

Литвиненко Ю.А.

*Методическое пособие к лабораторным работам по дисциплине
«Химия природных биологически активных веществ и фитопрепаратов»*



Алматы, 2012 г.

Методическое пособие к лабораторным работам по дисциплине «Химия природных биологически активных веществ и фитопрепаратов» разработано на основании Типового учебного плана направлений подготовки специальности «050721 - Химическая технология органических веществ»

Литвиненко Ю.А.

Методическое пособие по лабораторным работам по дисциплине «Химия природных биологически активных веществ и фитопрепаратов»

Свидетельство Серия 09915 №0030325

Подписано в печать 23.01.2012 г. Тираж 10 экз.

ИП Манько Н.А. г. Алматы, ул. Масанчи, 48 «А»

Лабораторные работы, приведенные в этом методическом пособии составлены на основе Государственной Фармакопеи Республики Казахстан; представлены методики определения качественного состава и количественного определения биологически активных веществ дикорастущих и лекарственных растений Флоры Республики Казахстан, рассмотрены способы получения настоек и отваров.

Методическое пособие по лабораторным работам рекомендовано для студентов 3 курса специальности 050721 – химическая технология органических веществ факультета химии и химической технологии.

Рекомендовано методическим бюро факультета химии и химической технологии КахНУ имени аль-Фараби.

СОДЕРЖАНИЕ

	ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
1	БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ	6
2	Инструкции к лабораторным работам	9
3	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1-2 Определение влажности растительного сырья	9
4	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2-5 Определение общей, сульфатной золы, золы нерастворимой в хлороводородной кислоте	12
5	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье	14
6	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7 Качественная оценка биологически активных веществ	14
7	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8 Органические кислоты	16
8	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9 Аминокислоты	17
9	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10-12 Фенолы, флавоноиды, полифенолы	18
10	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13-15 Получение отваров, настоев, масляных экстрактов	22
11	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16 Дубильные вещества	23
12	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17 Антрахиноны	25
13	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18 Сапонины	26
14	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №19 Кумарины	28
15	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №20 Алкалоиды	29
16	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №21-22 Углеводы, полисахариды	30
17	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №23-25 Витамины: аскорбиновая кислота, рибофлавин, каротиноиды	32
18	Материалы, используемые для подготовки	35
19	Список рекомендуемой литературы	35

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Аминокислоты представляют собой структурные химические единицы, образующие белки.

Биологически активные вещества – группа химических соединений, которые оказывают выраженный физиологический эффект в минимальных количествах.

Гидролиз – расщепление веществ в среде разбавленных кислот и щелочей.

Действующие вещества – группа биологически активных веществ, отвечающих за фармакологическую активность субстанций и лекарственных форм на их основе.

Жирные кислоты – алифатические насыщенные и ненасыщенные одноосновные карбоновые кислоты с открытой цепью, содержащиеся в этерифицированной форме в жирах, маслах и восках растительного и животного происхождения.

Извлечение (вытяжка) – полупродукт, получаемый в результате экстрагирования растительного сырья растворителем.

Качество лекарственного растительного сырья – показатели, которые соответствуют следующим техническим требованиям качества сырья: количественные показатели (определение доброкачественности сырья - влажность, зольность, экстрактивные вещества), качество и количество других добавок.

Лекарственное растительное сырье – лекарственные фитопрепараты или другие фармацевтические препараты или полуфабрикаты, получаемые с целью медицинского применения в качестве лекарственных веществ, фитопрепаратов, лекарственного растительного сырья или вспомогательных веществ.

Лекарственные препараты – дозированные лекарственные средства в определенной лекарственной форме.

Настойки – окрашенные жидкие спиртовые или водно-спиртовые разбавленные извлечения из лекарственного растительного сырья, получаемые без нагревания и удаления растворителя.

Сырье – существует три вида сырья: минеральное, животное и лекарственное.

Субстанция – вещество растительного, животного, микробного или синтетического происхождения, обладающее фармакологической активностью и предназначенное для производства и изготовления лекарственных препаратов.

Тонкослойная хроматография – вариант, основанный на различии в скорости перемещения компонентов смеси в плоском тонком слое (толщина 0,1-0,5 мм) сорбента при их движении в потоке подвижной фазы (элюента).

Фармакологические вещества – определение фармакологической активности вещества или комплекса веществ.

Фитохимические препараты – лекарственные вещества, получаемые из растений, содержащие сложные комплексы лекарственных и сопутствующих веществ или различные индивидуальные вещества.

Хроматография – метод разделения, анализа и физико-химические исследования веществ, основанный на распределении исследуемого вещества между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент).

Экстрагент – растворитель, который применяется для экстрагирования биологически активных веществ из растений.

Экстракты – концентрированные извлечения из лекарственного растительного сырья.

БАВ – биологически активные вещества

ТСХ – тонкослойная хроматография

БХ – бумажная хроматография

УФ – ультрафиолетовый спектр

ИК – инфракрасный спектр

GC/MS-газовая хромато- масс спектроскопия

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ

Наименование компонента	Характеристика
Дубильные вещества	Дубильные вещества являются производными полифенолов – пирогаллола, пирокатехина, флороглюцина и др. Дубильные вещества обладают вяжущим действием и способностью осаждать белки; некоторые конденсированные дубильные вещества обладают противоопухолевой и Р-витаминной активностью.
Алкалоиды	Алкалоиды представляют собой органические азотсодержащие соединения основного (щелочного характера). Алкалоиды – биологически высокоактивные соединения. Спектр фармакологического действия алкалоидов необычайно широк – это стимуляторы центральной нервной системы, седативные, спазмолитические и спазмогенные, противоопухолевые, анальгезирующие и снотворные средства.
Полисахариды	Полисахариды – высокомолекулярные полимерные соединения, состоящие из десяти и более одинаковых или различных моносахаридных остатков, связанных между собой α - и β -гликозидными связями и образующих линейные или разветвленные цепи. Полисахариды, входящие в состав клеточных оболочек микроорганизмов обладают противоопухолевой активностью.
Гликозиды	Гликозиды представляют собой органические соединения, молекулы которых состоят из остатков моно- или олигосахаридов, связанных полуацетальными (гликозидными) гидроксилами с органическим радикалом другой химической природы – агликоном или генином. Фармакологические свойства гликозидов определяются главным образом агликоном, сахарный остаток играет второстепенную роль. Так, стероидные гликозиды оказывают кардиотоническое действие, феногликозиды – бактерицидное, антрагликозиды – слабительное. Общим свойством гликозидов является их способность повышать диурез.
Сердечные гликозиды	Сердечные гликозиды – это производные стероидных соединений, представлены многоядерной циклопентано-пергидрофенентреновой системой, связанной гликозидной связью с одним или несколькими сахарными остатками – глюкозой, рамнозой, а также специфическими сахарами – цимарозой, дигитоксозой и др. Оказывают избирательное

	кардиотоническое действие, усиливая сократительную функцию и замедляя ритм сердца. Применяются для лечения сердечной недостаточности.
Стероидные сапонины	Стероидные сапонины имеют углеродный скелет, аналогичный сердечным гликозидам, но лактонное кольцо у них отсутствует. Стероидные сапонины оказывают противосклеротическое действие.
Тритерпеновые сапонины	Тритерпеновые сапонины являются пентациклическими терпеноидами, в основном типа амирина, имеющими кроме гидроксильных, лактонные, карбоксильные, альдегидные, кетонные и эфирные функциональные группы. Их используют в качестве отхаркивающих, диуретических, гипотензивных, седативных и тонизирующих средств.
Фенольные соединения	Фенолы (гидрохинон, пирокатехин, пирогаллол) оказывают бактерицидное, отхаркивающее и противовоспалительное действие. Оксикоричные кислоты: кофейная, кислота и ее производные (хлорогеновая и ее изомеры) оказывают противовоспалительное и желчегонное действие; сумма кофейной, хлорогеновой, ферулово, кумаровой и других кофеилхинных кислот оказывает гипотензивный эффект, усиливает функцию почек, стимулирует антиоксидантную функцию почек.
Флавоноиды	Флавоноиды – одна из самых распространенных групп фенольных соединений, объединенных общей структурой, имеющей дифенилпропановый скелет (C ₆ -C ₃ -C ₆), то есть ароматические кольца соединены друг с другом пропановым звеном. Они обладают широким спектром биологической активности, в частности Р-витаминной. Многим из них присуще желчегонное, противовоспалительное, антибактериальное, диуретическое, спазмолитическое и антигеморроидальное действие.
Хромоны	Хромоны – производные бензо-γ-пирана, по структуре близки к кумаринам. Они обладают спазмолитической, биостимулирующей, антиаллергенной и антибактериальной активностью.
Ксантоны	Ксантоны - производные дибензо-γ-пирана, по структуре близки к флавоноидам. Они обладают кардиотонической, диуретической, антиаллергенной, антибактериальной, противовоспалительной, противотуберкулезной и антибактериальной активностью.

Кумарины	Кумарины – ароматические лактоны, производные цис-о-оксикоричной кислоты (бензо-γ-пирана). Они обладают фотосенсибилизирующей, спазмолитической, Р-витаминной, антимикробной, противоопухолевой активностью.
Антрахиноны	Антрахиноны – природные соединения, в основе которых лежит ядро антрацена, окисленное по среднему кольцу до антранола, антрона, оксиантрона или антрахинона. Они проявляют нефролитическое, антимикробное, фотосенсибилизирующее действие
Эфирные масла	Эфирные масла – сложные смеси летучих веществ, которые образуются в различных растениях как продукты их жизнедеятельности. Большинство эфирных масел обладает дезинфицирующей, противовоспалительной, антимикробной, противовирусной активностью.
Иридоиды	Иридоиды – монотерпеновые соединения, содержащие частично гидрогенизированную циклопентана-(С)-пирановую систему. Они проявляют антимикробную, желчегонную, седативную, фунгицидную, противоопухолевую, тонизирующую, слабительную активность.
Витамин Е	Витамин Е (токоферолы) – группа витаминов, обладающих антистерильной активностью. Они регулируют нормальное развитие и функции эпителия половых желез и развитие зародыша. Витамин Е- активное противooksидлительное средство (антиоксидант), тормозит обмен белков, нуклеиновых кислот и стероидов.
Витамин РР	Витамин РР (никотиновая кислота) специфическое противоаллергенное средство. Он улучшает углеводный обмен, оказывает сосудорасширяющее действие и положительно влияет на гемодинамику.
Ретинол	Ретинол (витамин А) образуется в организме человека из поступающего с пищей каротина, участвует в образовании зрительного пигмента, способствует поддержанию зрения в норме, нормальному обмену веществ и развитию молодого организма.
Каротиноиды	В организме человека каротиноиды повышают иммунный статус, защищают от фотодерматозов, как предшественники витамина А обеспечивают механизм зрения, являются природными антиоксидантами; применяются в виде природных красителей, для лечения воспалительных процессов кожи и слизистых оболочек.

**Описание к лабораторным работам по дисциплине
«Химия природных биологически активных веществ и фитопрепаратов»**

Инструкции к лабораторным работам:

Цель лабораторной работы: освоить способы выделения биологически активного комплекса, способы выделения основных групп БАВ с целью увеличения количества фитопрепаратов: подбор оптимального растворителя, соотношения сырье-растворитель, температуру и время экстракции.

Выявление качественного состава фитопрепарата, полученного из известного растительного сырья, проверить приведенные параметры растворения.

Получение отваров, настоек и масляных экстрактов.

Каждый студент сам должен провести работу с выданным ему растительным объектом.

Провести анализ на основе нормативно – технической документации – фармакопея и утвержденные ВФС, ФС, ВАНД и АНД.

Методические инструкции: нужно оценить известные способы выделения комплекса биологически активных веществ получить и определить на основании методик Фармакопеи качественный состав и количественное содержание основных групп веществ.

Студент должен провести фитохимическое определения выданного ему сырья, для полученного фитопрепарата провести определение качественного состава и количественного содержания основных групп БАВ.

Необходимо также определить показатели доброкачественности сырья: влажность, общая и сульфатная зола, зола нерастворимая в 10% хлороводородной кислоте и сравнить с приведенными значениями.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1-2

Определение влажности растительного сырья

Под влажностью сырья понимают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в сырье при высушивании до постоянной массы.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц около 10 мм, перемешивают и берут две навески массой 3-5 г, взвешанные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску помещают в предварительно высушенный и взвешенный вместе с крышкой бюкс и ставят в нагретый до 100-105⁰С сушильный шкаф. Время высушивания отсчитывают с того момента, когда температура в сушильном шкафу вносью достигнет 100-105⁰С. Первое взвешивание листьев, трав и цветков проводят через 2 часа, корней, корневищ, коры, плодов, семян и других видов сырья – через 3 часа. Высушивание проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями

после 30 минут высушивания и 30 минут охлаждения в эксикаторе не превышает 0,01 г.

Определение потери в массе при высушивании для пересчета количества действующих веществ и золы на абсолютно сухое сырье проводят в навесках 1-2 г (точная навеска), взятых из аналитической пробы, предназначенной для определения содержания золы и действующих веществ вышеописанным методом, но при разнице между взвешиваниями, не превышающей 0,0005 г.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле:

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

где А – масса сырья до высушивания, г; В – масса сырья после высушивания, г.

Одной важной частью фитохимического исследования является определение макро- и микроэлементного состава общей золы растительного сырья.

Макро- и микроэлементы и их роль в организме

Калий и натрий играют ведущую роль в регулировании водно-солевого баланса и кислотно-щелочного равновесия организма. 98% всего калия, содержащегося в человеческом организме, находится внутри клеток, в то время как 50% всего натрия - во внеклеточной жидкости.

Железо является важнейшим микроэлементом, принимает участие в дыхании, кроветворении, иммунобиологических и окислительно-восстановительных реакциях, входит в состав более 100 ферментов. Железо является незаменимой составной частью гемоглобина и миогемоглобина. Оно входит в состав важнейших ферментов антиоксидантной защиты клеток (каталазы, пероксидазы) и ферментов системы обезвреживания чужеродных веществ в печени (цитохромов Р-450).

Магний участвует во многих процессах, происходящих в организме - в выработке энергии, усвоении глюкозы, передаче нервного сигнала, синтезе белков, построении костной ткани, регуляции расслабления и напряжения сосудов и мышц. Он оказывает успокаивающее действие, снижая возбудимость нервной системы и усиливая процессы торможения в коре головного мозга, выступает как противоаллергический и противовоспалительный фактор, защищает организм от инфекции, участвуя в выработке антител, играет значительную роль в процессах свертываемости крови, регуляции работы кишечника, мочевого пузыря и предстательной железы.

Кальций играет огромную роль в жизнедеятельности человеческого организма. В организме человека содержится 1000-1200 г кальция, 99% - включено в костную ткань, дентин, эмаль зубов, а 1% играет исключительно важную роль как внутриклеточный кальций, кальций крови и тканевой жидкости, то есть играет важнейшую роль в формировании костей. Кальций

участвует в процессах передачи нервных импульсов, обеспечивает равновесие между процессами возбуждения и торможения в коре головного мозга, участвует в регуляции сократимости скелетных мышц и мышцы сердца, влияет на кислотно-щелочное равновесие организма, активность ряда ферментов.

Фосфор относится к жизненно необходимым веществам, он входит в состав всех тканей организма, особенно мышц и мозга, участвует во всех видах обмена веществ, необходим для нормального функционирования нервной системы, сердечной мышцы и т. д. В тканях организма и пищевых продуктах фосфор содержится в виде фосфорной кислоты и органических соединений фосфорной кислоты (фосфатов). Основная его масса находится в костной ткани в виде фосфата кальция, остальной фосфор входит в состав мягких тканей и жидкостей. Фосфорная кислота участвует в построении молекул многих ферментов, нуклеиновых кислот и т. д.

Медь. Биологическая роль связана с участием в построении ряда ферментов и белков. Медь способствует росту и развитию, участвует в кроветворении, иммунных реакциях, тканевом дыхании. Медь входит в структуру цитохромоксидазы - терминального фермента дыхательной цепи митохондрий и, следовательно, необходима для процессов генерации энергии в клетке. Медь играет важную роль в антиоксидантной защите организма, т.к. вместе с цинком входит в структуру тканевого антиоксидантного фермента - супероксиддисмутазы и антиоксидантного белка плазмы крови - церрулоплазмينا, который является переносчиком этого металла. Медь обладает противовоспалительными и антисептическими свойствами (возможно, за счет антиоксидантного действия). Регулирует обмен катехоламинов, серотонина, тирозина, меланина, способствует повышению активности инсулина и более полной утилизации углеводов.

Марганец влияет на развитие скелета, участвуя в процессе остеогенеза, а поэтому необходим для нормального роста. Марганец участвует в реакциях иммунитета, в кроветворении и тканевом дыхании, поддерживает репродуктивные функции, участвует в регуляции углеводного и липидного обмена.

Цинк входит в структуру активного центра нескольких сотен металлоферментов. Он необходим для функционирования ДНК- и РНК-полимераз, контролирующих процессы передачи наследственной информации и биосинтез белков, а тем самым и репаративные процессы в организме; а также фермента ключевой реакции биосинтеза гема, который входит в структуру гемоглобина, цитохромов дыхательных цепей митохондрий, цитохрома P-450, каталазы и миелопероксидазы. Цинк входит в структуру ключевого антиоксидантного фермента - (Zn, Cu) - супероксиддисмутазы и индуцирует биосинтез защитных белков клетки - металлотионеинов, в силу чего цинк является антиоксидантом репаративного действия.

Кобальт стимулирует процесс кроветворения, участвует в синтезе белков, в том числе ферментных, регулирует углеводный обмен, влияя на

обмен веществ. Но важнейшая роль кобальта состоит в эндогенном синтезе витамина В12 (цианокобаламина).

Молибден главным образом входит в состав ферментов, влияя на рост, принимает участие в обмене азота, оказывает влияние на обмен меди. Молибден выполняет в организме следующие функции: способствует метаболизму белков, жиров и углеводов; нормализует половую функцию (способствует профилактике развития импотенции); стимулирует рост (активирует ряд ферментов, необходимых для развития и роста организма); входит в состав ряда ферментов необходимых для работы организма; укрепляет зубную ткань (задерживает фтор в организме, защищая зубы от разрушения и способствуя профилактике кариеса); ускоряет распад пуринов и выводит из организма мочевую кислоту (способствует профилактике развития подагры); важный компонент тканевого дыхания; участвует в синтезе аминокислот; влияет на состав крови (помогает вырабатывать гемоглобин); участвует в синтезе витамина С; влияет на обмен витаминов С, В₁₂ и Е; предотвращает анемию (улучшает усвоение и утилизацию железа); выступает как антиоксидантный фактор (влияет на распад сульфидов и алкоголя); влияет на количественный и качественный состав микрофлоры кишечника.

Никель участвует в стимулировании процессов кроветворения, активации некоторых ферментов. Он обладает высокой способностью усиливать окислительно-восстановительные процессы в тканях. Никель в сочетании с кобальтом, железом, медью участвует в процессах кроветворения, а самостоятельно - в обмене жиров, обеспечении клеток кислородом. В определенных дозах он активизирует действие инсулина.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2-5

Определение общей золы

Около 1 г препарата или 3-5 г измельченного лекарственного растительного сырья (точная навеска) помещают в предварительно прокаленный и точно взвешанный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, равномерно распределяя вещество по дну тигля. Затем тигель осторожно нагревают, давая сначала веществу сгореть или улетучиться при возможно более низкой температуре. Сжигание оставшихся частиц угля надо тоже вести при возможно более низкой температуре; после того как уголь сгорит почти полностью, увеличивают пламя.

При неполном сгорании частиц угля остаток охлаждают, смачивают водой или насыщенным раствором аммония нитрата, выпаривают на водяной бане и остаток прокаливают. В случае необходимости такую операцию повторяют несколько раз.

Прокаливание ведут при слабом красном калении (около 500⁰С) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания со стенками тигля.

По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Общую золу (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{M_2 \times 100 \times 100}{M_1 \times (100 - W)}$$

где, M_2 – масса золы, г; M_1 – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, % .

Определение сульфатной золы

Точную навеску препарата (около 1 г, если в соответствующей статье нет других указаний) помещают в предварительно прокаленный и точно взвешанный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, смачивают 1 мл концентрированной серной кислоты и осторожно нагревают на сетке или песчанной бане до удаления паров серной кислоты. Затем прокаливают при слабом калении (около 500⁰С) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

В случае трудного сгорания прибавление концентрированной серной кислоты и прокаливание повторяют.

Определение золы нерастворимой в хлороводородной кислоте

К остатку в тигле, полученному после сжигания препарата или лекарственного растительного сырья, прибавляют 15 мл 10% раствора хлористоводородной кислоты, тигель накрывают часовым стеклом и нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. К содержимому тигля прибавляют 5 мл горячей воды, обмывая ею часовое стекло. Жидкость фильтруют через беззольный фильтр, перенося на него остаток с помощью горячей воды. Фильтр с остатком промывают горячей водой до отрицательной реакции на хлориды в промывной воде, переносят его в тот же тигель, высушивают и сжигают, прокаливают, как указано выше и взвешивают.

Примечание: Определение сульфатной золы проводят по методике Государственной Фармакопеи.

Экстракция веществ растворителями очень сильно зависит от природы растительного сырья. Экстракцию биологически активных веществ осуществляют разнополярными растворителями: водой, водным спиртом, водным ацетоном, хлороформом и другими растворителями. Нужно учитывать природу биологически активных веществ и растворителя. Поэтому определение экстрактивных веществ из растительного сырья является одним из важнейших вопросов химии природных соединений.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье

Определение экстрактивных веществ в сырье проводят в случае отсутствия в нормативно-технической документации метода количественного определения действующих веществ.

Около 1 г. Измельченного сырья (точная навеска), просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200-250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей нормативно-технической документации на лекарственное растительное сырье, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью $\pm 0,01$ г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150-200 мл. 25 мл фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре 100-105⁰С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7-9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушат при температуре 100-105⁰С до постоянной массы, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится безводный хлорид кальция и немедленно взвешивают. Содержание экстрактивных веществ в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \times 200 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}$$

где, m – масса сухого остатка, г; m₁ – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7

Качественная оценка осуществляется методами одно- и двумерной хроматографии.

Для определения вещества важным является определение значения R_f. Определение значения R_f это отношение расстояния от центра пятна до точки нанесения к расстоянию от точки нанесения до фронта растворителя.

Для бумажной хроматографии используются следующие системы растворителей

1. Бутанол: уксусная кислота: вода (БУВ) (40:12,5:29)
2. Бутанол: уксусная кислота: вода (БУВ) (4:1:5)

3. 2% уксусная кислота
4. 15% уксусная кислота
5. Бутанол: уксусная кислота: вода (6:7:3) + 0,01г нингидрин
6. ЭА: Нас: вода (5:3:2)
7. Бензол: уксусная кислота: вода (6:7:3)
8. Бутанол: уксусная кислота: вода (6:7:3)
9. толуол
10. петролейный эфир, насыщенный метанолом
11. петролейный эфир
12. бензол-ацетон-вода (4:1:2)
13. толуол-этилацетат (8:2)
14. бензол-ацетон (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9)
15. хлороформ-этилацетат (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9)

Проявители для бумажной хроматографии

1. *Пары аммиака (С=О);*
2. *1% водно-спиртовой раствор хлорида алюминия (все типы полифенольных соединений с тремя рядовыми ОН-группами или сочетанием окси- и карбонильной групп);*
3. *Диазотированный п-нитроанилин (ДзПНА) (на свободные о- и п-положения относительно ОН-групп); готовят 0,3% раствор п-нитроанилина в 8% соляной кислоте, прибавляют несколько капель 5% нитрита натрия и перемешивают. Хроматограмму опрыскивают приготовленным проявителем, высушивают при комнатной температуре, потом обрабатывают 20% раствором карбоната натрия;*
4. *1% водный или водно-спиртовой раствор железно-аммониевых квасцов (ЖАК) (орто-диоксигруппировка любых фенольных соединений, 3-рядовое расположение ОН-фенольных соединений, дубильные вещества);*
5. *о-толуидиновый проявитель: в 10 мл 96% этилового спирта растворяют 0,4 г салициловой кислоты и 0,5 мл свежеперегнанного о-толуидина. Равномерно увлажненная хроматограмма высушивается на воздухе, нагревается 5 мин при 105°C. (альдозы, восстанавливающие сахара);*
6. *0,3% спиртовой или ацетоновый раствор нингидрина (аминокислоты, аминсахара, алкалоиды, амины);*
7. *1% раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте (любые фенольные соединения, флаван – 3,4-диолы, эфиры катехинов, галлокатехины, катехины, дубильные вещества);*
8. *1% водно-спиртовой раствор хлорида железа (III) (все фенольные соединения и кислоты);*
9. *10% водный раствор натра едкого (оксиантрахиноны);*
10. *реактив Драгендорфа (стероидные алкалоиды, кислые соли алкалоидов, кумарины);*
11. *3% спиртовой раствор магния ацетата (1,6-; 1,8-; 1,2-; 1,4-диоксиантрахиноны);*

12. *0.5 н спиртовый раствор калия гидроксида* (димерные формы антрахинонов и флавоноидов, окси-(метокси-)кумарины, фурукумарины);
13. *0.1 н раствор натрия гидроксида* (тритерпеновые сапонины, стероидные сапонины);
14. *калий перманганат* (соединения с ненасыщенными связями);
15. *10% раствор калия едкого в метаноле* (кумарины);
16. *2% раствор ацетата свинца* (все фенольные соединения с орто-диоксигруппировкой, дубильные вещества);
17. *2% раствор бензохинона* (пара-диоксигруппировка полифенолов).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

Органические кислоты

Органические кислоты разных групп одновременно могут быть в составе многих растений. Они находятся в клеточном соке и присутствуют во всех органах, особенно много их в листьях и незрелых плодах.

Наиболее распространены: уксусная (начало «ацетатного пути биосинтеза многих других соединений), муравьиная, масляная, щавелевая, яблочная, винная, валериановая и изовалериановая, лимонная кислоты.

Наряду с одно-, двух-, трехосновными карбоновыми и оксикислотами, во многих растениях содержатся amino-, феноло-, ароматические и «лишайниковые» кислоты.

Являясь обязательной составной частью растений, они в большем или меньшем количестве извлекаются полярными растворителями и переходят в состав многих фитопрепаратов (настоев, настоек, экстрактов, сиропов, соков, субстанций, извлечений).

Не все кислоты имеют самостоятельное значение как биологически активные вещества, но дополняют, или усиливают биоактивность и биодоступность других веществ растений.

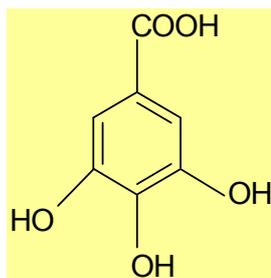
Определение содержания свободных органических кислот

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. 25 г измельченных плодов помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 200 мл воды и выдерживают в течение 2-х часов на кипящей водяной бане, затем охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают. Отбирают 10 мл извлечения, помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200-300 мл свежeproкипяченной воды, 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина, 2 мл 0,1% раствора метиленового синего и титруют раствором натрия едкого (0,1 моль/л) до появления в пене лилово-красной окраски.

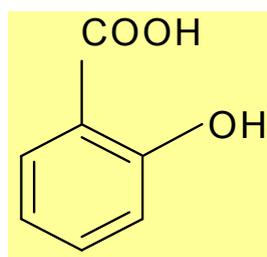
Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0.0067 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 10 \times (100 - W)}$$

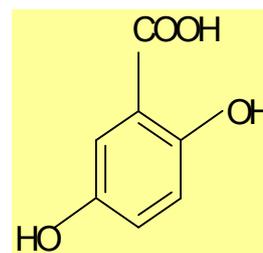
где: 0,0067г – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл раствора натрия едкого (0,1 моль/л), г;
 V- объем раствора натрия едкого (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, мл;
 m- масса сырья, г;
 W- потеря в массе пр высушивании, %



Галловая кислота



Салициловая кислота



Гентизиновая кислота

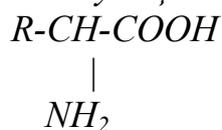
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

Аминокислоты

Аминокислоты – это вещества первичного синтеза, они присутствуют во всех органах всех растений.

В зависимости от взаимного расположения amino- и карбоксигрупп различают α,β,γ,σ и другие аминокислоты, из них наиболее распространены α,β и γ.

Общая формула аминокислот следующая:



где, R- радикал алифатического или ароматического ряда

α-аминокислоты L-конфигурации – важнейшие составные части пептидов и белков. Кроме того, в растениях могут быть одноосновные диамино- и двухосновные моноаминокислоты.

Все аминокислоты растворимы в кислых и щелочных растворах из-за образования солей (около изоэлектрической точки растворимость ничтожна мала), в спиртах, водно-органических растворителях.

Фотометрическое определение аминокислот

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика используют доминирующую в составе сырья аминокислоту или

смесь равных количеств нескольких аминокислот (фенилаланин, аспарагин, пролин, глутаминовая) в мерной колбе на 100 мл. Цвет должен совпадать по окраске анализируемого образца с нингидриновым реактивом.

Для каждого анализа берут по 10 мл стандартного раствора добавляли 10 мл нингидринового реактива, нагревали в течение 15 мин при температуре бани 80-85⁰С и охлаждают. Для построения калибровочного графика в ряд колб помещают по 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,0.5 и т.д. (до 0,8) мл окрашенного раствора стандартного образца, объемы в колбах доводят до 50 мл и измеряют оптическую плотность.

Нингидриновый реактив: 4 г нингидрина, 150 мл диоксана, 50 мл ацетатного буфера (рН 5,0) и 76 мг хлорида олова.

Ацетатный буфер: 7 частей 0,2М раствора ацетата натрия (2,72 г ацетата натрия в 100 мл воды) плюс 3 части 0,2 М раствора уксусной кислоты (58,5 мл уксусной кислоты до 1 л воды).

Определение суммы аминокислот в сырье. 1 г сырья настаивали в 20 мл воды в течение 24 часов пр комнатной температуре. К отфильтрованному экстракту (10 мл) добавляюь 10 мл нингидринового реактива, затем реакцию проводят по методике, описанной выше. После этого из реакционной смеси берут 2 мл раствора и разбавляют водой до 50 мл. Плотность полученного раствора измеряют на ФЭКе при длине волны 540 нм в кювете 10 мм со светофильтром №9. В качестве контрольного раствора используют воду с нингидриновым реактивом. Затем по калибровочному графику определяют количество аминокислот в пробе.

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

$$X = \frac{C \times 50 \times 25 \times 100}{V \times 10 \times W}$$

где: С – концентрация аминокислот, найденная по калибровочному графику, мг;

V- количество экстракта, взятое на определение, мл;

W- потеря в массе пр высушивании, %

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10 -12

Фенолы

Все содержащиеся в лекарственных растениях фенолы образуются из углеводов и продуктов их превращения. По числу ОН-групп определяется атомность фенолов. В растениях преобладают 2-х и 3-х атомные фенолы.

Все фенолы – кислоты, растворимы в воде и вдно-органических смесях, спиртах, ацетоне.

Количественное определение фенолов в растительном сырье

Около 1 г мелко измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл и добавляют 30 мл этилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают при умеренном кипении на кипящей водяной бане. После охлаждения экстракт сливают через складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют в тех же условиях. Экстракт в колбе доводят до метки тем же растворителем.

Аликвотную часть полученного экстракта (0,1-05 мл) доводят водой до 7 мл в градуированной пробирке с притертой пробкой. Смесь хорошо перемешивают и добавляют 0,5 мл реактива Фолина-Дениса. После перемешивания в течение 3 мин добавляют 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия и смесь хорошо перемешивают, оставляют на 40 мин.

Затем измеряют оптическую плотность в кювете 1 см при 725 нм.

В качестве контроля используют воду с реагентом (9,5 мл+0,5 мл реагента).

Расчет проводят по калибровочной кривой, построенной для известного фенола (пирокатехин), М 110; концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л или 1,10 мг в 100 мл воды (0,5;1,0;1,5;2,0;2,5;3,0 мл).

Реактив Фолина-Дениса: 100 г $\text{NaWO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 г фосфорномолибденовой кислоты и 750 мл воды, кипятят 2 часа в колбе с обратным холодильником и доводят объем до 1000 мл.

Количественное определение полифенолов

Около 1 г (точная навеска) содержимого капсул (драже, таблеток) или 2 г измельченного растительного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной и кипятят на водяной бане в течение 2 часов.

Смесь охлаждают и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой очищенной до метки, перемешивают. [5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем водой очищенной до метки, перемешивают]*

5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл раствора кислоты вольфраматофосфорной, доводят объем 15% раствором натрия карбоната до метки, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора через 2-3 мин после прибавления последнего реактива при длине волны 715 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Параллельно измеряют оптическую плотность СО пирогаллола, точно через 2 минуты после прибавления последнего реактива и в течение 15 минут после растворения пирогаллола.

Содержание суммы полифенолов, в пересчете на пирогаллол, в процентах (X) вычисляют по – формуле:

$$\frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot [25] \cdot 50 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 100 \cdot [100]}{D_0 \cdot m_1 \cdot [5] \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot [(100 - W)]}$$

где: D_1 – оптическая плотность анализируемого раствора при длине волны 715 нм;

D_0 – оптическая плотность раствора СО пирогаллола при длине волны 715 нм;

m_1 – масса измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного средства, г;

m_0 – масса навески СО пирогаллола – 0.0500 г;

W- потеря в массе при высушивании, %

**при необходимости разбавляют испытуемый раствор*

Приготовление раствора СО пирогаллола: 0,05 г (точная навеска) пирогаллола высшей очистки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают.

5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают.

5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл раствора кислоты вольфраматофосфорной, перемешивают, доводят объем до метки 15% раствором натрия карбоната, перемешивают.

Раствор готовят в защищенном от света месте!

Приготовление раствора кислоты вольфраматофосфорной: К 10 г натрия вольфрамата прибавляют 8 мл кислоты фосфорной 85%, 75 мл воды очищенной и нагревают в течение 3 часов с воздушным холодильником. Затем охлаждают и доводят объем водой очищенной до 100 мл, перемешивают.

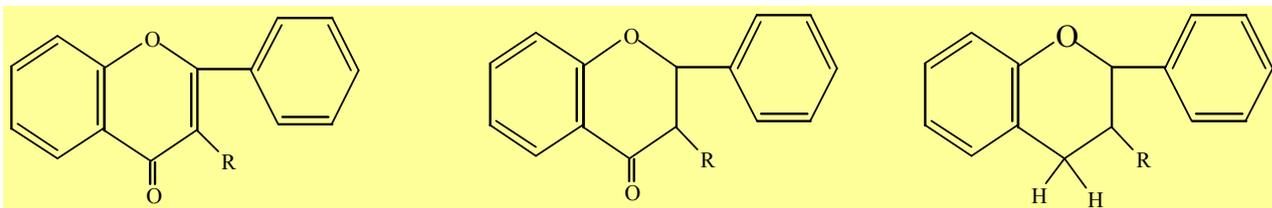
В качестве СО может быть использован любой фенол или фенолокислота, аналогичные содержащимся в сырье.

Флавоноиды

Флавоноиды относятся к одной из самых распространенных групп природных соединений. Большинство из них находятся в растениях в виде гликозидов, многообразие которых обусловлено не только положением и большим набором сахаров, но и различием в величине окисных циклов, а также конфигурацией гликозидных связей.

Процесс извлечения флавоноидов можно сочетать с гидролизом гликозидных форм хлороводородной или серной кислотами при нагревании. Метод избирательной экстракции заключается в извлечении флавоноидов из растительного сырья различными растворителями в определенной последовательности. С помощью низкокипящего петролейного эфира и четыреххлористого углерода вначале добиваются обезжиривания сырья, удаления воскообразных и смолистых веществ. Затем, для выделения флавоноидов проводят экстракцию растительного сырья спиртами,

ацетоном и их разнопроцентными водными растворами. Полученное извлечение упаривают, к остатку добавляют горячую воду и удаляют неполярные соединения (хлорофилл, жирные масла, эфирные масла) хлороформом или четыреххлористым углеродом. Флавоноиды из водной фазы извлекают последовательно эфиром (агликоны), этилацетатом (монозиды) и бутанолом (биозиды, триозиды и т.д.).



R=H флаворин
R=OH флаворинол

R=H флаванон
R=OH флаванонол

R=H флаван
R=OH флаванол

Количественное определение флавоноидов (в пересчете на кверцетин)

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90% спирта, содержащего 1% концентрированной кислоты хлороводородной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Извлечения объединяют, фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, промывают фильтр 90% спиртом и доводят объем фильтрата 90% спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 1 мл 1% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 мин 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 до метки 95% спиртом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

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

где,

D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны

430 нм;

764.6 – удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с 1% раствором алюминия хлорида при длине волны 430 нм;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13-15

Студенту необходимо отработать методы получения биологически активаного комплекса (настойка, отвар, масляный экстракт) из растительного лекарственного сырья, определить качественный состав основных групп БАВ.

Получение отваров из растительного сырья

5 грамм растительного сырья помещают в круглодонную колбу, заливают 25 и 50 мл дистиллированной водой и кипятят на водяной бане при температуре 80-85⁰С, в течение 10, 20, 30 минут, получая при этом 6 проб – экстрактов. Экстракты охлаждают, фильтруют, определяют значение рН-среды.

Качественный состав отваров определяют методом одно- и двумерной бумажной хроматографией.

Таким образом, определяют наиболее оптимальное время приготовления отваров, при котором переходит большее количество БАВ в экстракт.

Примечание: Для приготовления настоек можно использовать 5-10% этиловый спирт.

Нужно рассмотреть различные способы получения основного биологически активаного комплекса из растительного сырья и определить состав БАВ. Студент должен обосновать выбранные и отработанные параметры.

Получение настоев из растительного сырья

1 грамм растительного сырья заливают раствором водного спирта (разной процентности) и настаивают при комнатной температуре в течение определнного времени (несколько суток, недель). Таким образом, можно получить 4 настоя. Затем, полученные экстракты отфильтровывают.

Качественный состав настоев определяют методом одно- и двумерной бумажной хроматографией.

Таким образом, определяют наиболее оптимальное время приготовления настоев, при котором переходит большее количество БАВ в экстракт.

Приготовление масляных экстрактов из ягод облепихи, шиповника

10 грамм хорошо очищенных ягод облепихи заливают 25, 50 мл (чистое масло, не содержащее холестерина) и нагревают на водяной бане в течение 2 – 3 часов при температуре 70-80⁰С, получа при этом 4 масляных экстракта. Затем масляные экстракты охлаждают, фильтруют, качественный состав определяют ВЭЖХ.

Студент должен сам подобрать соотношение систем растворителей для ВЭЖХ.

Таким образом, можно определить наиболее оптимальное время получения масляных экстрактов.

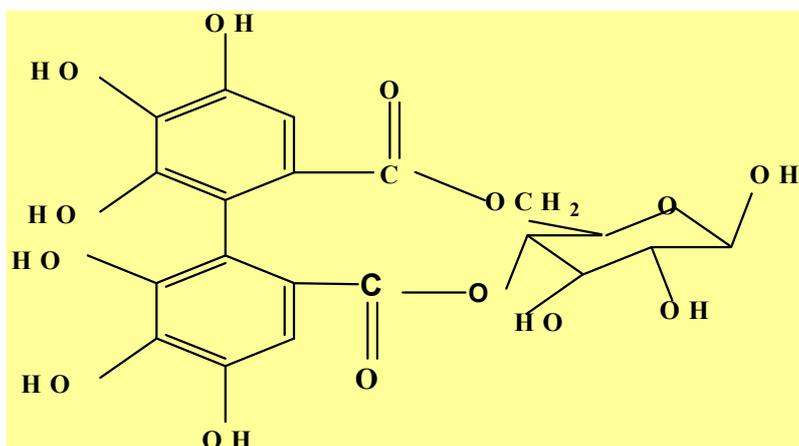
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16

Дубильные вещества

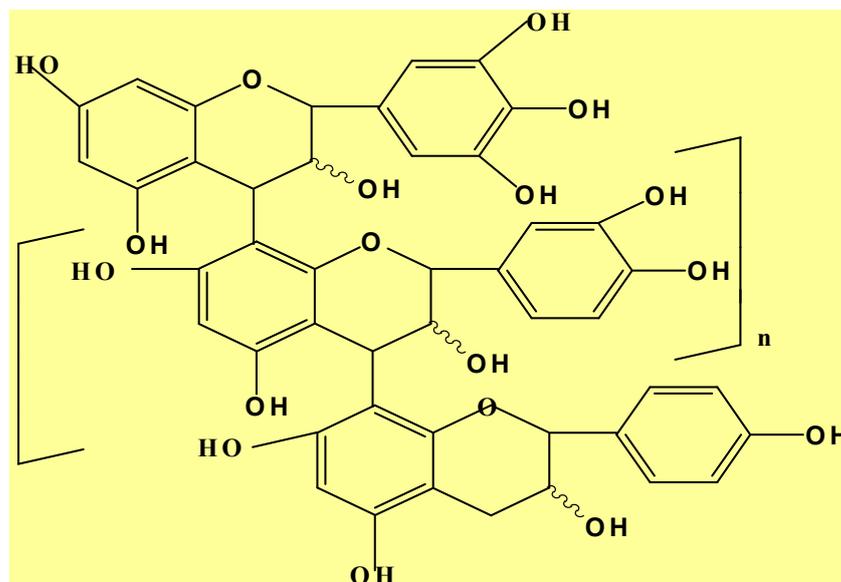
Под термином «дубильные вещества» понимают специфическое «дубящее» действие органических веществ, чаще всего полифенольной природы.

Практически во всех растениях содержатся дубильные вещества гидролизуемого и конденсированного или смешанного типов.

Гидролизуемые дубильные вещества – сложные эфиры на основе углеводов и фенолокислот. В качестве углеводного фрагмента чаще других описана глюкоза, из фенолокислот – галловая (галлотанины), эллаговая (эллаготанины) и др. кислоты.



Конденсированные дубильные вещества – ди-, три-, Тетра-, пента... поли –С-О-С или С-С продукты конденсации гомо- или гетерофлавоноидов различной степени окисленности.



Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито диаметром 3 мм помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой воды до кипения и кипятят с обратным холодильником на электроплитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают 100 мл в коническую колбу вместимостью 200-250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Затем отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл индигокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотистого цвета.

Параллельно проводят контрольный опыт. 1 мл раствора перманганата калия соответствует 0,004157 г дубильным веществам в пересчете на танин.

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

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

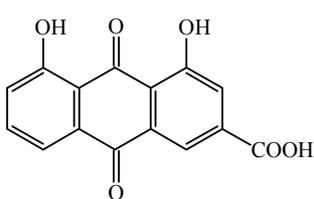
- где: V_1 – объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л) израсходованного на титрование извлечения, мл;
 V_2 – объем раствора перманганата калия израсходованного на титрование в контрольном опыте;
 m – масса
 250 – общий объем извлечения, мл;
 25 – объем извлечения, взятого на титрование, мл;
 W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17

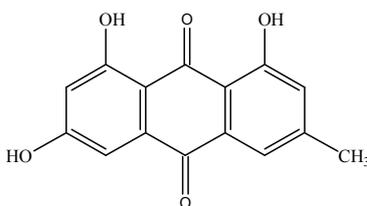
Антрахиноны

Антраценовыми называют группу природных веществ, содержащих три конденсированных кольца, общей формулы $C_6-C_2-C_6$.

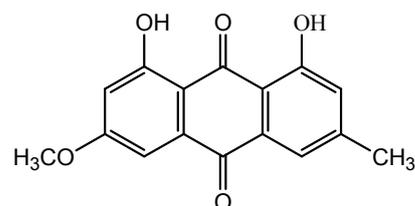
Различают окисленные, восстановленные и конденсированные производные антрахинонов, ниже представлены некоторые примеры структур:



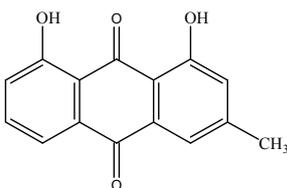
реин



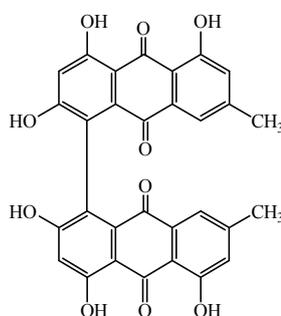
ЭМОДИН



фисцион



хризофановая кислота



5,5' - диэмодин

Все они могут содержать в качестве заместителей OH , OCH_3 , $C(O)H$, $COOH$, радикалы от C_1 до C_5 , углеводные фрагменты.

В зависимости от характера заместителей, они растворяются в неполярных (агликоны) и полярных растворителях при нагревании.

Восстановленные формы окисляются, особенно при нагревании, до соответствующих окисленных форм. За счет образования фенолятов, они хорошо растворимы в щелочах.

Количественное определение антрахинонов

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом 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, перемешивают.

Измеряют оптическую 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 вычисляют по формуле:

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

где,

C – содержание производных антрахинона в 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, в граммах;

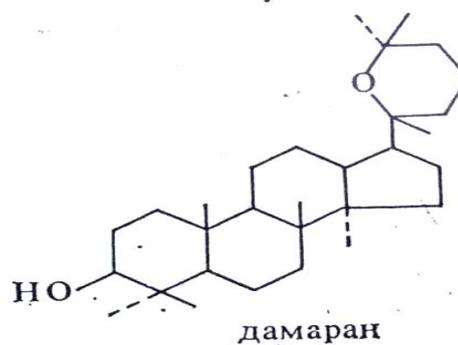
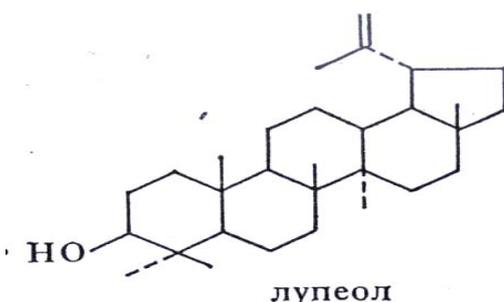
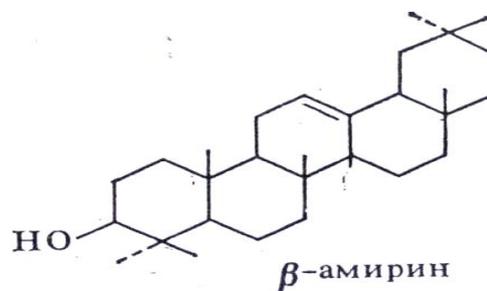
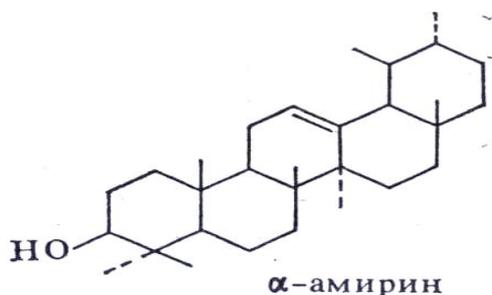
m – масса навески сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18

Сапонины

Сапонины – вещества, обладающие значительной поверхностной активностью, что связано с наличием в одной молекуле гидрофильного и гидрофобного остатка. Сапонины делят на 2 группы – нейтральные (стероидный тип легко растворимы в воде и кислые (тритерпеновые) трудно растворимы в воде, легко – в растворах щелочей.



Количественное определение сапонинов

Около 2 г измельченного сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 2 мм (Отточная навеска), помещают в колбу с нормальным шлифом

емкостью 150 мл, прибавляют 20 мл 3% ацетонового раствора азотной кислоты и настаивают в течение 1 часа при частом и сильном взбалтывании.

Извлечение отфильтровывают в цилиндр емкостью 100 мл. Порошок корня в колбе промывают 10 мл ацетона и фильтруют через тот же фильтр. В колбу с сырьем приливают еще 20 мл ацетона, которым одновременно смывают порошок с фильтра и смесь кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 5 мин.

Извлечение отфильтровывают через тот же фильтр в тот же цилиндр. Экстракцию горячим ацетоном повторяют, таким образом, еще 2 раза. Порошок корня промывают ацетоном до тех пор, пока объем жидкости в цилиндре не достигнет 100 мл. Жидкость из цилиндра выливают в стакан емкостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 40 мл этилового спирта, который выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном перемешивании добавляют аммиак (концентрированный) до появления светло-желтого творожистого осадка (рН 8,3-8,9 устанавливается по порозовению влажной фенолфталеиновой бумаги).

Осадок вместе с маточной жидкостью переносят на фильтр, помещенный в воронку Бюхнера, жидкость отсасывают. Стакан и фильтр с осадком промывают 50 мл ацетона в 3-4 приема. Осадок с фильтра переносят в стакан, в котором проводилось осаждение, и растворяют в 50 мл воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 250 мл. Фильтр несколько раз промывают небольшими порциями воды, присоединяя их к основному раствору. Доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

30 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 500 мл и доводят объем раствора до метки водой (раствор Б).

Определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, применяя в качестве контрольного раствора воду.

Процентное содержание глицирризиновой кислоты (X), в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 822 \times 250 \times 500 \times 100}{m \times V \times 1000 \times 11000}$$

где: D – оптическая плотность раствора Б;

m – масса сырья, г;

V – объем раствора А, использованного для приготовления раствора Б, мл;

822 – молекулярная масса глицирризиновой кислоты;

1100 – молекулярный показатель поглощения.

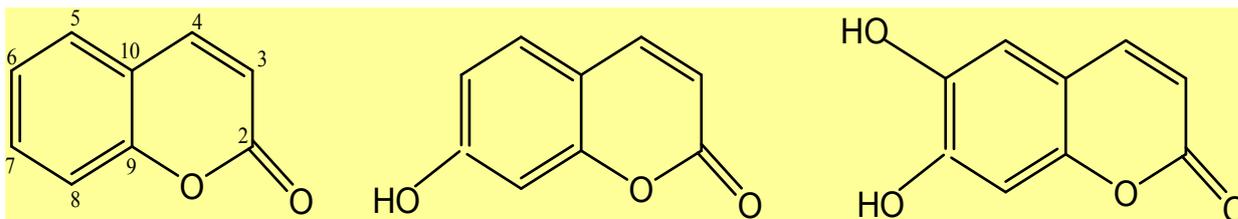
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №19

Кумарины

Спутником кумаринов в растениях являются оксикоричные кислоты, из которых они образуются в процессе биогенеза.

В основе разнообразия кумаринов лежит бензольное и пирановое кольцо, составляющие скелет любого кумарина.

В растениях чаще всего присутствуют кумарин, его оксипроизводные, фууро-, пиранокумарины и гликозидированные формы.



Кумарин

Умбеллиферон

Эскулетин

Количественное определение кумаринов

Около 2г 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:

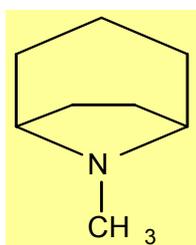
$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot [50] \cdot 100 \cdot 100}{734 \cdot 20 \cdot m \cdot [5] \cdot (100 - W)}$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 272 нм;
734 – удельный показатель поглощения СО кумарина при длине волны 272 нм;
 m – масса навески сырья, г;
 W – потеря в масее при высушивании сырья, %.

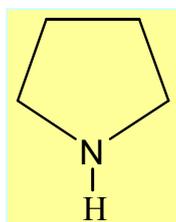
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №20

Алкалоиды

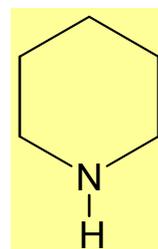
К алкалоидам принято относить азотсодержащие органические вещества основного характера, обладающие определенной физиологической активностью. Свое название эти вещества получили от латинского *alkali* (щелочь), хотя и не все алкалоиды имеют щелочной характер, например, четвертичные соли, слабоосновные или даже кислого характера азотистые гетероциклы. Структура алкалоидов очень разнообразна – от довольно простых алкилароматических аминов (эфедрин) до очень сложных конденсированных систем, в структуре которых содержится от 1 до 4-х атомов азота, многие из которых присущи только данному конкретному алкалоиду или небольшой их группе (резерпин, стрихнин, морфин, соласодин). Алкалоиды – основания, легко растворимые в спирте, эфире, хлороформе, дихлорэтане. Алкалоиды-соли не растворимы в органических растворителях, кроме спирта.



Тропан



Пирролидин



Пиперидин

Количественное определение алкалоидов в растительном сырье

Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлороформа или этилацетата, 5 мл концентрированного раствора аммиака, закрывают пробкой и встряхивают на вибрационном аппарате в течение 2 часов или оставляют при комнатной температуре на 15 часов, после чего встряхивают еще 30 минут.

Хлороформное извлечение фильтруют через вату. 50 мл фильтрата переносят в колбу вместимостью 100 мл и хлороформ отгоняют до объема 1-2 мл. Оставшийся хлороформ удаляют продуванием воздуха. К остатку прибавляют пипеткой 2 мл раствора едкого натра (0,1 моль/л) и растирают палочкой до полного исчезновения комочков, затем прибавляют пипеткой 8 мл воды и перемешивают 2-3 мин. К содержимому прибавляют пипеткой 10 мл раствора кислоты хлороводородной (0,1 моль/л), осторожно

перемешивают и оставляют на 8-10 мин, затем встряхивают на вибрационном встряхивателе 8-10 мин и фильтруют через тройной бумажный фильтр, диаметром 7 см.

10 мл фильтрата переносят в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды, 2 капли раствора метилового красного и оттитровывают избыток кислоты раствором гидроксида натрия (0,01 моль/л) до появления желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. В колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), прибавляют 4 мл воды и 5 мл кислоты хлороводородной (0,2 моль/л), перемешивают, прибавляют 2 капли раствора метилового красного и оттитровывают избыток кислоты раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л) до появления желтого окрашивания.

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

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0244 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}$$

где, 0,0244 – количество алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл раствора кислоты хлороводородной (0,1 моль/л), г;

V_1 – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование контрольного опыта, мл;

V_2 – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование испытуемого раствора, мл;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %

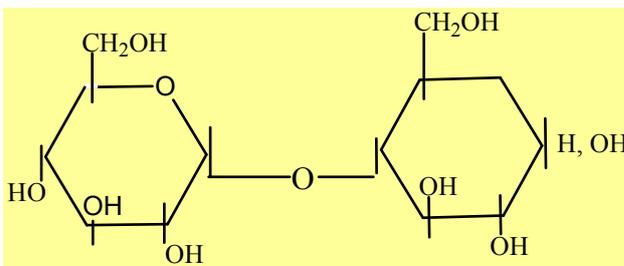
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №21-22

Углеводы присутствуют во всех растениях и извлекаются водой, водными спиртами, другими водно-органическими растворителями при нагревании.

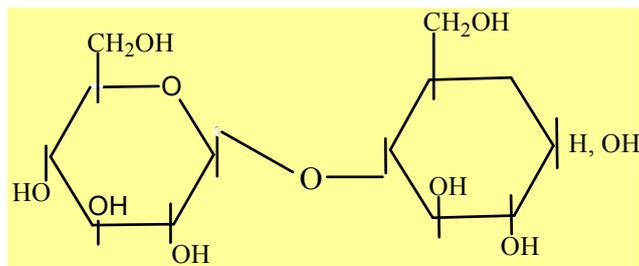
Они могут быть в свободном состоянии или в составе гликозидов. Все углеводы делят на моно- и полисахара.

Полисахариды (гомо-, гетеро-) – высокомолекулярные соединения углеводов. Некоторые из них нерастворимы в воде (клетчатка), другие набухают в теплой воде (крахмал), образуют полужидкие и коллоидные растворы (слизи, пектины, камеди).

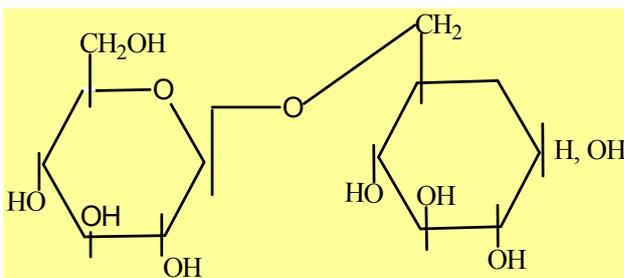
Все полисахариды делят на олиго- (от 2 до 10 углеводных единиц) и высшие полисахара (более 10 углеводных единиц) линейного и разветленного строения.



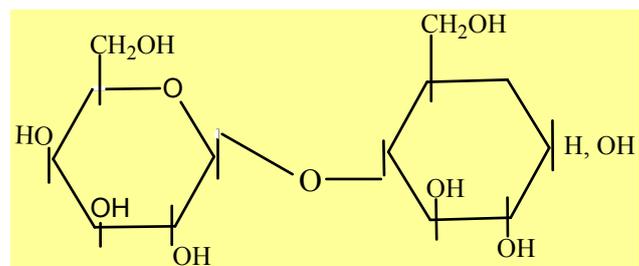
Мальтоза



целлобиоза



Генциобиоза



лактоза.

Количественное определение полисахаридов в растительном сырье

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 в 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 60⁰С 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 100-105⁰С 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, г;

m_2 – масса фильтра с осадком, г;

m – масса навески сырья, г;

W – влажность в массе при высушивании сырья, %

Количественное определение углеводов в растительном сырье

Навеска сырья (точная) около 2 г помещают в мерную колбу на 100 мл. Добавляют 70-80 мл горячей воды и выдерживают колбу на водяной бане при температуре 80-90⁰С в течение 1 часа. Затем колбу охлаждают. Для осаждения белков прибавляют 5 мл 10% ацетата свинца, перемешивают и доводят до метки. Затем отфильтровывают через бумажный фильтр в сухую колбу.

Из полученного фильтрата берут 10 мл и осаждают 100 мл этилового спирта, затем отцентрифугируют. Осадок небольшими порциями воды переносят в мерную колбу на 25 мл, объем в колбе доводят до метки дистиллированной водой, отфильтровывают.

После этого, из полученного фильтрата берут 1 мл, прибавляют 1 мл 5% раствора фенола и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают при помощи палочки с пропеллером, оставляют на 30 мин. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 490 нм.

Построение стандартной кривой: концентрация глюкозы от 1*10⁻⁵ до 6*10⁻⁵ г/мл. К 1 мл раствора прибавляют 1 мл 5% раствора фенола и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают при помощи палочки с пропеллером, оставляют на 30 мин. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 490 нм.

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

$$X = \frac{D * 25 * 100}{490 * 1 * 2 * (100 - W)}$$

где, D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 272 нм;

490 – длина волны;

W – влажность в массе при высушивании сырья, %

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 23-25

Количественное определение витаминов в растительном сырье

Количественное определение аскорбиновой кислоты (витамина С)

20 г неизмельченного или 10 г измельченного растительного сырья заливают 200 мл воды, фильтруют после 1 часа. В колбу объемом 50-100 мл помещают 1 мл фильтрата, прибавляют 1 мл 2% хлороводородной кислоты, 13 мл воды и титруют 0,001 н раствором 2,6- дихлорофенолиндофенолятом натрия до красного окрашивания. 1 мл раствора 0,001 н 2,6-дихлорофенолиндофенолята натрия соответствует 0,000088 г аскорбиновой

кислоте. В случае высокой концентрации при необходимости можно разбавить исследуемый раствор водой.

Содержание аскорбиновой кислоты (X) в процентах вычисляют по формуле:

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

где

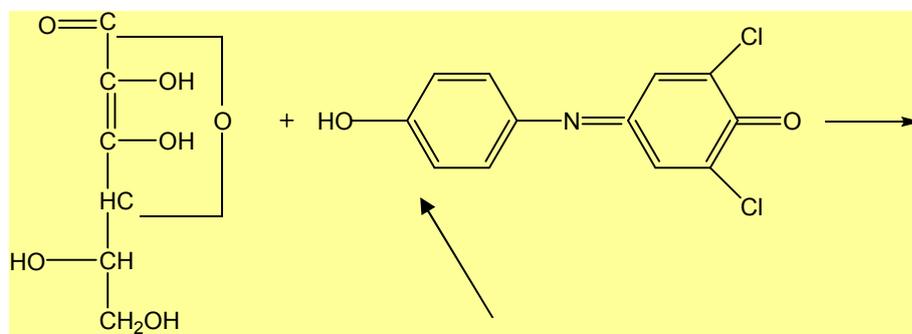
V – объем 2,6- дихлорофенолиндофенолята натрия, мл;

m – масса навески сырья, г;

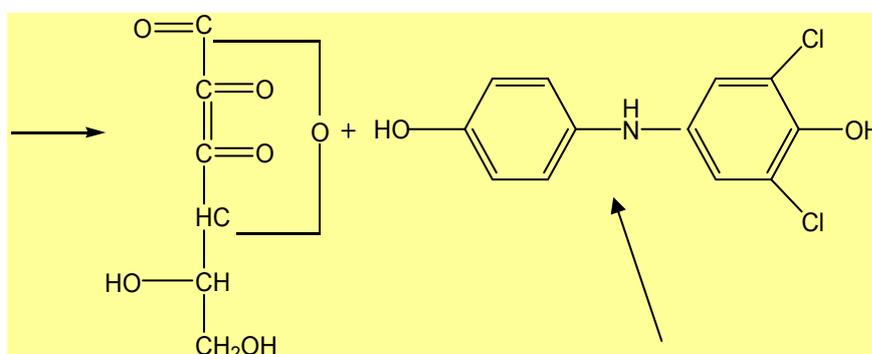
W – влажность в массе при высушивании сырья, %;

0,000088 – постоянная

Реакция с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом.



Зеленый раствор



Образование бесцветного лейконега

Количественное определение рибофлавина

0,06г растительного сырья помещают в колбу на 1000 мл, прибавляют 20 мл ледяной серной кислоты, 500 мл очищенной воды, нагревают на водяной бане, затем охлаждают до комнатной температуре, фильтруют и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Из полученного раствора берут 10 мл фильтрата, помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют 3,5 мл 0,1 моль/л раствора натрия ацетата и доводят объем раствора водой до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание рибофлавина в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 10000}{a \cdot 850}$$

где,

D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 270 нм;

850 – удельный показатель поглощения рибофлавина при длине волны 270 нм;

a – масса навески сырья, г

Количественное определение каротиноидов

Около 5 г (точная навеска) измельченного растительного 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 и 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) вычисляют 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,

D₁ – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 450 нм;

D₀ – оптическая плотность раствора СО калия бихромата при длине волны 450 нм;

0,00208 – количество β-каротина в миллиграммах, в растворе, соответствующем по окраске раствору СО калия бихромата;

m – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %

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.*

Материалы, которые необходимо использовать для подготовки:

- Технологические блок-схемы, растительное сырье, ВФС, производственные лабораторные регламенты;
- Государственная фармакопея СССР: вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11 изд. М:Медицина.-1991;
- Положение о технологических регламентах производства лекарственных средств, выпускаемых фармацевтическими производственными предприятиями РК от N371 от 30.07.97;
- ГОСТ 24027.0-80 Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб;
- ГОСТ 24027.1-80 Сырье лекарственное растительное. Методы определения подлинности, зараженности амбарными вредителями, измельченности и содержание примесей;
- ГОСТ 24027.2-80 Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных, дубильных веществ, Лекарственное растительное сырье – анализ;
- ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная;
- ГОСТ 4204-77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия;
- ГОСТ 17299-78 Спирт этиловый. Технические условия;
- ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;
- ГОСТ 42-3-84 Сырье лекарственное растительное, в порядок установления . сроков годности. Лекарственные растения- Контроль качества.

Учебно-методическая литература:

Основная литература:

1. В.В. Племенков Введение в химию природных соединений, Казань, 2004.
2. Н.А.Тюкавкина, Ю.И.Бауков Биоорганическая химия, Москва.- 2005.
3. Л.С.Майофис Химия и технология химфармпрепаратов, Л.:Медицина, 2001.
4. Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, А.У., Толстиков Р.А. Музыкакина, Природные флавоноиды, Новосибирск, 2008.

5. Б.В.Пассет, В.Я.Воробьева. Технология химфармпрепаратов и антибиотиков, М.:Медицина, 1997.
6. Г.Д.Бердимуратова, Р.А. Музыкакина, Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, А.У. Тулегенова Биологически активные вещества растений, выделение, разделение, анализ. – Алматы: Атамұра. – 2006.
7. Н.А.Султанова, Г.Ш.Бурашева Флавоноиды некоторых галофитов Казахстана.- Алматы.-2007.
8. Л.А.Иванова Технология лекарственных форм, в 2т., М.:Медицина, 2002.
9. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия. *Учебное пособие*, под редакцией Г.П.Яковлева, К.Н.Блиновой, С-П.,2004.
10. И.А.Муравьева Технология лекарств, ч.1 и 2, М.,1980

Дополнительная литература:

1. В.А. Барабой Биологическое действие растительных фенольных соединений.-Киев: Наукова думка.- 1976.
2. Н.И.Гринкевич, Л.И.Сафронич. Химический анализ лекарственных растений, М.,1983.
3. П.Э.Розенцвейг, Ю.К.Сандер. Технология лекарственных галеновых препаратов, М.:Медицина, 1977.
4. И.С.Ажгихин. Технология лекарств, М. 2003.
5. Н.К.Зенков и др. Фенольные биоантиоксиданты, Новосибирск, 2003