

2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ОСНОВНЫХ ГРУПП БАВ

2.1. Технологическая схема производства настоек

Настойки представляют собой прозрачные, разбавленные, окрашенные жидкие водно-спиртовые и спиртовые извлечения из растительного сырья, которые получают методом настаивания при комнатной температуре и удаления экстрагента. Настойки являются наиболее разбавленными извлечениями по сравнению с экстрактами. Из одной части растительного сырья можно получить пять или десять объемных частей настоек. Количество действующих веществ в настойках определяют химическими и спектральными методами анализа. На рисунке 76 представлена принципиальная технологическая схема получения настоек из растительного сырья.

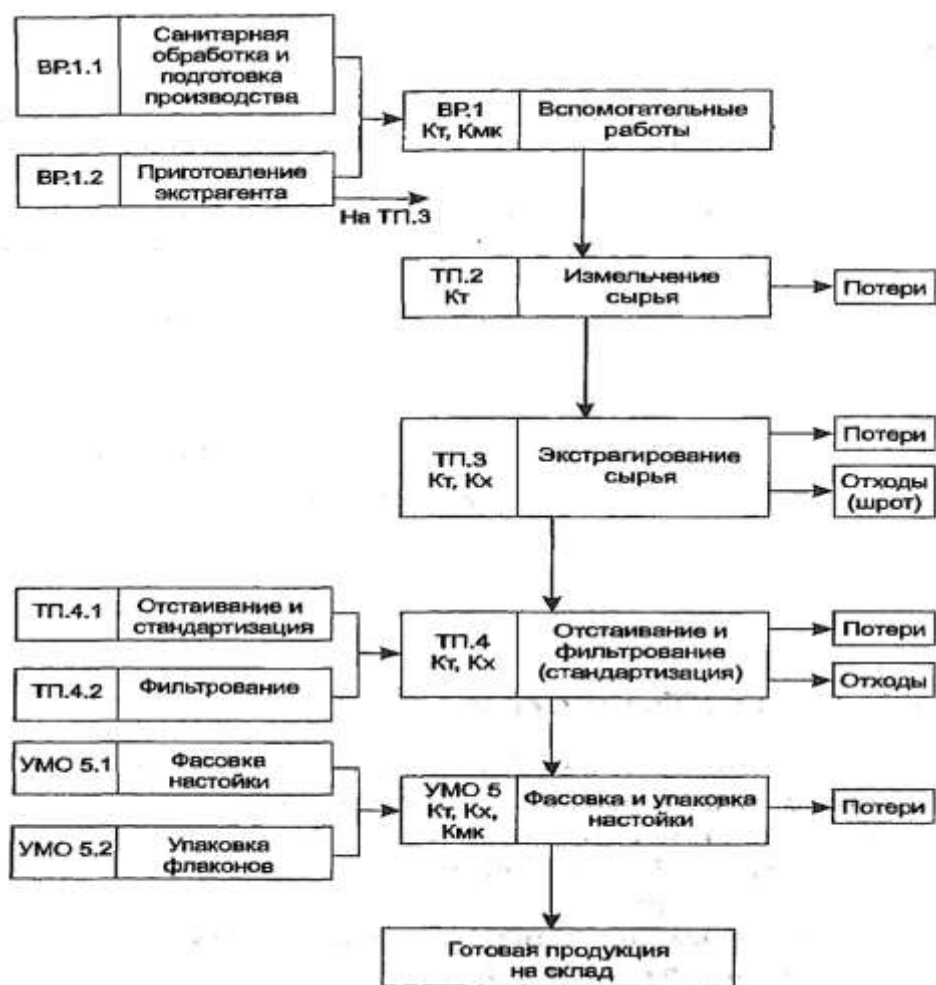


Рис. 76. Технологическая схема производства настоек

Технология получения настоек из растительного сырья включает следующие технологические процессы:

- самым главным процессом является санитарная обработка, подготовка оборудования и вспомогательные работы, которые включают в себя приготовление экстрагента (экстрагент состоит из воды и спирта, концентрация которого составляет от 40 до 90%);
- ТП.2 – измельчение растительного сырья осуществляют на специальных аппаратах – измельчителях;

- ТП.3 – экстрагирование растительного сырья осуществляется методами мацерации и перколяции. Извлечение получают из сырья в соотношении 1: 5 или 1:10, то есть готовят разбавленные вытяжки;
- ТП.4 – Отстаивание и фильтрование: извлечения отстаивают в специальных аппаратах – отстойниках; затем фильтруют через специальные фильтры и стандартизация готовой продукции (определение тяжелых металлов; количественное определение спирта; определение температуры кипения настойки);
- УМО.5 – Фасовка и упаковка: готовая настойка разливается в готовые флаконы, которые проверенные по ГОСТам и ОСТам.

2.1.1. Технология производства настойки валерианы

Технология производства настойки валериана включает в себя процесс настаивания 70%-ным водно-этиловым спиртом корней и корневищ валерианы лекарственной (*Rhizomata and radicus Valerianae*) в соотношении сырье : экстрагент 1:5.

В корнях и корневищах валерианы содержится эфирное масло (примерно 0,5 – 2%), представленное, в основном, сложным эфиром борнеола и изовалериановой кислоты, также содержатся сложные эфиры борнеола с уксусной и муравьиной кислотами, терпинеол, пинен, камфен, изовалериановая кислота; обнаружены алкалоиды, хатинин и валериан, гликозидные соединения (валерозиды), дубильные вещества и смолы.

Препараты, полученные из корней и корневищ валерианы, оказывают успокаивающее (седативное) и спазмолитическое действия. Их применяют при повышенной возбудимости, бессоннице.

На рисунке 77 представлена аппаратная схема производства настойки из валерианы.

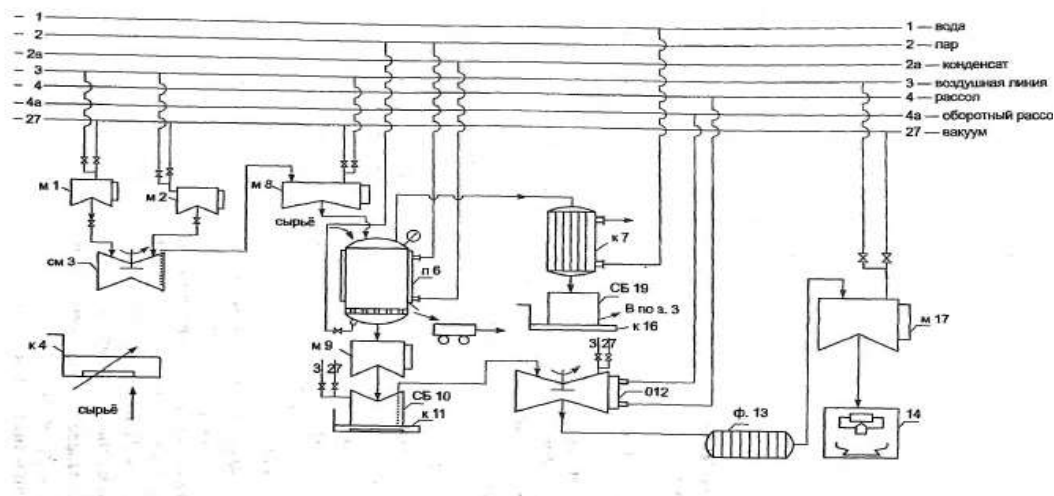


Рис. 77. Аппаратная схема производства настойки из валерианы:

м 1, м 2, м 5, м 8, м 9, м 17 – мерники; см 3 – мерник-смеситель; к 4, к 11, к 16 – весы; п 6 – перколятор; к 7 – холодильник; м 9, сб 10 – сборники; о 12 – сборник-отстойник; ф 13 – фильтр-пресс; 14 – фасовочная машина

Процесс приготовления настойки включает в себя следующие основные стадии:

- измельчение растительного сырья – корней и корневищ валерианы до размера частиц 0,5-1 мм;
- разбавление спирта, то приготовление 70%-го водно-этилового спирта;
- загрузка перколятора измельченным растительным сырьем;
- процесс вытеснения экстрагента;
- отстаивание и стандартизация 70%-го водно-этанольной вытяжки;
- фильтрация настойки через фильтр-пресс и расфасовка по бутылочкам.

2.2. Технологическая схема производства экстрактов

Экстракты представляют собою концентрированные извлечения из растительного сырья, из которых растворитель отогнан полностью или частично. Они часто используются с лекарственными веществами в виде таблеток, драже, суппозиторий и т.д.

В зависимости от консистенции экстракты можно подразделить на: жидкие, густые и сухие.

Жидкие экстракты представляют собой спиртовые или водно-спиртовые концентрированные извлечения, 1 или 2 объемные части которых получают из 1 части по массе высушенного растительного сырья. Такие экстракты должны содержать действующие вещества, концентрация которых соответствует концентрации ДВ, содержащихся в растительном сырье.

Густые экстракты – сгущенные извлечения, которые содержат до 15 – 20 % влаги и по консистенции представляют собой малоподвижную массу.

Сухие экстракты – концентрированные вытяжки порошкообразной природы, которые содержат влагу не более 5%.

2.2.1. Технология производства жидких экстрактов

Для получения жидких экстрактов используется спирт или водно-спиртовые растворы. Чаще всего в производстве жидких экстрактов используется 70%-й водно-этиловый спирт.

Особенности технологии производства жидких экстрактов обусловлены соотношением растительного сырья к объему, полученного экстракта.

Жидкие экстракты получают методами экстракции, в частности, перколяцией, реперколяцией и методом противоточной экстракции. На рисунке 78 изображена процессуальная схема получения жидкого экстракта с применением метода перколяции

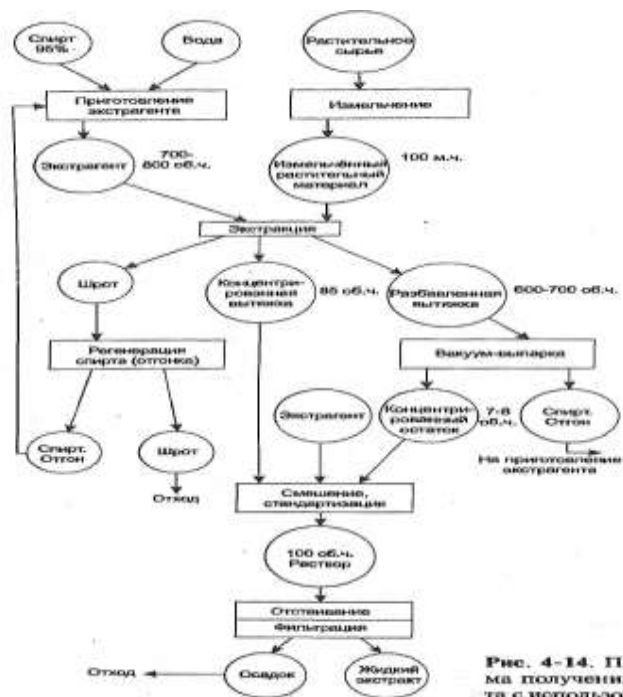


Рис. 4-14. Ц ма получения та с использо

Рис. 78. Принципиальная схема получения жидкого экстракта методом перколяции

Преимущества жидких экстрактов заключаются в том, что содержание действующих веществ в жидком экстракте соответствует содержанию ДВ в растительном сырье; в жидких экстрактах, полученных методами перколяции, реперколяции и противоточной экстракции, сохраняется содержание эфирных масел, фитоцинов и других летучих веществ.

2.2.1.1. Технология производства жидкого экстракта коры крушины

Экстракт получают из коры крушины (*Cortex Frangulae*) при соотношении сырья к экстрагенту 1:1, в качестве экстрагента применяют 70%-ый водно-этиловый спирт.

В коре крушины содержатся антрахиноновые гликозиды. В свежесобранном растительном сырье содержатся гликозиды и агликоны в восстановленной форме. Нужно знать, что антранолы при длительном хранении обладают способностью к окислению до антрахинонов, поэтому такое сырье хранят в течение 1 года и нагревание осуществляют при температуре 100°C в течение 1 часа.

Жидкий экстракт, полученный из коры крушины, обладает слабительным действием с преимущественным влиянием на тонкую кишку.

Технологическая схема производства жидкого экстракта из коры крушины представлена на рисунке 79.

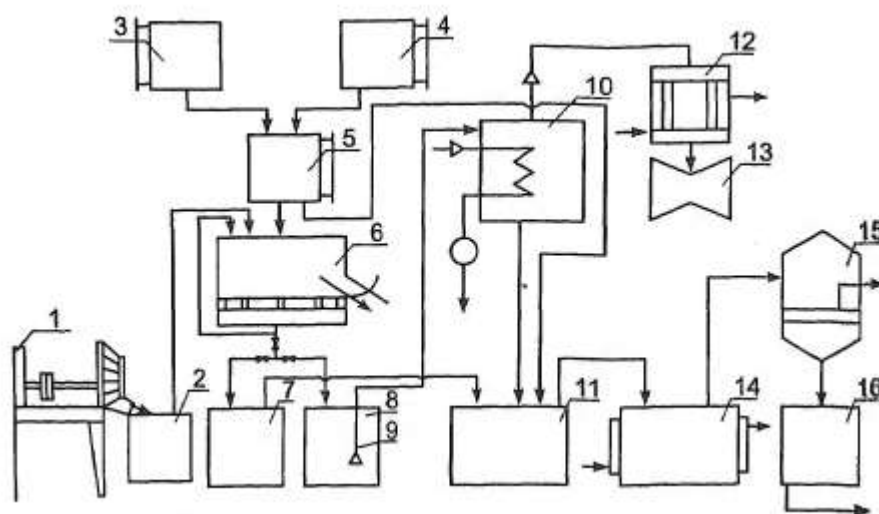


Рис. 79. Аппаратная схема получения жидкого экстракта:

1 – измельчитель; 2 – приемник измельченного сырья; 3 – мерник 96% спирта; 4 – мерник очищенной воды; 5 – мерник-смеситель; 6 – перколятор; 7 – приемник концентрированной вытяжки; 8 – приемник разбавленной вытяжки; 9 – фильтр-грибок; 10 – аппарат для вакуум-выпарки; 11 – приемник для сгущенной жидкости; 12 – конденсатор; 13 – сборник для отгона; 14 – сборник-отстойник для жидкого экстракта; 15 – друк-фильтр; 16 – сборник готового продукта

Технология получения жидкого экстракта из коры крушины включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение коры крушины до размера частиц 0,5-1 мм;

ТП.2 – приготовление экстрагента, то есть 70%-го водно-этилового спирта;

ТП.3 – экстрагирование сырья;

ТП.4 – отгонка спирта с использованием вакуума;

ТП.5 – смешение и стандартизация вытяжки;

ТП.6 – отстаивание полученного жидкого экстракта при температуре не выше 8°C в течение 3 суток в сборнике отстойнике;

ТП.7 – фильтрация отстоявшего жидкого экстракта под давлением инертного газа через друк-фильтр; отфильтрованный жидкий экстракт поступает на расфасовку.

2.2.2. Технология производства густых и сухих экстрактов

Густые экстракты – концентрированные извлечения, которые представляют собой густую малоподвижную массу с содержанием влаги до 15 – 20% влаги. Сухие экстракты – концентрированные вытяжки порошкообразной природы с содержанием влаги не более 5%.

Густые и сухие экстракты получают путем отгонки экстрагента и последующей сушки гущенного экстракта.

Общая технологическая схема получения экстрактов представлена на рисунке 80.

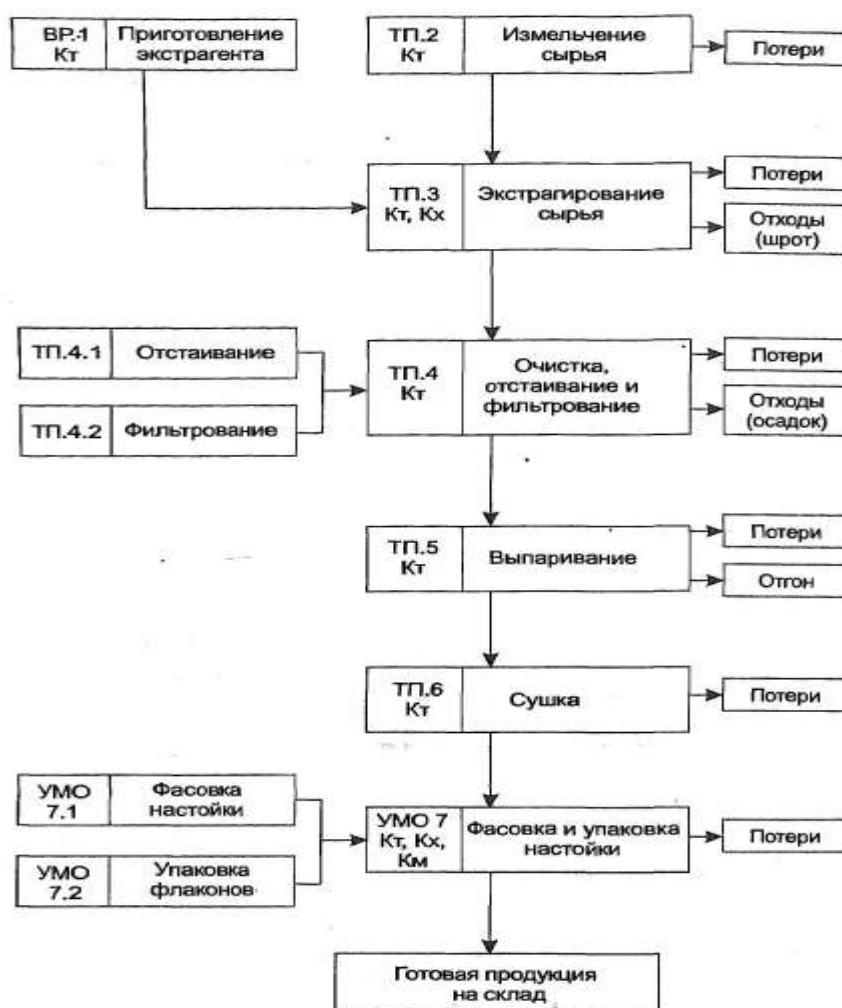


Рис. 80. Технологическая схема производства сухого экстракта

Первые стадии – измельчение растительного сырья (ТП.2) и приготовление экстрагента (БР.1) осуществляются так же, как и при производстве жидких экстрактов.

Для получения сухих и густых экстрактов возможно использование широкого ассортимента растворителей. Очень часто применяется очищенная вода, кипящая вода и водно-спиртовые растворители.

Экстрагирование (ТП.3) растительного сырья осуществляется следующими методами: ступенчатой (дробной) мацерацией с периодическим перемешиванием; перколяцией; противоточной периодической экстракцией; циркуляционной экстракцией; противоточной непрерывной экстракцией.

Отстаивание и фильтрование вытяжек (ТП.4) осуществляют при температуре ниже 10°С в течение 2 суток и более. После отстаивания извлечения отделяют осадок методом декантации из отстойников, чаще всего путем фильтрации.

Выпаривание вытяжек (ТП.6), то есть для концентрирования извлечений в производстве препаратов применяют вакуум-выпарные установки.

Сушка полученных сухих экстрактов (ТП.7) осуществляют в вакуум-сушилках контактного типа и конвективные распылительные сушилки.

2.2.3. Технология производства спиртовых экстрактов

В процессе производства получают частично очищенные от смол и других гидрофобных веществ сухие экстракты. На рисунке 81 представлена технологическая схема получения сухого экстракта из чернойгорки.

Сырьем для получения сухого экстракта является трава чернойгорки (горичвета весеннего) – *Herba Adonidis vernalis*. Основными действующими веществами являются производные циклопентанопергидрофенантрена.

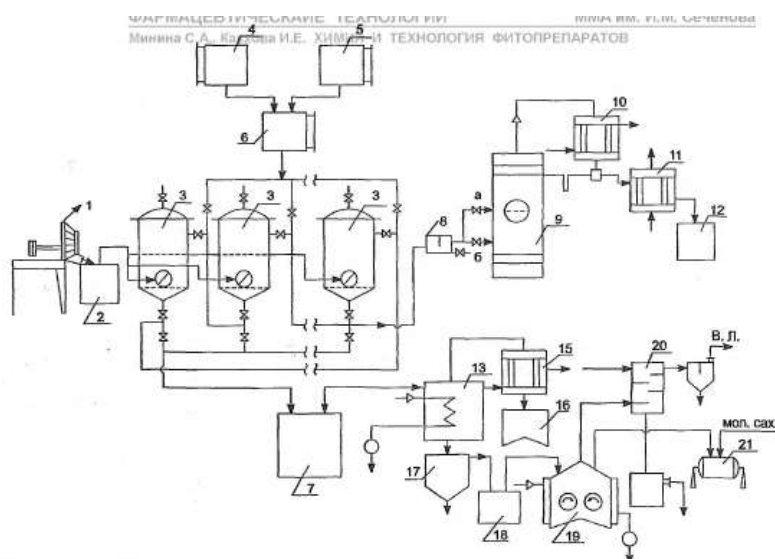


Рис. 81. Аппаратная схема получения сухого экстракта чернойгорки:
 1 – измельчитель; 2 – приемник измельченного сырья; 3 – перколятор; 4 – мерник спирта-ректификата; 5 – мерник очищенной воды; 6 – мерник-смеситель; 7 – приемник концентрированной вытяжки; 8 – разделительный сосуд; 9 – ректификационная колонна; 10 – дефлегматор; 11 – конденсатор; 12 – сборник; 13 – испаритель; 15 – конденсатор; 16 – сборник; 17 – центрифуга; 18 – сборник; 19 – вакуум-вальцовая сушилка; 20 – барометрический конденсатор смещения; 21 – шаровая мельница

Технология получения сухого экстракта чернойгорки включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

- ТП.1 – измельчение коры крушины до размера частиц 0,5-1 мм;
- ТП.2 – приготовление экстрагента, то есть 20%-го водно-этилового спирта;
- ТП.3 – экстрагирование сырья методом противоточной периодической экстракции;
- ТП.4 – регенерация спирта из шрота;
- ТП.4 – концентрирование извлечения с использованием вакуума;
- ТП.5 – сушка и измельчение экстракта.

2.2.4. Технология производства водных экстрактов

Если действующими веществами растительного сырья являются гликозиды, то экстракцию можно проводить очищенной водой или нагретой до кипения водой.

Технология получения густого экстракта полыни (*Extractum Absinthii spissn*) является примером получения водных экстрактов. Сырьем служит надземная часть – трава полыни горькой (*Herba Artemisiae absinthii*). Действующими веществами растения являются сесквитерпеновые производные.

Технология получения густого экстракта полыни включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение травы на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 1-3 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья методом противоточной периодической экстракции 0,5% раствором хлороформа в воде;

ТП.3 – вакуум-выпарка извлечения в выпарном аппарате;

ТП.4 – очистка извлечения путем добавления к остатку в смесителе равного количества спирта-ректификата и перемешивание смеси в течение 1 часа;

ТП.4 – получение густого экстракта ;

ТП.5 – сушка и измельчение экстракта.

Экстракт полыни содержит горечи, которые раздражают вкусовые рецепторы языка и повышают секрецию желудочного сока и аппетит.

2.2.5. Технология производства экстрактов-концентратов

Экстракты-концентраты являются исходным сырьем или заготовками для получения настоев и отваров. Они могут быть жидкими и сухими. Для их приготовления используют водно-спиртовые растворы низких концентраций (20-40%), чтобы приблизить их по составу экстрагируемых веществ к водным извлечениям.

Жидкие экстракты-концентраты – водно-спиртовые извлечения, которые получают при соотношении сырья к экстрагенту 1:2.

Сухие экстракты - концентраты – водно-спиртовые извлечения, которые упаривают, сушат и готовят концентраты в соотношении 1:1.

Технология производства экстрактов-концентратов включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение травы на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 0,5-1 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья методами перколяции, дробной мацерации, реперколяции;

ТП.3 – очистка экстракта отстаиванием при температуре не выше 8°C и с последующей фильтрацией.

2.3. Технология производства медицинских масел

Медицинские масла представляют собой масляные экстракты действующих веществ из лекарственного растительного сырья. Для их приготовления используют метод настаивания в нагретом до 60-70°C оливкового масла.

2.3.1. Технология производства масляного экстракта белены

Сырьем для получения масляного экстракта служат листья белены.

Действующими веществами растительного сырья являются алкалоиды тропанового ряда.

Технология производства масляного экстракта включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение травы на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 1 – 5 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья методом противоточной экстракции 70%-ным водно-этиловым спиртом, содержащего 1% аммиака;

ТП.3 – вакуум-выпарка полученного концентрата;

ТП.4 – экстракция концентрата подсолнечным маслом;

ТП.5 – отстаивание и фильтрация масляного концентрата.

Беленое масло применяется наружно для натираний, как болеутоляющее средство при невралгических и ревматических болях.

2.3.2 Технология производства масла облепихи

Сырьем для получения масла облепихи служат плоды облепихи крушиновидной.

Действующими веществами растительного сырья являются каротиноиды, витамин F и витамин P.

Технология производства масла шиповника включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение плодов на дробилке;

ТП.2 – выделение сока. Измельченные плоды поступают в вальцовый пресс, в котором осуществляется отжатие сока. Затем сок очищают и фильтруют;

ТП.3 – сушка жома. Жом высушивают в вакуум-вальцовой сушилке. Затем его измельчают в дробилке.

ТП.4 – экстракция масла из мякоти жома 4-5 кратным количеством хлористого метилена при температуре 40⁰С;

ТП.5 – переработка семян облепихи. Семена облепихи измельчают на дробилке в порошок и его экстракцию осуществляют хлористым метиленом. Затем извлечение поступает в испаритель, где отгоняют хлористый метилен до получения остатка масла.

ТП.6 – из шрота мякоти плодов отгоняют хлористый метилен. Затем сухой остаток экстрагируют 5-6 кратным количеством 60% этилового спирта. Отгоняют спирт из вытяжки до сухого остатка с помощью вакуум-испарителя. Таким образом, полученный сухой остаток сушат в вакуум-вальцовой сушилке.

На рисунке 82 представлена технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи.

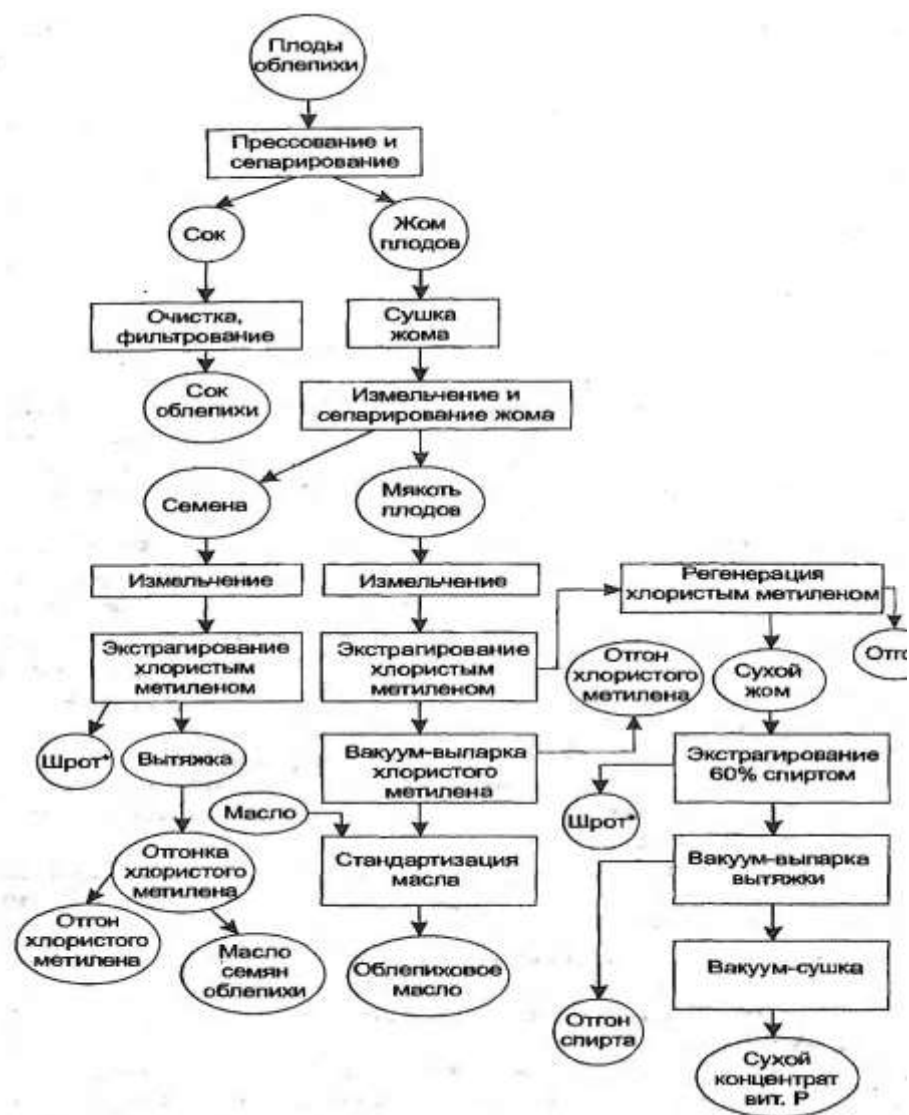


Рис. 82. Процессуальная схема комплексной переработки плодов облепихи

2.3.3 Технология получения концентрата витамина Е– масла шиповника

ТП.1 – подготовка сырья. Отбитые из шрота семена отправляют на молотковую дробилку.

ТП.2 – экстракция растительного сырья методом мацерации дихлорэтаном или хлористым метиленом.

ТП.3 – отгонка экстрагента в вакуум-выпарной установке до получения масла шиповника.

Препарат, полученный по такой схеме, представляет собой маслянистую жидкость бурового цвета с зеленоватым оттенком, горьковатым вкусом и специфичным запахом. Витамин Е применяют при пролежнях, трофических язвах, дерматозах.

2.4. Технология переработки растительного сырья, содержащего алкалоиды

Важным в технологии переработки растительного сырья, содержащего алкалоиды, является:

- увеличение выхода алкалоидов путем усовершенствования технологии переработки и применения современных методов очистки;

- разработка комплексной переработки нескольких биологически активных алкалоидов, содержащихся в сырье;
- создание малотокходной или безотходной технологии БАВ из алкалоидосодержащего растительного сырья;
- создание из нативных алкалоидов более эффективных полусинтетических аналогов.

На рисунке 83 представлена технологическая схема получения раунатина. Сырьем служат корни раувольфии змеиной.

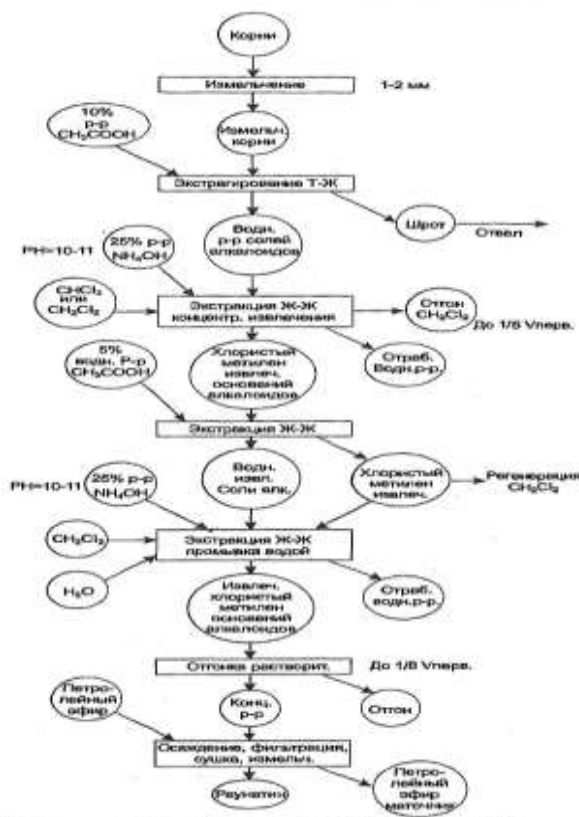


Рис. 83. Принципиальная схема получения раунатина

Технология производства раунатина включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение корней раувольфии змеиной на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 1-2 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья (твердое тело-жидкость) 10%-ным раствором уксусной кислоты;

ТП.3 – экстрагирование сырья (жидкость-жидкость) хлористым метиленом методом периодической экстракции;

ТП.4 – повторная очистка смеси алкалоидов;

ТП.5 – осаждение смеси алкалоидов путем добавления семикратного количества петролейного эфира или бензина.

ТП.6 – фильтрация смеси алкалоидов;

ТП.7 – сушка и измельчение экстракта.

Раунатин – порошок светло-желтого цвета с содержанием алкалоидов до 90%. Раунатин выпускают в виде таблеток, которые применяют для понижения артериального давления, также они оказывают седативное и снотворное действия.

2.5. Технология переработки растительного сырья, содержащего гликозидов

Технология переработки растительного сырья, содержащего гликозиды, включает следующие технологические процессы:

- ТП.1 – измельчение растительного сырья;
- ТП.2 – экстрагирование водой, спиртами, водно-спиртовыми растворителями;
- ТП.3 – многостадийная очистка выделяемых гликозидов;
- ТП.4 – разделение гликозидов методами колоночной хроматографии, противоточного распределения при экстракции жидкость-жидкость, избирательной экстракцией;
- ТП.5 – стандартизация выделенных гликозидов.

2.5.1. Технология переработки растительного сырья, содержащего флавоновые гликозиды

Методы выделения и очистки флавоновых гликозидов основаны на их специфических свойствах, то есть, в основном, на растворимости.

Экстракция гликозидов обычно проводится концентрированным этиловым спиртом или кипящей водой, так как флавоновые гликозиды являются термостабильными. Очистку их осуществляют обычно методом замены одного растворителя другим, например, спирта водой, экстракцией жидкости жидкостью (этилацетат или его смесь со спиртом), а также колоночной хроматографией на сорбенте полиамид с избирательным экстрагированием сопутствующих и действующих веществ.

Фламин представляет собой смесь флавоноидов. Сырьем для его получения служат цветки бессмертника песчаного (*Flores Helychrysi arenarii*). Цветки бессмертника песчаного содержат флавоновые гликозиды, которые относятся к флавонам, флавонолам, флаванонам, халконы, стерины, эфирные масла, смолы, фенольные соединения.

Фламин оказывает желчегонное и противовоспалительное действие, его назначают при холецистите и холангите.

На рисунке 84 представлена принципиальная схема производства фламина из цветков бессмертника песчаного.

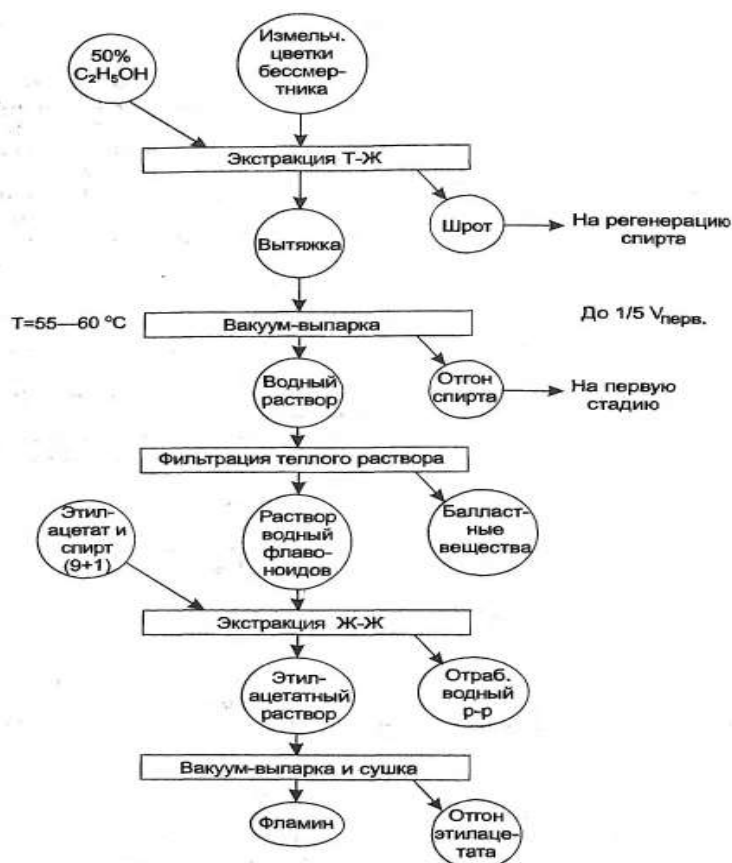


Рис. 84. Принципиальная схема получения фламина

Технология производства фламина из цветков бессмертника песчаного включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение цветков бессмертника песчаного на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 1-2 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья 50%-ным водно-этиловым спиртом методом противоточной экстракции;

ТП.3 – выпарка извлечения осуществляется в роторном испарителе под вакуумом;

ТП.4 – фильтрация концентрата через нутч-фильтр и освобождение от неполярных балластных веществ;

ТП.5 – экстракция жидкость – жидкость, которую осуществляют смесью этилацетат-этиловый спирт при соотношении 9:1;

ТП.6 – выпарка извлечения осуществляется в роторной пленочной установке под вакуумом;

ТП.7 – сушка в полочной вакуумной сушилке;

ТП.8 – измельчение фламина.

Фламин – порошок желтого цвета с содержанием флавоноидов до 95% и более, со слабым специфическим запахом и горьким вкусом.

2.5.2. Технологические особенности производства рутина из бутонов сафоры японской

Сырьем для получения рутина служат: боярышник, шиповник, бессмертник песчаный, цветки сафоры японской, цветки гречихи посевной; трава пустырника и другие растения.

Метод основан на первичной водной экстракции и последующей очистке.

Технология производства рутина из бутонов сафоры японской включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение бутонов сафоры японской;

ТП.2 – экстракция измельченных бутонов сафоры японской водой при кипячении в реакторе с рубашкой и обратным холодильником в течение 1,5 часа;

ТП.3 - фильтрация полученной насыщенной вытяжки через обогреваемый нутч-фильтр;

ТП.4 – вытяжку сливают в кристаллизатор, где охлаждают до 5-8⁰С в течение 24 часов;

ТП.5 – выпадают микрокристаллы рутина, которые центрифугируют и получают рутин-сырец;

ТП.6- оставшееся сырье после первой экстракции повторно последовательно экстрагируют еще 4 раза в реакторе кипящей водой; каждый раз заливают 200 л воды (при соотношении 1:10) и кипятят в течение 1 ч;

ТП.7 – фильтрация извлечений через обогреваемый нутч-фильтр;

ТП.8 - заливают вытяжки в другой кристаллизатор отдельно от первой вытяжки и охлаждают до 6-8⁰С в течение 24 часов;

ТП.9 – выпавший рутин отфуговыывают;

ТП.10 – перекристаллизация рутина-сырца из 95% этилового спирта;

ТП.11 – очистка рутина: отфильтрованный рутин помещают в кристаллизатор и обрабатывают ацетоном для удаления примесей. Смесью рутина с ацетоном снова центрифугируют и полученный чистый рутин высушивают в вакуум-сушилке при 60-70⁰С до остаточной влаги 7-8%.

На рисунке 85 изображена принципиальная схема получения рутина из бутонов сафоры японской.

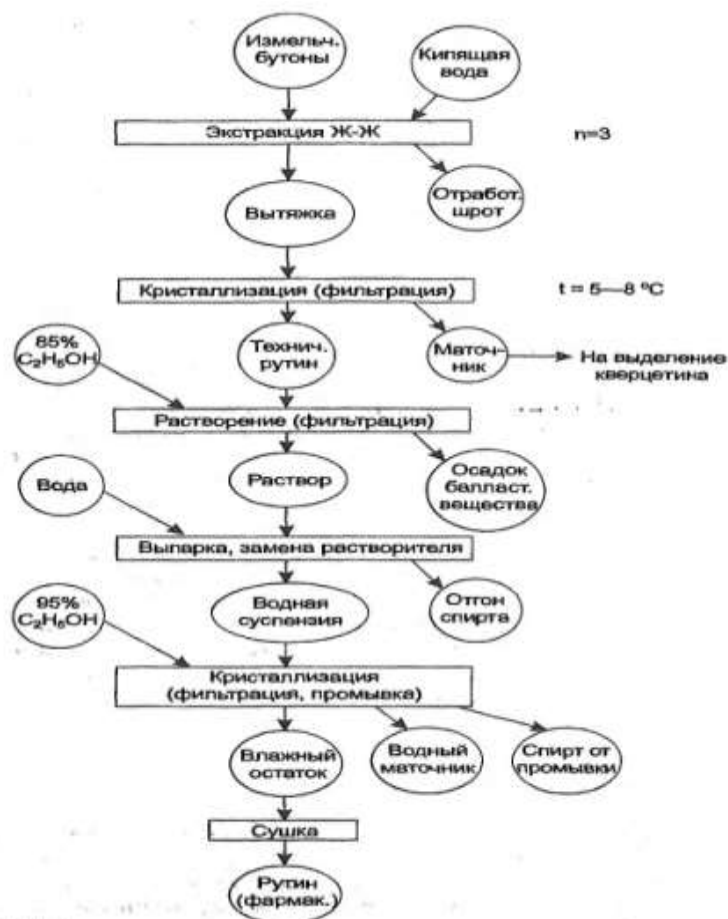


Рис. 85. Принципиальная схема получения рутина из бутонов сафоры японской

2.5.3. Технологические особенности производства антрасеннина

Антрасеннин является новогаленовым препаратом, который содержит сумму антрагликозидов листьев сенны (кассии остролистной) *Cassia acutifolia Del.*

Технология производства антрасеннина включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – подготовка сырья, то есть измельчение листьев сенны до размеров частиц 3 мм;

ТП.2 – экстрагирование 3-х кратным количеством 65% этиловым спиртом при соотношении сырье: экстрагент (1:7) при постоянном перемешивании в течение 1 часа;

ТП.3 – упаривание водно-спиртовой вытяжки в циркуляционном вакуум-выпарном аппарате при температуре 40⁰С. Затем водный остаток отстаивают при температуре 8-10⁰С в течение 3-х часов. В осадок выпадают смолы, которые не растворяются в воде и отделяются на центрифуге;

ТП.4 – осаждение кальциевых солей антрагликозидов 10% спиртовым раствором кальция хлорида (16:1), перемешивают в течение 15-20 минут, затем прибавляют смесь аммиака со спиртом, строго выдерживая рН смеси в пределах 6,5-6,7. При осаждении спиртом появляется кроваво-бурое окрашивание, образуется хлопьевидный осадок кальциевых солей антрагликозидов, который отделяют на центрифуге. Осадок на фильтре промывают ацетоном и сушат в вакуум- сушильном шкафу при температуре 35-40⁰С.

2.5.4. Технология переработки растительного сырья, содержащего сапонины

Далее будут рассмотрены технологические схемы производства сапарала, полиспонина и глицирама.

Технология производства сапарала из корней аралии маньчжурской включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение корней аралии маньчжурской на мельнице-эксельсиоре до размера частиц 1-3 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья кипящим метиловым спиртом в реакторе с обратным холодильником при соотношении сырье: экстрагент 1:8. Процесс перичной экстракции осуществляют 1 ч, затем вытяжку сливают, и процесс экстракции повторяют еще 3 раза описанным выше способом. Вытяжа, полученная в результате четвертой обработки, применяют для первичной экстракции новой партии сырья;

ТП.3 – вакуум-выпарка вытяжек. Вытжки, которые получились в результате 3-х кратной экстракции, объединяют и упаривают в вакууме при температуре 50-55⁰С до 1/10 первоначального объема. Отгон метанола используют для перичной экстракции новой партии сырья, а концентрированный остаток расворяют в 15-кратном количестве воды и затем осуществляют очистку сапонинов.

ТП.4 – очистка сапонинов от неполярных балластных веществ. Концентрированный остаток растворяют в воде, при этом тритерпеновые сапонины переходят в раствор, а фитостерины, липиды, ряд пигментов и другие неполярные вещества находятся в виде взвеси. Для удаления неполярных балластных веществ водный раствор сначала обрабатывают этилацетатом (при соотношении 1:3) при перемешивании (экстракция жидкость-жидкость) в течение 5 минут. Затем отделяют эфирную вытяжку от водной фазы. Водную вытяжку обрабатывают н-бутиловым спиртом (при соотношении 1:10) с перемешиванием (экстракция жидкость - жидкость) в течение 3 минут и отстаивают в течение 30 минут. Методом фильтрации водный раствор окончательно очищают от взвеси. Путем отгонки регенируют этилацетат и н-бутиловый спирт.

ТП.5 – очистка сапонинов от водорастворимых балластных веществ осуществляется методом избирательной экстракции. Для этого водный раствор подкисляют 2 н раствором хлороводородной кислоты до рН 3-4, так как сапонины переходят из солей в кислотную форму, поэтому их экстрагируют н-бутиловым спиртом, в котором они хорошо растворимы. Процесс экстракции осуществляют 3 раза (при соотношении н-бутилового спирта и воды 1:3) при перемешивании в течение 10 минут. н-бутиловый спирт экстрагирует сапонины, а основная масса балластных веществ остается в водном растворе.

ТП.6 – получение аммонийных солей тритерпеновых сапонинов. 25% раствор аммиака добавляют к объединенному бутанольному экстракту порциями до рН 7-8 при тщательном перемешивании в течение 5 минут. Затем производят отгонку растворителя в вакууме при 80-85⁰С и остаточном давлении 75 мм рт.ст. до получения густого остатка. Отгон н-бутанола используется на 3-4 стадиях.

ТП.7 – получение фармакопейного сапарала. Окончательную очистку сапарала производят обработкой метанольного раствора активированным углем и осаждением аммонийных солей сапонинов этилацетатом. В 4-х кратном количестве метилового спирта растворяют смолообразный густой остаток, нагревают до температуры кипения в реакторе с обратным холодильником и прибавляют к раствору активированный уголь. Смесь перемешивают 10 минут и фильтруют через друк-фильтр под давлением инертного газа. Затем раствор охлаждают и смешивают с 4-х кратным количеством этилацетата. В результате резкого изменения растворимости сапонины выпадают в осадок и их отфильтровывают через друк-фильтр под давлением инертного газа и промывают этилацетатом. Осадок сушат в вакуум-сушилке и затем измельчают.

На рисунке 86 изображена процессульная схема получения сапарала из корней аралии маньчжурской.

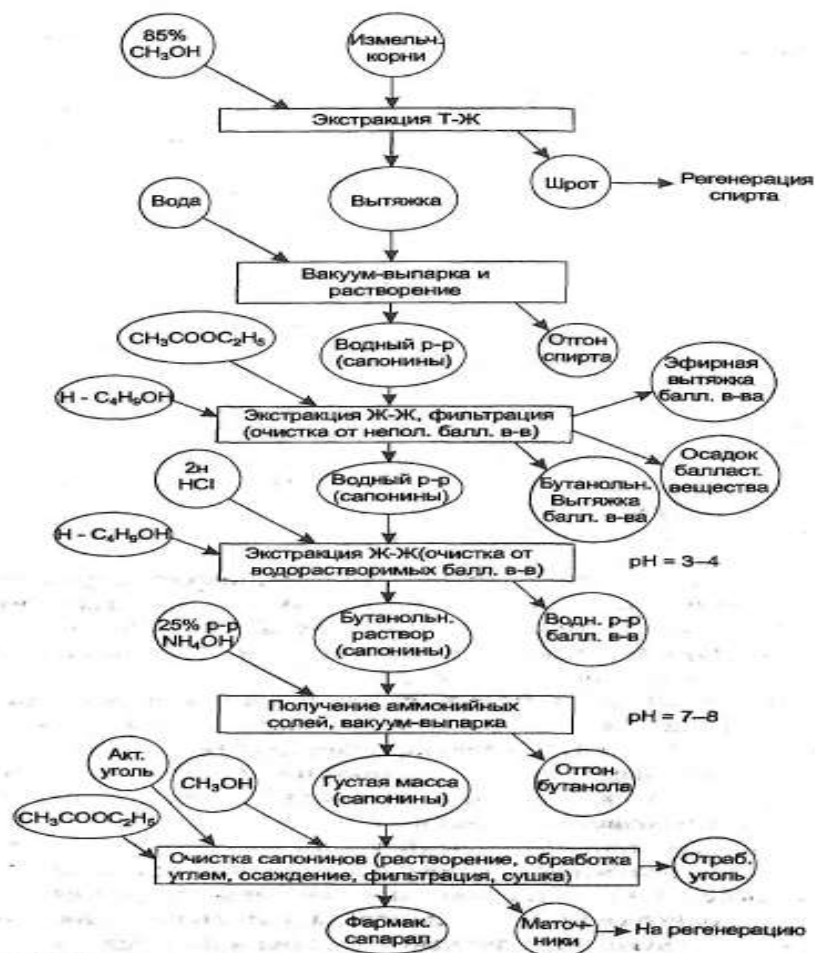


Рис. 86 Процессульная схема получения сапарала

Препарат применяют как тонизирующее средство при депрессии, для профилактики умственного и физического переутомления.

2.6. Технология переработки растительного сырья, содержащего дубильные вещества

Технология производства танина из листьев скумпии включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение листьев скумпии на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 2-3 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья водой, нагретой до 60 – 65°C методом непрерывной действующей экстракцией;

ТП.3 – обработка полученного извлечения 0,6%-ным активированным углем (для уменьшения растворимости танина) и 8%-ным раствором хлорида натрия (для высаливания);

ТП.4 – экстракция танина из водного раствора органическими растворителями (смесь, состоящая из 80% бутилацетата и 20% бутанола);

ТП.5 – упаривание эфирного извлечения в вакуум-выпарном аппарате при 55 – 60°C до 1/6 первоначального объема;

ТП.6 – отгонка растворителя полностью;

ТП.6 – выпарка извлечения осуществляется в роторной пленочной установке под вакуумом;

ТП.7 – обработка водного остатка 1%-ным активированным углем, затем фильтрация;

ТП.8 – сушка концентрированного раствора в двухступенчатой распылительной сушилке.

На рисунке 86 изображена принципиальная схема получения танина из листьев скумпии.

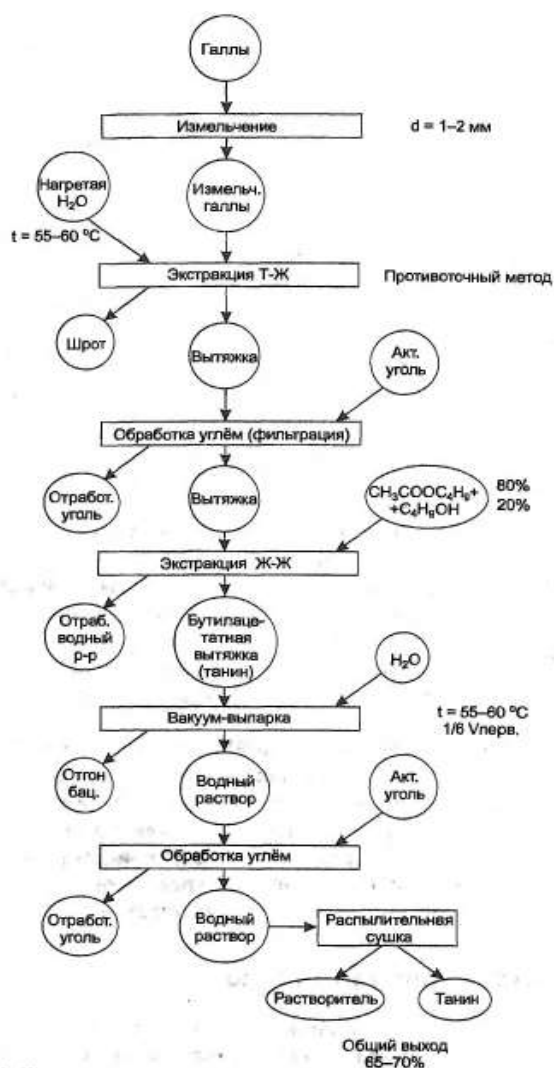


Рис. 86 Принципиальная схема получения танина

2.7. Технология переработки растительного сырья, содержащего эфирные масла

Алантол – новогаленовый препарат, который содержит очищенную сумму веществ тритерпеновой природы. Основными действующими веществами в препарате являются сесквитерпеновые лактоны. Сырьем для получения алантола служат корни и корневища девясила высокого (*Inula helinium L.*).

Технология производства алантола из корней и корневищ девясила высокого включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение корней и корневищ девясила высокого на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 2-3 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья 85%-ным водно-этиловым спиртом при соотношении сырье-экстрагент 1:3 методом перколяции;

ТП.3 – упаривание водно-спиртового экстракта в выпарном вакуум-циркуляционном аппарате до 2/5 первоначального объема;

ТП.4 – выделение терпеноидной фракции из водного остатка;

- ТП.5 – хроматографическая очистка;
- ТП.6 – отгонка растворителя полностью;
- ТП.6 – выделение алантола;

Алантол – порошок желтого цвета, содержание сесквитерпенов составляет 85%. Его применяют как противоязвенное средство.

На рисунке 88 изображена принципиальная схема получения танина из листьев скумпии.

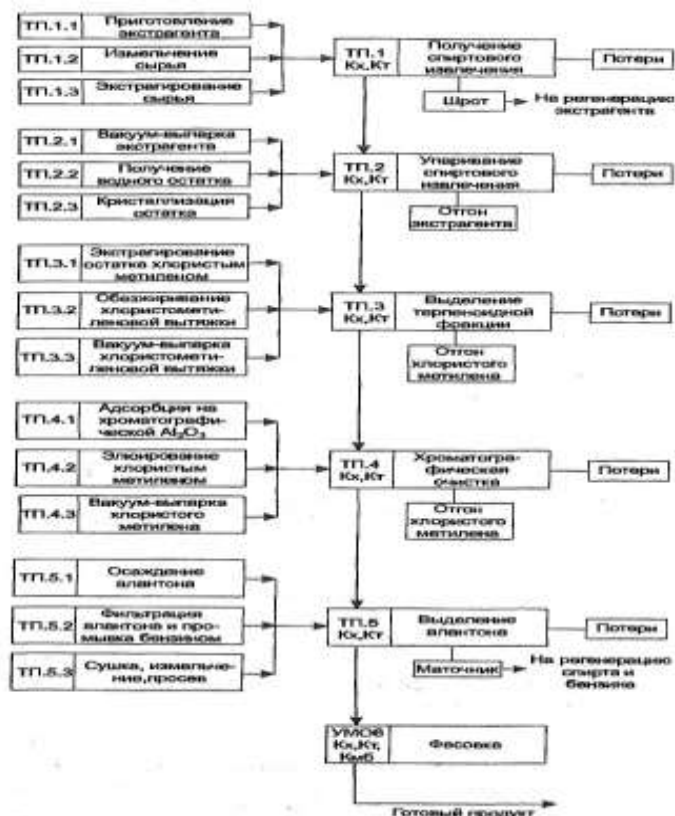


Рис. 88. Принципиальная схема получения алантола

2.8. Технологические особенности получения препаратов аскорбиновой кислоты

Сырьем для получения препаратов аскорбиновой кислоты служат плоды шиповника. Технология производства препаратов из плодов шиповника *Fructus Rosae* включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – экстракция плодов шиповника горячей водой (70-75⁰С) до получения 10 – кратного извлечения;

ТП.2 – очистка от пектиновых веществ ферментативным путем;

ТП.3 – сгущение извлечения на вакуум-выпарной установке до получения водного концентрата, который содержит 50-55 % сухих веществ и 3-5% аскорбиновой кислоты;

ТП.4 – получение сухого концентрата. Водный концентрат высушивают на распылительной сушилке;

ТП.5 – получение спиртоочищенного концентрата. Водный концентрат очищают в коагуляторе от белковых веществ 96% спиртом (при соотношении 2:1) при нагревании 60-65⁰С, перемешивают и через 10 мин фильтруют через фильтр-пресс. Осадок на фильтре промывают спирто-водной смесью. Полученный фильтрат и промывную смесь упаривают в вакуум-выпарной установке до получения темно-бурой жидкости, которая содержит не менее 2,2% аскорбиновой кислоты и не менее 65% сухих веществ.

На рисунке 89 изображена процессуальная схема комплексной переработки плодов шиповника.

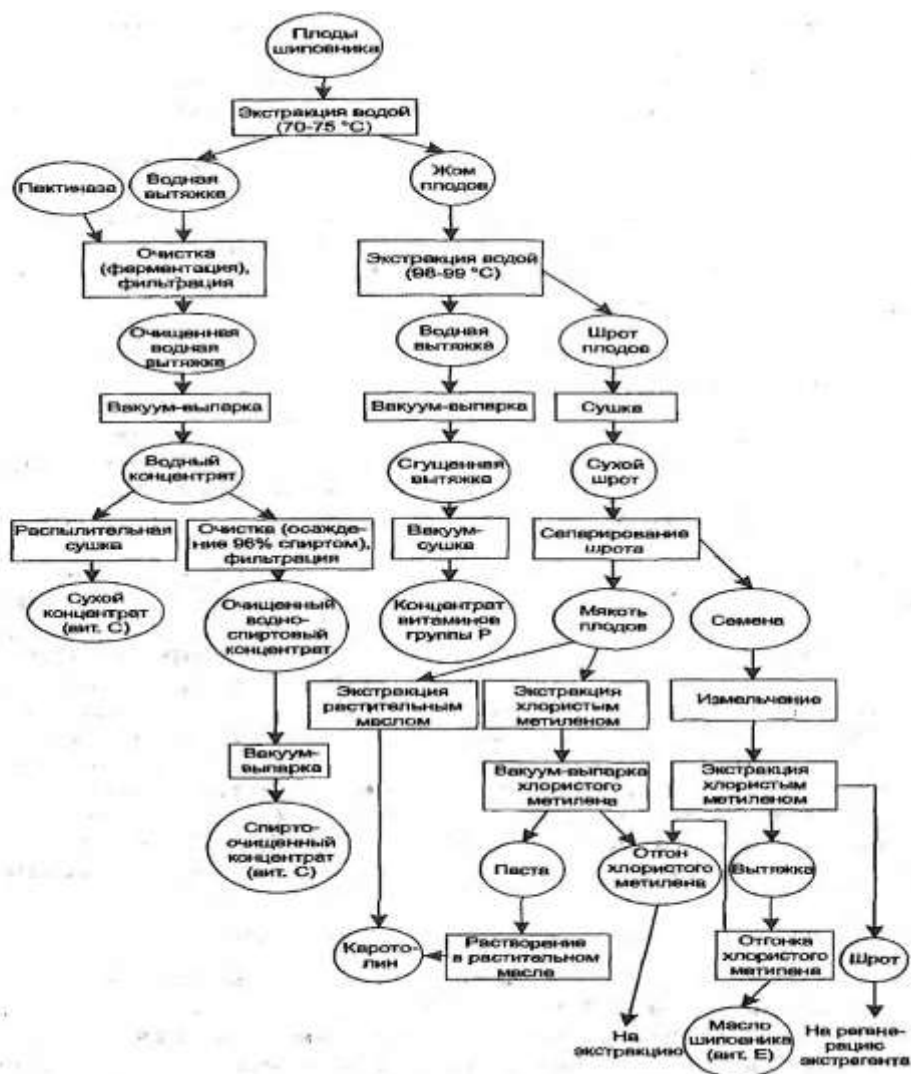


Рис. 89. Процессуальная схема комплексной переработки плодов шиповника

2.9. Технологические особенности получения соков

Технология производства соков состоит из следующих технологических стадий производства:

ТП.1 - Вымытый, высушенный растительный материал измельчают на траворезках, вальцовых дробилках или волчках до получения кашицеобразной смеси.

ТП.2 - Измельченную массу подвергают прессованию на гидравлических прессах под высоким давлением. Иногда при небольшом содержании сока в материале, до прессования его настаивают со спиртом.

ТП.3 - Очистка соков. Полученные соки в большом количестве содержат белки, ферменты, слизи, поэтому они неустойчивы. Для их очистки осуществляют обработку 95% спиртом. При этом осаждаются белковые, пектиновые и слизистые вещества. Для более глубокой очистки соков от ферментативных веществ, используют нагревание при температуре 77-78⁰С. затем сок подвергают отстаиванию и фильтрованию. Иногда осадок удаляют методом центрифугирования.

ТП.4 Стандартизация соков. Для консервации соков, к ним добавляют спирт до 15-20%, хлорэтан до концентрации 0,5%.

2.10. Технологические особенности получения фитонцидных препаратов

Из свежих частей растений получают препараты, которые содержат фитонциды (в переводе с греческого *phyton* – растение, а *caedo* с латинского - убивать) – БАВ, которые выделяются растениями и способны убивать бактерии и паразитирующие грибы или подавлять их рост и развитие. Понятие «фитонцид» было введено в 1928 году российским биологом, профессором Токиным Б.П., который установил способность некоторых растений выделять вещества с подобной активностью. Фитонциды содержатся во многих растениях, но, однако методы их выделения, стандартизации, стабилизации недостаточны, поэтому в медицинской практике большое применение нашли препараты, полученные из чеснока и лука.

Из луковиц чеснока получают чесночную настойку и аллилсат.

Технологические особенности получения чесночной настойки:

ТП.1 – измельчение чеснока на мясорубке

ТП.2 – экстракция измельченных зубчиков чеснока методом мацерации 90% этиловым спиртом.

ТП.3 – настаивание в течение 48 часов. Затем полученную настойку отстаивают, фильтруют и стандартизуют по содержанию аллилсульфидов. Их содержание должно быть не менее 0,15%

Технологические особенности получения аллилсата:

ТП.1 – экстракция луковиц чеснока методом реперколяции 90% спиртом этиловым при соотношении 1:3;

ТП.2 – настаивание в течение 72 часов;

ТП.3 – отстаивание вытяжки в течение 48 часов;

ТП.4 – фильтрация полученной вытяжки.

Технологические особенности получения аллилчеп:

ТП.1 – измельчение луковиц лука на мясорубке;

ТП.2 – экстракция измельченных луковиц лука 70% спиртом этиловым;

ТП.3 – настаивание в течение 7 суток при комнатной температуре. Затем вытяжку сливают.

ТП.4 – Полученный остаток сырья (выжимки) заливают 1 объемной частью 60% спирта этилового и настаивают в течение 1 суток. Затем извлечение вновь сливают, остаток отжимают, вторую порцию извлечения смешивают с первой и доводят 44% спиртом этиловым до 4 объемных частей;

ТП.5 – для осветления, к извлечению добавляют 0,3 г активированного угля, жидкость отфильтровывают от угля через бельтинговые фильтры-мешки.

Аллилчеп представляет собою прозрачную желтую или зеленоватую жидкость с запахом лука.

3. ОПИСАНИЕ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ»

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 – фармакопеи 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 определение 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%-ой хлороводородной кислоте и сравнить с приведенными значениями.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1-2

Заготовка, сушка и измельчение растительного сырья при помощи измельчителей.

Отработка технологических параметров для создания принципиальной схемы получения биологически активного комплекса: соотношение сырье-экстрагент, кратности, времени экстракции; концентрирование полученного экстрагента в роторном испарителе при помощи водоструйного насоса; сушка БАК. Определение качественного компонентного состава и количественного содержания действующих БАВ в полученном БАК.

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, 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 и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком доводят до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100 – 105⁰С, 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 рассчитывают 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, %.

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 разнополярными органическими растворителями.

При этом нужно учитывать природу биологически активных веществ и растворителя. Поэтому определение экстрактивных веществ из растительного сырья является одним из важнейших вопросов химической технологии переработки растительного сырья.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3-4

Определение влажности и минерального состава 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, измельченную 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 помещают в нагретый до $100 - 105^{\circ}\text{C}$ сушильный шкаф. Время высушивания отсчитывают с того момента, когда температура в сушильном шкафу вносье достигнет $100 - 105^{\circ}\text{C}$. 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.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле:

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

где M – масса сырья до высушивания, г;

M₁ – масса сырья после высушивания, г.

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

Макро- и микроэлементы и их роль в организме

К природным соединениям относятся и минеральные вещества животных и растений. Так, например, в живых организмах содержится 27 элементов таблицы Д.И. Менделеева: С, Н, О, Р, N, S, Ca, Na, K, Fe, Cl, Mn, Mg, Mo, Cu, Zn, Ni, F, I, Si, Se, Al, Li, Pb, Ag, Au, Cr; в организме человека – 18.5% С, 9.5% Н, 65% О, 3.3% N, 1.0% Р, 1.3% Ca, 0.2% Na, 0.1% Mg, 0.3% S, F и Si - в следовых количествах.

В растениях описан 21 химический элемент, из этого количества 16 содержатся у всех растений, 5 (В, Al, V, Mo, I) - у некоторых. По количественному содержанию их делят на макро (K, Ca, Mg, Na, Cl, P, Si) и микро (Cu, Zn, I, Co, Mn, Mo, Al, Ag, As, S, Fe) элементы. Все химические элементы участвуют в окислительно-восстановительных, ферментативных и обменных процессах организма. Например, **фосфор** в виде фосфорной кислоты, входит в состав АТФ, которая является источником энергии, освобождающейся при переходе АТФ в АДФ и АМФ. **Железо, медь, молибден** и другие элементы участвуют в образовании структур многих ферментов (цитохромы), **магний** является составной частью хлорофилла, активизирует ферменты, регулирует распад и превращения углеводов. **Кальциевые и магниевые соли** пектиновых кислот являются основой пектинов срединных пластинок,

которые склеивают между собой стенки отдельных клеток, а **кальций** является структурным элементом мембран клеток.

Калий и натрий играют важную 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, так как 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 P-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-полимерах, 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 Р-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.

Большое значение приобретают в настоящее время микроэлементы при лечении таких тяжелых заболеваний как болезни крови, злокачественные опухоли. Они помогают регулировать жизненно важные процессы в организмах растений, животных и человека, служат катализаторами, ускоряющими фотосинтез, синтез белков, процессы оплодотворения, развитие организма. Недостаток или избыток отдельных микроэлементов, обычно, вызывает снижение продуктивности сельскохозяйственных животных, уменьшение урожая, ухудшение качества получаемой продукции, ослабление сопротивляемости организма к неблагоприятным условиям среды, возникновение эндемических болезней у животных и человека: Базедова болезнь, акабальтоз, лизуха и другие, то есть **все вещества в живом организме человека, животного или растения не являются случайными, каждое из них выполняет свою, специфическую функцию, обеспечивая все процессы жизнедеятельности в целом.**

Растения более интересны тем, что при их использовании лечебный эффект достигается сочетанием минеральных веществ и биологически активных соединений. Некоторые растения обладают способностью избирательно поглощать из почвы только определенные элементы, являясь, таким образом, их концентраторами или накопителями. С другой стороны, состав микроэлементов у каждого растения является специфичным, поэтому **растения служат биоиндикаторами почвы**, на которой они произрастают и окружающей среды и могут быть использованы в биологическом мониторинге.

Существует взаимосвязь между содержанием в почве отдельных химических элементов и продуцированием растениями отдельных биологически активных веществ.

Например, растения, продуцирующие сердечные гликозиды, избирательно поглощают **марганец, молибден и хром**; продуцирующие алкалоиды - **медь, марганец и кобальт**; сапонины - **молибден и ванадий**; терпеноиды - **марганец**; кумарины, витамины и полифенольные соединения - **медь, цинк и марганец**; полисахариды - **марганец и хром**; углеводы - **цинк**.

В экологически неблагоприятных районах в лекарственных растениях происходит чрезмерное накопление тяжелых металлов или радионуклидов и любые нарушения оптимальных соотношений микроэлементов в них могут привести к непредсказуемым последствиям.

В комплексе, эти свойства растений могут быть использованы при оценке не только мест и условий их произрастания, но и при медицинской оценке значимости и пригодности тех или иных растений. Если растение усваивает какие-то вещества из окружающей среды и при этом выживает и адаптируется в ней, значит, эти вещества могут помочь и другим живым организмам, в том числе человеку, адаптироваться в местах его проживания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5-7

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 500°С) 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 рассчитывают 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 500°С) 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.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

Идентификация любых индивидуальных природных веществ включает:

- определение констант ($T_{пл.}$, $T_{кип.}$, n_D , $[\alpha]_D$);
- сравнение со стандартными образцами (СО, РСО, ГСО) разных групп БАВ по цвету от специфических проявителей (реагентов) и хроматографической подвижности R_f (если вещество известно);
- комплекс спектральных данных (если вещество новое) для доказательства основных структурных элементов молекул и их расположения.

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%-ая уксусная кислота
4. 15%-ая уксусная кислота
5. Бутанол: уксусная кислота: вода (6:7:3) + 0,01 г 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)

Поскольку абсолютное большинство описанных природных соединений выделяют из растений, нами выработан **научно-обоснованный подход к выделению природных веществ растений разных классов и групп** (схема 1).

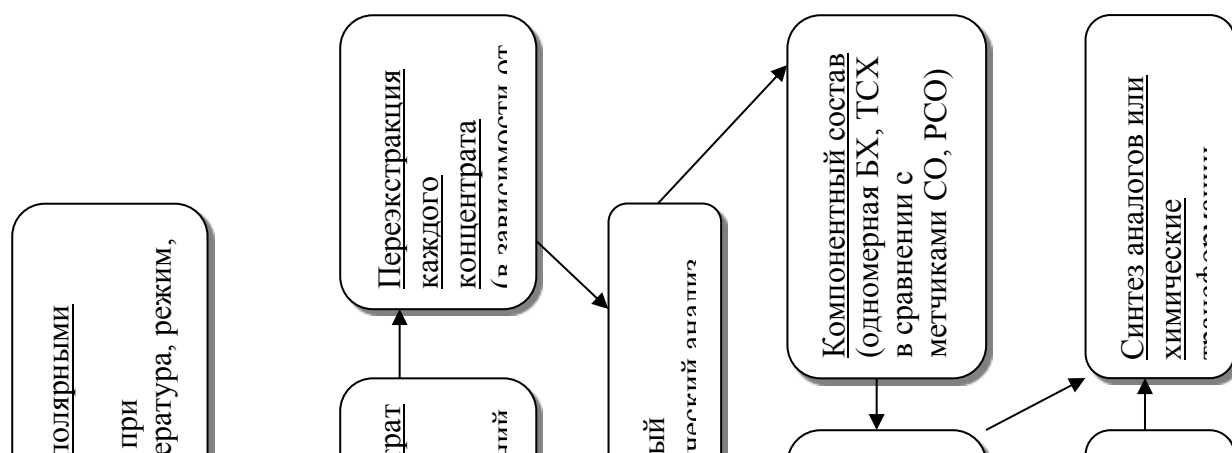


Схема 1- Научно-обоснованный подход к выделению природных веществ растений разных классов и групп

Общий подход к качественному анализу веществ растений

Систематические исследования последних лет показывают, что своими целебными свойствами лекарственные растения обязаны, прежде всего, гармоничному сочетанию содержащихся в них биологически активных веществ различных классов природных соединений.

Компонентный состав растений в основном колеблется от 30 до 80 соединений, которые иногда близки по химической природе. Именно это и затрудняет их суммарную идентификацию и соответственно требует фракционирования или хроматографического разделения.

Наибольшую информацию о качественном составе, как правило, дает применение экстрагентов по 2 и более признакам химического сродства, то есть, это вода, водный спирт (30-70%), ацетон (50%), диоксан (50%).

Таблица 4

Растворимость основных групп веществ 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	-	+	-	-	-
Слизи	част.	+	+	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.	+	+	+	-
Фенолоксиклоты	+	+	+	+	-
Флавоноиды					
- агликоны	-	огр.	+	+	+
- гликозиды	огр.	+	+	+	-
Дубильные вещества					
- гидролизуемые	+	+	+	+	-
- конденсированные	-	+	+	+	огр.
Антоцианы	-	+	+/HCl	+/HCl	-
Антраценовые					
- агликоны	-	-	+	+	+
- гликозиды	огр.	+	+	+	-
Ксантоны	-	-	+	+	-
Кумарины	-	огр.	+	+	-
Аминокислоты	+	+	+	+	-
Терпеноиды	-	-	огр.	+	+
Сердечные гликозиды	-	+	+	+	-
Сапонины	огр.	+	+	+	-

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

Как видно из таблицы 4, в воду при экстракции без нагревания переходят органические кислоты, углеводы, инулин, аминокислоты, гидролизуемые дубильные вещества, частично кислоты и гликозиды ароматического ряда, а слизи образуют коллоидный раствор.

Экстракция с нагреванием позволяет извлекать пектины, слизи, полисахара, все кислоты, гликозиды, дубильные вещества, сердечные гликозиды, сапонины. Не извлекаются при этом терпеноиды (карбоциклы) без функциональных групп, ксантоны, агликоны антраценов и флавоноидов, смолы, эфирные масла, липиды, каротиноиды, жирные масла.

Жирные, эфирные масла, пигменты, смолы, липиды, каротиноиды, терпеноиды, агликоны ароматического ряда извлекаются неполярными органическими растворителями.

Фракционирование и разделение веществ разных групп или различно замещенных веществ одной группы, отделение их от минеральных веществ проводится с применением показателя «растворимость».

Как правило, извлечение всех основных групп БАВ растений в большом количестве достигается водно-спиртовыми или водно-ацетоновыми растворами различной концентрации (лучше 50%) и метанолом.

Применение выше описанных экстрагентов позволяет вести процесс при температурах ниже 100⁰С, а непродолжительность и кратность нагревания позволяют сохранить даже термолабильные вещества. Разделение компонентов состава - самый

продолжительный и трудоемкий процесс в работе с растениями. Вначале первичный экстракт концентрируют в вакууме до небольшого объема. Затем пробу концентрата исследуют методом двумерной БХ (размер 10x10) в системах: н-бутанол - уксусная кислота - вода 40:12. 5:29 (I) и 2, 6 или 15% уксусная кислота (II).

Хроматограммы (6-10 штук) просматривают в УФ-свете, отмечают положение и цвет пятен, затем каждую хроматограмму проявляют специфическими (для каждой группы БАВ) проявителями, подтверждая или исключая группы веществ в составе извлечений.

Дальнейшее разделение групп или веществ осуществляют, применяя наиболее подходящую для конкретного состава схему разделения (фракционирование сменой растворителя, осаждение, хроматографическое разделение на специфических сорбентах в вариантах адсорбционной, препаративной, ТСХ, ГЖХ, ЖЖХ или ВЭЖХ).

Состав элюентов и их природа зависят от природы разделяемых веществ и неподвижной фазы и могут контролироваться по ходу разделения, при этом переход от неполярных элюентов к полярным используют чаще других.

Для анализа любых групп БАВ и фракций не существует строго специфичных реакций и, видимые признаки реакций (изменение цвета, выпадение осадка и др.) не всегда однозначны, поскольку в элюате или фракции присутствует «N» число компонент. В таких случаях рекомендуется параллельное проведение нескольких реакций.

Проблема анализа и стандартизации качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов также связана с проблемой изучения действующих и сопутствующих веществ, их количественного соотношения и растворимости.

Если действующее вещество является индивидуальным, с установленной структурой, то появляется проблема, которая заключается в его выделении и очистке от сопутствующих веществ.

Если это группа веществ одного класса, предполагается экстракция сырья подходящим экстрагентом и отделение от сопутствующих веществ других классов.

Если действует комплекс БАВ, то присутствует некая неопределенность о природе действующих(его) веществ(а) этого комплекса, связанная с отсутствием сведений о биологической активности каждого компонента комплекса.

Ниже приведены наиболее информативные реактивы на основные группы веществ растений.

Проявители для бумажной хроматографии

1. *Пары аммиака (С=O);*

2. *1%-й 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%-й раствор п-нитроанилина в 8%-ой соляной кислоте, прибавляют несколько капель 5%-го 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 железо-аммониевых квасцов (ЖАК)* (орто-диоксигруппировка любых фенольных соединений, 3-рядовое расположение ОН-фенольных соединений, дубильные вещества);

5. *о-толуидиновый проявитель*: в 10 мл 96%-го 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%-й спиртовой или ацетоновый раствор нингидрина* (аминокислоты, аминсахара, алкалоиды, амины);

7. 1%-й раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте (любые фенольные соединения, флаван – 3,4-диолы, эфиры катехинов, галлокатехины, катехины, дубильные вещества);
8. 1%-й водно-спиртовой раствор хлорида железа (III) (все фенольные соединения и кислоты);
9. 10%-й водный раствор натра едкого (оксиантрахиноны);
10. реактив Драгендорфа (стероидные алкалоиды, кислые соли алкалоидов, кумарины);
11. 3%-й спиртовой раствор магния ацетата (1,6-; 1,8-; 1,2-; 1,4-диоксиантрахиноны);
12. 0.5 н спиртовой 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%-й раствор калия едкого в метаноле (кумарины);
16. 2%-й раствор ацетата свинца (все фенольные соединения с орто-диоксигруппировкой, дубильные вещества);
17. 2%-й раствор бензохинона (пара-диоксигруппировка полифенолов).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

Органические кислоты

Органические кислоты разных групп одновременно могут быть в составе многих растений. Они встречаются 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 аминок-, феноло-, ароматические и «лишайниковые» кислоты.

Органические кислоты являются 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.

ОБЩИЕ ПРИЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

В природе очень большое разнообразие химических структур карбоновых кислот, поэтому единого метода выделения их из растительного сырья не существует.

Выделение суммы свободных органических кислот можно осуществлять методом анионообменной хроматографии на ионите АВ-17 или подобном ионите. Сначала сток стеклянной колонны покрывают увлажненным войлоком, затем заполняют подготовленным к работе ионитом АВ-17 до высоты 100 мм. При полностью открытом кране колонны вливают 5М уксусную кислоту до положения чуть выше поверхности ионита и промывают 50 мл 0.1М раствора кислоты уксусной. Выделение свободных органических кислот из спиртового экстракта осуществляют следующим образом: 10 мл образца вносят на подготовленный к работе анионит и пропускают со скоростью 1 кап/сек.

После этого колонку промывают с такой же скоростью 50 мл 0.1М раствора уксусной кислоты, а затем 50 мл воды очищенной. Связанные с анионитом кислоты элюируют со скоростью 1 кап/сек 100 мл 1М раствора натрия сульфата.

Для выделения феноло-, оксикоричных кислот к сконцентрированному спиртовому экстракту, добавляют равный объем 5% водного раствора натрия бикарбоната. При этом феноло-, оксикоричные кислоты образуют хорошо растворимые в воде соли. Сопутствующие соединения трижды экстрагируют этилацетатом (по 15-20 мл). Водную часть подкисляют (до pH=4-5). Феноло-, оксикоричные и лишайниковые кислоты трижды экстрагируют этилацетатом по 10-15 мл. Этилацетатный экстракт промывают в делительной воронке несколько раз водой для удаления минеральной кислоты и концентрируют в мягких условиях.

Разделение и анализ феноло-, оксикоричных и лишайниковых кислот необходимо осуществлять в системе: колонка Aqua ODS C₁₈, подвижная фаза А: 2% уксусная кислота, В: 0.5% уксусная кислота - ацетонитрил (1:1) с градиентным элюированием от 10:55 до 55:100 за 50 минут. Лишайниковые и фенолокислоты определяют при 280 нм, оксикоричные кислоты – при 320 нм. Кроме того, можно применять метод анализа феноло- и оксикоричных кислот на колонке с LiChrospher RP-C₁₈ с использованием подвижной фазы: 0.1% трифторуксусная кислота-ацетонитрил с увеличением содержания последнего в смеси от 10 до 100% и фотодиодного детектора. Высокую селективность в изучении феноло- и оксикоричных кислот имеет система: колонка – LaChrosorb RP-C₁₈, с линейным градиентом подвижной фазы метанол-уксусная кислота-вода от (10:2:88) до (90:2:8) за 30 минут и УФ детектировании при 276 нм или на колонке с Separon-SPH-18 с использованием элюента – ацетонитрила в водном буфере: уксусная кислота (1 моль/л), ацетат аммония (0.02 моль/л), тетра-метиламмоний (0.01 моль/л), pH 2.9-3.0 и УФ-детектировании (270 и 320 нм).

Определение содержания свободных органических кислот

25 г измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм плодов помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 200 мл воды и выдерживают в течение 2-х часов на кипящей водяной бане. Затем содержимое колбы охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и 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%-го спиртового раствора фенолфталеина, 2 мл 0,1%-го 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) рассчитывают по формуле:

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

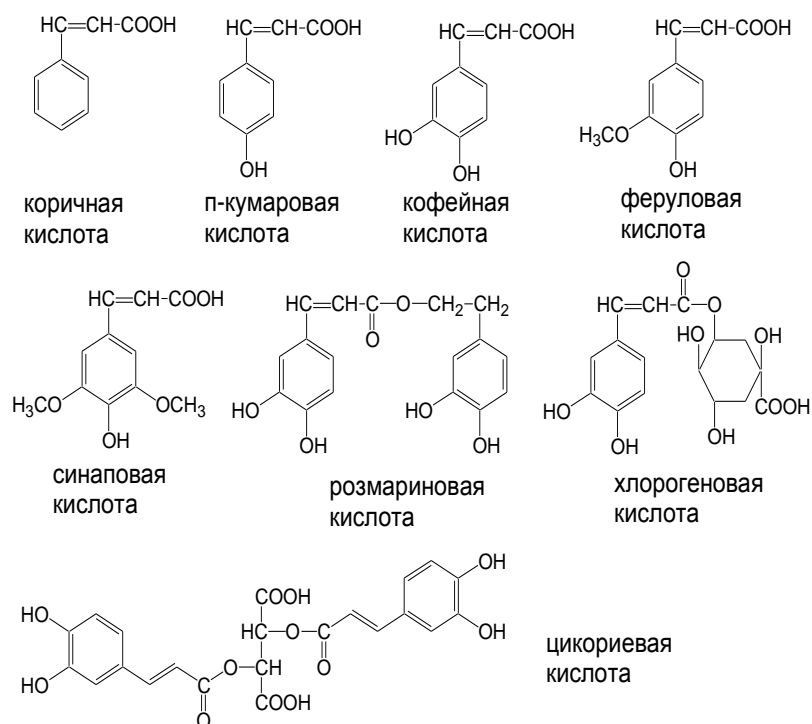
где 0,0067 г – количество яблочной кислоты, которое соответствует 1 мл раствора натрия едкого (0,1 моль/л), г;

V – объем раствора натрия едкого (0,1 моль/л), которое пошло на титрование, мл;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Оксикоричные кислоты содержатся в разных сочетаниях в свободном виде или в форме гликозидов практически в каждом высшем растении. Они относятся к классу кислот фенольного типа. Наиболее распространена кофейная кислота и ее соединения, в частности хлорогеновая, представляющая собой 3-кофеиловый эфир хинной кислоты:



Количественная оценка содержания оксикоричных кислот включает следующие этапы: извлечение их из сырья водой или 10-40% спиртовыми растворами с последующим титрованием аликвоты извлечений или спектрофотометрическим методом с использованием СО любой оксикоричной кислоты.

Определение содержания оксикоричных кислот

Около 0.5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 35 мл спирта этилового 40% и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 2 часов, охлаждают, фильтруют.

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

[5 мл препарата (капли, раствор, сок) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.] (*)

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения применяют воду очищенную.

Содержание производных гидроксикоричных кислот в пересчете на *кислоту цикориевую* в абсолютно сухом сырье (X_1) или в препарате (X_2) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{D \times 35 \times 100 \times [100]}{m \times 1 \times 782 \times [(100 - W)]}$$

$$X_2 = \frac{D \times 5 \times 100}{782 \times m}$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 330 нм;

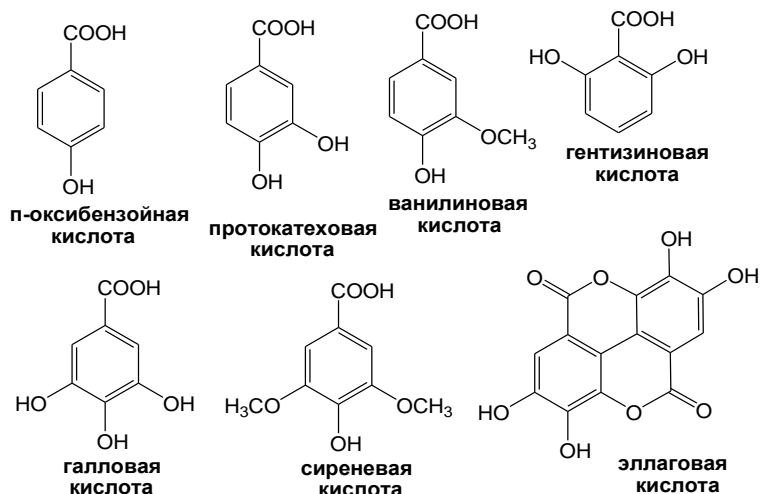
m – масса навески сырья, в граммах;

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

782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты в воде очищенной при длине волны 330 нм.

* При низком содержании гидроксикоричных кислот, разведение можно опустить. Отмеченное разведение можно использовать как начало методики определения гидроксикоричных кислот в жидких лекформах.

Феноловые кислоты.



Определение содержания феноловых кислот

Метод 1. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу, прибавляют 50 мл спирта этилового 70-90%, экстрагируют на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Затем колбу с содержимым охлаждают и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым.

* [5 мл препарата (настойки, жидкие экстракты) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым.]

Оптическую плотность полученного раствора измеряют при длине волны 290 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения применяют спирт этиловый 96%.

Содержание кислот феноловых в препарате или в сырье, в процентах (X), рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times V_1 \times 100 \times [100]}{P \times V_2 \times m \times [(100 - W)]}$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 290 нм;

V₁ – объем испытуемого раствора, в миллилитрах;

V₂ – объем аликвоты испытуемого раствора, в миллилитрах;

m – масса навески сырья в граммах;

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

P – удельный показатель поглощения раствора СО при длине волны 290 нм = 510 для кислоты галловой, 464 – для кислоты кофейной, 616 – в пересчете на цинарин при длине волны 325 нм, 470 – в пересчете на хлорогеновую кислоту в спирте этиловом 60% при 328 нм.

* Методика пригодна и для анализа лекарственных форм.

Метод 2. 2 г препарата помещают в стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 10% раствора кислоты уксусной и тщательно перемешивают, фильтруют и промывают 10% раствором кислоты уксусной до исчезновения желтого окрашивания фильтра. Полученный раствор пропускают через слой силикагеля L40/100, собирая раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стакан промывают дважды 10 мл 10% раствором кислоты уксусной и промывной раствор также пропускают через колонку до получения объема 100 мл (элюат).

* [10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл (V_1) и доводят объем раствора спиртом этиловым 50% до метки.]

Оптическую плотность полученного раствора измеряют при длине волны 325 нм. В качестве раствора сравнения применяют спирт этиловый 50%.

Содержание суммы фенолокислот в препарате в мг/100 мл, в пересчете на цинарин, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times V_1 \times 10^5 \times d}{616 \times V \times m}$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 325 нм;

V_1 – объем испытуемого раствора, в миллилитрах;

V – объем элюата, добавленного в испытуемый раствор, в миллилитрах;

m – масса навески препарата, в граммах;

d – относительная плотность испытуемого раствора препарата;

616 – удельный показатель поглощения цинарина при длине волны 325 нм в спирте этиловом 50%.

* При низком содержании фенолокислот стадию разбавления можно опустить.

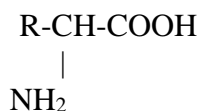
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10

Аминокислоты

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

В зависимости от взаимного расположения amino- и карбоксигрупп различают $\alpha, \beta, \gamma, \sigma$ 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 ничтожно мала), в спиртах, водно-органических растворителях.

ОБЩИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ, БЕТАИНОВ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Широкое и разнообразное применение в научных исследованиях, медицине и биотехнологии находят препараты высокоочищенных аминокислот, бетаинов, белков и пептидов. Так как многие из аминокислот являются высоколабильными, поэтому их выделение осуществляют при помощи предельно мягких методов и при пониженной температуре (0-5⁰С). К таким методам выделения относятся: диализ, высаливание, гель-фильтрация и ионообменная хроматография. В последние годы капиллярный электрофорез применяется для выделения, разделения и анализа бетаинов, белков и пептидов.

Капиллярный электрофорез (СЕ, СЕ/MS) проводится на капиллярных колонках длиной от 40 см до 1 м. Движение молекул электролита от анода к катоду осуществляется в пустотелом капилляре, к стенкам которого приложен отрицательный потенциал, а к его концам накладывается разность потенциалов, под действием электрического поля, что приводит к общему течению жидкости. В такой системе положительно заряженные молекулы анализируемого образца движутся к катоду быстрее потока жидкости в капилляре, незаряженные молекулы «текут» с потоком, а отрицательно заряженные, удерживаясь положительным зарядом, текут медленней всего, но тем не менее, текут к катоду. При этом наблюдается весьма эффективное разделение молекул по зарядам. Спектральным (УФ) или другим подходящим методом (часто- масс-спектрометр-СЕ/MS) осуществляется идентификация аминокислот, бетаинов и белковых комплексов.

В таком методе анализа используются пустотелые кварцевые капилляры с эффективной длиной 24.5, 40, 56, 72 и 104 см и внутренними диаметрами 50, 75 и 100 мкм. С наружной стороны капилляры имеют полиамидное покрытие, которое улучшает их прочность. Торцы капилляров обработаны с зеркальной чистотой поверхности. Также необходимо "окошко" для детектирования по методу УФ-спектроскопии. Также имеются капилляры с удлиненным оптическим путем детектирования. Например, для капилляров с внутренним диаметром 25 мкм оптический путь составляет 125 мкм, для 50-мкм капилляров- 150 мкм, а для 75 микронных- 200 мкм.

Капилляры, которые покрыты изнутри поливиниловым спиртом минимизируют гидрофобные и электростатические взаимодействия анализируемых соединений со стенками и, таким образом, снижают электроосмотический поток. Покрытие стабильно в растворах с рН от 2.5 до 9.5. Все это улучшает форму пиков и воспроизводимость времен удерживания.

Для **капиллярной электрохроматографии (СЕС)** капилляры обычно заполняют СЕС-Hypersil сорбентом для ВЭЖХ (силикагелевые частицы размером 3 мкм с привитой фазой). В качестве привитой фазы используют (С₈, С₁₈ и фенил) углеводородные цепи. Капиллярная электрохроматография сочетает в себе разделительную способность ВЭЖХ и эффективность капиллярного электрофореза. В результате наложения высокого потенциала на обоих концах капилляров можно создавать избыточное давление для предотвращения выделения пузырьков газа.

Капиллярный электрофорез отличается чрезвычайно высокой эффективностью разделения от родственных ему методов жидкостной хроматографии.

Фотометрическое определение аминокислот

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика применяют 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 прибавляют 10 мл нингидринового реактива, нагревают 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 0,2 М 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 настаивают в 20 мл воды при комнатной температуре в течение 24 часов. К отфильтрованному экстракту (10 мл) прибавляют 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 спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете 10 мм. 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) рассчитывают 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;

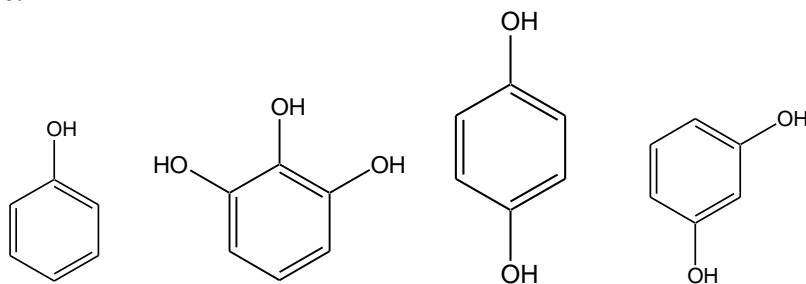
W – потеря в массе при высушивании, %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11-13

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 водно-органических смесях, спиртах, ацетоне.



Фенол

Пирогаллол

Гидрохинон

Резорцин

Так как все фенолы, как кислоты, хорошо растворяются в воде и водно-органических смесях, спиртах, ацетоне, поэтому **их, совместно с родственными соединениями, извлекают из сырья** экстракцией водой или низкопроцентными водно-спиртовыми растворами.

Пренилированные фенолы и С-С (С-О-С)- фенольные димеры и тримеры, встречающиеся в ряде растений, извлекают спиртами или чаще 70-90% водно-спиртовыми и 50% водно-ацетоновыми растворами.

Для выделения С-С и С-О-С фенольных димеров воздушно-сухое сырье экстрагируют кипящим метанолом. Сконцентрированный досуха в мягких условиях метанольный экстракт, растворяют в воде очищенной и последовательно фракционируют

н-гексаном, хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом. Хлороформную фракцию наносят на колонку с силикагелем и элюируют сначала бензолом, затем смесью бензол-этилацетат с увеличением содержания последнего. Фракции, элюированные смесью состава (17:3 и 13:7) по отдельности препаративно рехроматографируют методом ВЭЖХ (80% CH₃CN). Хроматографирование бутанольного экстракта осуществляют на колонке с сефадексом LH-20, элюируя водным метанолом (0-100%). Фракцию, элюированную 20% водным метанолом рехроматографируют на колонке с RP-18 сорбентом и подвижной фазой 40-50% водный метанол.

Для выделения простых пренилированных фенолов воздушно-сухое сырье последовательно экстрагируют петролейным эфиром и ацетоном. Ацетоновый экстракт исчерпывающе экстрагируют хлороформом. Хлороформный экстракт концентрируют досуха в мягких условиях, обезжиривают действием гексана и наносят на колонку с силикагелем СС. Компоненты экстракта элюируют с колонки хлороформом и ацетоном. Первую хлороформную фракцию препаративно разделяют методом ТСХ в системе: петролейный эфир-хлороформ (3:1), последующие хлороформные фракции делят в системе хлороформ-этилацетат (4:1). Препаративное выделение веществ ацетоновых фракций осуществляют в системе: пропанол-2 – хлороформ (1:25).

Количественное определение фенолов в растительном сырье

Около 1 г мелко измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 30 мл этилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане при умеренном кипении. 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 прибавляют 0,5 мл реактива Фолина-Дениса. После перемешивания в течение 3 мин прибавляют 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия, смесь хорошо перемешивают и 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 NaWO₂·2H₂O, 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, добавляют 1 мл раствора кислоты вольфраматофосфорной, доводят объем 15%-ым раствором натрия карбоната до метки, перемешивают.

Оптическую плотность, полученного раствора, измеряют через 2-3 мин после добавления 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) рассчитывают 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!

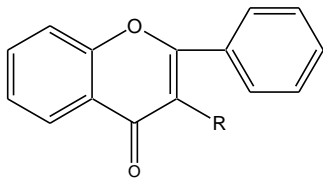
Приготовление раствора кислоты вольфраматофосфорной: К 10 г натрия вольфрамата добавляют 8 мл кислоты фосфорной 85%, 75 мл воды очищенной и нагревают в течение 3 часов с воздушным холодильником. Затем охлаждают и доводят объем водой очищенной до 100 мл, перемешивают.

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

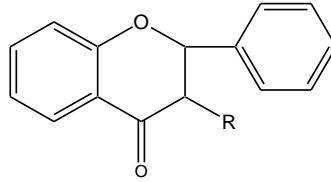
Флавоноиды

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

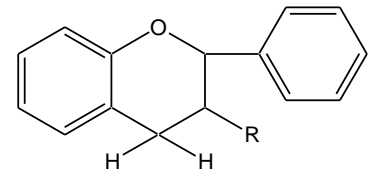
Процесс извлечения флавоноидов можно сочетать с гидролизом гликозидных форм хлороводородной или серной кислотами при нагревании. Метод избирательной экстракции заключается в извлечении флавоноидов из растительного сырья различными органическими растворителями в определенной последовательности. Вначале добиваются обезжиривания сырья, удаления воскообразных и смолистых веществ при помощи низкокипящего петролейного эфира и четыреххлористого углерода. Затем, для выделения флавоноидов осуществляют экстракцию растительного сырья спиртами, ацетоном и их разбавленными водными растворами. Таким образом, 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 флавоон
R=OH флавонол



R=H флаванон
R=OH флаванонол



R=H флаван
R=OH флаванол

Общие методы выделения и разделения флавоноидов

Флавоноиды, как полиоксипроизводные извлекают из растений спиртами, ацетоном и их разнопроцентными водными растворами, после обезжиривания сырья и отделения терпеноидов и липидов экстракцией бензолом и (или) хлороформом.

Чаще всего применяется следующая схема фракционирования веществ растений, представленная на рисунке 89:

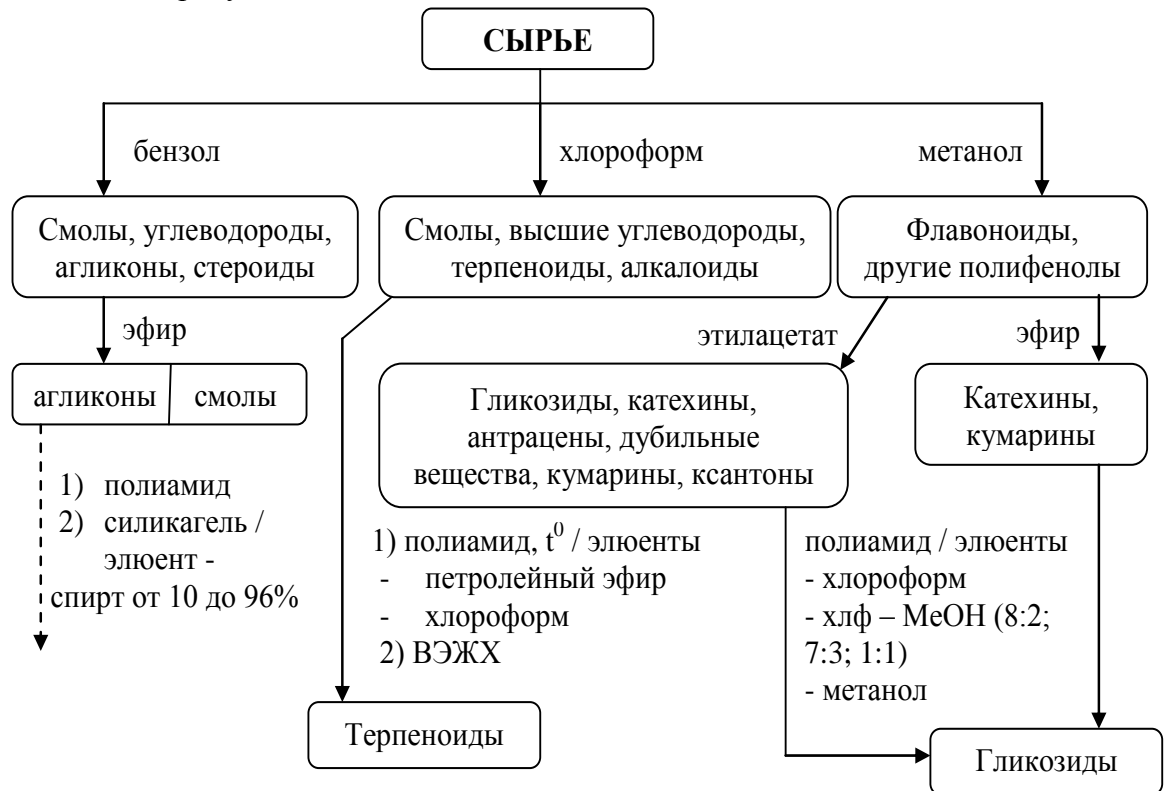


Рис. 89 Схема фракционирования веществ растений

Методом электрофореза в формиат/ацетатном буфере при pH=2.0 разделяют сульфаты флавоноидов или другие полифенолы, аминокислоты, сложные эфиры

Растительное сырье обрабатывают петролейным эфиром, бензолом или смесью бензол-хлороформ 1:1, чтобы удалить хлорофилл, терпеноиды, липиды, стероиды.

Однако при такой обработке может наблюдаться потеря некоторого количества флавоноидных агликонов. Кроме того, некоторые изофлавоны и ротеноны экстрагируют гексаном, а метилированные флавоны растворимы в петролейном эфире.

Некоторые фенолы, катехины, оксикоричные кислоты отделяют эфиром. После эфира сырье обрабатывают этилацетатом, для отделения лейкоантоцианидинов, димерных проантоцианидинов, эфиров различных групп соединений.

В связи с тем, что флавоноиды накапливаются практически во всех органах растений, то методы их выделения зависят от сырья и от типа выделяемых флавоноидов. Увеличение выхода экстрактивных веществ достигается предварительной сушкой растений.

В свежесобранных растениях возможен собственно ферментативный гидролиз гликозидов, поэтому экстракция такого сырья проводится кипящими экстрагентами.

Для экстракции флавоноидных гликозидов в растворитель прибавляют следовые количества кислоты, сочетание кислоты и нагревания приводит к гидролизу любых типов гликозидов.

Антоцианы являются катионами и в клетках растений они существуют в виде солей с органическими кислотами, их экстрагируют из сухого сырья 0.1-2% растворами кислоты хлороводородной в охлажденном метаноле, а затем осаждают трехкратным избытком эфира и перекристаллизовывают в форме хлоргидратов (или пикратов).

Антоцианы не растворимы в эфире, бензоле, ацетоне и хлороформе. При наличии ацилированных форм антоцианов применяют уксусную или щавелевую кислоты. Очистка и разделение антоцианов осуществляется осаждением ацетатом свинца из спиртовых растворов с последующей доочисткой хроматографическими методами на целлюлозе с использованием элюентов: н-бутиловый спирт: 2н кислота хлороводородная 1:1 или уксусная кислота: вода: кислота хлороводородная 15:82:3, на полиамиде с использованием воды и 1% раствора кислоты хлороводородной в метаноле.

Наряду с антоцианами, флавоновые вещества, которые содержат орто-диокси-группировку в кольце В, например, лютеолин, кверцетин, их гликозидные формы при обработке их спиртовых растворов средним уксуснокислым свинцом образуют осадки ярко желтого или красного цвета. После осаждения осадки отделяют, суспендируют в спирте и подвергают разложению в токе сероводорода. Сульфид свинца удаляют фильтрованием, регенерированное вещество выделяют из спиртового раствора.

Ацетатом свинца осаждаются многие сопутствующие вещества с орто-диоксигруппировкой, начиная от фенолов, поэтому этот реактив является менее полезный. В качестве осадителей используются некоторые кислоты, сульфаты, фосфаты, поливинилпирролидон при рН-3.5 в 10% водном метаноле. При одновременном присутствии ацилированных производных эти осадители не используются.

Сумма флавоноидов из плодов боярышника, леспедеции копеечниковой и репешка волосистого выделялась по схеме, представленной на рисунке 90:

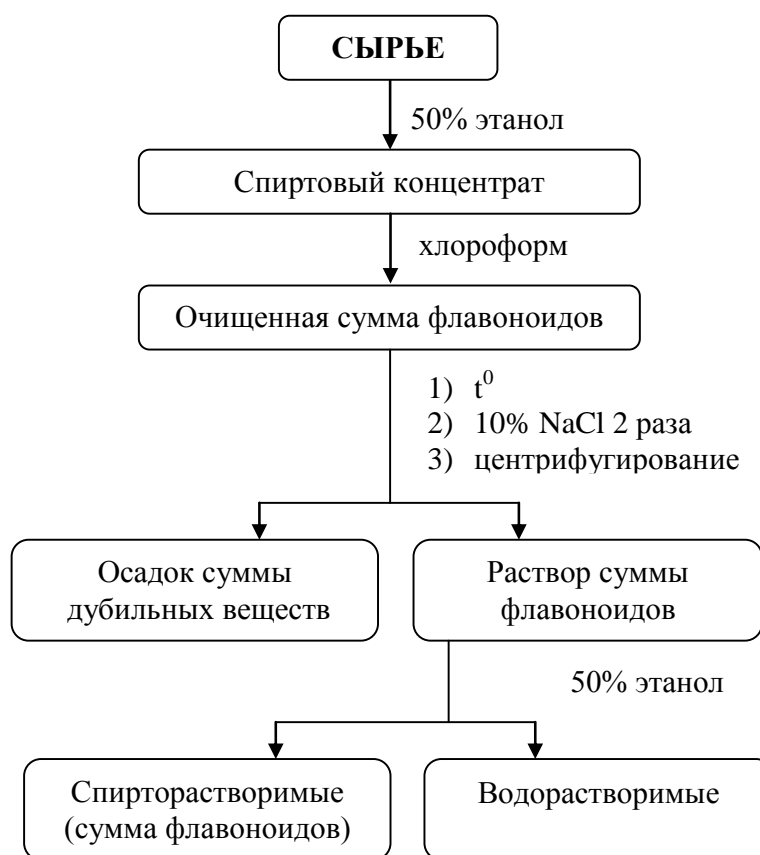


Рис. 90 Схема выделения суммы флавоноидов из плодов боярышника, леспедеции копеечниковой и репешка волосистого

В обращенно-фазовом режиме на колонке Сепарон C_{18} при скорости элюирования 100 мкл/мин, элюент: вода-уксусная кислота-метанол 65:5:30, первыми, как правило, выходят фенолокислоты, обладающие наименьшим сродством к неполярной неподвижной фазе, затем - гликозиды, а затем агли-коны в порядке уменьшения числа ОН-групп (кверцетин, лютеолин, апигенин).

Электрофорез на бумаге, как метод разделения и очистки флавоноидов, не имеет каких-либо существенных преимуществ по сравнению с БХ, но его используют для анализа веществ, близких по структуре, например, апигенин, лютеолин, кверцетин, мирицетин; для отделения веществ с орто-диокси-группировкой от других ОН- замещенных, анализа антоцианидиновых красителей, сульфатов флавоноидов. С помощью электрофореза в присутствии ионов металлов, способных образовывать комплексы, проводят разделение и очистку флавоноидов от более простых фенольных соединений.

Сульфаты флавоноидов отличает низкая подвижность в БУВ и высокая в 5% уксусной кислоте, но более существенные отличия, пригодные для идентификации, получают методом электрофореза при $pH=2.2$.

Разделение **флавонов и их С-гликозидов, С-алкилпроизводных** осуществляют в системах бензол - пиридин - аммиак 80:20:1 и ацетон-бензол 1:3, причем в последней системе можно также поделить флавоны и флавонолы.

Разделение **флавонолов и флавоноловых гликозидов, изофлавонов** осуществляют в системах этилацетат - петролейный эфир 3:1 или 1:1.

Для **флаванонов и антоцианидов**, имеющих близкие значения R_f , рекомендуется проводить двумерное хроматографирование. В растворителе БУВ 4:1:5, антоцианидины имеют R_f от 0.40 до 0.80, агликоны - около 0.70, антоцианины - 0.40. Второе направление в 2-5% уксусной кислоте, 1% HCl позволяет отличить антоцианы, флавоны, флавонолы, халконы, ауроны и антоцианидины.

С увеличением степени гидроксирования, подвижность соединений уменьшается во всех системах растворителей. Метилирование гидроксигрупп приводит к повышению величин R_f , ацетилирование может способствовать повышению и понижению величин R_f , а гликозидирование снижает величину R_f , аналогично новой ОН-группе.

Флавоноиды, имеющие плоскую структуру (агликоны флавонолов, халконы, ауруны и т.д.) можно отделить от некомпланарных (флаван-3-гликозиды, катехины, флаваноны и т.д.) так как подвижность последних в водных растворителях близка к нулю.

Кверцетин и его изомерные монометилвые эфиры хорошо разделяются в системе БУВ (кверцетин - 0.64, 3-ОСН₃-кверцетин - 0.93, 5-ОСН₃ - 0.48, 7-ОСН₃ - 0.72, 3'-ОСН₃ - 0.74). 7-метилвый эфир (рамнетин) и 3'-метилвый эфир (изорамнетин) наиболее близки по подвижности в БУВ, но хорошо делятся в системе пропанол - уксусная кислота - вода 1:1:1.

Изменение положения одного и того же углевода в молекуле сказывается на ее подвижности, например, 3-, 7- и 4'-гликозиды кверцетина в системе БУВ имеют R_f , соответственно: 0.58, 0.37 и 0.48. Ниже приведен рисунок хроматограммы С-гликозидов:

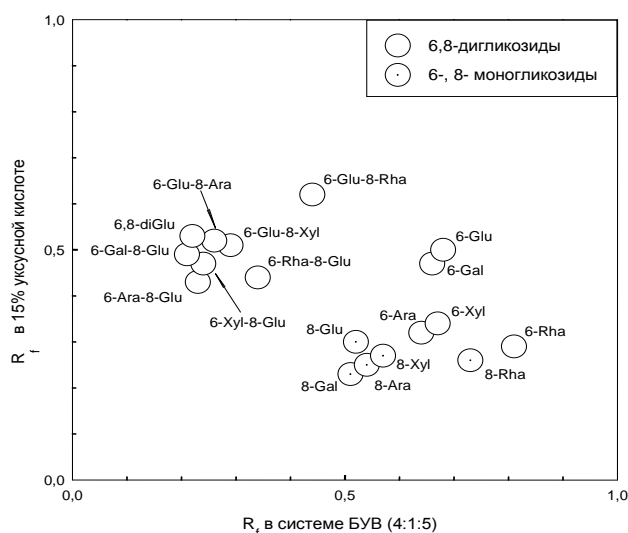


Рис.91 Хроматограмма С-гликозидов

Разделение **О- и С-гликозидов изофлавонов и флаванонов** производят на колонках или пластинах силикагеля и кремневой кислоты в системах БУВ.

При двумерном хроматографировании в качестве второй подвижной фазы применяют 2, 6 или 18% уксусную кислоту.

При наличии значительных количеств флавоноидов в растительных экстрактах удачным может быть вариант колоночной хроматографии с применением силикагеля, полиамида, целлюлозы, сефадекса, оксида алюминия, магнезола, кизельгура и т.д. При этом подвижные фазы подбирают исходя из растворимости разделяемой суммы веществ.

Гликозиды изофлавонов, флаванонов, дигидрофлавонолов, флавонов и флавонолов разделяют элюентами: бензол - метанол 3:1, 7:3, 6:4 и 1:1.

Гликозиды флавонов и флавонолов делят с применением водно-метанольных смесей, а смесь моно-, ди- и триметоксипроизводных кемпферола и кверцетина разделяют с использованием сложного элюента: хлороформ - метанол - метилэтилкетон - 2,4-пентадион 20:10:5:1 или более простого сочетания: хлороформ - этилацетат 3:1, хлороформ - метанол 1:3.

Ауруны и халконы между собой разделяют метанолом, а в присутствии бифлавонов и флаванонов лучшее разделение достигается при использовании водно-метанольных смесей.

Не только природа разделяемых веществ и характер элюентов, но и величина макромолекул полиамидного сорбента и кислотно-основные свойства флавоноидов влияют на величину сорбции флавоноидов.

При этом наличие двойной связи $C_2=C_3$ у флавоноидов приводит к значительному повышению сорбционной активности таких соединений по сравнению с соответствующими дигидропроизводными.

При наличии в растениях многих типов флавоноидных молекул одновременно, оптимальную экстракцию осуществляют 70-80% метанолом; экстракт концентрируют до минимального объема и осуществляют последовательную обработку хлороформом (или бензолом), этилацетатом и каждую из полученных фракций изучают методом двумерной бумажной хроматографии на наличие флавонов, флавонолов, флаван-3-олов, флаван-3,4-диолов и их гликозидов.

Если в сырье обнаружены антоцианы, их отделяют обработкой или 1% метанольным раствором HCl или в метанольный экстракт пропускают ток сухого хлороводорода. Затем экстракт разбавляют 1:3 водой и осуществляют экстрагирование изоамиловым спиртом. Как правило, антоцианы на хроматограммах окрашены в красный цвет. Более 3-х антоцианов в экстракте успешно разделяют препаративно на бумаге или на колонках с целлюлозой.

Флаван-С-гликозиды, галактозиды и ксилозиды, замещенные по 6- и 8- или по 6,8-положениям, а также моно-, ди- и тригликозиды разделяют в системе этилацетат - пиридин - вода - метанол 80:12:10:5, при этом 6- и 8-С-глюкозиды имеют R_f 0.44 и 0.63; 6- и 8-С-галактозиды - 0.32 и 0.46; 6- и 8-С-ксилозиды - 0.62 и 0.70, 6,8-С-диглюкозид - 0.62 и 0.70; 6,8-С-диглюкозид - 0.11; 6,8-ди-С-ксилозид - 0.30, 6-С-ксилозил-8-С-глюкозид - 0.19.

Изофлавоноиды разделяют в системе хлороформ - метанол 4:1, **флаваноны** - бензол-уксусная кислота-вода 125:72:3, хлороформ - уксусная кислота - вода 2:1:1 и бензол - пиридин - муравьиная кислота 6:9:5, **дигидрофлавонолы** - хлороформ-метанол-уксусная кислота 7:1:1, **халконы и ауруны** в системе: бензол - этилацетат - муравьиная кислота 9:7:4, хлороформ - этилацетат - муравьиная кислота 6:3:1, толуол - этилацетат - муравьиная кислота 5:4:1, **антоцианидины и антоцианины**: этилацетат - муравьиная кислота - 2н HCl или этилацетат - бутанол - муравьиная кислота - вода 5:3:3:1.

Птерокарпаны и изофлавоны делят на силикагеле Мерск-60 в системах бензол - этилацетат - метанол - петролейный эфир 6:4:1:6 или хлороформ - метанол 8:2.

Разделение **катехинов** и отделение их от полимеров осуществляют на силикагеле, а из водных растворов - на кожном порошке, десорбируя катехины эфиром и этилацетатом, а **полимеры катехинов** - ацетоном и 50% ацетоном.

Разделение **антоцианов** возможно на силикагеле или целлюлозе с применением в качестве элюентов и растворителей БУВ 4:1:5 или препаративно на бумаге в этой же подвижной фазе.

Разделения, основанные на адсорбции, успешно использованы для большинства групп флавоноидов. Например, разделение антоцианов на G-25 в 60% водном этаноле, в водном ацетоне с добавлением кислоты, на LH-20 в подкисленном метаноле, флавоновых и флавоноловых гликозидов на G-10 с использованием смеси метанол - вода 1:1, изофлавонов на G-25 в 0.1M гидроксиде аммония, катехинов, процианидиновых димеров и процианиди-новых агликонов на LH-20 в этаноле или смеси его с пропанолом 1:1 и широкий набор флавоноидов и их гликозидов на LH-20 в метаноле.

Примером успешного применения ВЭЖХ может служить исследование интенсивно окрашенных экстрактов чашелистников *Poinsettia* на колонках с μ -Бондапаком C_{18} и Лихросорбом RP_{18} в режиме изократического и градиентного элюирования смеси 2% уксусная кислота - ацетонитрил или 2% уксусная кислота - тетрагидрофуран или на основе триацетата целлюлозы на СГ-диоле с использованием в качестве элюентов гексан - изопропиловый спирт 9:1 или метанол при повышении его содержания от 20% до 60% в течение 20 минут (УФ-детектор, 295 нм).

Эффективное разделение достигается на колонке с Нуклеосилом 100-С₁₈ в двух вариантах: - градиентное элюирование смесью метанол - тетрагидрофуран – 0.5% фосфорная кислота переменного состава от 22.5:22.5:55 до 30:30:40 с УФ-детектором на 340 нм или элюирование смесями, состав которых в течение 30 минут меняется: изопропиловый спирт - тетрагидрофуран 25:65 с ацетонитрилом и 0.5% фосфорной кислотой 15:15:83.5 до 0:78:75 с УФ-детектором 254 и 350 нм, на колонке с Pell ODS и с Нуклеосилом С₁₈ при 32⁰С при градиентном элюировании смесью уксусная кислота - вода 10:90 - 82:18 в течение 47 минут и от 82:18 до 100:0 за 8 минут (УФ-детектор 277 нм).

Анализ катехинов проходит в условиях нормального фазового процесса с использованием колонки с Лихросфером 100-CN (5 мкм) и подвижной фазы н-гексан - этилацетат 55:45 с УФ-детектором 278 нм.

Для антоцианидинов пригоден μ -Бондапак С₁₈ с использованием элюента вода - уксусная кислота - метанол 71:10:19, **для антоцианов** - Лихросорб RP₁₈ с использованием 1.5% фосфорной, 20% уксусной кислот и 25% раствора ацетонитрила в воде, **для флавонов и флавонолов** - μ -Бондапак - этанол-вода-уксусная кислота 650:1:350, **для бифлавоноидов** - Меркосорб S-160 с 8% раствором метанола в диизопропиловом эфире, **для флавонол-гликозидов** - μ -Бондапак С₁₈ - 2% уксусная кислота и тетрагидрофуран (градиент), **для изофлавоноидов** - Порасил - 3 части смеси дихлорметан - этанол - уксусная кислота 485:15:1 и 22 части гексана, **для метилированных флавонов** - Лихросорб 81-60 с гептан - этанолом 3:1, **для проантоцианидинов** - Лихросорб RP₈ с использованием смеси воды с метанолом.

Для разделения флавоноидов и отделения их от фенолокарбоновых кислот, причем полученная картина разделения принципиально отличается от характерной для обычной ТСХ наибольшее применение имеет обращенно-фазовой высокоэффективной ТСХ на силикагеле.

Для разделения гликозидов флавоноидов на препаративном уровне (от нескольких мг до нескольких грамм) предложена **капельная противоточная хроматография**.

Доступны компьютерные варианты сочетания 2-3 методов анализа, разделения и идентификации веществ одновременно из одной аналитической пробы, например: хромато-масс-спектрометрия, хромато-УФ-, хромато-ИК-, хромато-УФ-ПМР- и т.д. Описано быстрое разделение полиметоксифлавонов методом **сверхкритической флюидной хроматографии**, ВЭЖХ и аффинной хроматографии.

Количественное определение флавоноидов (в пересчете на кверцетин)

Около 1 г (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90%-го 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%-ным спиртом и доводят объем фильтрата 90%-ным 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%-ном спирте и доводят объем раствора 95%-ным 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%-ным спиртом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают 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%-ным раствором алюминия хлорида при длине волны 430 нм;
 m – масса сырья, г;
 W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14-16

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, приливают 25 и 50 мл дистиллированной водой и кипятят на водяной бане при температуре 80 – 85°C 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 хроматографии.

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

Примечание: Для приготовления настоек можно использовать 5-10%-й 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 водным раствором спирта (разной процентности) и настаивают при комнатной температуре в течение определенного времени (несколько суток, недель). Таким образом, можно получить 4 настоя. Затем, полученные экстракты отфильтровывают.

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

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 – 80°C, при этом получают 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.

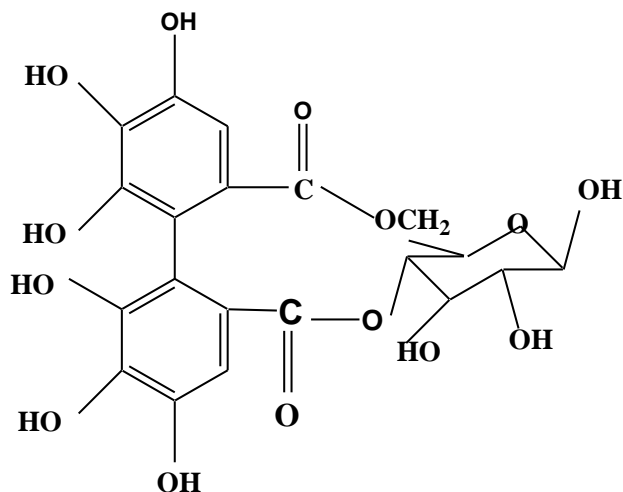
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17

Дубильные вещества

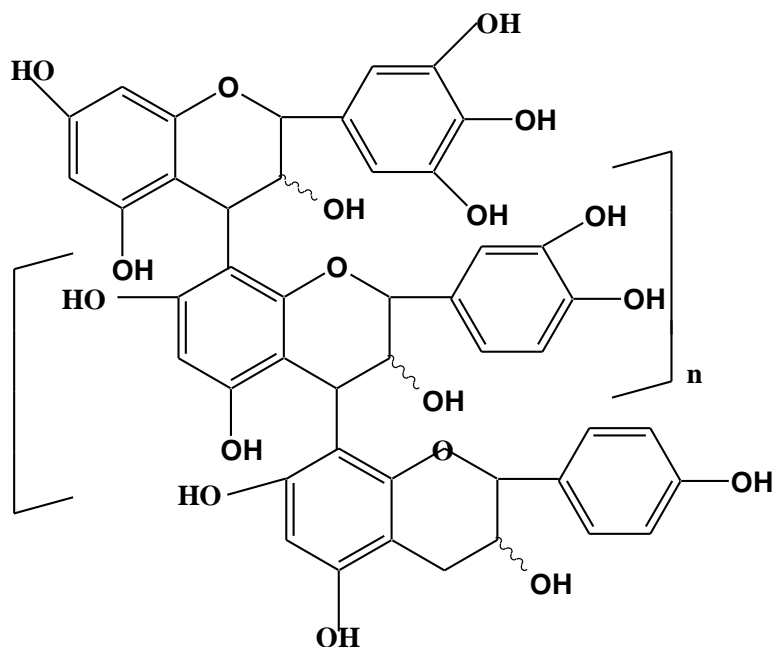
Под термином «дубильные вещества» понимают специфическое «дубящее» действие органических веществ, чаще всего полифенольной природы.

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.



ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

С наличием большого числа фенольных ОН-групп, особенно с рядовым расположением, связывают возможность дубильных веществ образовывать комплексы, хелаты или соли с белками, протеинами, алкалоидами, тяжелыми металлами, либо выводя

их из организма или способствуя их биоактивности. Конденсированные дубильные вещества ограниченно растворимы в воде, поэтому их выделение из растений проводят экстракцией ацетоном или метанолом. Из сухого остатка экстракцией этилацетатом выделяют сумму димеров, дальнейшее отделение от мономеров и полимеров проводят на колонках капрона, перлона, сефадекса, целлюлозы, ионообменных смол. Сумму полученных димеров сразу же переводят в ацильные производные, а затем перацетаты разделяют на колонках кремневая кислота : целит 545 (1:1) из неполярных растворителей или вариантом препаративной хроматографии в тонком слое или на бумаге. Перацетаты разделяются достаточно хорошо, за исключением профизетинидина и пробинетидина, димеров брусники и конского каштана (тип А₁ и А₂).

Дубильные вещества конденсированного и смешанного типа отделяют от гидролизуемых прибавлением 10% уксусной кислоты и 10% раствора ацетата свинца. При этом в осадок выпадают гидролизуемые дубильные вещества и остается черно-зеленый фильтрат при наличии конденсированных дубильных веществ.

С помощью хроматографических методов: адсорбционно-распределительной хроматографии на колонках целлюлозы, силикагеля или полиамида, ионообменной хроматографией на колонках кати-онита (Daueх-50), гель-хроматографией на колонках сефадекса G-50 или G-100 можно разделять на индивидуальные компоненты суммарные извлечения дубильных веществ.

Метод диализа может быть использован для предварительной очистки, лучшие результаты, при этом, получены при выделении высокомолекулярных флавоноидов и танинов, растворимых в воде и для смесей с сахарами и полисахаридами, а также растворимыми неорганическими компонентами растительных экстрактов.

Оптимальных результатов в разделении конденсированных дубильных веществ удалось достичь на неподвижной фазе Лихросорб RP₈ с (10 мкм), Сферисорб гексил (5 мкм) и Гиперсил SAS (5 мкм) с УФ-детектором 280 нм. Предложена методика анализа и разделения конденсированных дубильных веществ на колонке [250x4] с Нуклеосилом-5 C₁₈ при 45⁰С с применением в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрила и 0.5М раствора фосфорной кислоты при повышении концентрации ацетонитрила и расходе подвижной фазы 0.75 мл/мин.

Применяя колонку [250x4.6] с Сферисорбом ODS (5мкм) при анализе конденсированных танинов в соке некоторых сортов французских яблок, удалось получить достаточно хорошие результаты при градиентном элюировании смесями: А (вода - 1М HCl 99.8: 0.2) и В (метанол - 1М HCl 99.8: 0.2) с повышением содержания В в А от 0 до 50% в течение 85 минут при расходе подвижной фазы 1.8 мл/мин и использовании УФ-детектора с переменной длиной волны.

При разделении и анализе смешанных танинов хороших результатов удалось достичь на колонке с Лихросфером RP₁₈ (5 мкм) при повышении концентрации уксусной кислоты в смеси её с водой от 2 до 10% за 99 минут, при расходе подвижной фазы 0.5 мл/мин и на колонке Diasorb-130-C16T при повышении концентрации ацетонитрила в 0.1М ортофосфорной кислоте от 0 до 15% за 180 минут, с дальнейшим элюированием смесью ацетонитрила и муравьиной кислоты при повышении концентрации ацетонитрила от 0 до 30% за 80 мин при расходе подвижной фазы 4 мл/мин при использовании УФ-детектора 280 нм.

Широко применяются варианты жидкость-жидкостной хроматографии с использованием в качестве сорбентов неподвижных фаз, помимо названных выше, адсорбентов аффинного типа для выделения, разделения и очистки дубильных веществ. Перспективность использования химически модифицированных сорбентов связана со способностью дубильных веществ образовывать комплексы не только с биополимерами (эластазой, коллагеназой, желатином, альбумином и др.), но и с алкалоидами и другими азотсодержащими лекарственными веществами. Описано разделение компонентов

дубильных веществ из корневища бадана, кровохлебки, лапчатки, змеевика, коры дуба методом нетрадиционной аффинной хроматографии.

Различить катехины, димерные проантоцианидины и конденсированные флаваны можно по их положению на бумажной хроматограмме: высокомолекулярные флаваны образуют «дорожки» от точки нанесения по движению водных систем, в зависимости от молекулярной массы - чем ниже масса, тем выше фронт «дорожки».

Бифлавоноиды, их перметилловые эфиры, хинокифлавоны (4-О-8'-, 4-О-6'- межфлавановые связи), **аментофлавоны** (3,8'-, 3,6'- связи) делят в системе бензол - пиридин - этилформиат – диоксан 5:1:2:2 в тонком слое силикагеля.

Для варианта двумерной хроматографии на бумаге применяют системы растворителей: н-бутиловый спирт - уксусная кислота - вода в соотношениях 6:1:8, 4:1:5, 40:12.5:29, в одном направлении и кислота уксусная 2%, 6% и 15% - во втором. Для одномерной бумажной хроматографии используют системы соляная кислота - уксусная кислота - вода (3:3:1), н-бутиловый спирт - уксусная кислота - вода - этиленгликоль (4:1:5:1), муравьиная кислота - соляная кислота - вода (5:3:2), н-бутиловый спирт - соляная кислота - вода (7:2:5).

Для хроматографии в тонком слое сорбента более пригодны системы: ацетон - вода - пиридин (20:4:1), бензол - метиловый спирт - пиридин (16:2:1), бензол - этиловый спирт (1:1), бензол-ацетон (1:5, 1:4, 1:3).

На рисунке 92 приведена схема разделения катехинов и гликозидов, которую можно использовать для любого катехин-содержащего сырья:

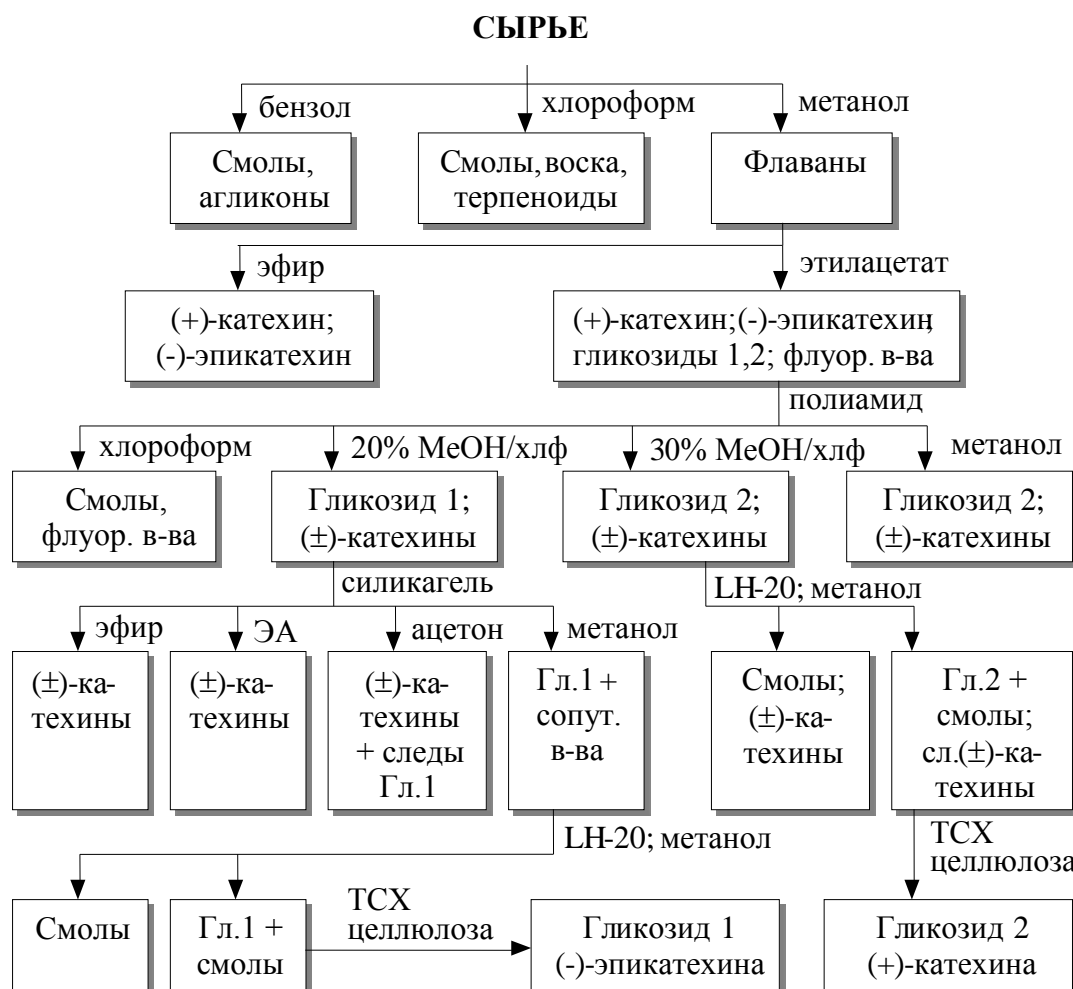


Рис.92 Схема разделения катехинов и гликозидов из растительного сырья

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 рассчитывают 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, в г;

250 – общий объем извлечения, в мл;

25 – объем извлечения, взятого на титрование, в мл;

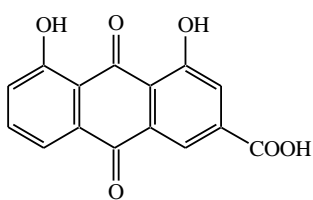
W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18

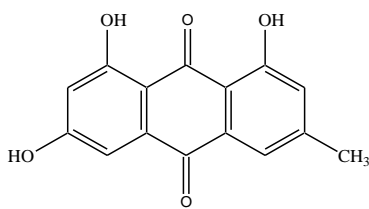
Антрахиноны

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

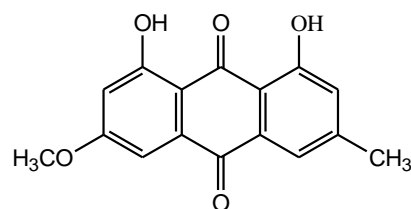
Различают окисленные, восстановленные и конденсированные производные антрахинонов, ниже представлены некоторые примеры структур:



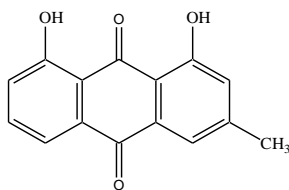
реин



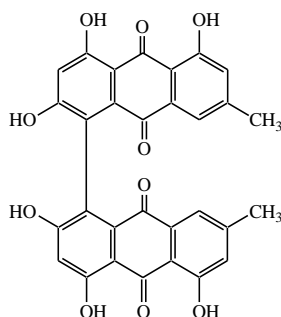
эмодин



фисцион



хризфановая кислота



5,5'- диэмодин

Все они могут содержать в качестве заместителей OH, OCH₃, C(O)H, COOH, радикалы от C₁ до C₅, 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.

ОБЩИЕ ПРИЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ АНТРАХИНОНОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Для выделения антрагликозидов растительный материал экстрагируют водой, спиртами (этиловым, метиловым, изопропиловым) или водно-спиртовыми смесями. Агликоны лучше растворимы в органических растворителях, но растворимость их избирательная. Для получения агликонов, гликозиды в растительном материале подвергают гидролизу, нагревая с кислотой, или энзиматическому расщеплению, после чего извлекают свободные агликоны этиловым эфиром, бензолом или хлороформом. Антрахиноны, имеющие в качестве заместителя карбоксильную группу, растворяются в водных растворах карбонатов и гидрокарбонатов щелочных металлов и их гидроксидов с образованием солей. Антрахиноны с гидроксилом в β-положении не взаимодействуют с гидрокарбонатами, а с водными растворами карбонатов и гидроксидов щелочных металлов дают феноляты. Вещества, содержащие α-гидроксил, образуют феноляты только в растворах щелочей.

Сырье измельчают до размеров частиц 3-5 мм и экстрагируют при нагревании и перемешивании в экстракторах обычного типа, как правило, циклами по 2-5 часов 2-3(4) раза, либо методом противотока.

Для отделения сопутствующих веществ, экстракты объединяют, концентрируют до небольшого объема и фракционируют концентрат в соответствии с химической природой сопутствующих веществ.

Количественное определение антрахинонов

Аналитическую пробу сырья

Около 1 г (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 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 прибавляют 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.

Оптическую плотность полученных щелочно-аммиачных извлечений измеряют 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 или др.) рассчитывают 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, г;

m – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

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 длине волны 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.

Оптическую плотность раствора измеряют при длине волны 530±5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Далее, как в методе 1.

Содержание производных антрахинона в процентах рассчитывают по формуле:

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

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 530±5 нм;

m – масса навески сырья или препарата, в граммах;

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

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

*** Метод пригоден для анализа сырья и фитопрепаратов [54].*

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°C. Охлаждают, фильтруют в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора ацетоном до метки, перемешивают.

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

Содержание производных антрахинона в пересчете на гиперин в процентах (X) рассчитывают по формуле:

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

где

D - оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 590 нм;

513 – удельный показатель поглощения гиперина в ацетоне при длине волны 590 нм;

* 718 - удельный показатель поглощения гиперина в спирте этиловом при длине волны 590 нм;

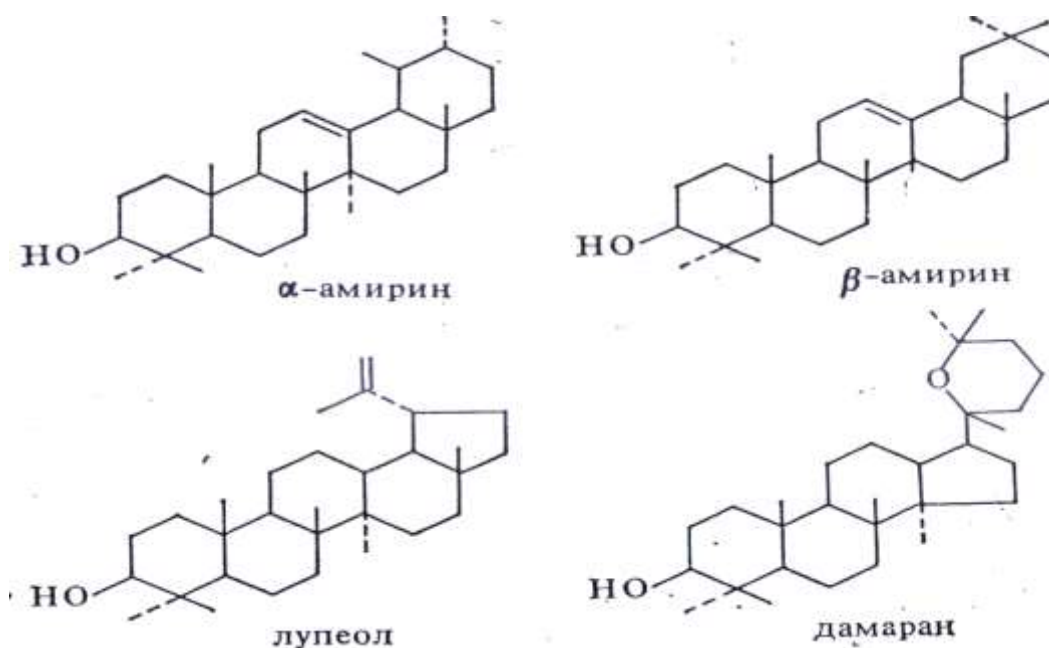
m – масса навески препарата, в граммах;

b – средняя масса препарата (таблетка, суппозиторий и т.д.).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №19

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 растворимые в воде, легко – в растворах щелочей.



Для выделения сапонинов суммарный экстракт получают после предварительной обработки сырья петролевым эфиром или четыреххлористым углеродом для разрушения комплексов сапонинов со стеринами.

Методы выделения суммы сапонинов из экстракта зависят от их строения. Гликозиды с небольшим числом моносахаридных остатков (3-4) обычно плохо растворимы в воде и выпадают в осадок при разбавлении спиртовых растворов водой. Полярные сапонины плохо растворимы в метиловом и этиловом спиртах и выпадают в осадок при охлаждении или продолжительном стоянии спиртовых растворов, либо при добавлении спирта к водным и водно-спиртовым растворам. Кислые сапонины растворимы в водных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении. Из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины осаждают этиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, а некоторые – бутиловым и изоамиловым спиртами. Из водных растворов сопутствующие малополярные примеси извлекают этиловым эфиром, хлороформом, четыреххлористым углеродом, а тритерпеновые гликозиды - бутиловым или изоамиловым спиртом.

Полученные сапониновые фракции очищают повторным переосаждением, что, однако, не приводит к полной очистке от полярных сопутствующих веществ: неорганических примесей, моно- и олигосахаридов, гликозидов других классов, органических кислот и др. Ряд методов основан на способности сапонинов образовывать нерастворимые в воде или водном спирте соли с гидроксидом бария или ацетатом свинца и комплексы с холестерином, танинами, белками. Соли затем разлагают угольной или серной кислотами; холестериновые комплексы - извлечением холестерина бензолом, толуолом, этиловым эфиром или пиридином; таниновые - кипячением с водной суспензией оксида цинка; белковые - извлечением гликозидов подходящими органическими растворителями. Эта группа методов дает более чистую сумму сапонинов, но не является общей методикой и не гарантирует количественного выделения и отсутствия значительного содержания балластных веществ. Сапонины, образующие коллоидные растворы, очищают от примесей, дающих истинные растворы (моносахариды, минеральные вещества), с помощью диализа и электролиза. Хорошие результаты очистки сапониновых фракций от растительных пигментов и восстанавливающих сахаров получены при гельфильтрации на сефадексах V-25, V-50 и A-25.

На рисунке 93 приведена схема выделения сапонинов из соевой муки:

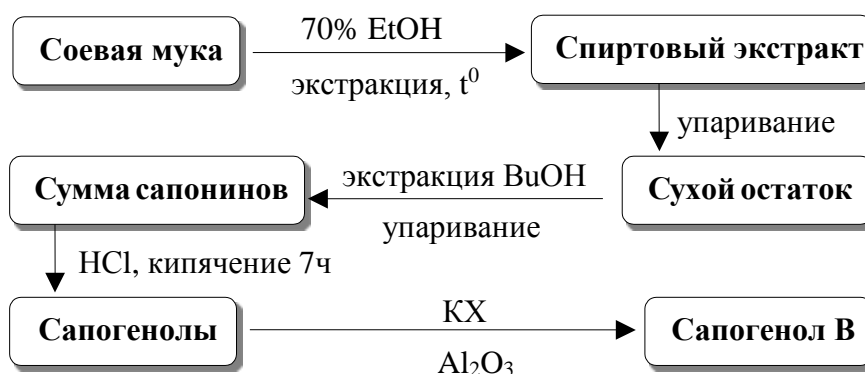


Рис. 93 Схема выделения сапонинов из соевой муки

Количественное определение сапонинов

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в колбу с нормальным шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 20 мл 3%-го ацетонового раствора азотной кислоты и настаивают в течение 1 часа при частом и сильном взбалтывании.

Извлечение отфильтровывают в цилиндр вместимостью 100 мл. Порошок корня в колбе промывают 10 мл ацетона и фильтруют через тот же фильтр. В колбу с сырьем добавляют 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 вместимостью 200 мл. Цилиндр ополаскивают 40 мл этилового спирта, который выливают в тот же стакан. Далее по каплям при интенсивном перемешивании прибавляют 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 вместимостью 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 вместимостью 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 рассчитывают 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, в мл;

822 – молекулярная масса глицирризиновой кислоты;

1100 – молекулярный показатель поглощения.

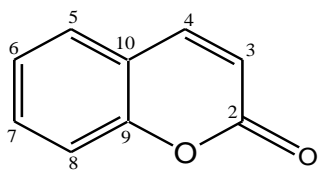
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №20

Кумарины

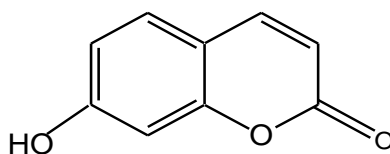
Оксикоричные кислоты являются спутником кумаринов в растениях, из которых они образуются в процессе биогенеза.

Разнообразие кумаринов объясняется наличием бензольного и пиранового кольца, составляющие скелет любого кумарина.

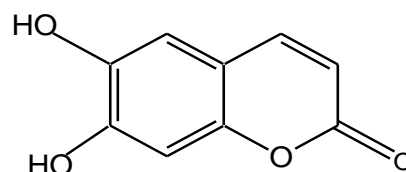
В растениях чаще всего присутствуют кумарин, его оксипроизводные, фууро-, пиранокумарины и гликозидированные формы.



Кумарин



Умбеллиферон



Эскулетин

Общие методы выделения кумаринов

Для выделения кумаринов из растительного сырья чаще всего используют экстракцию различными растворителями: метиловым и этиловым спиртом, бензолом, хлороформом, этиловым и петролейным эфирами.

Наиболее исчерпывающая экстракция кумаринов, как агликонов, так и гликозидов достигается этиловым спиртом. Получаемый после отгонки спирта густой экстракт последовательно фракционируют разнополярными растворителями: хлороформом, этиловым эфиром, ацетоном и др.

В некоторых случаях целесообразно растительный материал предварительно обрабатывать петролейным эфиром, а затем исчерпывающе экстрагировать хлороформом, этиловым и метиловым спиртом.

Сконцентрированный экстракт из растительного сырья обрабатывают 0.5% водным раствором калия гидроксида для удаления кислотных и фенольных компонентов, чтобы отделить кумарины от сопутствующих веществ. Затем экстракт обрабатывают 5% водно-спиртовым раствором КОН в течение 1 часа, при этом в кумаринах раскрывается лактонное кольцо и образуются соли кумариновых кислот. Одновременно происходят и другие реакции: омыление соответствующих жиров и других сложных эфиров. Индифферентные составные части экстракта (стерины, спирты, углеводороды) удаляются обработкой щелочного раствора этиловым эфиром. Водно-щелочной раствор подкисляется кислотой хлороводородной разбавленной. При этом освобождаются органические кислоты, а присутствующие кумариновые кислоты переходят с отщеплением элементов воды в кумарины. Смесь кислот и кумаринов извлекается этиловым эфиром. Кислотные составные части из лактонной фракции можно удалить добавлением по каплям 0.5% КОН в раствор, в который они переходят, в то время как нейтральные кумарины, как более устойчивые по отношению к разбавленной щелочи, остаются в эфире.

При описанном методе выделения суммы кумаринов, сложно избежать их частичной деструкции, поэтому как для очистки кумаринов от сопутствующих веществ, так и для выделения индивидуальных соединений широкое распространение получили хроматографические методы. В качестве сорбента при хроматографировании кумаринов чаще всего используется оксид алюминия и силикагель. Кумарины хорошо элюируются с колонки смесью петролейного эфира с хлороформом, бензолом, смесью бензола с этилацетатом, смесью бензола с метиловым спиртом в различных соотношениях. Эфирные масла, глицериды, стероиды и тритерпены обычно элюируются в первых фракциях, затем следуют кумарины. Кумарины на колонке и в элюатах обнаруживаются по флуоресценции в УФ свете.

Методы бумажной и тонкослойной хроматографии в исследовании растительных кумаринов позволяют быстро устанавливать однородность экстракта(элюата), проводить сравнительный качественный анализ образцов и препаративное выделение индивидуальных соединений.

Из-за плохой растворимости кумаринов в водных и лучшей – в неполярных фазах, разделение их осуществляется при помощи распределительной хроматографии на импрегнированной бумаге. В качестве подвижной фазы применяют бензин, петролейный эфир (70-110⁰), смесь петролейный эфир – бензол – метиловый спирт (5:4:1). Хроматографическая бумага, как правило, предварительно пропитывается 20% водным раствором этиленгликоля или пропиленгликоля, либо 10% раствором формамида в спирте метиловом.

Помимо бумажной хроматографии, широко применяется хроматография в тонком слое оксида алюминия или силикагеля. Хорошее разделение кумаринов в тонком слое достигается при применении следующих систем:

- 1 петролейный эфир – этилацетат (2:1, 7:3, 8:2);
- 2 н-гептан – бензол (4:1);
- 3 н-гексан - этилацетат (7:1);

- 4 хлороформ – метанол (19:1);
- 5 хлороформ – диэтиловый эфир (7:3);
- 6 толуол – метанол – ацетон (10:10:0.8);
- 7 дихлорметан - метанол (97:3).

Кумарин и его производные могут быть разделены методом ВЭЖХ на колонках с «обращенной» фазой, состоящей из неподвижной фазы Kromasil C₁₈ и подвижной фазы состава вода - ацетонитрил (1:3) при расходе подвижной фазы 2 мл/мин (40⁰С) и УФ-детектировании (254 нм). Высокое разрешение получено в системе ODS RP₁₈ сорбент / метанол + вода (8:2).

Количественное определение кумаринов

Около 2г (точная навеска) измельченного сырья 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 рассчитывают по формуле:

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

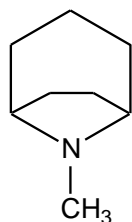
где D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 272 нм;
734 – удельный показатель поглощения СО кумарина при длине волны 272 нм;
m – масса навески сырья, в г;
W – потеря в масее при высушивании сырья, в %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №21

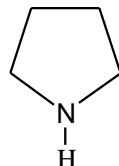
Алкалоиды

К алкалоидам относятся азотсодержащие органические вещества основного характера, которые обладают 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).

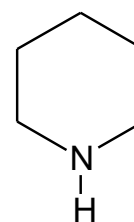
Алкалоиды – основания, легко растворимые в спирте, эфире, хлороформе, дихлорэтаноле. Алкалоиды-соли не растворимы в органических растворителях, кроме спирта.



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 тернопсин и абсолютно сухое сырье (X) в процентах рассчитывают 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 тернопсин, 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, %

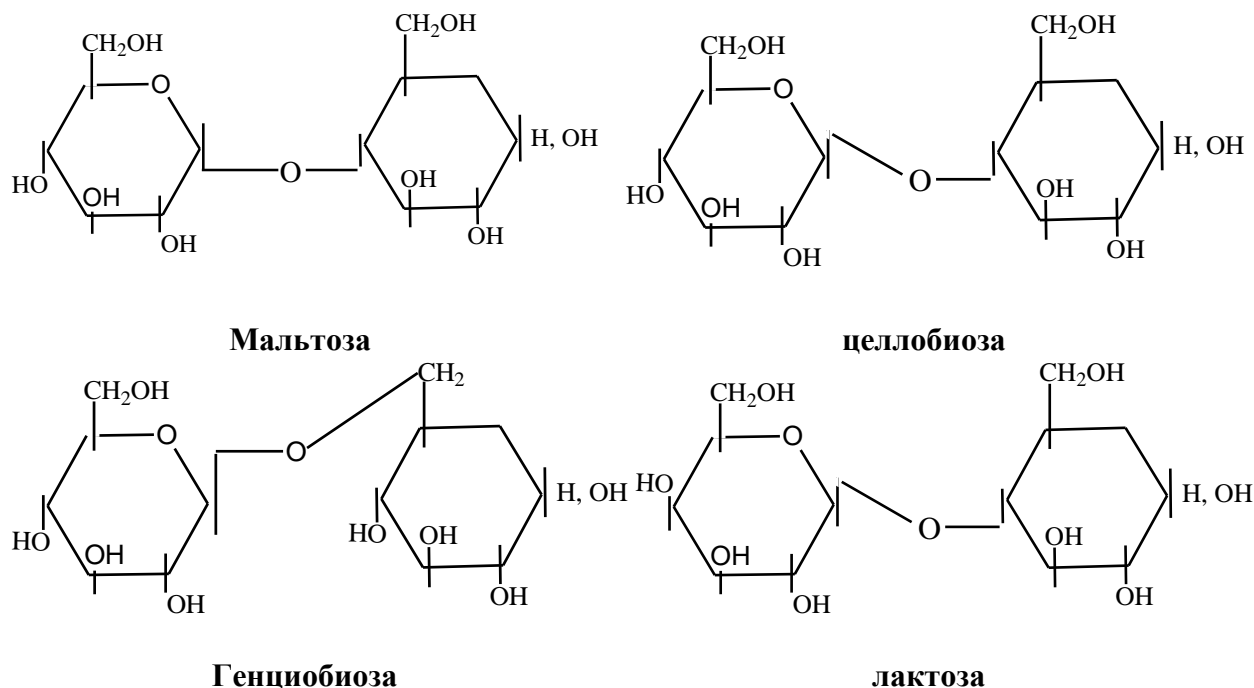
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №22-23

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 разветвленного строения.



Количественное определение полисахаридов в растительном сырье

Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, добавляют 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, добавляют 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) рассчитывают 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. Прибавляют 70 – 80 мл горячей воды и выдерживают колбу на водяной бане при температуре 80 – 90°С в течение 1 часа. Затем колбу охлаждают. Для осаждения белков добавляют 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%-го 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 $1 \cdot 10^{-5}$ до $6 \cdot 10^{-5}$ г/мл. К 1 мл раствора прибавляют 1 мл 5%-го 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) рассчитывают по формуле:

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

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

490 – длина волны;

W – влажность в массе при высушивании сырья, %

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 24-26

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 рассчитывают по формуле:

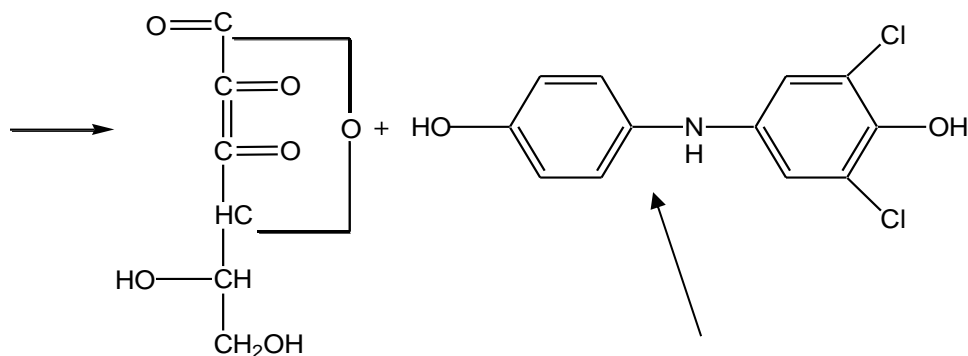
$$X = \frac{V \cdot 0,000088 \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}$$

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

490 – длина волны;

W – влажность в массе при высушивании сырья, %

Реакция с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом



Количественное определение рибофлавина

0,06г растительного сырья помещают в колбу на 1000 мл, добавляют 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.

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

Содержание рибофлавина в процентах (X) рассчитывают по формуле:

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

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, добавляют 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].

*

Оптическую плотность раствора измеряют 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 длине волны 450 нм;

D_0 – 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.

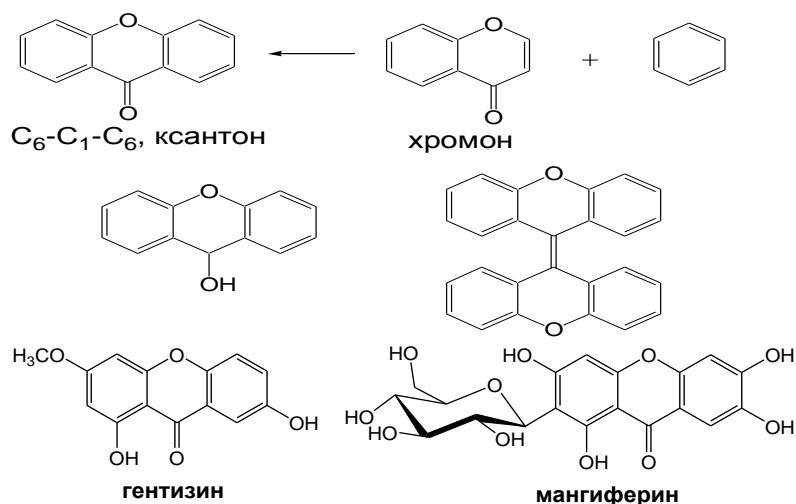
**Методика пригодна и для анализа препаратов.*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 27-28

Ксантоны, в переводе с греческого слова *xanthos* означают желтый. Это конденсированная система бензольных колец и гетерокольца (добензо-γ-пирона). С другой стороны их можно рассматривать как производные хромона, общей формулы $C_6-C_1-C_6$.

В растениях это пигменты желтого цвета, чаще α- и β-оксипроизводные и димерные структуры, которые обладают кардиотонической, диуретической, желчегонной, психотропной, антимикробной, инсектицидной, противотуберкулезной активностью.

Наиболее распространены в растениях гентизин, мангиферин (2-С-β-D-глюкопиранозил-1,3,6,7-тетраоксиксантон) и его изомеры, моно- и биозиды с С-С и С-О-С связями:



ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КСАНТОНОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Ксантоновые соединения по химическим свойствам близки очень близки к флавоноидам и антрахинонам. Они содержатся во всех органах растений и методы их выделения зависят от вида растения и содержащихся в нем веществ.

Для выделения суммы ксантонов из растительного сырья известно несколько методик, которые заключаются в первоначальной фракционной экстракции сырья в аппарате Сокслета разнополярными растворителями, с последующим адсорбционно-распределительным хроматографированием на колонках с сефадексом либо гель-фильтрацией.

Например, выделение суммы ксантонов из растения кассии включает в себя следующие стадии технологических процессов: воздушно-сухое сырье последовательно экстрагируют в аппарате Сокслета петролейным эфиром и хлороформом (дихлорметаном) и этилацетатом в течение 48 часов. Затем концентрированные эфирные и хлороформные экстракты для получения ксантоновых агликонов, по отдельности хроматографируют на колонке с силикагелем L60/120, элюируя гексаном и смесью гексан-этилацетат (98:2 и 95:5). Ксантоновые гликозиды получают хроматографируя концентрированную этилацетатную фракцию на колонке с силикагелем L60/120 при градиентном элюировании смесью: дихлорметан-этилацетат состава от 100:0 до 70:30 с шагом 5%. Наибольшее количество ксантоновых гликозидов содержит фракция состава (85:15).

Другими наиболее эффективными экстрагентами ксантоновых соединений из растительного сырья являются этиловый и метиловый спирты. В этом случае, концентрированный спиртовой экстракт фракционируют между водной и органическими (хлороформ, этилацетат) фазами. Хлороформную фракцию наносят на колонку с силикагелем L60/120, элюирование ксантонов проводят смесью гексана и этилацетата от 1:10 до 1:1. Этилацетатную фракцию наносят на колонку с силикагелем L70/230 и элюируют смесями н-гексан-этилацетат (20:1, 10:1 и 5:1), дихлорметан-ацетон (10:1, 5:1 и 0:1) и дихлорметан-метанол (10:1, 5:1 и 0:1). Полученные фракции рехроматографируют на Сефадексе LH-20, с использованием в качестве подвижной фазы 75% водного метанола. Индивидуальные ксантоны перекристаллизовывают из ацетон-гексановых смесей [127,128].

Из *Gentiana lutea* гентизин и его гликозиды были выделены по схеме, приведенной на рисунке 94:

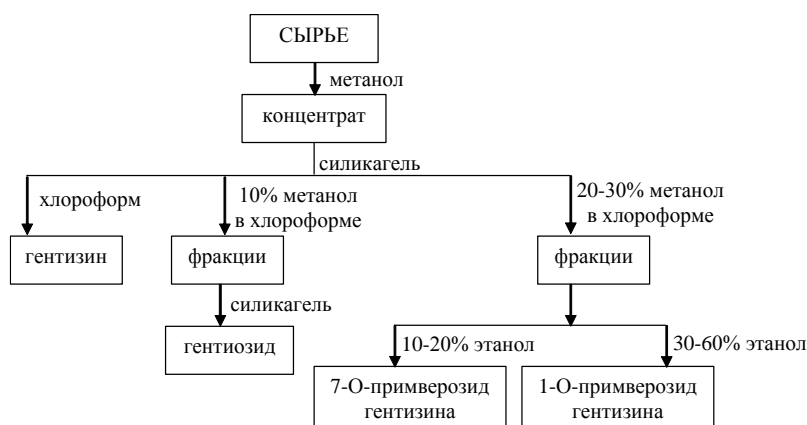


Рис. 94 Схема выделения гентизина из *Gentiana lutea*

Количественное определение ксантонов

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 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), рассчитывают по формуле:

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

где

D - оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 372 нм;

D_1 - оптическая плотность раствора СО при длине волны 372 нм;

m - масса навески сырья, в граммах;

m_1 - масса навески СО, в граммах;

V_1 - объем раствора СО, в миллилитрах, нанесенного на хроматограмму;

V_2 - объем испытуемого раствора в миллилитрах, нанесенного на хроматограмму;

W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Опишите основы заготовительного процесса лекарственного растительного сырья.
2. В какое время производят сбор надземной части растений?
3. В какое время производят сбор подземной части растений?
4. При какой температуре осуществляют сушку сочных плодов?
5. Каким видом анализа можно определить доброкачественность растительного сырья?
6. Какие методы анализа применяют для определения подлинности лекарственного растительного сырья?
7. Что такое измельченность лекарственного растительного сырья?
8. Опишите состав новогленовых препаратов.
9. Опишите состав галеновых препаратов.
10. Опишите отличия галеновых препаратов от новогаленовых.
11. Какой экстрагент можно применять для получения жидких экстрактов?
12. Использование каких вакуум-выпарных аппаратов является более эффективным при концентрировании извлечений?
13. Перечислите виды сушилок контактного типа?
14. При помощи каких методов можно получать масляные экстракты?
15. Что понимают под циркуляционной экстракцией?
16. Что понимают под влажностью растительного сырья?
17. Перечислите основные этапы заготовительного процесса растительного сырья.
18. Что такое подлинность растительного сырья?
19. Какие побочные явления могут возникнуть при технологическом процессе – выпаривании?
20. Какие экстрагенты можно применять для получения сухих экстрактов?
21. Какие экстрагенты можно применять для получения густых экстрактов?
22. Опишите методы экстрагирования, их достоинства и преимущества.
23. Какой экстрагент можно использовать для получения жидких экстрактов?
24. При каком методе экстрагирования достигается наибольший выход основных групп биологически активных веществ?
25. Объясните технологический процесс-сушка лекарственного растительного сырья.
26. Объясните и опишите процесс просеивания сырья и его основные принципы. Ситовые механизмы.
27. Приведите аппараты для перегонки, опишите их виды и объясните принцип работы.
28. Проанализируйте сущность процесса извлечения. Опишите факторы, влияющие на полноту и скорость извлечения.
29. Какие вещества и в каком количестве ивлекаются экстрагентом – водой из растительного сырья?
30. Объясните и опишите метод фильтрации и его основные принципы.
31. Перечислите способы получения сухих экстрактов?
32. Объясните и опишите метод прессования и его основные принципы. Дайте классификацию прессовых механизмов.
33. Опишите виды и особенности перемешивания жидкостей.
34. Объясните и опишите метод выпаривания, его основные принципы и классификация.
35. Объясните и опишите метод фасования и упаковки и их основные принципы.
36. Перечислите способы получения жидких экстрактов?

37. Какие виды сушки применяются для высушивания сухих экстрактов?
38. Сравните виды технологических регламентов производства, их особенности.
39. Проанализируйте контроль качества лекарственного растительного сырья.
40. Проанализируйте товароведческий анализ? Объясните и опишите его основные показатели.
41. Что можно получить из свежего растительного сырья?
42. Что понимают под влажностью лекарственного растительного сырья?
43. Что понимают под подлинностью лекарственного растительного сырья?
44. Что понимают под действующими веществами лекарственного растительного сырья?
45. Что понимают под сопутствующими веществами лекарственного растительного сырья?
46. Что понимают под балластными веществами лекарственного растительного сырья?
47. Какой новогаленовый препарат получают из цветков бессмертника песчаного?
48. Что является действующими веществами препарата сапарала?
49. К какому классу природных соединений относится препарат танин?
50. Что является сырьем для получения препарата танина?
51. Модифицируйте и опишите технологическую схему выделения БАВ из растения на примере производства настойки.
52. Модифицируйте и опишите технологическую схему производства жидкого экстракта из растения крушины.
53. Опишите технологические особенности получения жидких экстрактов.
54. Опишите технологические особенности получения густых экстрактов.
55. Опишите технологические особенности получения сухих экстрактов.
56. Создайте и опишите технологию производства водных экстрактов, их особенности.
57. Модифицируйте и опишите технологическую схему производства густого экстракта из травы полыни.
58. Модифицируйте и опишите технологическую схему производства масляного экстракта из растения белены.
59. Модифицируйте и опишите технологическую схему производства флавоновых гликозидов на примере фламина.
60. Оцените свойства и опишите методы анализа дубильных веществ. Разработайте и опишите технологическую схему получения таннина из листьев скумпии.
61. Оцените и опишите эфирные масла, распространение и анализ. Разработайте и опишите технологическую схему производства алантона из девясила высокого.
62. Создайте и опишите технологическую схему производства настойки валерианы.
63. Создайте и опишите технологию производства отваров из растительного сырья, содержащего сапонины, дубильные вещества, антрагликозиды.
64. Опишите основные действующие вещества цветков бессмертника, разработайте способ получения настойки и опишите ее действия.
65. Охарактеризуйте флавоноиды в составе травы Шалфея, разработайте и опишите получение настойки, ее действие на организм человека.
66. Разработайте и охарактеризуйте технологическую схему выделения БАВ из растения на примере производства настойки.
67. Разработайте и опишите технологическую схему производства Келлина и опишите его свойства.
68. Создайте и опишите технологическую схему производства Ликвиритона и опишите его свойства.
69. Модифицируйте и опишите технологию получения арбутина из растения толокнянки.
70. Модифицируйте и опишите технологическую схему производства настойки из растения зверобоя.

71. Разработайте и опишите технологическую схему переработки плодов шиповника.
72. Модифицируйте и охарактеризуйте технологию производства антраценнина из листьев сенны. Опишите методы анализа антрахинонов.
73. Создайте и охарактеризуйте технологическую схему получения рутина из растительного сырья.
74. Опишите методы выделения и анализ кумаринов. Разработайте и опишите технологическую схему производства «каммифурина».
75. Разработайте и опишите технологию производства настоек из растения, содержащего сердечные гликозиды.
76. Разработайте и опишите способ получения и свойства юглона, содержащегося в растениях.
77. Охарактеризуйте растительное сырье, оказывающее положительное влияние на желчный проток, опишите основные биологически активные вещества.
78. Опишите основные действующие вещества в составе Кукурузных рыльцев, разработайте и опишите способ получения настойки и ее действия.
79. Разработайте и опишите способ получения и свойства комплекса флавоноидных гликозидов – ликвиритона из корней Солодки.
80. Разработайте и опишите способ получения флавонолов, робинина из растительного сырья.
81. Опишите и охарактеризуйте метод фасования и упаковки и их основные принципы.
82. Опишите и охарактеризуйте метод сушки и его основные принципы. Виды сушки.
83. Опишите основные механизмы процесса экстракции БАВ, системная экстракция.
84. Объясните и опишите метод выпаривания, его основные принципы и классификацию.
85. Опишите виды и особенности перемешивания жидкостей.
86. Объясните и опишите метод прессования и его основные принципы. Дайте классификацию прессовых механизмов.
87. Объясните и опишите метод фильтрации и его основные принципы.
88. Приведите аппараты для перегонки, опишите их виды и объясните принцип работы.
89. Объясните и опишите процесс просеивания сырья и его основные принципы. Ситовые механизмы.
90. Объясните и опишите процесс измельчения сырья и его основные принципы. Виды измельчителей.
91. Опишите методы экстрагирования, их достоинства и преимущества.
92. Опишите ксантоны, основные представители, разработайте и опишите их технологические схемы получения.
93. Разработайте и опишите технологическую схему получения алкалоидов тропанового ряда из растительного сырья.
94. Разработайте и опишите технологическую схему получения цитизина из травы термопсиса.
95. Разработайте и опишите технологическую схему получения раунатина из корней раувольфии.
96. Разработайте и опишите технологическую схему получения амигдалина из семян горького миндаля..
97. Разработайте и опишите технологическую схему получения рамнила из коры крушины.
98. Разработайте и опишите технологическую схему получения лантозида из листьев наперстянки шерстистой.
99. Разработайте и опишите технологическую схему получения полиспонина из корней и корневищ диоскореи nipponской.
100. Разработайте и опишите технологическую схему получения рутина из растительного сырья.

101. Разработайте и опишите технологическую схему получения сапарала из аралии маньчжурской.
102. Разработайте и опишите технологическую схему получения настойки лимонника из плодов, семян, коры и стеблей лимонника китайского.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Муравьева И.А. Технология лекарств. – М.: Медицина, 1980. – Т. 1. – 704 с.
2. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технологи фитопрепаратов. – М.: ГЭОТАР, 2004. – 560 с.
3. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
4. Бердимуратова Г.Д., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Тулегенова А.У. Биологически активные веществарастений: выделение, разделение, анализ. – Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.
5. Иванова Л.А. Технология лекарственных форм: в 2 т. – М.: Медицина, 2002. – 496 с.
6. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: учебное пособие/ под ред. Г.П. Яковлева, К.Н. Блиновой. – СПб., 2004. – 765 с.
7. Майофис Л.С. Химия и технология химфармпрепаратов, Л.:Медицина, 2001. – 540 с.
8. Розенцвейг П.Э., Сандер Ю.К.. Технология лекарственных галеновых препаратов. – М.: Медицина, 1977. – 772 с.
9. Ажгихин И.С. Технология лекарств. – М., 2003. – 440 с.
10. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. – Казань, 2004. – 373 с.
11. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. – М., 2005. – 528 с.
12. Технологические блок – схемы, растительное сырье, ВФС, производственные лабораторные регламенты.
13. Государственная фармакопея СССР: вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11 изд. – М.: Медицина, 1991.
14. Положение о технологических регламентах производства лекарственных средств, выпускаемых фармацевтическими производственными предприятиями РК от N371 от 30.07.97
15. ГОСТ 24027.0 – 80. Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб.
16. ГОСТ 24027.1 – 80. Сырье лекарственное растительное. Методы определения подлинности, зараженности амбарными вредителями, измельченности и содержание примесей.
17. ГОСТ 24027.2 – 80. Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных, дубильных веществ. Лекарственное растительное сырье – анализ
18. ГОСТ 42 – 3 – 84. Сырье лекарственное растительное. Порядок установления сроков годности. Лекарственные растения – Контроль качества.
19. Музычкина Р.А. Природные антрахиноны. Биологические свойства и физико-химические характеристики. Москва, 1998, 864с.
20. Глызин В.И., Николаева Г.Г., Даргаева Т.Д. Природные ксантоны. Новосибирск, 1986, 175с.
21. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. и др. Биологически активные вещества растений. Выделение, разделение, анализ. Алматы, 2006, 438с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учебное пособие разработано автором в соответствии с требованиями государственного стандарта по спецкурсу «Химическая технология переработки растительного сырья». Оно предназначено, в первую очередь, для студентов 3-4 курсов специальности «5В072100 – Химическая технология органических веществ», факультета химии и химической технологии бакалавриата.

В учебном пособии изложен лекционный материал, посвященный изучению теоретических основ классификации растительного сырья, заготовительного процесса растительного сырья, основам технологических процессов переработки растительного сырья, в рамках дисциплины «Химическая технология переработки растительного сырья».

Приведенные технологические процессы химической переработки растительного сырья используются во всех ведущих отраслях химико-фармацевтической промышленности и являются теоретической базой в производстве субстанций, фитопрепаратов для расширения ассортимента отечественных препаратов.

Каждая глава учебного пособия включает достаточно подробное рассмотрение вопросов структурного многообразия изучаемого класса органических природных соединений, методы их обнаружения, технологические особенности выделения и технологические особенности получения препаратов на их основе.

Учебное пособие сопровождается указаниями к выполнению практических занятий. В процессе выполнения лабораторных работ студенты приобретают практические навыки и умения работы по отработке технологических параметров, таких, как соотношение сырья к экстрагенту, режим экстракции, времени и кратность экстракции для разработки оптимальных технологических схем получения условных фитопрепаратов и биологически активных комплексов.

Кроме того, настоящее издание несомненно окажется весьма полезным для студентов химических факультетов при изучении биоорганической химии, химии природных соединений и химической технологии переработки растительного сырья, в качестве дополнительной литературы студентам фармацевтических и биологических специальностей.