

6

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

---

**ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Репринтное издание

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ  
1998

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

Кафедра фармакогнозии

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Методические указания к лабораторным занятиям

Репринтное издание

Санкт-Петербург  
1998

**Рецензент**

канд. фарм. наук ассист. Е. И. Саканян

**К63** Комарова М. Н. и др. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: Методические указания к лабораторным занятиям / Под ред. К. Ф. Блиновой. Репринтное издание.— СПб.: СПХФА, 1998.— 60 с.

Работа включает качественные реакции на группы действующих веществ, а также фармакопейные методы их количественного определения. Приведены вопросы для самоподготовки студентов. Даны контрольные вопросы для проверки степени овладения методиками анализов.

Предназначены для студентов фармацевтического факультета.

Утверждены методической комиссией фармацевтического факультета 25.12.91 (протокол № 2).

**Составители:**

М. Н. Комарова, Л. А. Николаева, В. Г. Регир  
Л. С. Тесов, Н. П. Харитоновна, Р. К. Шагохина

**Под общей редакцией**

канд. фарм. наук проф. К. Ф. Блиновой

**ВВЕДЕНИЕ**

В течение двух семестров при изучении курса фармакогнозии студенты ознакомились с методами макроскопического анализа, используемого при определении подлинности и доброкачественности цельного лекарственного сырья, и микроскопического анализа, имеющего исключительное значение при определении подлинности и доброкачественности измельченного, порошкообразного, резано-прессованного сырья с использованием микрохимических реакций. Однако в вопросах стандартизации лекарственного растительного сырья определяющее значение имеет содержание в нем действующих веществ.

В данные методические указания включены общие качественные реакции для обнаружения групп действующих веществ и общие фармакопейные методы количественного определения этих веществ.

Базисные знания и умения, необходимые для выполнения аналитических приемов, даны в курсах аналитической, органической, физической и коллоидной, биологической химии. Поэтому самоподготовка к каждому занятию предусматривает повторение соответствующих разделов этих дисциплин и восстановление практических навыков, а также обязательное восстановление теоретических знаний и проработку материала по фармакогнозии.

На занятиях при проведении качественного и количественного определения действующих веществ студенты руководствуются нормативно-техническими документами (методическими ГОСТами, Государственными Фармакопеями X и XI изданий, методическими пособиями). Самостоятельная работа студентов предусматривает включение элементов учебно-исследовательской работы (УИРС) по определению количественных показателей стандартизации лекарственного растительного сырья.

Целью выполняемых работ является освоение методов качественного и количественного определения групп действующих веществ в лекарственном растительном сырье.

В свете требований квалификационной характеристики на основе полученных знаний и приобретенных навыков будущий специалист должен уметь анализировать лекарственное растительное сырье на содержание действующих веществ и оценивать его доброкачественность по этому показателю в соответствии с требованиями нормативно-технических документов.

Некоторые общие положения о работе студентов  
в лаборатории фитохимии кафедры фармакогнозии

1. На первом занятии ознакомиться с инструкцией по технике безопасности и противопожарной безопасности и порядком работы в лаборатории.

2. На занятия приходиться в белых халатах, застегивающихся спереди, колпаках (косынках), волосы должны быть тщательно убраны. Обязательна сменная обувь.

Сумки, портфели складывать в специально отведенном для них месте. Не держать их около рабочего места! На рабочем месте иметь только тетради, учебные пособия и оборудование, необходимое для данного занятия.

Во время занятий в лаборатории категорически запрещается принимать пищу! Запрещается работать в лаборатории одному студенту в отсутствие преподавателя или лаборанта.

Перед началом работы ознакомиться с размещением в лаборатории средств пожаротушения, размещением реактивов, оборудования, установок и т.п.

Выполнение работ осуществляется в соответствии с календарным планом и графиком. Указания о типе задач и видах сырья для анализа студент получает у преподавателя, оборудование и реактивы - у лаборанта.

Инструкция для студентов по технике безопасности и пожарной безопасности при работе в химической лаборатории кафедры фармакогнозии

1. Подготовка к выполнению работы

1.1. Проверить исправность электроприборов, водяной бани и убедиться о наличии в ней воды (не менее 1/2 объема).

1.2. Включить подачу охлаждающей воды в водяной холодильник, проверить, что выходной шланг находится в раковине и из него вытекает вода не слишком сильной струей.

2. Выполнение работы

2.1. Во время работы содержать рабочее место в чистоте и порядке, не загромождать его ненужными для работы предметами.

2.2. После отмеривания необходимого количества реактива обязательно закрывать склянку, бокс или бутылку и ставить ее на место.

Запрещается переносить сосуды с реактивами на другие столы. В случае их отсутствия или недостаточного для работы количества реактива в сосуде следует обратиться в лаборантскую.

2.3. Работы с летучими органическими растворителями (хлороформ, бензол, толуол, бутанол и др.), а также с концентрированными кислотами и щелочами, выполнять только в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.

2.4. Категорически запрещается сливать в раковины или канализацию остатки органических растворителей, кислот, щелочей, сильнопахнущих жидкостей, извлечений из растительного сырья. Сливать все эти жидкости следует в специальные, предназначенные для этих целей емкости, находящиеся в лаборатории.

2.5. Не засорять раковины растительным сырьем, бумагой, твердыми веществами и прочим мусором. Их следует сбрасывать в специально предназначенные для этого емкости.

2.6. При работе соблюдать тишину, чистоту и порядок в помещении лаборатории и на рабочем месте, запрещено оставлять включенную установку без присмотра.

2.7. При нагревании в пробирках жидкостей или твердых веществ наполнять их не более, чем на 1/3 объема пробирки. Не направлять устье пробирки на себя или соседей, т.к. при выбросе из нее могут быть ожоги.

2.8. Не наклоняться близко к прибору, в котором происходит реакция или нагревание веществ.

2.9. При термическом ожоге посыпать обожженное место питьевой содой либо приложить примочку из свежеприготовленных растворов питьевой соды либо калия перманганата. При тяжелых и обширных ожогах необходима медицинская помощь.

2.10. При ожогах кислотами промыть обожженное место проточной водой, затем раствором питьевой соды (натрия гидрокарбоната).

2.11. При ожогах едкими щелочами промыть обожженное место проточной водой, затем разбавленной уксусной кислотой.

2.12. Если пролилось сколько-нибудь значительное количества легковоспламеняющейся жидкости:

- немедленно выключить все электронагревательные приборы;
- закрыть двери и открыть форточки;
- собирать пролитую жидкость полотенцем или тряпкой, которые выжимать над широким сосудом, из сосуда жидкость перелить в склянку с пробкой;

- прекратить проветривание после полного исчезновения запаха пролитой жидкости в помещении.

2.13. Если в лаборатории отключилась подача электроэнергии, выключить все электронагревательные приборы и вытяжную вентиляцию и соблюдать осторожность.

2.14. В случае воспламенения горючей жидкости отключить электронагревательные приборы, отставить сосуды с огнеопасными веществами; прикрыть пламя одеялом, а в случае необходимости засыпать песком или воспользоваться огнетушителем.

2.15. В случае воспламенения одежды на пострадавшего немедленно набросить любую одежду (халат, пиджак либо одеяло). Нельзя совершать резкие движения (бежать и т.п.).

2.16. В случае воспламенения электропроводки отключить ток. Запрещается применять для тушения необесточенной электропроводки воду и жидкостные огнетушители.

2.17. В случае воспламенения водорастворимых спиртов и других жидкостей разрешается заливать их водой.

### 3. О к о н ч а н и е р а б о т ы

3.1. При разборе установки выключить электроплитку, отключить подачу воды в водяной холодильник, разобрать установку.

3.2. Тщательно вымыть лабораторную посуду и убрать рабочее место.

3.3. Поставить посуду и реактивы в том порядке, в каком они находились до выполнения работы.

3.4. Сдать рабочее место дежурному по группе и лаборанту.

### 4 . О б я з а н н о с т и д е ж у р н о г о с т у д е н т а

Дежурный по группе после окончания работы обязан:

- проверить, все ли установки, использовавшиеся группой, выключены;
- отключить аналитические весы;
- слить остатки реактивов из бюреток в соответствующие склянки;
- убрать вытяжные шкафы и принять рабочие места у студентов;
- убедиться в сохранности и комплектности оборудования, полученного для работы, и сдать его в лаборантскую;
- сдать лаборанту лабораторию.

## Тема I. АНАЛИЗ ЖИРНЫХ МАСЕЛ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ МАСЕЛ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о жирных маслах, строение, классификация, физико-химические свойства, методы получения, очистки.

Анализ жирных масел на подлинность, доброкачественность и чистоту по ГФ X и ГФ XI: качественные реакции, физико-химические константы, методы их определения, аналитическое значение.

Методы количественного определения жирных масел: принцип метода, достоинства и недостатки, аппаратура.

Латинские названия, химический состав, источники получения жирных масел, медицинское применение миндального, персикового, оливкового, касторового, подсолнечного, кукурузного и льняного масел.

Формулы глицеридов пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, рицинолевой кислот; общая формула жира.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

#### Задание I. Анализ жирных масел

I. Определение подлинности образца жирного масла (ГФ X, с.483-484).

а) определите растворимость анализируемого образца в сравнении со стандартным образцом того же наименования. Жирные масла практически не растворимы в воде и спирте, легко растворимы в эфире, хлороформе, петролейном эфире. Исключение составляет касторовое масло, легко растворимое в спирте и трудно растворимое в петролейном эфире. Для определения растворимости возьмите I мл испытуемого масла и проверьте его растворимость в указанных выше растворителях;

б) определите цвет, запах, вкус образца жирного масла в сравнении со стандартным образцом.

2. Определение посторонних примесей (ГФ X, с.484):

а) определите примесь парафина, вазелинового масла, вазелина, воска, смоляных масел. I мл масла нагревают с 10 мл спиртового раствора гидроксида калия (0,5 моль/л) при непрерывном взбалтывании. Если примеси указанных выше веществ отсутствуют, полученный прозрачный раствор не должен мутнеть при добавлении 25 мл воды;

б) определите наличие альдегидов и перекисей. I мл масла взбалтывают в течение I минуты с I мл концентрированной хлористоводородной кислоты, прибавляют I мл эфирного раствора флороглюцина

и снова встряхивают. Появление розового или красного окрашивания указывает на наличие отбеленного или разложившегося масла, присутствие которого не допускается;

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

Запишите результаты проведенного вами анализа, укажите, на каких свойствах масел основаны пробы.

### 3. Определение химических констант (ГФ XI, вып. I, с. 191-193);

а) определите кислотное число. Кислотным числом называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Около 2 г (точная навеска) масла помещают в колбу вместимостью 250 мл и растворяют в 50 мл смеси равных объемов 95% спирта и эфира, предварительно нейтрализованной по фенолфталеину раствором едкого натра (0,1 моль/л); если необходимо нагревают с обратным холодильником на водяной бане до полного растворения. Прибавляют 1 мл раствора фенолфталеина и титруют при постоянном помешивании раствором едкого натра (0,1 моль/л) до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Кислотное число  $K_{\text{ч}}$  вычисляют по формуле:

$$K_{\text{ч}} = \frac{a \cdot 5,61}{b},$$

где а - количество миллиграммов раствора едкого натра (0,1 моль/л), израсходованное на титрование;

б - навеска вещества в граммах;

5,61 - количество миллиграммов едкого кали, соответствующее 1 мл раствора едкого натра (0,1 моль/л);

б) определите число омыления. Числом омыления называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных кислот и кислот, образующихся при полном гидролизе сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Около 2 г вещества (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 25 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л), присоединяют к колбе обратный холодильник, погружают ее в кипящую баню и нагревают в течение 1 часа, регулярно перемешивая.

Параллельно нагревают 25 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л). Оба раствора тотчас же после прекращения нагревания разбавляют 25 мл свежее кипяченой горячей воды, прибавляют по 1 мл раствора фенолфталеина и титруют раствором хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л) до обесцвечивания.

Число омыления  $\zeta$  вычисляют по формуле:

$$\zeta = \frac{(a-b) \cdot 28,05}{v},$$

где а - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование в контрольном опыте;

б - количество миллилитров хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества;

в - навеска вещества в граммах;

28,05 - количество миллиграммов едкого кали, соответствующее 1 мл раствора едкого кали (0,5 моль/л);

в) рассчитайте величину эфирного числа. Эфирным числом называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации кислот, образующихся при гидролизе сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Эфирное число определяют по разности между числом омыления и кислотным числом;

г) определите йодное число. Йодным числом называют количество граммов йода, связываемое 100 г исследуемого вещества.

Точную навеску исследуемого вещества (см. примечание) помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью 250-300 мл, растворяют в 3 мл эфира или хлороформа, прибавляют 20 мл раствора йода монохлорида (0,1 моль/л), закрывают пробкой, смоченной

10% раствором калия йодида, осторожно взбалтывают вращательным движением и выдерживают в темном месте в течение 1 часа. Затем прибавляют последовательно 10 мл 10% раствора калия йодида, 50 мл воды и титруют раствором натрия тиосульфата (0,1 моль/л) при постоянном энергичном взбалтывании до светло-желтой окраски, после чего прибавляют 3 мл хлороформа, сильно взбалтывают, затем прибавляют 1 мл раствора крахмала и титруют до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

При анализе твердых жиров навеску растворяют в 6 мл эфира, прибавляют 20 мл раствора йода монохлорида (0,1 моль/л) и 25 мл воды. Дальнейшее определение проводят как указано выше.

Йодное число  $I_{\text{ч}}$  вычисляют по формуле:

$$I_{\text{ч}} = \frac{(a-b) \cdot 0,01269 \cdot 100}{v}$$

- где а - количество миллилитров раствора натрия тиосульфата (0,1 моль/л), израсходованное в контрольном опыте;  
 б - количество миллилитров раствора натрия тиосульфата (0,1 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества;  
 в - навеска вещества в граммах.

Примечание. Величины навески вещества в граммах в зависимости от ожидаемых величин йодного числа приведены ниже:

Йодное число	Навеска, г
0 - 30	1,1 - 0,7
31 - 50	0,7 - 0,5
51 - 100	0,5 - 0,25
101 - 150	0,25 - 0,15
Свыше 150	Менее 0,15

Проанализируйте полученные результаты и сделайте вывод о подлинности, чистоте и доброкачественности анализируемого образца.

**Задание 2.** Определите количественное содержание жирного масла в семенах (по массе обезжиренного остатка)

Количественное определение жирных масел основано на их способности растворяться в органических растворителях. Наиболее широко распространены методы, основанные на экстракции масла из определенных навесок и последующем взвешивании полученного масла или

высушенного обезжиренного остатка после удаления растворителя. Экстракцию масла проводят в аппарате Сокслета. Аппарат состоит из трех частей: плоскодонной колбы, экстрактора, обратного холодильника. В экстрактор помещается пакетик из фильтровальной бумаги, содержащий навеску; пакетик подвергается многократному воздействию низкокипящих растворителей. В качестве растворителей жирного масла применяют хлороформ, четыреххлористый углерод и др.

0,5 г растительного материала (точно не взвешивают) растирают в ступке для пропитывания маслом стенок ступки. Растертую массу выбрасывают, ступку очищают. Затем в ступке растирают 5-7 г сырья.

1,5-2 г (с погрешностью 0,0005) растертой массы помещают в подписанный простым карандашом бумажный пакетик, предварительно высушенный до постоянной массы. Взвешивают пакетик вместе с навеской с погрешностью 0,0005 г. В один экстрактор аппарата Сокслета можно загрузить несколько таких пакетиков. К экстрактору присоединяют обратный холодильник и колбу. Собранный аппарат Сокслета помещают в водяную баню и через верхнее отверстие холодильника с помощью воронки наливают в колбу растворитель - 1,5 объема экстрактора. При нагреве водяной бани пары растворителя из колбы направляются в холодильник, а оттуда сконденсированный растворитель попадает каплями на пакетики, растворяя жирное масло и унося его с собой в колбу. Экстрагируют до полного извлечения жирного масла (до 8 часов). Чтобы убедиться, что экстракция закончилась, следует осторожно разобрать прибор и дать упасть 1-2 каплям растворителя из экстрактора на часовое стекло. Если после испарения растворителя на часовом стекле не остается налета масла, то экстракция считается законченной.

По окончании экстракции пакетики с обезжиренными остатками вынимают из экстрактора, высушивают на стекле в вытяжном шкафу, а затем в сушильном шкафу при 100-105°C до постоянной массы. Охлаждают в эксикаторе и взвешивают с погрешностью 0,0005.

Содержание жирного масла X в процентах в расчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 100}{v} \cdot \frac{100}{100-w}$$

- где а - масса пакетика с навеской до экстракции, г;  
 б - масса пакетика с навеской после экстракции, г;

$m$  - масса навески сырья, г ;

$\omega$  - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Опишите кратко метод количественного определения жирного масла в семенах. Зарисуйте аппарат Сокслета в собранном виде.

#### Контрольные вопросы

1. Как определить примесь мыла в жирном масле? На каких свойствах основана эта проба?
2. Как определить присутствие в жирном масле альдегидов и перекисей? Когда они образуются в жирном масле?
3. Как определить в жирных маслах примеси вазелинового масла, вазелина, восков, смол? На каких свойствах основана эта проба?
4. Как изменится величина кислотного числа, если масло получено из незрелых семян или хранилось при неблагоприятных условиях?
5. Как изменится величина эфирного числа в присутствии примеси вазелинового масла, вазелина, парафина, восков, смол?
6. Как изменится величина йодного числа, если масло получено из незрелых семян; в присутствии примеси вазелинового масла, вазелина, парафина, восков и смол; при прогоркании жирных масел?
7. От чего зависят величины кислотного числа, числа омыления, эфирного числа и йодного числа?
8. На каких свойствах жирных масел основано их количественное определение? Назовите методы количественного определения, их достоинства и недостатки.

## Тема 2. АНАЛИЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие об эфирных маслах, строение, классификация, физико-химические свойства, методы получения.

Анализ эфирных масел на подлинность, чистоту и доброкачественность по ГФ XI: качественные реакции, физико-химические константы, методы их определения, аналитическое значение.

Методы количественного определения эфирных масел в растительном сырье: принцип и выбор метода, достоинства и недостатки, аппаратура.

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств, химический состав, применение лекарственного растительного сырья, содержащего эфирные масла.

Формулы линалоола, ментола, цинеола, пинена, борнеола, борнилизовалерата, камфоры, матрицина, хамазулена, тимола, анетола.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

#### Задание I. Анализ эфирных масел

I. Определение подлинности образца эфирного масла (ГФ XI, вып. I, с. 287):

а) определите цвет и прозрачность анализируемого образца, сравнивая его со стандартным образцом того же наименования;

б) определите запах: 2 капли масла наносят на полоску фильтровальной бумаги длиной 12 см и шириной 5 см. Через каждые 15 минут сравнивают запах испытуемого образца с запахом контрольного образца, нанесенного таким же образом на другую полоску фильтровальной бумаги. В течение одного часа запах должен быть одинаков;

в) определите вкус, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на нее каплей эфирного масла.

2. Определение посторонних примесей (чистота):

а) определите примесь спирта: 2-3 капли эфирного масла наносят на воду, налитую на часовое стекло и наблюдают на черном фоне: не должно быть заметного помутнения вокруг капель масла; 1 мл эфирного масла наливают в пробирку, закрывают рыхлым комочком ваты, в середину которого помещен кристалл фуксина, и доводят до кипения. При наличии спирта пары его растворяют фуксин и вата окраши-

вается в фиолетово-розовый цвет;

б) определите примесь жирных и минеральных масел: 1 мл эфирного масла взбалтывают с пробирке с 10 мл спирта: не должно наблюдаться помутнения и капель жирного масла. Укажите, на каких свойствах основана эта проба и примесь всех ли жирных масел может быть обнаружена таким образом.

3. Определение химических констант (ГФ XI, вып. I, с. 191):

а) определите кислотное число (см. тему № I "Анализ жирных масел");

б) определите эфирное число (ГФ XI, вып. I, с. 288). Эфирным числом называют количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого образца.

Для определения эфирного числа используют раствор, оставшийся после определения кислотного числа. К раствору прибавляют 20 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л), соединяют колбу с воздушным холодильником и нагревают на водяной бане в течение 1 часа с момента закипания. Одновременно в ту же баню помещают в равных условиях 20 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л). Контрольный опыт необходим потому, что фактор спиртового раствора щелочи не стабилен, особенно при нагревании. По окончании омыления в обе колбы добавляют по 100 мл воды и избыток едкого кали титруют раствором хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л) до обесцвечивания (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число X вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a-b) \cdot 28,05}{v}$$

где a - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование в контрольном опыте;

б - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества;

v - навеска вещества в граммах;

28,05 - количество миллиграммов гидроксида калия, соответствующее 1 мл раствора едкого кали (0,5 моль/л).

Эфирное число используют для вычисления содержания сложных эфиров или связанных спиртов в процентах  $|X_1|$  по формуле:

$$X_1 = \frac{X \cdot M \cdot 100}{56,1 \cdot 1000} = \frac{X \cdot M}{561}$$

где X - эфирное число; M - молекулярная масса эфира или спирта; 56,1 - молекулярная масса едкого кали.

Проанализируйте полученные результаты и сделайте вывод о подлинности, чистоте и доброкачественности эфирного масла;

в) определите эфирное число после ацетилирования (ГФ XI, вып. I, с. 289-290). Эфирным числом после ацетилирования обозначают количество миллиграммов едкого кали, необходимое для омыления сложных эфиров, содержащихся первоначально в 1 г масла и образовавшихся при ацетилировании. Определение этой константы позволяет рассчитать содержание свободных спиртов (ментола, линалоола и др.).

10 г масла помещают в специальную колбу для ацетилирования с пришлифованным воздушным холодильником, приливают 10 мл уксусного ангидрида и прибавляют около 2 г безводного натрия ацетата. Смесь кипятят на песчаной бане при частом взбалтывании в течение 15 мин. Затем смесь переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и отделяют слой масла. Масло 4-5 раз промывают при взбалтывании 50 мл насыщенного раствора натрия хлорида (до нейтральной реакции промывных вод, индикатор метиловый оранжевый), затем масло дважды промывают порциями воды по 20 мл для удаления следов натрия хлорида, обезвоживают безводным натрия сульфатом (около 3 г) и фильтруют.

1-2 г полученного масла (с точностью до 0,001 г) взвешивают в конической колбе, растворяют в 5 мл спирта, нейтрализуют спиртовым раствором едкого кали (0,5 моль/л) и определяют эфирное число, как описано выше (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число после ацетилирования  $X_2$  вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{28,05 \cdot y_1}{v}$$

где  $y_1$  - объем раствора едкого кали (0,5 моль/л), израсходованного на омыление эфиров после ацетилирования, мл;

v - масса навески, г; 28,05 - количество миллиграммов едкого кали, содержащихся в 1 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л).

Содержание свободных спиртов  $X_3$  в процентах вычисляют по формуле:

$$X_3 = \frac{(X_2 - X) \cdot M \cdot 100}{56,1 \cdot 1000 \cdot \left[ 1 - \frac{(X_2 - X) \cdot 42}{56,1 \cdot 1000} \right]} = \frac{(X_2 - X) \cdot M}{561 - 0,42(X_2 - X)},$$

где  $X$  - эфирное число;  
 $X_2$  - эфирное число после ацетилирования;  
 $M$  - молекулярная масса спирта;  
 $56,1$  - молекулярная масса едкого кали;

$\left[ 1 - \frac{(X_2 - X) \cdot 42}{56,1 \cdot 1000} \right]$  - поправка на увеличение массы эфирного масла за счет присоединения ацетильного остатка с молекулярной массой 42.

Общее содержание спиртов выражается суммой связанных и свободных спиртов.

Напишите схемы реакций, имеющих место при определении эфирного числа после ацетилирования.

**Задание 2.** Определите количественное содержание эфирного масла в растительном сырье (ГФ XI, вып. I, с. 290).

Определение содержания эфирного масла проводят путем его перегонки с водяным паром из растительного сырья с последующим изменением объема.

В ГФ XI приведены 4 метода определения содержания эфирного масла. Выбор метода зависит от физико-химических свойств масла. Наиболее часто используют методы 1 и 2.

Сырье, содержащее эфирное масло, которое при перегонке претерпевает изменения, образует эмульсию, легко загустевает или имеет плотность, близкую к единице, анализируют методами 3 и 4.

Масса сырья, степень его измельчения, время перегонки, метод и возможные растворители указаны в соответствующей нормативно-технической документации на лекарственное растительное сырье, с которой Вы должны предварительно ознакомиться.

Метод 1. Навеску измельченного сырья помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл воды и закрывают резиновой пробкой с обратным шариковым холодильником. В пробке снизу укреплены металлические крючки, на которые подвешивают градуированный приемник так, чтобы

конец холодильника находился над воронкообразным расширением приемника, не касаясь его. Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенок, и отстоять от уровня воды не менее, чем на 50 мм. Цена деления градуированной части приемника 0,025 мл. Колбу с содержимым нагревают в течение времени, указанного в соответствующем НТД. По истечении срока, указанного в статье на анализируемое сырье, выключить прибор. Вынув и остудив приборчик Гинзберга (V-образную трубку) до комнатной температуры, отсчитать деления, занятые маслом, вычислить его содержание в сырье. Содержание эфирного масла  $X$  в объемно-весовых процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - \omega)},$$

где  $V$  - объем эфирного масла, мл;  
 $m$  - масса сырья, г;  
 $\omega$  - потеря в массе при высушивании сырья, %.

По результатам работы сделать заключение о соответствии содержания эфирного масла требованиям НТД. Зарисовать приборы, с помощью которых определяют количественное содержание эфирного масла по методу 1 и 2.

#### Контрольные вопросы

1. Как определить в эфирном масле примесь спирта и жирного масла? На каких свойствах основаны эти пробы?
2. Как изменится величина эфирного числа при наличии в эфирном масле примеси жирного масла, минеральных масел?
3. Как изменится величина кислотного числа при гидролизе сложных эфиров, содержащихся в эфирном масле?
4. На каких свойствах эфирных масел основано их количественное определение и выбор метода?
5. Для чего определяется эфирное число после ацетилирования? Суть метода.
6. Как рассчитать содержание в эфирном масле свободных и связанных спиртов?

### Тема 3. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ (СЕРДЕЧНЫХ) ГЛИКОЗИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

#### Вопросы для самоподготовки

Понятие о сердечных гликозидах, строение, классификация, физико-химические свойства, связь химического строения с фармакологическим действием, распространение в растительном мире, применение в медицине.

Экстракция из сырья, методы очистки от сопутствующих веществ (свободные сахара и др.).

Качественные реакции на пятичленное лактонное кольцо, стероидную структуру, углеводный компонент; химизм реакций, аналитический эффект.

Физико-химические и биологические методы количественного определения сердечных гликозидов.

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств, химический состав, препараты и применение видов наперстянки, адониса весеннего, видов ландыша, строфантов, желтушника серого (ж.раскидистого).

Формулы пурпуреагликозидов А, В, дигиланидов (ланатозидов) А, В, С, строфантозида и их ступенчатый гидролиз; конваллятоксина, эризимины, адонитоксина, глюкозы, рамнозы, цимарозы, дигитоксозы.

#### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Провести экстракцию сердечных гликозидов из растительного сырья и очистку полученного извлечения.

2,0 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 40 мл 70% этанола, перемешивают и оставляют на ночь. Водно-спиртовое извлечение отфильтровывают, фильтрат обрабатывают 5 мл 10 % раствора свинца ацетата до полного осаждения сопутствующих веществ (фенольные соединения, алкалоиды и др.). Образовавшийся осадок отфильтровывают, а к фильтрату приливают 2 мл насыщенного раствора натрия сульфата для удаления избытка ионов свинца. Жидкость снова фильтруют, очищенную вытяжку переносят в делительную воронку. Для извлечения сердечных гликозидов фильтрат последовательно дважды обрабатывают в течение 2-3 минут, равными с фильтром объемами спирто-хлороформной смеси 1:3 (свободные сахара остаются в водном растворе).

Нижний спирто-хлороформный слой, содержащий сумму кардиотонических гликозидов, сливают в сухую колбу на 100 мл через фильтр, на который предварительно насыпано 3-4 г безводного натрия сульфата. Из спирто-хлороформного фильтрата отгоняют растворитель досуха на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 5 мл 95% спирта и полученный раствор используют для проведения качественных реакций.

Задание 2. Провести качественные реакции на кардиотонические гликозиды.

Для подтверждения присутствия сердечных гликозидов в растительном сырье проводят реакции на стероидный цикл, 5-членное лактонное кольцо и углеводный компонент.

#### Реакции на стероидный цикл

Реакции основаны на образовании сопряженных ненасыщенных систем под действием кислых реагентов (концентрированная серная кислота, ледяная уксусная кислота, уксусный ангидрид, сурьмы (V) хлорид и др.) в неводной среде. При этом образуются полиены, дающие галохромные, интенсивно-окрашенные продукты, быстро изменяющие окраску во времени.

#### Реакция Либермана-Бурхарда

1 мл спиртового раствора выпаривают на водяной бане в фарфоровой чашке, сухой остаток растворяют в смеси уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (5:1). Развивается быстро проходящее красновато-оранжевое окрашивание, переходящее к зеленой и синей окраске.

#### Реакция Розенгейма

1 мл спиртового раствора выпаривают на водяной бане и сухой остаток растворяют в 1 мл 90% трихлоруксусной кислоты. В присутствии кардиотонических гликозидов появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в синее.

#### Реакции на 5-членное ненасыщенное лактонное кольцо

Реакции основаны на способности пятичленного ненасыщенного лактонного кольца образовывать окрашенные комплексы в щелочной среде с различными ароматическими нитропроизводными: нитропруссидом натрия (реакция Легаля); 3-5-динитробензойной кислотой (реактив Кедде), мета-динитробензолом (реактив Раймонда), никриновой кислотой (реактив Валье).

### Реакция Балье

В пробирку наливают 1 мл спиртового раствора, прибавляют 1 мл свежеприготовленного реактива Балье (при приготовлении реактива сливают 0,25 мл 10% раствора натрия гидроксида и 4,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты). Появление оранжево-красного окрашивания в течение 5 минут свидетельствует о наличии карденолидов. Через 10-15 минут положительную реакцию могут дать свободные сахара, аскорбиновая кислота, если извлечение не освобождено от них.

### Реакция Легала

К 1 мл спиртового извлечения прибавляют 1 мл 1% раствора натрия нитропруссиды и 1-2 капли 10% раствора натрия гидроксида. В присутствии карденолидов появляется постепенно исчезающее красно-фиолетовое окрашивание.

### Реакции на углеводный компонент

#### Реакция Келлера-Килиани (на 2-дезоксисахара)

1 мл спиртового извлечения выпаривают на водяной бане, сухой остаток растворяют в 20 каплях раствора А и осторожно, по стенке пробирки, прибавляют 1 каплю реактива В. В присутствии кардиотонических гликозидов, содержащих 2-дезоксисахара, появляется синее, переходящее в сине-зеленое окрашивание.

Раствор А. 1 мл 5% раствора железа (III) сульфата и 99 мл концентрированной уксусной кислоты.

Раствор В. 1 мл 5% раствора железа (III) сульфата и 99 мл концентрированной серной кислоты.

Запишите результаты реакций и сделайте вывод о наличии или отсутствии карденолидов в сырье.

Задание 3. Освоить физико-химические методы количественного определения кардиотонических гликозидов.

Количественное содержание сердечных гликозидов можно определить по лактонному кольцу, стероидной системе ядра, углеводному компоненту, альдегидной группе - в положении 10. Используют колориметрические, спектрофотометрические, флуориметрические и полярографические методы. Недостатком этих методов является их малая специфичность и невозможность оценить молекулу сердечного гликозида в целом.

### Количественное определение дигиланида С в листьях наперстянки шерстистой (ФС 42-614-89)

Методика основана на хроматографическом разделении сердечных гликозидов с последующим спектрофотометрическим или колориметрическим определением дигиланида С и состоит из следующих этапов:

- получение извлечения;
- очистка полученного извлечения;
- хроматографическое разделение;
- элюирование дигиланида С;
- + проведение реакции с ксантогидрольным реактивом;
- определение оптической плотности на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре.

10,0 г сырья, измельченного до размера частиц диаметром 1 мм, помещают в колбу вместимостью 200 мл, приливают 100 мл 70% этилового спирта, колбу с содержимым взвешивают, соединяют с обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню. После того, как закипит спирт, колбу выдерживают 30 мин. Затем колбу с содержимым взвешивают, в случае потери в массе доводят 70% этиловым спиртом до первоначальной массы и фильтруют через бумажный фильтр. 50 мл фильтрата помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл и отгоняют при 40°C под вакуумом (до вспенивания раствора). Содержимое колбы количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл и обрабатывают четыреххлористым углеродом 6 раз по 10 мл. Очищенное четыреххлористым углеродом извлечение помещают в колбу вместимостью 100 мл, приливают 50 мл 20% этилового спирта и 10 мл 15% раствора свинца ацетата и перемешивают. Выпавший осадок центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин или фильтруют через стеклянный фильтр (пор.16) под вакуумом. Осадок промывают 10 мл 20% этилового спирта, присоединяя промывной спирт к основному извлечению.

Полученное извлечение обрабатывают смесью хлороформ-метилового спирт (9:1) 5 раз по 40 мл в течение 3 мин. Объединенные извлечения фильтруют через бумажный фильтр с 10 г безводного натрия сульфата и отгоняют досуха под вакуумом на водяной бане при температуре не более 50°C. Сухой остаток растворяют в 3 мл смеси хлороформ-метилового спирт (1:1) и полученный раствор хроматографируют.

Лист хроматографической бумаги марки "С" размером 16x50 см размечают вдоль на 4 равных полосы по 4 см шириной; на расстоянии

10 см от верхнего края бумаги отмечают стартовую линию. Бумагу пропитывают в течение 5 мин 30% раствором формамида в метиловом спирте, отжимают между листами фильтровальной бумаги и подсушивают на воздухе 20 мин.

На линии старта, в точки, расположенные в центрах полос, наносят: на первую полосу - 0,01 мл раствора рабочего стандартного образца (PCO) абицина, на 2 другие - испытуемый раствор по 0,02 мл в каждую точку, четвертую полосу оставляют чистой (контроль).

Затем бумагу помещают в камеру и хроматографируют нисходящим способом в течение 6 час. В качестве подвижной фазы используют смесь растворителей хлороформ-диоксан-н-бутиловый спирт (7:2:0,5), насыщенный формамидом. Хроматографирование проводят при температуре 20-25°C в темном месте.

По истечении указанного времени хроматограмму вынимают из камеры, отмечают линию фронта, сушат на воздухе в течение 20 мин, затем в сушильном шкафу при температуре 120°C в течение 30 мин. Сухую хроматограмму разрезают на отдельные полосы по линиям, обозначенным ранее. Полосу со свидетелем и одну полосу с испытуемым раствором опрыскивают свежеприготовленным 25% раствором трихлоруксусной кислоты в хлороформе, содержащим хлорамин Б. После этого полосы сушат 2 мин на воздухе, затем 5 мин при 120°C в вакуум-сушильном шкафу; наблюдают свечение пятен в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм и отмечают границы пятен. Дигиланид А имеет значение распределительного фактора  $R_f$  около 0,79 и желто-зеленую флуоресценцию; дигиланид В -  $R_f$  около 0,55 и голубовато-зеленую флуоресценцию; дигиланид С -  $R_f$  около 0,39 и голубую флуоресценцию.

Проявленную полосу с испытуемым раствором прикладывают к непроявленной полосе так, чтобы линии старта совпадали. Затем из непроявленной полосы вырезают участок, расположенный на уровне пятна дигиланида С на проявленной полосе. Полученный участок бумаги с дигиланидом С помещают по отдельности в пробирки 2x20 см и заливают в каждую 10 мл свежеприготовленного ксантгидролового реактива. Параллельно вырезают из контрольной полосы участок бумаги, равный по размеру участку с пятном дигиланида С и приливают 10 мл того же реактива. Пробирки закрывают ватными тампонами, выдерживают при 60±0,5°C в течение 1 часа в водяной бане или сушильном шкафу, затем охлаждают холодной водой в течение 5 мин и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность окрашенного

раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 535 нм или на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контрольного раствора используют воду.

По калибровочному графику находят концентрацию Государственного стандартного образца (ГСО) целанида (дигиланида С) в микрограммах в 1 мл фотометрируемого раствора.

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

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 3 \cdot 10 \cdot 100}{50 \cdot 0,02 \cdot m \cdot 1000000 \cdot (100 - \omega)} = \frac{C \cdot 3}{m \cdot (100 - \omega) \cdot 10} ,$$

где С - масса целанида в 1 мл фотометрируемого раствора, найденного по калибровочному графику, мкг;

m - масса сырья, г ;.

ω - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Дигиланида С в сырье должно быть не менее 0,06%.

Методы биологической стандартизации кардиотонических гликозидов описаны в ГФ XI, т.2, с. 169-175 (статьи: 14 - "Лист наперстянки", 43 - "Трава горицвета весеннего", 49 - "Трава ландыша").

**Примечания**

1. Построение калибровочного графика. Около 0,0250 г (точная навеска) ГСО целанида (ФС 42-2260-84) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяют в смеси хлороформа и метилового спирта (1:1). Описанным выше способом готовят четыре хроматограммы. При помощи микропипетки на линию старта первой хроматограммы наносят на 3 полосы по 0,01 мл (10 мкг), второй хроматограммы - 0,05 (50 мкг), третьей хроматограммы - 0,1 мл (100 мкг) и четвертой хроматограммы 0,12 мл (120 мкг) полученного раствора ГСО целанида. Четвертую полосу каждой хроматограммы оставляют в качестве контрольной. Далее поступают так, как описано в ходе количественного определения.

При построении калибровочного графика на оси ординат откладывают значение оптической плотности, а на оси абсцисс - концентрации ГСО целанида в микрограммах в 1 мл фотометрируемого раствора.

2. Приготовление смеси растворителей для хроматографирования. В делительную воронку вместимостью 250 мл помещают 70 мл хлороформа, 20 мл диоксана, 4 мл н-бутилового спирта и около 10 мл формамида. Смесь тщательно встряхивают в течение 10 мин и оставляют

расслаиваться (в течение 20 час). Нижний слой удаляют, верхний помещают в камеру для насыщения ее парами смеси растворителей в течение 20 ч. Хроматографирование проводят при температуре 20-25°C в темном месте.

3. Приготовление 25% раствора трихлоруксусной кислоты с хлораминном. 25,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл хлороформа, 0,2 г хлорамина Б и содержимое колбы доводят хлороформом до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

#### Контрольные вопросы

1. На каких свойствах кардиотонических гликозидов основаны качественные реакции, методы количественного определения?
2. Какие реакции можно использовать для обнаружения 5-членного лактонного кольца, стероидной структуры, углеводного компонента? Химизм этих реакций, специфичность, условия выполнения.
3. Что представляют собой реактивы Кедде, Балье, Легалья, Розенгейма?
4. Какие меры принимаются для того, чтобы при проведении реакции Балье исключить присутствие сахаров?
5. Назовите основные этапы количественного определения кардиотонических гликозидов в лекарственном растительном сырье.

#### Тема 4. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

##### Вопросы для самоподготовки

Понятие об антраценпроизводных, строение, классификация, физико-химические свойства окисленных и восстановленных форм, динамика образования и накопления, распространение в растительном мире, Экстракция из сырья, методы очистки от сопутствующих веществ. Качественные реакции на окисленные и восстановленные формы антраценпроизводных, химизм реакций, аналитический эффект. Методы количественного определения антраценпроизводных в сырье: принцип методов, основные этапы, достоинства и недостатки. Латинские названия сырья, производящих растений, семейств; химический состав, препараты и применение крушины ольховидной, жостера, кассии остролистной, марены красильной, ревеня тангутского, щавеля конского, зверобоя продырявленного и з.пятнистого, алоэ. Формулы антрацена, антранола, антрона, оксиантрона, антрахинона, франгулярозида, глюкофрангулина, франгулина, реум-эмолина, сеннозидов, реина, ализарина, рубэритриновой кислоты, гиперидина, алоина, алоэ-эмолина.

##### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание I. Проведите качественные реакции на антраценпроизводные.

##### Реакция Бюнтрегера

Реакция основана на способности окисленных форм антрацена давать вишнево-красное окрашивание со щелочью и аммиаком.

0,5 г измельченного сырья кипятят в колбочке вместимостью 50 мл с 10 мл 10% раствора щелочи. При этом происходит щелочной гидролиз антрагликозидов, окисление восстановленных форм и взаимодействие агликонов со щелочью с образованием красного окрашивания (антрахиноляты). В случае присутствия в растениях дубильных веществ, флавоноидов и пигментов извлечение может быть не красным, а бурым. К извлечению прибавляют 10 мл воды и фильтруют через вату в делительную воронку вместимостью 100 мл. Фильтрат подкисляют 10% раствором хлористоводородной кислоты до слабокислой реакции (по лакмусу). При этом исчезает красное окрашивание, раствор становится мутным за счет выпадения в осадок агликонов антрахи-

нонов, нерастворимых в воде. Затем прибавляют 10 мл хлороформа и содержимое делительной воронки взбалтывают. Агликоны растворяются в хлороформе, окрашивая его в желтый цвет. 3 мл хлороформного извлечения встряхивают в пробирке с равным объемом аммиака. При наличии антраценпроизводных аммиачный слой окрашивается в вишнево-красный цвет (за счет эмодина), а хлороформный слой остается окрашенным в желтый цвет (за счет хризофанола).

Напишите схемы химических реакций, имеющих место при проведении этой пробы, отметьте аналитический эффект.

Примечание: оставшееся хлороформное извлечение используйте для идентификации антрагликозидов методом бумажной хроматографии.

#### Реакция с 1% спиртовым раствором ацетата магния

Реакция основана на способности антраценпроизводных давать окрашенные комплексы с ацетатом магния; при этом 1,2 - диоксипроизводные образуют фиолетовое окрашивание; 1,4 - пурпурное; 1,6 и 1,8 - оранжево-красное.

1,0 г сырья помещают в колбочку вместимостью 50 мл со шлифом, добавляют 10 мл 95% спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей бане 10 минут. Полученное извлечение охлаждают, фильтруют. К 1 мл спиртового извлечения добавляют несколько капель реактива. Отмечают характер образовавшейся окраски и делают заключение о строении антраценпроизводных.

Напишите схему реакции.

#### Микросублимация антраценпроизводных

Антраценпроизводные легко возгоняются при температуре 100°C и выше. Реакцию проводят в сухой пробирке или на предметном стекле. В пробирку или на предметное стекло помещают небольшое количество порошка и нагревают на спиртовке или на плитке. Антраценпроизводные, возгоняясь, конденсируются на холодных стенках пробирки или на холодном предметном стекле, которым накрывают стекло с порошком при появлении дымка, в виде желтого налета. При воздействии на него 1 капли щелочи последний окрашивается в вишнево-красный цвет.

Задание 2. Проведите идентификацию антраценпроизводных методом бумажной хроматографии.

Хлороформное извлечение, оставленное после проведения реакции Борнтрегера, переносят в стаканчик вместимостью 30-50 мл; 5-6 капель извлечения по капле (каждая капля должна высохнуть) наносят на стартовую линию полосы хроматографической бумаги. На расстоянии 2 см от первого пятна наносят раствор суммы агликонов ревеня. Хроматограмму помещают в камеру, на дне которой налито толуола столько, чтобы край листа погрузился в него на 1 см. После окончания хроматографирования (фронт растворителя не доходит до края бумаги 2-3 см) хроматограмму вынимают из камеры, отмечают линию финиша, высушивают и просматривают в видимом и УФ-свете до и после проявления парами аммиака.

Рассчитайте величину R<sub>f</sub>. Сделайте заключение о качественном составе антраценпроизводных исследуемого сырья. Зарисуйте схему хроматограммы.

Примечание. R<sub>f</sub> реина - 0; реум-эмодина 0,40; алоэ-эмодина 0,65; хризофанола 0,98.

Задание 3. Провести количественное определение антраценпроизводных фотоколориметрическим методом (ГФ XI, вып.2, с.231).

Метод основан на способности окисленных форм производных антрацена давать со щелочами вишнево-красное окрашивание. Определяется сумма всех агликонов, содержащихся в сырье в свободном виде и образовавшихся после гидролиза антрагликозидов ледяной уксусной кислотой.

В колбу вместимостью 100-200 мл, снабженную пришлифованным обратным холодильником, помещают около 0,05 г (точная навеска) порошка коры крушины или корня ревеня, измельченных до частиц размеров 1 мм; наливают 7,5 мл ледяной уксусной кислоты. Содержимое колбы с присоединенным обратным холодильником нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут, затем колбу снимают с водяной бани, охлаждают, присоединяют к тому же холодильнику, добавляют через холодильник 30 мл хлороформа и кипятят на водяной бане еще 15 минут. Раствор охлаждают, фильтруют через маленький комочек ваты в делительную воронку вместимостью до 300 мл и промывают вату 10 мл хлороформа. Затем вату помещают в колбу, наливают 30 мл хлороформа и кипятят 10 минут. Охлажденный раствор фильтруют в ту же воронку через другой комочек ваты, промывая его 10 мл хлороформа. К объединенным хлороформно-уксусным извлечениям

по стенке добавляют 100 мл щелочно-аммиачного раствора и осторожно взбалтывают 5-7 мин, охлаждая воронку под струей холодной воды. После полного расслоения прозрачный верхний красный слой, не фильтруя, сливают в мерную колбу вместимостью 200 мл, а хлороформный слой обрабатывают порциями по 20 мл щелочно-аммиачного раствора до прекращения окрашивания жидкости, присоединяя их к содержимому мерной колбы. Содержимое колбы доводят водой до метки. Затем 25 мл этой жидкости помещают в колбу, соединенную с обратным холодильником, и нагревают 15 минут на кипящей водяной бане. При этом происходит окисление тех производных антрацена, которые были еще в восстановленной форме. Интенсивность и оттенок красного окрашивания при этом изменяются. После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора на фотоколориметре ФЭК-М при длине волны 540 нм; контроль - щелочно-аммиачный раствор, кювета - 10 мм, зеленый светофильтр.

При получении слишком интенсивной окраски раствор перед колориметрированием нужно разбавить.

Концентрацию производных антрацена в колориметрируемом растворе находят по калибровочному графику, построенному по растворам кобальта хлорида.

Содержание производных антрацена (агликонов) в процентах (X) в пересчете на абсолютно-сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 200 \cdot K}{1000 \cdot v} \cdot \frac{100}{100 - \omega} = \frac{20 \cdot C \cdot K}{v(100 - \omega)},$$

где C - концентрация производных антрацена, найденная по калибровочному графику, мг/л;

200 - объем всего щелочно-аммиачного извлечения, мл;

$\omega$  - потеря в массе при высушивании сырья, %;

v - масса сырья, г;

K - коэффициент разбавления.

Сделайте заключение о соответствии анализируемого сырья требованиям НТД.

Примечания:

1. В методику количественного определения внесены изменения по сравнению с ГФ XI: диэтиловый эфир заменен на хлороформ.

2. Построение калибровочного графика. 50,0 кобальта хлорида, высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу на 500

мл, растворяют в 250 мл воды, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты и раствор доводят водой до метки. Готовят серию разбавленных растворов, измеряют оптическую плотность растворов кобальта хлорида в пределах концентрации от 0,25 до 30%. По оси ординат откладывают значения оптической плотности, а по оси абсцисс - концентрации производных антрацена в мг/л, исходя из того, что 1% раствора кобальта хлорида соответствует 3,6 мг производных антрацена в одном литре раствора. Приготовление эталонных растворов и определение их оптической плотности проводят не менее трех раз.

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

#### Контрольные вопросы

1. Почему при обнаружении антраценпроизводных в сырье нельзя ограничиться только реакцией со щелочью в водном или спиртовом извлечении?

2. Назовите качественные реакции, используемые для обнаружения антраценпроизводных. Напишите химические реакции.

3. Какое окрашивание со щелочью дают окисленные и восстановленные формы производных антрацена?

4. Назовите основные этапы реакции Борнтрегера, проиллюстрируйте их химическими реакциями.

5. Что происходит при нагревании навески сырья с ледяной уксусной кислотой?

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

7. С какой целью нагревают щелочно-аммиачный раствор перед колориметрированием?

8. Как определить содержание в сырье восстановленных форм антраценпроизводных?

9. Какие реакции можно использовать для проявления антраценпроизводных на хроматограммах?

## Тема 5. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о флавоноидах, строение, классификация по степени окисления пиранового кольца, месту присоединения фенильного кольца, по характеру присоединения углеводного компонента; физико-химические свойства, распространение в растительном мире, применение в медицине.

Экстракция флавоноидов из сырья.

Качественные реакции на флавоноиды, химизм реакций, аналитический эффект.

Хроматографический анализ.

Методы количественного определения флавоноидов в растительном сырье (получение извлечения, очистка, количественное определение).

Латинские и русские названия сырья, производящих растений, семейств; химический состав, препараты и применение софоры японской, аронии черноплодной, бессмертника песчаного, видов боярышника, василька синего, видов горца, липы сердцевидной, пажиты обыкновенной, пустырника сердечного и пятилопастного, стальника полевого, сушеницы топяной, хвоща полевого, череды трехраздельной, шлемника байкальского.

Формулы катехина, флавана, лейкоантоцианидина, антоцианидина, флаванона, флавонола, оксихалкона, изофлавонола, апигенина, лютеолина, нарингенина, кемпферола, кверцетина, мирицетина, витексина, ононина, рутина, гиперозида, гнафалозида.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Провести экстракцию флавоноидов из растительного сырья.

2 г сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл со шлифом и заливают 20 мл 70% этанола. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения жидкость фильтруют и с извлечением проводят качественные реакции и хроматографический анализ.

Задание 2. Проведите качественные реакции на флавоноиды.

Цианидиновая реакция или проба Шинода (Синода)

В три пробирки наливают по 1 мл фильтрата. В одну пробирку до-

бавляют порошок магния, во вторую - цинка, в третьей - только фильтрат.

Затем во все три пробирки добавляют по 5-7 капель концентрированной хлористоводородной кислоты. При наличии значительного количества флавоноидов в пробирках с магнием и цинком сразу же появляется розовое, оранжевое или красное окрашивание. При малом количестве флавоноидов необходимо нагревание. Для этого пробирки помещают в водяную баню на 10 минут, а затем наблюдают окраску.

Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием или цинком в присутствии хлористоводородной кислоты дают розовое, красное или оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов.

Третья пробирка контрольная: появление розового или красного окрашивания в ней указывает на присутствие в сырье антоциановых пигментов, халконов или аурунов, которые при добавлении только одной концентрированной хлористоводородной кислоты образуют красное окрашивание за счет образования оксониевых солей.

Напишите схему реакции.

### Реакция с алюминия хлоридом

К 1 мл фильтрата добавляют 3-5 капель 5% спиртового раствора реактива. При наличии флавоноидов, содержащих в положении 5 OH-группу, появляется лимонно-желтое окрашивание. Напишите схему реакции.

### Реакция с аммиаком, натрия гидрокарбонатом, щелочью

К 1 мл фильтрата добавляют 3-5 капель 5% раствора реактива. При наличии флавонов, флаванонов, флавонолов и флаванололов появляется желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное; антоцианы дают синее или фиолетовое окрашивание.

### Реакция с солями железа (Ш)

К 1 мл фильтрата прибавляют 2-3 капли 1% раствора железа (Ш) хлорида или железосамониевых квасцов. При наличии флавоноидов с орто-диоксигруппировкой в кольце В появляется зеленое окрашивание и осадок. При наличии веществ с рядовой три-оксигруппировкой в кольце В появляется черно-синее окрашивание и осадок. Эту реакцию дают и другие фенольные соединения.

Из приведенных реакций специфической является цианидиновая проба.

Результаты качественных реакций оформите в следующем виде:

Реактив	Результат реакции (цвет, осадок или другие изменения)	Заключение о наличии флавоноидов и их принадлежности к той или иной группе по классификации
---------	---	---

Примечание. При проведении качественных реакций сырье должно быть предварительно освобождено от пигментов экстрагированием в аппарате Сокслета хлороформом или другим органическим растворителем.

Задание 3. Выполнить хроматографическое исследование флавоноидов.

Оставшееся после качественного анализа спиртовое извлечение упаривают до половины объема. На круглый диск хроматографической бумаги на расстоянии 0,5 см от центра наносят исследуемое извлечение, а в качестве свидетелей - спиртовые растворы рутина, кверцетина или других веществ. Диаметр пятна не должен превышать 5 мм. В центр диска вводят фитиль из хроматографической бумаги. Хроматографирование проводят в чашках Петри, в качестве растворителя используют 15% уксусную кислоту. Экспозиция 20-25 минут. Хроматограммы высушивают до испарения растворителя и просматривают в УФ-свете без предварительного проявления, а затем после проявления алюминия хлоридом и парами аммиака.

Зарисуйте схему хроматограммы, сделайте вывод о числе веществ флавоноидной природы, их строении.

Задание 4. Проведите количественное определение флавоноидов в растительном сырье.

Количественное определение суммы флавоноидов в цветках арники 1 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц до 2 мм помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта, содержимое колбы встряхивают и взвешивают с погрешностью 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После этого колбу охлаждают до комнатной температуры, вновь взвешивают и при необходимости добавляют 70% спирт до первоначальной

массы. Извлечение фильтруют через складчатый бумажный фильтр в колбу вместимостью 100 мл, отбрасывая первые 20 мл фильтрата.

1 мл фильтрата помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте, объем раствора доводят 95% спиртом до метки и перемешивают. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения и 0,1 мл концентрированной уксусной кислоты, доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца рутина, используя в качестве раствора сравнения 95% спирт.

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - \omega) \cdot 100} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 10000}{D_0 \cdot m \cdot (100 - \omega)},$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>0</sub> - оптическая плотность стандартного образца рутина; m - масса сырья, г; m<sub>0</sub> - масса рутина, г; ω - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Приготовление эталонного раствора стандартного образца рутина.

0,05 г (точная навеска) стандартного образца рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки спиртом той же концентрации и тщательно перемешивают.

1 мл стандартного образца содержит 0,0005 г рутина. Раствор стабилен в течение 1 месяца.

Количественное определение флавоноидов в траве горца птичьего (спорыша)

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение

Зак. 903.

ние 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Объединенные извлечения повторно фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают 70% спиртом и доводят объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А).

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

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 капля разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

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

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; 330 - удельный показатель поглощения комплекса авикуларина с алюминия хлоридом при 410 нм; m - масса сырья, г;  $\omega$  - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Запишите кратко методику определения, рассчитайте содержание флавоноидов и сделайте вывод о соответствии сырья требованиям НТД.

#### Контрольные вопросы

1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций?
2. Назовите качественные реакции на флавоноиды, на каких свойствах флавоноидов они основаны? Химизм реакций. Почему при проведении пробы Шинода необходимо делать контрольную пробу?
3. Какие качественные реакции являются специфическими, а какие общими для фенольных соединений?
4. Какую флуоресценцию развивает большинство флавоноидов в УФ-свете?

5. Какие качественные реакции могут быть использованы для количественного определения флавоноидов?
6. Назовите основные этапы количественного определения флавоноидов.
7. Назовите методы количественного определения флавоноидов.

## Тема 6. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ (ТАННИДОВ) В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о дубильных веществах, строение, классификация, физико-химические свойства, распространение в растительном мире, применение в медицине.

Экстракция танинов из сырья.

Качественные реакции (выделить специфические); реакции отличия групп танинов (гидролизуемые или конденсированные).

Методы количественного определения: принцип метода, преимущества и недостатки.

Латинские и русские названия сырья, производящих растений и семейств; химический состав, препараты, применение галл, сумаха дубильного, скумпии кожевенной, видов дуба, лапчатки прямостоячей, кровохлебки лекарственной, горца змеиноного, бадана толстолистного, черемухи обыкновенной, черники, ольхи серой и о. клейкой.

Формулы пирогаллола, пирокатехина, флороглюцина, галловой и эллаговой кислот, катехина, лейкоантоцианидина, танина, галлокатехина, катехингаллата; фрагментов конденсированных дубильных веществ.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Провести экстракцию дубильных веществ из сырья.

5 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 100 мл кипящей воды, кипятят на плитке в течение 5 мин, фильтруют через складчатый фильтр. Полученное извлечение используют для проведения качественных реакций.

Задание 2. Провести качественные реакции на дубильные вещества.

I. Реакции обнаружения дубильных веществ.

а) реакция с раствором желатина. К 3-5 мл извлечения добавляют 2-3 капли 1% раствора желатина в 10% растворе натрия хлорида. При наличии танинов образуется белый осадок или помутнение раствора от образовавшихся желатинтанинов, которые растворимы в избытке реактива. Результаты анализа наблюдают на черном фоне, сравнивая с исходным извлечением.

б) реакция с солями алкалоидов. К 3-5 мл извлечения добавляют 2-3 капли 1% раствора солей кофеина, хинина или другого алкалоида. При наличии танинов выпадает осадок или наблюдается помутнение раствора.

в) реакция с калия бихроматом. К 3-5 мл извлечения добавляют 2-3 капли 5% раствора калия бихромата. При наличии танинов наблюдается потемнение раствора или выпадение желто-коричневого осадка;

г) реакция со свинцом основным уксуснокислым. К 3-5 мл извлечения добавляют раствор свинца основного уксуснокислого. При наличии танинов выпадает осадок;

д) реакция с реактивом Фолина-Дениса (смесь фосфомолибденовой и фосфовольфрамовой кислот). К 3-5 мл извлечения добавляют 3-5 капель реактива Фолина-Дениса и небольшое количество натрия карбоната. При наличии танинов образуется вольфрамовая или молибденовая синь. Окраска устойчива. Эта реакция может быть использована для количественного определения дубильных веществ.

Запишите результаты реакций и укажите, какие реакции являются специфическими.

2. Реакции отличия групп танинов:

а) реакция с солями железа (Ш). К 2-3 мл извлечения добавляют 3 капли 1% раствора железоаммониевых квасцов. Гидролизуемые дубильные вещества дают при этом черно-синее окрашивание, конденсированные - черно-зеленое;

б) реакция с бромной водой. К 5 мл извлечения добавляют несколько капель бромной воды и жидкость доводят до кипения (под тягой!). Конденсированные дубильные вещества сразу образуют желто-оранжевый осадок, а гидролизуемые выпадают в осадок только при добавлении избытка бромной воды (постепенно);

в) реакция свинца ацетатом средним в уксуснокислой среде. К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 10% уксусной кислоты и 1 мл 10% раствора свинца ацетата среднего. При наличии гидролизуемых дубильных веществ выпадает белый осадок; осадок отфильтровывают и к фильтрату добавляют 10 капель 1% раствора железоаммониевых квасцов и 0,5 г натрия ацетата (не встряхивать!). При наличии в сырье конденсированных дубильных веществ фильтрат окрашивается в черно-зеленый цвет;

г) реакция с формальдегидом и концентрированной хлористоводородной кислотой. К 25 мл извлечения прибавляют 5 мл 40% раствора формальдегида и 3 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Смесь кипятят 30 минут в колбе с обратным холодильником. При наличии конденсированных дубильных веществ и галловой кислоты обра-

зается осадок кирпично-красного цвета. После охлаждения осадок отфильтровывают; к 10 мл фильтрата в пробирке добавляют 1 мл 1% раствора железоммониевых квасцов и 1 г кристаллического натрия ацетата (не взбалтывать!). При наличии в сырье дубильных веществ гидролизуемой группы образуется сине-фиолетовое окрашивание около кристаллов натрия ацетата.

Запишите результаты реакций и сделайте заключение о характере дубильных веществ в анализируемом сырье.

Задание 3. Проведите количественное определение дубильных веществ в растительном сырье ( ГФ XI, вып. I, с. 286-287).

Фармакопейный метод количественного определения дубильных веществ в растительном сырье основан на их легкой окисляемости калия перманганатом в присутствии индигосульфокислоты при комнатной температуре. Индигосульфокислота является индикатором и регулятором реакции.

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают около 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 индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт (определяют индигочисло). Берут 25 мл индигосульфокислоты, прибавляют 500 мл воды и титруют калия перманганатом (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания.

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

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

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

V<sub>1</sub> - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

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

m - масса сырья, г;

ω - потеря в массе при высушивании сырья, %;

250 - общий объем извлечения, мл;

25 - объем извлечения, взятого для титрования, мл.

#### Контрольные вопросы

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

2. Какие реакции на дубильные вещества являются специфическими?

3. Какие соединения образуют окрашенные в черно-синий или черно-зеленый цвет продукты с солями железа (Ш)? От чего зависит характер окраски?

4. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье гидролизующих танинов?

5. Какими реакциями можно доказать присутствие в сырье конденсированных танинов?

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

7. Для чего ставится контрольный опыт при количественном определении дубильных веществ по ГОСТ 24027.2-80 и ГФ XI?

8. Преимущество оксидиметрического метода количественного определения дубильных веществ перед другими методами?

## Тема 7. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие об алкалоидах, строение, классификация, физико-химические свойства, распространение в растительном мире, локализация; правила хранения сырья.

Экстракция алкалоидов из сырья, методы очистки.

Качественные реакции: реактивы, аналитический эффект, специфичность реакций.

Хроматографический анализ.

Методы количественного определения алкалоидов в растительном сырье: принцип метода, их сравнительная характеристика.

Латинские названия сырья, производящих растений и семейств; химический состав, препараты и применение видов растений, содержащих алкалоиды.

Формулы гетероциклов, эфедрина, платифиллина, термопсина, цитизина, пахикарпина, скополамина, гиосциаминина, морфина, кодеина, папаверина, глауцина, галантамина, колхаминина, лизергиновой кислоты, эрготамина, резерпина, соласодина.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

**Задание 1.** Получите извлечение из сырья для проведения качественных реакций.

1 г измельченного растительного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 10 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

**Задание 2.** Проведите качественные реакции на алкалоиды

Извлечение разливают в пробирки по 0,5 мл и в каждую пробирку осторожно, по каплям, добавляют соответствующий реактив на алкалоиды. При наличии алкалоидов тотчас или через некоторое время должен образоваться осадок. Интенсивность осадка зависит как от количественного содержания алкалоидов, так и от чувствительности алкалоида к реактиву. Реакции можно провести на часовом стекле, соединяя каплю извлечения и реактива.

Общеалкалоидные реактивы:

- реактив Майера ( $HgCl_2 \cdot 2K_2Y$ );
- реактив Вагнера ( $I_2 \cdot 2K_2Y$ );
- реактив Драгендорфа ( $BiCl_3 \cdot K_2Y$ );
- 10% раствор танина;
- 1% раствор кремневольфрамовой кислоты  $H_8Si(W_2O_7)_6 \cdot H_2O$ ;
- 1% раствор фосфорномолибденовой кислоты  $H_7P(Mo_2O_7)_6 \cdot H_2O$ ;
- 1% раствор пикриновой кислоты.

Запишите результаты реакций и сделайте вывод о наличии или отсутствии алкалоидов в растительном сырье.

**Задание 3.** Определите содержание суммы алкалоидов в сырье растений семейства пасленовых (ГФ XI, вып. 2, с.252).

Метод основан на выделении алкалоидов из сырья в виде оснований, их последующей очистке и титриметрическом определении.

10 г воздушно-сухого измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, взвешивают на ручных весах с погрешностью не более 0,01 г, высыпая в склянку с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Под склянку подкладывают лист бумаги для избежания просыпания сырья. Приливают в склянку 150 мл дихлорэтана\* (хлороформа), 7 мл раствора аммиака, содержащее взбалтывают в течение 15 минут и оставляют стоять до следующего дня.

На другой день содержимое склянки еще раз взбалтывают в течение 15 минут. Экстракт фильтруют, добавляют 10 мл воды, взбалтывают, воду отделяют (удаление аммиака), точно измеряют цилиндром объем экстракта, 15 мл которого соответствует 1 г растительного материала. Затем вытяжку переливают в делительную воронку вместимостью 200 мл (при работе с делительными воронками необходимо смазывать кран и стеклянную пробку вазелином), дважды ополаскивают цилиндр органическим растворителем по 10 мл, который присоединяют к измеренному извлечению. Из экстракта алкалоиды извлекают 1 % раствором хлористоводородной кислоты, взбалтывая экстракт каждый раз по 2 минуты последовательно с 20, 15, 10 и 5 мл 1 % раствора

\* Диэтиловый эфир заменен на хлороформ или дихлорэтан

хлористоводородной кислоты до полного извлечения алкалоидов. Взбалтывание нужно проводить осторожно, чтобы не образовалась эмульсия. Каждый раз после расслаивания жидкости поступают следующим образом: поскольку слой органического растворителя в делительной воронке будет внизу, его временно сливают в колбочку или в стаканчик, а прозрачный водный слой фильтруют через гладкий, предварительно смоченный водой фильтр во вторую делительную воронку вместимостью 200 мл. Органический слой выливают в первую делительную воронку и прибавляют кислоту. Полноту извлечения алкалоидов кислотой проверяют общеалкалоидными реактивами, например, кремневольфрамовой кислотой. Для этого на часовое стекло помещают 5 капель из последнего извлечения и добавляют каплю реактива. Отсутствие осадка или помутнения свидетельствует о полном извлечении алкалоидов. Затем фильтр дважды промывают 1% раствором хлористоводородной кислоты по 5 мл, присоединяя промывные воды к общему кислотному извлечению. Фильтрат подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину и извлекают алкалоиды хлороформом, взбалтывая последовательно с 20, 15 и 10 мл экстрагента по 3 минуты. После отстаивания и полного разделения слоев хлороформные извлечения фильтруют через гладкий фильтр, на который предварительно помещают 4-5 г безводного натрия сульфата, в сухую коническую колбу вместимостью 100 мл. Для проверки полноты извлечения выпаривают на часовом стекле 5 капель последнего хлороформного извлечения, растворяют остаток в 1% растворе хлористоводородной кислоты, добавляют каплю общеалкалоидного реактива, например, кремневольфрамовой кислоты; не должен образоваться осадок или помутнение. После проверки полноты извлечения фильтр промывают дважды хлороформом по 5 мл. Хлороформ отгоняют на водяной бане до 1-2 мл, остаток его удаляют продуванием воздухом с помощью груши до полного исчезновения запаха хлороформа. Сухой остаток растворяют при нагревании на водяной бане в 15 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,02 моль/л), избыток последней оттитровывают раствором гидроксида натрия (0,02 моль/л) до желтого окрашивания (индикатор - метиленовый красный). Оттитрованную жидкость не выбрасывают, а используют для хроматографии (задание 4).

1 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,02 моль/л) соответствует 0,00578 г алкалоидов в пересчете на пносциамин.

Содержание алкалоидов в сырье в процентах (X) в пересчете на

абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(15-a) \cdot 0,00578 \cdot 100}{m} \cdot \frac{100}{100-W},$$

где a - количество раствора гидроксида натрия (0,02 моль/л), пошедшее на титрование, мл;

m - масса сырья, рассчитанная по отмеренному объему извлечения, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Запишите схему количественного определения алкалоидов в виде реакций. Сравните содержание алкалоидов в сырье с требованиями НТД и сделайте заключение о соответствии сырья требованиям НТД.

Задание 4. Проведите идентификацию алкалоидов методом распределительной хроматографии.

Оттитрованную жидкость, оставшуюся после количественного определения, подщелачивают аммиаком по фенолфталеиновой бумажке, переносят в делительную воронку и извлекают алкалоиды 20 мл хлороформа. Хлороформное извлечение взбалтывают с 2 г безводного натрия сульфата, фильтруют и хлороформ отгоняют до объема, равного 1-2 мл (для красавки) или 0,5 мл (для белены). Хлороформный раствор алкалоидов используют для хроматографии.

1. Хроматография в тонком не закрепленном слое алюминия оксида.

На стеклянную пластинку размером 8x12 см наносят слой алюминия оксида толщиной 0,25 - 1 мм. На линию старта (1,5 см от нижнего края пластинки) посередине наносят капилляром последовательно 5 - 10 капель хлороформного раствора алкалоидов. На расстоянии 1,5 - 2 см по обе стороны наносят свидетели - растворы атропина и скополамина. Пластинку осторожно помещают в хроматографическую камеру и нижний конец опускают в систему растворителей (бензол-этанол в соотношении 9:1) на 0,5 см. Когда фронт растворителей пройдет расстояние 10-11 см, пластинку вынимают, высушивают на воздухе (в вытяжном шкафу) и помещают в эксикатор, насыщенный парами йода. Алкалоиды обнаруживаются в виде темно-бурых пятен. Находят центры пятен, измеряют расстояние от центра пятна до старта и от старта до фронта и рассчитывают значения R<sub>f</sub>.

2. Хроматография на бумаге.

На полосе хроматографической бумаги проводят графитным карандашом на расстоянии 3-4 см от края стартовую линию и на ней наме-

чают 2 точки на расстоянии 2 - 3,5 см друг от друга. Посередине между этими точками перпендикулярно стартовой линии рекомендуется вырезать узенькую полоску, оставив неразрезанными верх и низ бумаги.

На стартовую линию при помощи капилляра или пипетки наносят подлежащий хроматографированию хлороформный раствор. (Если бумага не прорезана, то раствор наносят каплями: на одну точку испытуемый раствор, на другую - раствор алкалоида свидетеля, если же бумага прорезана, то растворы можно наносить штрихом вдоль стартовой линии). Каплям дают высохнуть, а затем подвешивают бумагу в цилиндр, на дне которого налита смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:2. Нижний конец бумаги должен быть погружен в жидкость примерно на 0,5 см. Сверху цилиндр плотно закрывают. Когда жидкость поднимется по бумаге на 25-30 см, хроматограмму вынимают, отмечают карандашом линию фронта растворителя и высушивают на воздухе. Высушенную хроматограмму проявляют, опрыскивая ее из пульверизатора реактивом Драгендорфа. Проявившиеся оранжевые пятна обводят карандашом, находят их центры и вычисляют значения  $R_f$ .

Зарисуйте схемы хроматограмм, запишите значения  $R_f$  на двух видах хроматограмм. Сделайте вывод о качественном составе алкалоидов. Сравните методы хроматографии в тонком слое и на бумаге и укажите преимущества и недостатки каждого метода.

#### Контрольные вопросы

1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций?
2. Назовите общеалкалоидные реактивы и укажите окраску образовавшихся осадков?
3. Назовите этапы количественного определения алкалоидов?
4. Для чего нужно измерять объем полученного экстракта при количественном определении алкалоидов?
5. Почему для подщелачивания используется раствор аммиака, а не щелочи?
6. Как просверить полноту извлечения алкалоидов при переводе их из дихлорэтанового извлечения в водную фазу и из водного извлечения в хлороформ?
7. Что такое  $R_f$  и как оно рассчитывается?
8. Каковы преимущества и недостатки хроматографии в тонком слое и на бумаге?

## Тема 8. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САПОНИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о сапонилах, строение, классификация, физико-химические свойства, распространение в растительном мире, применение в медицине.

Экстракция сапонинов из сырья, методы очистки от сопутствующих веществ.

Качественные реакции, основанные на биологических, физических и химических свойствах сапонинов.

Методы количественного определения: принцип метода, их сравнительная характеристика.

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств; химический состав, препараты и применение видов солодки, синюхи голубой, астрагала шерстистоцветкового, каштана конского, женьшеня, аралии маньчжурской, диоскореи японской, якорцев стелющихся, видов юкки, агавы.

Формулы диосгенина, глицирризиновой кислоты, протопанаксадиола, олеаноловой кислоты,  $\alpha$ - и  $\beta$ -амирина, дазиантогенина.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Получите извлечение сапонинов из растительного сырья и определите его гемолитическую активность.

1,0 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в пробирку, заливают 10 мл изотонического раствора натрия хлорида и настаивают на водяной бане в течение 15 мин. Настой фильтруют и определяют гемолитическую активность: к 1 мл настоя добавляют 1 мл 2% дефибринированной взвеси эритроцитов в изотоническом растворе. При наличии сапонинов раствор становится прозрачным, ярко-красным, вследствие растворения эритроцитов ("лаковая кровь").

Задание 2. Определите химическую группу сапонинов.

0,5 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в пробирку, заливают 5 мл воды и нагревают на водяной бане 15 мин. Жидкость фильтруют и разливают в 2 пробирки. В одну пробирку наливают 5 мл хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л), в другую - 5 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л), энергично встряхивают в течение минуты и сравнивают высоту столбов пены. Если столбы пены приблизительно одинаковы, или столб пены выше в кислоте, то сапонины

относят к стероидным.

Запишите результаты исследования и сделайте вывод о группе сапонинов.

Задание 3. Определите количественное содержание сапонинов одним из методов.

Количественное определение сапонинов в семенах каштана конского (ТУ 64-4-75-87).

2 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц 2 мм помещают в патрон из фильтрованной бумаги и в аппарате Сокслета экстрагируют хлороформом в течение 2 часов (10 сливов). Хлороформное извлечение отбрасывают. Патрон с сырьем высушивают, снова помещают в аппарат Сокслета и проводят экстракцию 95% спиртом в течение 5 часов (10 сливов). Растворитель отгоняют на водяной бане до объема 1-2 мл, прибавляют 10 мл воды и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 50 мл, прибавляют 3 мл раствора хлористоводородной кислоты (1 моль/л) и извлекают смесью н-пропиловый спирт-хлороформ (20:50) 2 раза по 70 мл в течение 5 минут. После каждого извлечения дают жидкости расслоиться в течение 10 минут. Хлороформно-пропанольные извлечения фильтруют в колбу для отгонки вместимостью 200 мл через бумажный фильтр и растворитель отгоняют под вакуумом досуха. К сухому остатку в колбе прибавляют 10 мл диэтилового эфира, взбалтывают в течение 2 минут, эфирное извлечение сливают. Операцию повторяют еще раз, эфирные извлечения отбрасывают. Остаток в колбе растворяют в ледяной уксусной кислоте и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до метки (раствор А). 0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до метки (раствор Б). В пробирку помещают 2 мл раствора Б, 2 мл раствора кобальта двухлористого, 2 мл концентрированной серной кислоты, закрывают ватным тампоном и помещают в кипящую водяную баню на 1 час. По истечении указанного времени пробирку быстро охлаждают и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 381 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл раствора кобальта двухлористого и 2 мл концентрированной серной кислоты, выдержанный в тех же условиях.

По калибровочному графику находят содержание эсцина в 1 мл спектрофотометрируемого раствора в граммах.

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

$$X = \frac{a \cdot 6 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 0,5 \cdot (100 - W)} = \frac{375000 \cdot a \cdot 100}{m \cdot (100 - W)},$$

где a - содержание эсцина в 1 мл спектрофотометрируемого раствора, найденное по калибровочному графику, г ;

m - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Содержание эсцина в сырье должно быть не менее 7%. Запишите ход количественного определения и сделайте вывод о соответствии анализируемого образца требованиям НТД.

Построение калибровочного графика. 0,05 г предварительно высушенного эсцина (ВФС 42-368-74) взвешивают с погрешностью 0,00002 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50-70 мл ледяной уксусной кислоты, взбалтывают до полного растворения и доводят объем раствора той же кислотой до метки. Из полученного раствора готовят серию разбавленных растворов, для чего в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают соответственно 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; мл раствора эсцина и доводят объем растворов ледяной уксусной кислотой до метки. В пробирки помещают по 2 мл полученного раствора, 2 мл раствора кобальта двухлористого, 2 мл концентрированной серной кислоты и далее поступают, как описано выше. В 5 мл исходного раствора содержится 0,00003 г эсцина. В 7,5 - 0,0000498, в 10 - 0,0000664, соответственно. Количественное определение сапонинов в корневищах с корнями диоскореи nipпонской (ФС 42-1521-80).

Около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 2 мм, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют пипеткой 50 мл 95% спирта и вносят остекленный перемешивающий стержень. Колбу с содержимым взвешивают (с точностью до 0,1 г) и нагревают при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа с момента закипания растворителя. По окончании указанного времени экстракт охлаждают до комнатной температуры, потерю в массе восполняют 95% спиртом, перемешивают и фильтруют через

бумажный фильтр 30-40 мл раствора. 5 мл фильтрата переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят до метки 95% спиртом и тщательно перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А пипеткой переносят в стеклянную пробирку с нормальным шлифом и сюда же прибавляют пипеткой 5 мл 1% раствора п-диметиламинобензальдегида в спиртовом растворе хлористоводородной кислоты (4 моль/л). Пробирку закрывают стеклянной пробкой, резиновым колпачком, встряхивают для перемешивания жидкости и нагревают в течение 2 часов в ультратермостате при температуре  $58 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Раствор охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл спиртового раствора хлористоводородной кислоты (4 моль/л), который также выдерживают в ультратермостате при указанной выше температуре.

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

$$X = \frac{c \cdot 0,0101 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - v) \cdot K} = \frac{c \cdot 50500}{a \cdot (100 - v) \cdot K},$$

где c - количество кобальта хлорида, найденного по калибровочному графику, г ;

0,0101- коэффициент пересчета концентрации кобальта хлорида на концентрацию фураностаноловых гликозидов;

50 - исходный объем извлечения, мл;

10 - число разведения;

a - масса сырья, г ;

v - потеря в массе при высушивании сырья, % ;

K - поправочный коэффициент на титр кислоты.

Содержание фураностаноловых гликозидов в сырье должно быть не менее 3%. Запишите ход количественного определения и сделайте вывод о соответствии анализируемого образца требованиям НТД.

Построение калибровочного графика. 5 г кобальта хлорида помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют дистиллированную воду. 1 каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. В мерные колбы на 25 мл отмеривают из шпиретки 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15 мл исходного раст-

вора и объем доводят до метки водой. Полученные растворы содержат соответственно 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,25; 0,03 г кобальта хлорида в 1 мл. Оптическую плотность раствора измеряют с толщиной слоя 10 мм и по полученным данным строят калибровочный график. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду. Для построения графика необходимо 3 измерения в каждой точке. По оси ординат откладывают значение оптической плотности, а по оси абсцисс - содержание кобальта хлорида в 1 мл в граммах.

#### Контрольные вопросы

1. Какие вещества растительного происхождения ингибируют гемолиз?
2. Какие вещества растительного происхождения, кроме сапонинов, могут вызывать гемолиз?
3. Как проводится проба, позволяющая определить химическую группу сапонинов?
4. На каких физико-химических свойствах сапонинов основаны методы их выделения, очистки и количественного определения?

## Тема 9. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КУМАРИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о кумаринах, строение, классификация, физико-химические свойства, распространение в растительном мире, применение в медицине.

Экстракция кумаринов из сырья, методы очистки от сопутствующих веществ.

Качественные реакции, химизм реакций, аналитический эффект.

Методы количественного определения: принцип методов, их сравнительная характеристика.

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств; химический состав, препараты и применение амми большой, псоралеи костянковой, пастернака посевного, вздутоплодника сибирского, амми зубной, инжира.

Формулы кумарина, псоралена, ангелицина, бергаптена, ксантотоксина, дигидросамидина, виснадина, келлина.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Получите извлечение кумаринов из растительного сырья.

1,0 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и заливают 15 мл 95% спирта, соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. Содержимое колбы фильтруют через вату. К горячему раствору добавляют по каплям 10% раствор ацетата свинца. При этом большая часть веществ фенольного характера, обладающая способностью к азосочетанию, осаждается. Еще горячую массу переносят на фильтр, отделяют осадок свинцовых солей, а фильтрат охлаждают. Кумарины из спиртового извлечения переводят в хлороформ, взбалтывая в делительной воронке с 20 мл хлороформа. Хлороформ отгоняют, а остаток в колбе растворяют в 95% спирте. С этим раствором проводят качественные реакции на кумарины и их хроматографическое разделение.

Задание 2. Проведите качественные реакции на кумарины.

#### Лактонная проба

Реакция основана на способности кумаринов при нагревании в щелочной среде образовывать соли желтого цвета, растворимые в воде,

которые при подкислении превращаются в исходные продукты, не растворимые в воде.

В пробирку наливают 1 мл исходного раствора, добавляют 0,5 мл 10% раствора натрия или калия гидроксида, нагревают на кипящей водяной бане. В присутствии кумаринов появляется желтое окрашивание. Содержимое пробирки охлаждают, добавляют 4 мл дистиллированной воды, 10% раствор хлористоводородной кислоты до кислой реакции (по лакмусу). Появление осадка или помутнение раствора указывают на возможное присутствие кумаринов в сырье.

#### Реакция азосочетания

Основана на способности кумаринов образовывать с ароматическими аминопериодными окрашенные продукты.

К 1 мл исходного раствора добавляют 3 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л), нагревают на водяной бане, охлаждают и смешивают с 1 мл свежеприготовленного диазотированного раствора сульфаниловой кислоты. В присутствии кумаринов в зависимости от их химической структуры появляется окрашивание от красно-оранжевого до вишнево-красного.

Напишите схемы реакций, укажите аналитический эффект. Сделайте вывод о наличии кумаринов.

Приготовление диазореактива. 5 мл раствора сульфаниловой кислоты (4,5 г сульфаниловой кислоты и 45 мл концентрированной хлористоводородной кислоты в 500 мл воды) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл 10% раствора натрия нитрита. Смесь оставляют на льду в течение 5 минут, затем прибавляют еще 10 мл 10% раствора натрия нитрита, взбалтывают, оставляют на льду в течение 5 минут, и доводят объем раствора водой до метки. Реактив сохраняют на льду.

Задание 3. Идентификация кумаринов методом хроматографии на бумаге или в тонком слое.

На стартовую линию хроматографической пластинки "Силуфол" или на хроматографическую бумагу наносят капилляром испытуемый раствор и свидетелей. После нанесения каждой капли дают возможность ей подсохнуть. В случае хроматографии на бумаге ее предварительно пропитывают раствором  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,05 моль/л) и высушивают. Разделение проводят в камере с *n*-бутанолом, насыщенным водой, или, при хроматографии в тонком слое, в системе *n*-гексан-метанол-бензол (5:1:4). После поднятия фронта растворителя на 15-18 см хроматог-

раммы вынимают из камеры, подсушивают на воздухе, а затем высушивают при 100-120°C. Хроматограммы просматривают в УФ-свете. Кумарины в зависимости от структуры флуоресцируют ярко-голубым, зеленовато-голубым, фиолетовым, зеленым цветом. Отмечают пятна кумаринов простым карандашом. Хроматограмму на пластине "Силу фол" проявляют путем опрыскивания 10% раствором натрия гидроксида в метаноле, подсушивания при 100-120°C и опрыскивания диазотированной сульфаниловой кислотой. Хроматографическую бумагу проявляют без предварительной обработки щелочью. Появляются пятна кумаринов от оранжево-красного до сине-фиолетового окрашивания.

Рассчитайте величину R<sub>f</sub>, сравните с R<sub>f</sub> достоверных образцов кумаринов, идентифицируйте компоненты исследуемого извлечения и сделайте заключение о качественном составе кумаринов. Зарисуйте схему хроматограммы.

**Задание 4.** Определите количественное содержание кумаринов в сырье.

Количественное определение кумаринов основано на их физико-химических свойствах. В настоящее время используются спектрофотометрические, полярографические методы, методы газовой хроматографии и другие.

Количественное определение кумаринов в плодах амми большой.

Около 5 г (точная навеска) неизмельченных плодов помещают в колбу вместимостью 100 мл (с притертой пробкой), прибавляют 50 мл 95% спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают (с погрешностью до 0,01 г), затем присоединяют к обратному холодильнику с водяным охлаждением и нагревают на кипящей водяной бане в течение двух часов. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают (с погрешностью до 0,01 г) и доводят массу колбы 95 % спиртом до первоначальной. Полученное извлечение перемешивают, переносят пипеткой 25 мл в круглодонную колбу вместимостью 50 мл и отгоняют до объема 1-2 мл. Затем приливают 0,5 мл хлороформа, смывая со стенок колбы осадок, прибавляют 2 мл 95% спирта, перемешивают и количественно переносят в пикнометр вместимостью 5 мл. Далее промывают еще раз колбу 95% спиртом, переносят в пикнометр, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

На хроматографические пластинки наносят микропипеткой 3 полосы длиной 2 см полученного извлечения (по 0,1 мл), три полосы раствора стандартного образца аммифурина (по 0,03 мл) и одну полосу

оставляют для контрольного опыта. Пластинки высушивают на воздухе в течение 30 минут. Хроматографирование проводят при температуре 23-25°C в предварительно насыщенной растворителями в течение 30 мин вертикальной камере вместимостью 360 мл. Подвижная фаза - петролейный эфир (t<sub>кип</sub> = 40-70°C) и этилацетат (1:1).

Когда фронт смеси растворителей пройдет 17 см, пластинки вынимают и сушат на воздухе в течение 40 минут, затем просматривают в УФ-свете при 300 нм и отмечают зоны, содержащие фурукумарины на уровне зон стандартного образца аммифурина. Силикагель с отмеченных зон и зоны контрольного опыта количественно переносят в колбы вместимостью 25-30 мл, приливают по 10 мл 95% спирта и содержимое колбы перемешивают в течение 1 часа.

Элюаты фильтруют через беззольные фильтры с синей полосой или через хроматографическую бумагу марки С. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 352 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм на фоне контрольного опыта.

Содержание суммы фурукумаринов (изопимпинеллина, бергаптена и ксантотоксина) в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 0,03 \cdot D \cdot 5 \cdot 50 \cdot 100}{m_1 \cdot D_0 \cdot 25 \cdot 0,1 \cdot 25} \cdot \frac{100}{100 - W} = \frac{12 \cdot m \cdot D}{m_1 \cdot D_0} \cdot \frac{100}{100 - W}$$

где D - усредненное значение оптической плотности элюата зоны испытуемого раствора;

D<sub>0</sub> - усредненное значение оптической плотности элюата зоны раствора стандартного образца аммифурина;

m - масса стандартного образца аммифурина, г;

m<sub>1</sub> - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Содержание фуранокумаринов должно быть не менее 0,6%. Сделать заключение о соответствии анализируемого образца требованиям ФС 42-1196-83 "Плод амми большой".

#### П р и м е ч а н и я

1. Приготовление раствора стандартного образца аммифурина. Около 0,3 г аммифурина (точная навеска) в пересчете на 100% вещество растворяют в 15 мл хлороформа в мерной колбе вместимостью 25 мл. Затем доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор годен для применения в течение 1 месяца.

2. Приготовление хроматографических пластинок. 6 г силикагеля марки АСА 254 5/40 для тонкослойной хроматографии с люминесцентным индикатором и 13% гипса (ЧСФР) перемешивают с 20 мл воды в фарфоровой ступке и ровным слоем наносят на стеклянную пластинку размером 13x20 см, которую после этого сушат на воздухе в течение суток.

#### Контрольные вопросы

1. Как получить извлечение кумаринов из сырья и очистить его от сопутствующих веществ?
2. Что происходит при взаимодействии кумаринов со щелочью? Почему исчезает желтая окраска при подкислении?
3. Как провести реакцию азосочетания и является ли она специфической для кумаринов?
4. Почему нельзя использовать для извлечения кумаринов воду?
5. Назовите основные этапы и методы количественного определения кумаринов. Укажите, на каких свойствах кумаринов они основаны.
6. Какую флуоресценцию обнаруживают кумарины в УФ-свете?

## Тема 10. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРБУТИНА В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

### Вопросы для самоподготовки

Понятие о фенольных соединениях, строение, классификация, физико-химические свойства, распространение в растительном мире.

Экстракция арбутина из сырья, методы очистки.

Качественные реакции на арбутин.

Количественное определение арбутина: принцип метода, достоинства и недостатки.

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств: химический состав, препараты и применение толокнянки, брусники, фиалки трехцветной и полевой, родиолы розовой, папоротника мужского.

Формулы ди- и триоксифенолов, арбутина, салидрозида (родиолозида), аспидинола.

### Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Приготовьте водное извлечение из сырья и проведите качественные реакции на арбутин.

0,5 г сырья, измельченного до частиц размером 1 мм, помещают в пробирку, заливают 10 мл воды, кипятят в течение 2-3 мин и фильтруют через бумажный фильтр.

1. К 1 мл фильтрата прибавляют небольшой кристаллик железа сульфата закисного; появляется крановато-фиолетовое, затем темно-фиолетовое окрашивание и, наконец, темно-фиолетовый осадок (арбутин).

2. К 1 мл фильтрата (в фарфоровой чашке) прибавляют 4 мл раствора аммиака и по каплям 1 мл 10% раствора натрия фосфорномолибденовокислого в хлористоводородной кислоте; появляется синее окрашивание (арбутин).

Запишите результаты реакций и сделайте выводы о присутствии арбутина в анализируемом сырье.

Задание 2. Определите количественное содержание арбутина (ГФ XI, вып. 2, с. 276).

Метод количественного определения арбутина основан на гидролизе арбутина с образованием гидрохинона, который количественно определяется йодом в щелочной среде, которая создается натрием

гидрокарбонатом.

0,5 г (точная навеска) листьев, измельченных и просеянных сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в колбу на 100 мл, заливают 50 мл воды и кипятят на плитке 30 мин. Для уменьшения испарения в колбу вставляют воронку. Горячее извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, избегая попадания растительного материала на фильтр. Растительный материал в колбе вновь заливают 25 мл воды и кипятят 20 минут. После этого горячее извлечение вместе с сырьем переносят на фильтр и остаток на фильтре промывают дважды горячей водой (по 10 мл). Ко всему фильтрату прибавляют 3 мл свинца ацетат основного для осаждения балластных веществ, перемешивают, охлаждают и доводят объем фильтрата водой до метки. Колбу помещают в кипящую баню и выдерживают до полной коагуляции осадка. Горячую жидкость полностью фильтруют в сухую колбу через бумажный фильтр, прикрывая воронку чашкой Петри или часовым стеклом (во избежание испарения).

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

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

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

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

$$X = \frac{V \cdot 0,01361 \cdot 2 \cdot 100}{m} \cdot \frac{100}{100 - w},$$

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

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

m - масса сырья, г;

w- потеря в массе при высушивании сырья, %.

#### Контрольные вопросы

1. На каких свойствах арбутина основано его количественное определение?
2. С какой целью прибавляется порошок цинка при количественном определении арбутина?
3. Для чего добавляется к извлечению раствор свинца ацетата основного?
4. Как проводится гидролиз арбутина?
5. Почему после нейтрализации жидкости натрия гидрокарбонатом добавляют его еще 2 г?
6. Качественные реакции на арбутин.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

Государственные стандарты СССР. Лекарственное растительное сырье. М.: Изд-во стандартов, 1980. 196 с.

Государственная фармакопея СССР. X. изд. М.: Медицина, 1968, 1079 с.

Государственная фармакопея СССР. XI изд. М.: Медицина, 1987. Вып. I. 334 с.

Государственная фармакопея СССР XI изд. М.: Медицина, 1990. Вып. 2. 398 с.

Кемертелидзе Э.П., Георгиевский В.П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения. Тбилиси: Медициереба, 1976. С. 58-105.

Муравьева Д.А. Фармакогнозия. М.: Медицина, 1981. 657 с.

Муравьева Д.А. Фармакогнозия. М.: Медицина, 1991. 560 с.

Химический анализ лекарственных растений: Учеб.пособ./Под ред. Н.И.Гринкевич, Л.Н.Сафронич. М.: Высшая школа. 1983. 176 с.

Дополнительная

Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир, 1977. 239 с.

Биохимические методы анализа растений /Под ред. М.Н.Запрометова. М.: Иностранная лит., 1960. 625 с.

Выделение и анализ природных биологически активных веществ. Томск: Изд-во Том.ун-та 1987. с.116-137. Краснов Е.А. и др.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений и их биосинтез// Итоги науки и техники. Биологическая химия, 1988. Т.2. С.188.

Методы биохимического исследования растений/ М.-Л.: Сельхозгизд 1952. С.256-261. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Мурри И.К.

Фармакогнозия: Атлас / Под ред. Н.И.Гринкевич, Е.Я.Ладыгиной. М.: Медицина, 1989. 510 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение . . . . .	3
Тема 1. Анализ жирных масел. Количественное определение жирных масел в растительном сырье . . . . .	7
Тема 2. Анализ эфирных масел. Количественное определение эфирных масел в растительном сырье . . . . .	13
Тема 3. Качественное и количественное определение кардиотонических (сердечных) гликозидов в растительном сырье . . . . .	18
Тема 4. Качественное и количественное определение антраценпроизводных в растительном сырье . . . . .	25
Тема 5. Качественное и количественное определение флавоноидов в растительном сырье . . . . .	30
Тема 6. Качественное и количественное определение дубильных веществ (таннидов) в растительном сырье . . . . .	36
Тема 7. Качественное и количественное определение алкалоидов в растительном сырье . . . . .	40
Тема 8. Качественное и количественное определение сапонинов в растительном сырье . . . . .	45
Тема 9. Качественное и количественное определение кумаринов в растительном сырье . . . . .	50
Тема 10. Качественное и количественное определение арбутина в растительном сырье . . . . .	55
Литература . . . . .	58

Составители:

М.Н. Комарова, Л. А. Николаева, В. Г. Регир,  
Л. С. Теслов, Н. П. Харитоновна, Р. К. Шатохина

Под общей редакцией

канд. фарм. наук проф. К. Ф. Блиновой

**ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Редактор *Г. М. Самаркина*

Технический редактор *М. М. Егорова*

Печать на ризографе *Н. Н. Белокуровой*

---

ЛР № 021251 от 23.10.97. Подписано к печати 07.07.98. Формат 60x90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Печать ризогр. Бумага тип. Печ. л. 3,75. Тираж 300 экз. Заказ 158.

---

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия  
197376, С.-Петербург, ул. Профессора Попова, 14