

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ
И ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ
ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2005

Рецензент:

д-р фарм. наук, проф. Е. И. Сакания

Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья. Методические указания к лабораторным занятиям по фармакогнозии/ Под ред. Л. С. Теслова.— СПб.: Издательство СПХФА, 2005. — 152 с.

Работа включает методики качественного и количественного анализа различных групп биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в лекарственных растениях. Приведена краткая характеристика основных групп БАВ, методы их анализа.

Даны вопросы для самоподготовки студентов, а также контрольные вопросы для проверки степени усвоения материала занятия.

Предназначены для студентов фармацевтического факультета, а также специалистов, связанных с анализом лекарственного растительного сырья.

Составители:

Н. П. Харитонова, Р. К. Шатохина

*Рекомендовано методической комиссией
фармацевтического факультета.*

ISBN 5-8085-0229-2

© Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 2005

ВВЕДЕНИЕ

При стандартизации лекарственного растительного сырья важное значение имеет определение содержания в нем действующих веществ.

В данные методические указания включены методики качественного и количественного анализа основных групп БАВ: жирные и эфирные масла, полисахариды, кардиотонические гликозиды, сапонины, фенологликозиды, кумарины, флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества, алкалоиды, аскорбиновая кислота, каротиноиды, витамин К₁.

Кроме того, дана краткая характеристика указанных выше групп БАВ, описаны методы их анализа, включенные в нормативные документы. По сравнению с предыдущим изданием методических указаний (1993 г.) дополнительно включен анализ полисахаридов, фенологликозидов (салидрозид), витаминов; приведена характеристика групп БАВ, более детально представлены методики их анализа, а также включен товароведческий анализ ЛРС в соответствии с ОФС 42-0013-03 «Правила приемки и методы отбора проб ЛРС».

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 нормативными документами (методическими ОФС, ГОСТами, Государственными Фармакопеями X и XI изданий, методическими пособиями). Самостоятельная работа студентов предусматривает включение элементов учебно-исследовательской работы по определению количественных показателей стандартизации лекарственного растительного сырья, проведение полного товароведческого анализа ЛРС.

Целью выполнения работ является освоение методов качественного и количественного определения групп действующих веществ в лекарственном растительном сырье, стандартизации ЛРС.

В свете требований квалификационной характеристики на основе полученных знаний и приобретенных навыков будущий специалист должен уметь анализировать лекарственное растительное сырье на содержание действующих ве-

ществ и оценивать его пригодность к медицинскому применению в соответствии с требованиями нормативных документов.

Некоторые общие положения о работе студентов в лаборатории фитохимии кафедры фармакогнозии

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

2. На занятия приходите 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, реактивов, оборудования, установок и т.п.

Выполнение работ осуществляется в соответствии с календарным планом. 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 в 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, бюкс 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 кислотами концентрированными и щелочами, выполнять только в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.

2.4. Категорически запрещается сливать в раковины или канализацию остатки органических растворителей, кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, 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 пищевой содой, либо приложить примочку из свежеприготовленных растворов пищевой соды либо калия перманганата. При тяжелых и обширных ожогах необходима медицинская помощь.

2.10. При ожогах кислотами промыть обожженное место проточной водой, затем раствором пищевой 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 количество легко воспламеняющейся 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.

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. Окончание работы:

3.1. При разборе установки выключить электроплитку, отключить подачу воды в 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.

3.5. Слить остатки реактивов из бюреток в соответствующие склянки.

4. Обязанности дежурного студента.

Дежурный по группе после окончания работы обязан:

— проверить, все ли установки, использовавшиеся группой, выключены;

— отключить аналитические весы;

— 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 1. АНАЛИЗ ЖИРНЫХ МАСЕЛ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ МАСЕЛ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о жирах, строение, классификация, физические и химические свойства, методы их получения и очистки (рафинирования).

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

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

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

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

Контрольные вопросы для проверки усвоения материала

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, парафина, восков, смол? На каких свойствах основана эта проба?

4. От чего зависят величины кислотного числа, числа омыления, эфирного числа и йодного числа? Методика их определения.

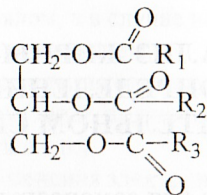
5. Как изменится величина кислотного числа, если масло получено из незрелых семян или хранилось при неблагоприятных условиях?

6. Как изменится величина эфирного числа в присутствии примеси вазелинового масла, вазелина, парафина, восков, смол?

7. Как изменится величина йодного числа, если масло получено из незрелых семян, а также в присутствии примеси вазелинового масла, вазелина, парафина, восков, смол; при прогоркании жирных масел?

8. На каких свойствах жирных масел основано их количественное определение? Назовите методы количественного определения, их достоинства и недостатки.

Жирные масла (*Olea pinguis*) (глицериды, триглицериды) — смеси сложных эфиров трехатомного спирта глицерина с высшими жирными кислотами.

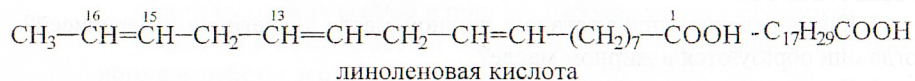
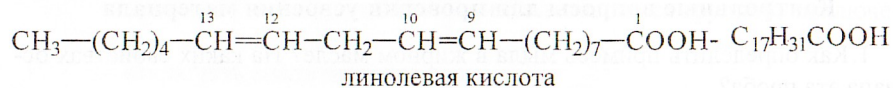
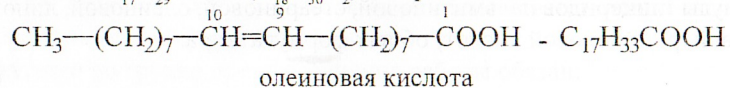


R_1, R_2, R_3 — высшие жирные кислоты

Известно около 40 жирных кислот с четным числом углеродных атомов от C_8 до C_{24} , входящих в состав жиров. В составе растительных масел чаще всего встречаются следующие кислоты:

— насыщенные: лауриновая — $C_{11}H_{23}COOH(C_{12}H_{24}O_2)$; миристиновая — $C_{13}H_{27}COOH(C_{14}H_{28}O_2)$; пальмитиновая — $C_{15}H_{31}COOH(C_{16}H_{32}O_2)$; стеариновая — $C_{17}H_{35}COOH(C_{18}H_{36}O_2)$;

— ненасыщенные: олеиновая — $C_{17}H_{33}COOH(C_{18}H_{34}O_2)$; рициноловая (12-оксиолеиновая) — $C_{17}H_{32}ONCOOH(C_{18}H_{33}ONO_2)$, образующие невысыхающие масла; линолевая — $C_{17}H_{31}COOH(C_{18}H_{32}O_2)$, образующая полувысыхающие масла; линоленовая $C_{17}H_{29}COOH(C_{18}H_{30}O_2)$ — преобладает в высыхающих маслах.



Известно около 1300 различных глицеридов, различающихся по виду жирных кислот, их соотношением в молекуле глицеридов.

Физические и химические свойства глицеридов определяются характером жирных кислот, входящих в их состав, их количественным соотношением, а также сложнэфирной природой глицеридов.

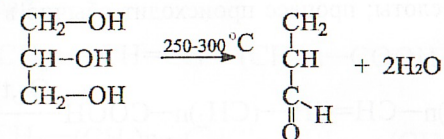
Физические свойства. Глицериды могут быть твердыми (образованы насыщенными кислотами) и жидкими (образованы ненасыщенными кислотами) веществами. Все они жирные на ощупь, на бумаге оставляют характерное жирное пятно, не исчезающее при нагревании. Цвет зависит от сопутствующих веществ, чаще всего желтоватый (от каротиноидов) или бесцветный; запах слабый, маслянистый, реакция нейтральная. Плотность всегда меньше единицы (0,910—0,940), касторовое — 0,970.

Глицериды не растворяются в воде, мало в спирте (за исключением касторового масла), хорошо растворяются в органических растворителях: диэтиловом эфире, хлороформе, петролейном эфире и др., эфирных маслах, вазелиновом масле.

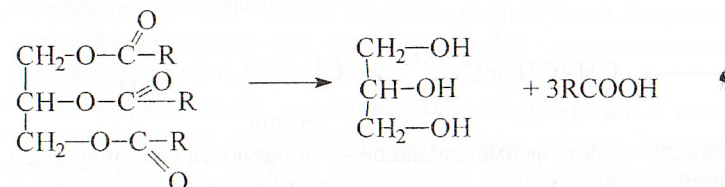
Оптически не активны, за исключением касторового масла. Коэффициент рефракции 1,44—1,48. Чем больше двойных связей в составе глицеридов, тем выше коэффициент рефракции.

Химические свойства.

1. При температуре 250—300 °C глицериды разлагаются с образованием альдегида акролеина, обладающего характерным неприятным запахом (реакция подлинности на жиры).



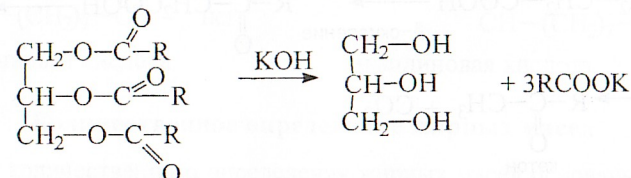
2. Гидролиз глицеридов происходит при участии фермента липазы, повышенной температуры в присутствии воды. Образуется глицерин и свободные кислоты.



Образование свободных кислот происходит при неправильном хранении жирных масел и семян, повышенное содержание свободных кислот наблюдается также в том случае, если масло получено из незрелых семян.

Содержание свободных кислот в глицеридах ограничивается НД; норма содержания контролируется определением кислотного числа.

3. Омыление. При действии щелочей глицериды омыляются с образованием глицерина и калиевых или натриевых солей жирных кислот (мыла); продукты омыления хорошо растворяются в воде.



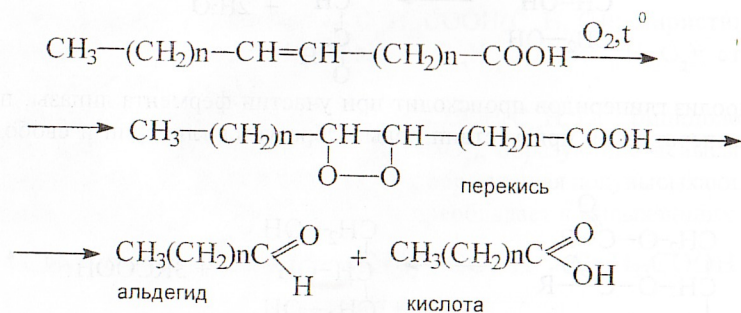
Эта реакция используется в анализе глицеридов при определении их подлинности (эфирное число и число омыления), а также чистоты (пробы на при-

месь пазелина, парафина, вазелинового масла, которые не омыляются щелочью, так как представляют собою смесь насыщенных углеводов).

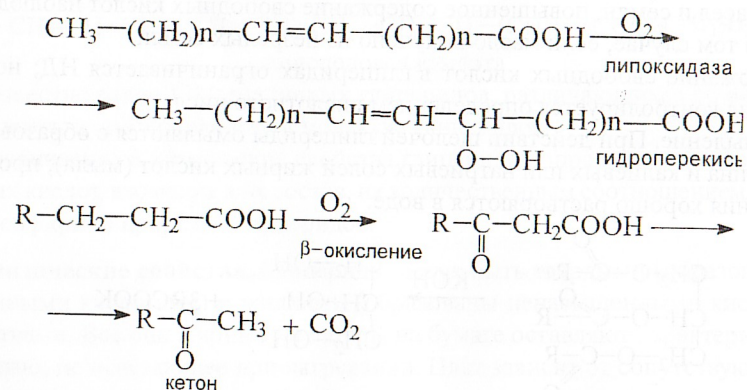
4. Прогоркание. Сложный химический и биохимический процесс, который протекает в глицеридах в присутствии влаги, кислорода воздуха, света, повышенной температуры, а в нерафинированных маслах, кроме того, при участии ферментов и микроорганизмов. Характер образующихся веществ зависит от степени рафинирования масел. Возможны следующие типы прогоркания:

— гидролитическое (первая стадия прогоркания) — образуются свободные жирные кислоты, которые затем подвергаются различным химическим превращениям (см. гидролиз);

— окислительное неферментативное — образуются перекиси, альдегиды, низкомолекулярные кислоты; процесс происходит обычно в рафинированных маслах.



— окислительное ферментативное — образуются гидроперекиси, кетоны. В нерафинированных маслах под действием указанных выше факторов происходит гидролиз, а затем β -окисление жирных кислот.



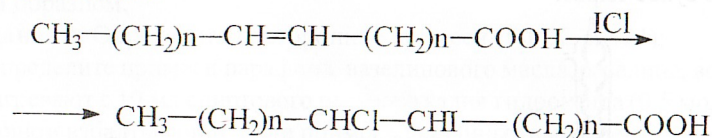
При прогоркании меняется цвет глицеридов (масло какао белеет), обнаруживается раздражающий запах и вкус, увеличивается плотность, коэффициент рефракции, растворимость в спирте.

Наличие продуктов прогоркания устанавливают с помощью пробы Крейса (на альдегиды, кетоны, перекиси), по уменьшению йодного, увеличению кислотного числа.

5. Реакции насыщения двойных связей.

— гидрогенизация: под действием водорода, в присутствии катализатора идет насыщение двойных связей и жидкие масла превращаются в твердый продукт. На этом свойстве основан процесс производства маргаринов из растительных масел.

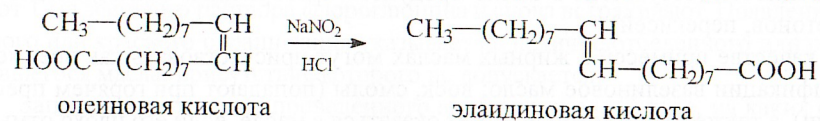
— Реакция с галогенами: галогены — хлор, бром, йод или их соединения — йодмоноклорид (ICl), йодмонобромид (IBr) также могут присоединяться по месту двойных связей



На этой реакции основано определение йодного числа (и.ч.) при анализе жирных масел. Его величина зависит от количества двойных связей в молекуле глицерида, чем больше двойных связей, тем выше йодное число. Твердые жиры имеют и.ч. менее 80, невысыхающие масла — 80—105; полувывсыхающие — 100—140; высыхающие 140—200.

6. Высыхание жирных масел: способность некоторых жирных масел под влиянием кислорода воздуха образовывать эластичные пленки. Это сложный физико-химический процесс, который начинается с окисления метиленовых групп, соседних с двойной связью, последующей полимеризацией, конденсацией и пр. Это свойство глицеридов широко используется в технике при производстве лаков, олифы.

Способность масел к высыханию оценивают элаидиновой пробой. Она основана на том, что олеиновая кислота, входящая в невысыхающие масла под воздействием нитрита натрия и кислоты хлористоводородной превращается в свой трансизомер — элаидиновую кислоту, которая образует твердый продукт.



Количественное определение жирных масел

Методы количественного определения жирных масел основаны на способности жирных масел растворяться в органических растворителях: хлороформе, диэтиловом и петролейном эфире. Наряду с жирными маслами извлекаются со-

путствующие вещества. Экстракция проводится в аппарате Сокслета (рис. 1). Используют два метода: метод Рушковского и метод Сокслета.

По методу Рушковского о количестве жирного масла судят по убыли в массе навески до и после экстракции. Положительным моментом является то, что одновременно можно определить содержание жирного масла в таком количестве проб, которые могут поместиться в экстракторе.

По методу Сокслета содержание жирного масла можно определить одновременно только в одной пробе, так как после отгонки растворителя колба с маслом высушивается до постоянной массы и затем взвешивается, после вычитания массы колбы рассчитывают содержание жирного масла в процентах на абсолютно сухое сырье.

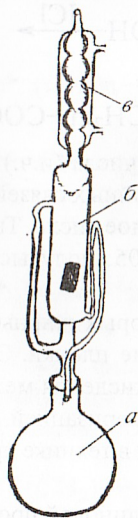


Рис. 1. Аппарат Сокслета:

a — колба;
б — экстрактор;
в — холодильник

Цель анализа жирных масел — определение подлинности (соответствие масла своему названию), чистоты (отсутствие посторонних примесей) и доброкачественности (отсутствие в масле продуктов прогоркания: кислот, альдегидов, кетонов, перекисей).

В качестве примесей в жирных маслах могут присутствовать как предмет фальсификации вазелиновое масло; воск, смолы (попадают при горячем прессовании), а также мыло, которое может оказаться в масле, если его плохо отмыли водой после нейтрализации кислот в процессе рафинирования масла с использованием соды.

В анализе жирных масел используют следующие методы:

— органолептические: определение цвета, запаха, вкуса, консистенции, прозрачности;

— физические: определение плотности, растворимости, коэффициента рефракции, оптической активности;

— химические: качественные реакции на подлинность, чистоту, доброкачественность, определение химических констант.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Определить подлинность образца жирного масла (ГФ X, с. 483-484):

а) определите растворимость анализируемого образца в сравнении со стандартным образцом того же наименования. Для определения растворимости возьмите 1 мл испытуемого масла и проверьте его растворимость в хлороформе, спирте, петролейном эфире.

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

Задание 2. Определить посторонние примеси (ГФ X, с. 484):

а) определите примеси парафина, вазелинового масла, вазелина, воска. 1 мл масла нагревают с 10 мл спиртового раствора калия гидроксида (0,5 моль/л), при непрерывном взбалтывании. Если примеси указанных выше веществ отсутствуют, полученный прозрачный раствор не должен мутнеть при добавлении 25 мл воды. Напишите реакцию.

б) 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 оставаться бесцветным. Затем к горячей воде приливают 5 мл масла и нагревают на кипящей водяной бане 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 (реакция нейтральная) или на то, что его содержание составляет не более 0,01 %;

в) определите наличие альдегидов и перекисей. 1 мл масла взбалтывают в течение 1 мин с 1 мл кислоты концентрированной хлористоводородной, прибавляют 1 мл эфирного раствора флороглюцина и снова встряхивают. Появление розового или красного окрашивания указывает на наличие отбеленного или разложившегося масла, присутствие которого не допускается.

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

Задание 3. Определить химические константы (ГФ X1, вып. 1, 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 10 мл смеси равных объемов 95 % спирта и эфира, предварительно нейтрализованной по фенолфталеину раствором натрия гидроксида (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 перемешивании раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л) до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 сек.

Кислотное число к.ч. вычисляют по формуле:

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

где a — количество миллилитров раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л), израсходованное на титрование;

b — навеска вещества в граммах;

5,61 — количество миллиграммов едкого кали (калия гидроксида), соответствующее 1 мл раствора натрия гидроксида (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. Величина числа омыления (ч.о.) зависит от молекулярной массы глицерида: чем меньше молекулярная масса, тем выше ч.о. Примесь вазелина, вазелинового масла и т.п. снижает ч.о., так как эти вещества не омыляются. Таким образом по величине ч.о. можно судить о подлинности и чистоте жирных масел.

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 свежепрокипяченной горячей воды, прибавляют по 1 мл раствора фенолфталеина и титруют раствором кислоты хлористоводородной (0,5 моль/л) до обесцвечивания.

Число омыления (ч.о.) вычисляют по формуле:

$$\text{ч.о.} = \frac{(a - b) \cdot 28,05}{v},$$

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

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

v — 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 (э.ч.). 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. Аналитическое значение э.ч. такое же, как ч.о., но кроме того, при прогоркании э.ч. уменьшается (доброкачественность).

г) определите йодное число. Йодным числом называют количество граммов йода, связываемое 100 г исследуемого вещества. Величина йодного числа (и.ч.) зависит от количества двойных связей в молекуле жирной кислоты: чем больше двойных связей, тем выше и.ч. При прогоркании, в присутствии примесей вазелинового масла, вазелина и пр., не содержащих двойных связей, и.ч. уменьшается. Таким образом, по величине и.ч. можно судить о подлинности, чистоте и доброкачественности жирных масел.

Точную навеску исследуемого вещества (см. примечание) помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью 250—300 мл, растворяют в 3 мл хлороформа, прибавляют 20 мл раствора йодброма (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 калий 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 йодброма (0,1 моль/л) и 25 мл воды. Дальнейшее определение проводят как указано выше.

Йодное число и.ч. вычисляют по формуле:

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

где a — количество миллилитров раствора натрия тиосульфата (0,1 моль/л), израсходованное в контрольном опыте;

b — количество миллилитров раствора натрия тиосульфата (0,1 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества;

v — навеска вещества в граммах.

Примечание. Величина 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

Напишите химические реакции, происходящие при определении йодного числа.

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

Химические константы жирных масел (из ГФ 9, 10)

№ п/п	Название масла	Кислотное число	Число омыления	Йодное число
1	Оливковое Oleum Olivarum	не > 2,5	187—196	
2	Касторовое Oleum Ricini	не > 5	176—186	82—88
3	Кунжутное Oleum Sesami	не > 2,5	187—193 188—195 (США)	
4	Миндальное Oleum Amygdalarum	не > 2,5	190—195	93—102
5	Подсолнечное Oleum Helianthi	не > 2,25	185—198	
6	Льняное Oleum Lini	не > 5	184—195	
7	Персиковое Oleum Persicorum	не > 2,5	187—195 (ГФ X)	96—103

Задание 4. Определите количественное содержание жирного масла в семенах по методу Рушковского (по массе обезжиренного остатка).

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 0,0001) растертой массы помещают в подписанный простым карандашом бумажный пакетик, предварительно высушенный до постоянной массы. Взвешивают пакетик вместе с навеской с погрешностью 0,0001 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 останется 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 °С до постоянной массы. Охлаждают в эксикаторе и взвешивают с погрешностью 0,0001.

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 a — масса пакетика с навеской до экстракции, г;

b — масса пакетика с навеской после экстракции, г;

v — масса навески сырья, г;

w — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Зарисуйте аппарат Сокслета в собранном виде. Рассчитайте содержание жирного масла на абсолютно сухое сырье.

В процессе работы студент показывает преподавателю результаты всех видов анализа; оформляет протокол; защищает работу, отвечая на вопросы преподавателя.

ТЕМА 2. АНАЛИЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие об эфирных маслах, строение, классификация, физические и химические свойства, методы получения.

Анализ эфирных масел на подлинность, чистоту и доброкачественность по ГФ XI: качественные реакции, физические и 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, борнилизовалерианата, камфоры, матрицина, хамазулена, арнифолина, бисаболола, алантолактона, ледола, тимола, анетола, азарона, эвгенола.

Контрольные вопросы для проверки усвоения материала

1. Как определить цвет, запах, прозрачность и растворимость эфирных масел?

2. Как определить в эфирном масле примесь спирта и жирного масла? На каких свойствах основаны эти пробы?

3. Как изменится величина эфирного числа при наличии в эфирном масле примеси жирного масла, минеральных масел (вазелинового масла, вазелина и пр.)?

4. Как изменятся величины кислотного и эфирного числа при гидролизе сложных эфиров, содержащихся в эфирном масле?

5. Для чего определяется эфирное число после ацетилирования? Суть метода.

6. Как рассчитать содержание в эфирном масле свободных и связанных спиртов?

7. На каких свойствах эфирных масел основано их количественное определение? Сколько методов предлагает ГФ XI, выбор метода. Аппаратура.

8. Как определить содержание в эфирном масле фенолов?

9. Почему запах эфирных масел определяется в течение одного часа?

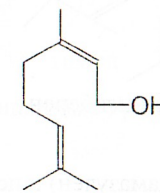
Эфирные масла (*Olea aetherea*) — смеси душистых летучих веществ, относящихся преимущественно к терпеноидам, способные перегоняться с водяным паром. Из эфирных масел выделено более тысячи различных веществ, представленных различными классами органических соединений: углеводороды, спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, лактоны, сложные эфиры и др.

Наиболее удобна для провизоров классификация эфирных масел (ЭМ) по химической природе главных биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в ЭМ. Все ЭМ делят на 3 большие группы: ЭМ, содержащие монотерпеноиды, сесквитерпеноиды и ароматические соединения (производные бензола).

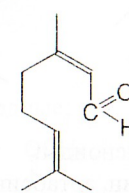
Внутри каждая группа подразделяется на ряд подгрупп.

I. Монотерпеноиды ($C_{10}H_{16}$)

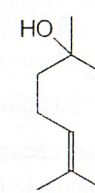
1. Ациклические монотерпеноиды:



гераниол

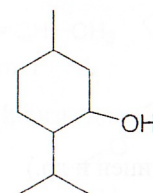


цитраль

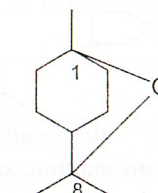


l-линалоол

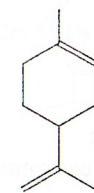
2. Моноциклические монотерпеноиды:



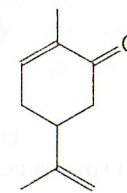
ментол



1,8-цинеол

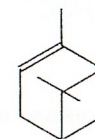


лимонен

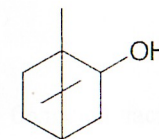


карвон

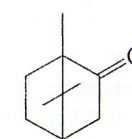
3. Бициклические монотерпеноиды:



пинен



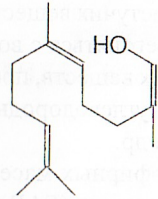
борнеол



камфора

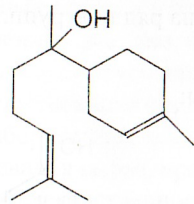
II. Сесквитерпеноиды (C₁₅H₂₄).

1. Ациклические сесквитерпеноиды:

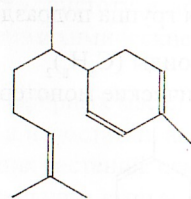


фарнезол

2. Моноциклические сесквитерпеноиды:



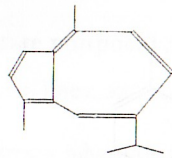
бисаболл



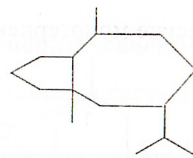
α-шингиберен

3. Бициклические сесквитерпеноиды:

а) группа гваяна (матрицин, артабсин, хамазулен) и псевдогваяна (амб-розана)

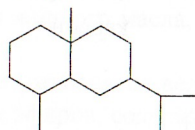


гвайазулен



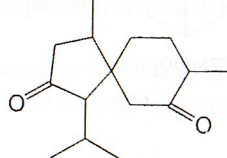
амброзан

б) группа селинана: (сантонин, алантолактон, кадинен и др.)



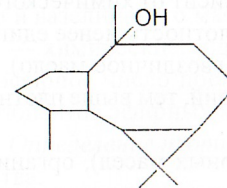
селинан

в) группа акорана



акорон

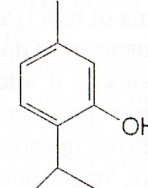
4. Трициклические сесквитерпеноиды:



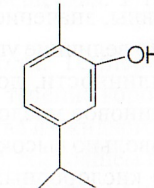
ледол

III. Ароматические производные.

1. Ароматические терпеноиды:

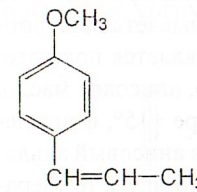


тимол

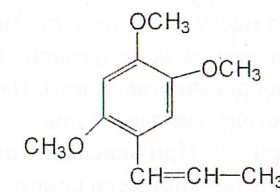


карвакрол

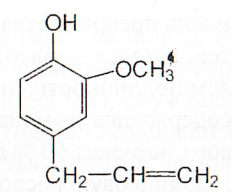
2. Фенилпропановые производные:



анетол

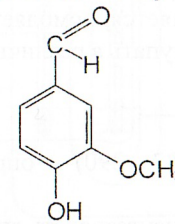


азарон



эвгенол

3. Производные C₆-C₁:



ванилин

Физические свойства. ЭМ большей частью бесцветные или желтоватые прозрачные жидкости, реже окрашенные (масло тимьяна — красное, ромашки аптечной — синее). Запах характерный, вкус пряный, жгучий, жирные на ощупь, в отличие от жирных масел улетучиваются, не оставляя жирного пятна (отсюда название эфирные масла).

Плотность находится в пределах 0,8—1,19, она зависит от химического состава масла. Масла, содержащие терпеноиды, имеют плотность менее единицы (0,8—0,98), а ароматические производные — более 1 (гвоздичное масло). Чем больше компоненты масел содержат кислородных функций, тем выше плотность масла. При окислении масла плотность повышается.

Хорошо растворяются в спирте (в отличие от жирных масел), органических растворителях, жирах. Чем больше в эфирном масле кислородсодержащих соединений, тем легче оно растворяется в спирте разных концентраций от 96 % до 70 %. Мало растворимы или не растворимы в воде, придают ей свой запах (получение ароматных вод).

Оптически активны, значение угла вращения (d или l) зависит от химического состава масла. По величине угла вращения плоскости поляризованного луча можно судить о подлинности, доброкачественности и чистоте масла (спирт, жирные масла, вазелиновое масло понижают угол вращения).

ЭМ обладают довольно высоким коэффициентом преломления (рефракции). Чем больше в масле кислородных производных, тем выше коэффициент преломления. Примесь жирного масла, спирта, вазелинового масла понижают коэффициент преломления; при окислении он повышается.

При охлаждении ряда масел, а иногда и при комнатной температуре часть масла превращается в плотную массу. Твердая часть масла называется стеароптен, жидкая — элеоптен. Температура затвердевания масла является показателем подлинности, чистоты и доброкачественности. Например, анисовое масло, содержащее не менее 80 % анетола, застывает при температуре $+15^\circ$, фенхелевое (не менее 60 % анетола) при $+3^\circ$. При окислении анетола в анисовый альдегид, анисовую кислоту, в присутствии примеси спирта, жирного масла температура затвердевания снижается.

Химические свойства. Под воздействием кислорода воздуха, солнечных лучей, повышенной температуре эфирное масло окисляется, осмоляется, изменяет цвет, запах. Отдельные компоненты ЭМ могут вступать в различные химические реакции.

Анализ эфирных масел

Цель анализа эфирных масел (ГФ XI, вып. 1, с. 287—290) — определение подлинности, чистоты и доброкачественности.

В качестве примесей в эфирных маслах могут присутствовать спирт, жирное и вазелиновое масло (минеральные масла).

При анализе определяют:

- органолептические показатели: цвет, запах, вкус, прозрачность;
- физические: плотность, температура затвердевания, растворимость в определенном объеме спирта соответствующей концентрации; коэффициент

рефракции, оптическую активность; проводят реакции на примесь спирта, жирного и вазелинового масел;

— химические: химические константы — кислотное число, эфирное число, эфирное число после ацетилирования; определяют содержание отдельных компонентов эфирных масел (ментола, цинеола, линалоола, фенолов и др.).

Определение плотности. Плотностью называют массу единицы объема вещества:

$$P = \frac{m}{V}.$$

Если массу m измерить в граммах, а объем V в кубических сантиметрах, то плотность представляет собой массу 1 см³ вещества: P г/см³. Определяется с помощью пикнометра.

Определение температуры затвердевания. Температурой затвердевания называют наиболее высокую, остающуюся в течение короткого времени постоянной температуру во время перехода вещества из жидкого состояния в твердое.

Определение проводят в приборе (рис. 2), состоящем из толстостенной пробирки 1 с внутренним диаметром 20 ± 1 мм, снабженной пробкой, в которой укреплены термометр 2 и мешалка 3. Рекомендуются укороченные термометры с ценой деления шкалы $0,5^\circ\text{C}$. Мешалку можно применять стеклянную или из проволоки, согнутую на конце петлей под прямым углом.

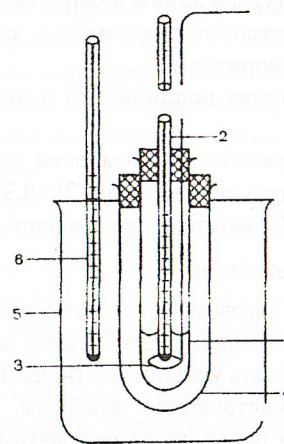


Рис. 2. Прибор для определения температуры затвердевания (объяснение в тексте)

Пробирку укрепляют на пробке во второй толстостенной наружной пробирке 4 (диаметр около 35 мм), служащей воздушной баней. Прибор помещают в сосуд 5 вместимостью 1000 мл, наполняемый водой или охлаждающей смесью таким образом, чтобы уровень жидкости в сосуде был выше вещества во внутренней пробирке. Температуру в сосуде измеряют с помощью второго термометра 6.

Вместо указанных выше пробирок (1,4) можно использовать прибор Жукова (ГОСТ 4255-75).

Методика определения. 10 г испытуемого вещества, находящегося в жидком состоянии (твердое вещество предварительно расплавляют при возможно более низкой температуре), помещают во внутреннюю сухую пробирку прибора и укрепляют термометр таким образом, чтобы ртутный шарик находился посередине слоя испытуемого вещества.

Пробирку с веществом вставляют в наружную пробирку и укрепляют в сосуде, жидкость в котором должна иметь температуру на 5 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания.

При постоянном перемешивании испытуемого вещества отмечают температуру каждые 30 с. Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем, при появлении твердой фазы, она остается некоторое время постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной с начала затвердевания вещества. Эту температуру и принимают за температуру затвердевания.

Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его охлаждают на 1—2 °С ниже ожидаемой температуры и вызывают затвердевание внесением кристаллика испытуемого вещества. Для веществ, имеющих высокую температуру затвердевания, определение можно проводить по методу Жукова (ГОСТ 4255-75).

Определение показателя преломления (рефрактометрия). Показателем преломления (n) называют отношение скорости распространения света в вакууме к скорости распространения света в испытуемом веществе. Это абсолютный показатель преломления. На практике определяют так называемый относительный показатель преломления, т.е. отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Рефрактометрия применяется для установления подлинности и чистоты вещества.

Приборы, применяемые для определения показателя преломления, называют рефрактометрами. Определение проводится при температуре ($20 \pm 0,3$) °С и длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Показатель преломления определенный при таких условиях, обозначается индексом n_D^{20} .

Современные приборы откалиброваны таким образом, что отсчеты, полученные по их шкалам, соответствуют показателям преломления для D линии натрия, поэтому при проведении измерений следует соблюдать указания в отношении соответствующего источника света, приведенные в инструкции к приборам.

Обычно измерения показателя преломления проводят на рефрактометрах типа Аббе, в основу которых положено явление полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления.

Диапазон измеряемых показателей преломления при измерении в проходящем свете 1,3—1,7.

Точность измерения показателя преломления должна быть не ниже $\pm 2 \cdot 10^{-4}$. Могут быть использованы рефрактометры других типов с такой же или большей точностью.

Рефрактометры юстируют по эталонным жидкостям, прилагаемым к приборам, или дистиллированной воде, для которой $n_D^{20} = 1,3330$.

Определение оптического вращения (поляриметрия). Оптическое вращение — это способность вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, плоскость поляризации вращается по часовой стрелке, то вещество называют правовращающим и перед его названием ставят знак +, если же плоскость поляризации вращается против часовой стрелки, то вещество называют левовращающим и перед его названием ставят знак –.

Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой α . Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе) и длины волны света. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света в оптически активной среде, т.е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора. Влияние температуры в большинстве случаев незначительно.

Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращения $[\alpha]$. Удельное вращение — это константа оптически активного вещества. Удельное вращение $[\alpha]$ определяют расчетным путем как угол поворота плоскости поляризации монохроматического света на пути длиной в 1 дм в среде, содержащей оптически активное вещество, при условном приведении концентрации этого вещества к значению, равному 1 г/мл.

Если нет специальных указаний, определение оптического вращения проводят при температуре 20 °С и при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Соответствующую величину удельного вращения обозначают $[\alpha]_D^{20}$. Иногда для измерения используют зеленую линию спектра ртути с длиной волны 546,1 нм.

При определении $[\alpha]$ в растворах оптически активного вещества необходимо иметь в виду, что найденная величина может зависеть от природы раствори-

теля и концентрации оптически активного вещества. Замена растворителя может привести к изменению $[\alpha]$ не только по величине, но и по знаку. Поэтому, приводя величину удельного вращения, необходимо указывать растворитель и выбранную для измерения концентрацию раствора.

Величину удельного вращения рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе:

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}, \quad (1)$$

где α — измеренный угол вращения в градусах;

l — толщина слоя в сантиметрах;

c — концентрация раствора, выраженная в граммах вещества на 100 мл раствора.

Для жидких веществ:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho}, \quad (2)$$

где α — измеренный угол вращения в градусах;

l — толщина слоя в сантиметрах;

ρ — плотность жидкого вещества в граммах на 1 мл.

Удельное вращение определяют либо в пересчете на сухое вещество, либо из высушенной навески, о чем в частных статьях должно быть соответствующее указание.

Измерение величины угла вращения проводят либо для оценки чистоты оптически активного вещества, либо для определения его концентрации в растворе. Для оценки чистоты вещества по уравнению (1) или (2) рассчитывают величину его удельного вращения $[\alpha]$. Концентрацию оптически активного вещества в растворе находят по формуле:

$$C = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha] \cdot l}. \quad (3)$$

Поскольку величина $[\alpha]$ постоянна только в определенном интервале концентраций, возможность использования формулы (3) ограничивается этим интервалом.

Измерение угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью $\pm 0,02^\circ \text{C}$.

Предназначенные для измерения угла вращения растворы или жидкие вещества должны быть прозрачными. При измерении прежде всего следует установить нулевую точку прибора или определить величину поправки с трубкой, заполненной чистым растворителем (при работе с растворами) или с пустой трубкой (при работе с жидкими веществами). После установки прибора на нулевую

точку или определения величины поправки проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз.

Для получения величины угла вращения α показания прибора, полученные при измерениях, алгебраически суммируют с ранее найденной величиной поправки.

Количественное определение фенолов. Метод основан на способности фенолов взаимодействовать со щелочами с образованием водорастворимых фенолятов. За счет образования фенолятов уменьшается объем масла.

Содержание фенолов определяют следующим образом: в кассиеву колбу вместимостью 200—250 мл с шейкой, градуированной на 10 мл (с точностью до 0,1 мл), вносят пипеткой 5 мл испытуемого масла и 150 мл 5 % раствора едкого натра и взбалтывают в течение 15 мин. Отстоявшееся масло вводят в градуированную шейку колбы прибавлением такого же раствора едкого натра. Через 1 ч определяют объем не прореагировавшего масла.

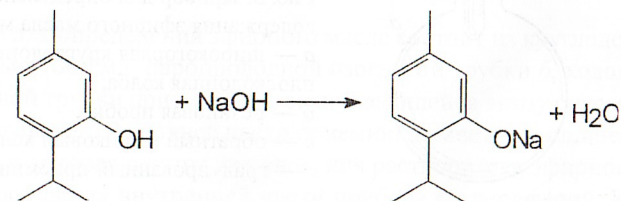
Содержание фенолов (X_4) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_4 = \frac{(5 - V) \cdot 100}{5} = (5 - V) \cdot 20,$$

где 5 — объем испытуемого масла в миллилитрах;

V — объем масла, не прореагировавшего с 5 % раствором едкого натра, в миллилитрах.

Температура масла при внесении в колбу и при отсчете, должна быть одинаковой.



Количественное определение эфирного масла в лекарственном растительном сырье

Определение содержания эфирного масла проводят путем его перегонки с водяным паром из растительного сырья с последующим измерением объема. Содержание масла выражают в объемно-весовых процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Масса сырья, степень его измельчения, время перегонки, метод и возможные растворители указаны в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье.

Определение проводят одним из четырех описанных ниже методов. Сырье, содержащее эфирное масло, которое при перегонке претерпевает изменения, образует эмульсию, легко загустевает или имеет плотность, близкую к единице, анализируют методами 3 или 4.

Метод 1. Для определения эфирного масла используют прибор, изображенный на рис. 3. Навеску измельченного сырья помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу *а* вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл воды и закрывают резиновой пробкой *б* с обратным шариковым холодильником *в*. В пробке снизу укрепляют металлические крючки, на которые, при помощи тонкой проволоки подвешивают градуированный приемник *г* 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.

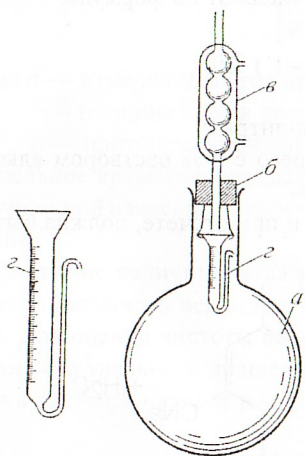


Рис. 3. Прибор для определения содержания эфирного масла методом 1:
а — широкогорлая круглодонная или плоскодонная колба;
б — резиновая пробка;
в — обратный шариковый холодильник;
г — градуированный приемник

Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье.

Объем масла в градуированной части приемника измеряют после окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры.

После 6—8 определений холодильник и градуированный приемник необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (*X*) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

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

где *V* — объем эфирного масла в миллилитрах;
m — масса сырья в граммах;
W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 2. Для определения эфирного масла используют прибор, изображенный на рис. 4.

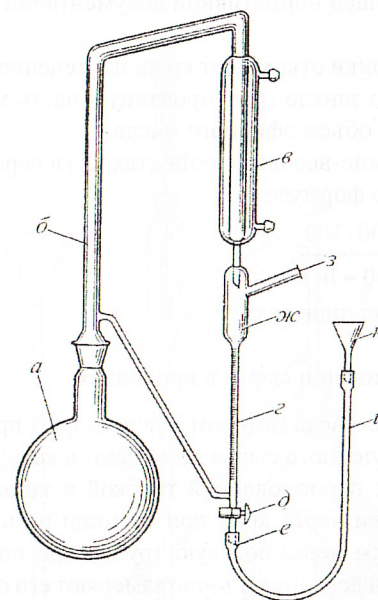


Рис. 4. Прибор для определения содержания эфирного масла методами 2 и 3:
а — круглодонная колба;
б — паропроводная изогнутая трубка;
в — холодильник;
г — градуированная трубка приемника;
д — спускной кран;
е — сливная трубка;
ж — расширение;
з — боковая трубка;
и — резиновая трубка;
к — воронка

Прибор для определения эфирного масла состоит из круглодонной колбы *а* вместимостью 1000 мл, паропроводной изогнутой трубки *б*, холодильника *в*, градуированной трубки приемника *г*, оканчивающейся внизу спускным краном *д* и сливной трубкой *е*. В верхней части приемника имеется расширение *ж* с боковой трубкой *з*, которая служит для внесения растворителя эфирного масла в дистиллят и сообщения внутренней части прибора с атмосферой. Колба и паропроводная трубка соединяются через нормальный шлиф. градуированная трубка имеет цену деления 0,02 мл. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка *и* с внутренним диаметром 4,5—5 мм, длиной 450 мм и воронка *к* диаметром 30—40 мм.

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15—20 мин. После 6—8 определений прибор необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Примечание. Допускается применение такого же разборного прибора, у которого паропроводная трубка *б* сочленена с холодильником через нормальный шлиф, а сливная трубка *е* заменена каучуковой.

Навеску измельченного сырья помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой. Колбу с содержимым нагревают и кипятят с интенсивностью, при которой скорость стекания дистиллята составляет 60—65 капель в 1 мин в течение времени, указанного в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье.

Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки приемника, и еще через 5 мин измеряют объем эфирного масла.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

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

где V — объем эфирного масла в миллилитрах;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 3. Для определения эфирного масла методом 3 используют прибор, изображенный на рис. 4. Навеску измельченного сырья помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой. Затем через боковую трубку при помощи пипетки вливают в приемник около 0,5 мл декалина и точно измеряют его объем, опуская для этого уровень жидкости в градуированную часть трубки. Далее поступают как описано в методе 2.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - W)},$$

где V — объем раствора масла в декалине в миллилитрах;

V_1 — объем декалина в миллилитрах;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 4. Для определения эфирного масла методом 4 используют прибор, изображенный на рис. 5.

Прибор состоит из круглодонной колбы с коротким горлом a вместимостью 1000 мл, паропроводной трубки b , холодильника $в$, отстойника $г$ с термометром до 100 °С $д$, ртутный шарик которого находится на уровне отверстия

холодильника, градуированной трубки e с ценой деления 0,001 мл, спускного крана $ж$ и сливной трубки $з$. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка $и$ с внутренним диаметром 4,5—5 мм, длиной 450 мм и воронка $к$ диаметром 30—40 мм.

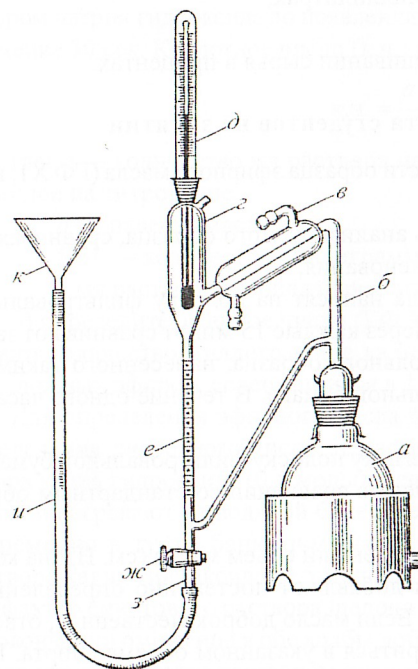


Рис. 5. Прибор для определения содержания эфирного масла методом 4:

- a — круглодонная колба с коротким горлом;
- b — паропроводная трубка;
- $в$ — холодильник;
- $г$ — отстойник;
- $д$ — термометр;
- e — градуированная трубка;
- $ж$ — спускной кран;
- $з$ — сливная трубка;
- $и$ — резиновая трубка;
- $к$ — воронка

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15—20 мин. После 6—8 определений прибор последовательно промывают уксусом и водой.

Навеску измельченного сырья помещают в колбу, прибавляют необходимое количество воды. Колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой, до тех пор, пока в нижней воронкообразной части отстойника не наберется слой воды высотой 8—12 мм. Во время перегонки этот уровень воды должен оставаться без изменения. Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в нормативной документации на лекарственное растительное сырье. Во время перегонки температура в отстойнике не должна превышать 25 °С. Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки. Еще через 5 мин измеряют объем эфирного масла.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

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

где V — объем эфирного масла в миллилитрах;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Определение подлинности образца эфирного масла (ГФ Х1, вып. 1, 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 в сравнении со стандартным образцом;

г) определите растворимость: определенный объем масла (см. НД на конкретное масло) наливают в пробирку и добавляют постепенно определенный объем спирта указанной концентрации. Если масло доброкачественное, отвечает требованиям НД оно должно раствориться в указанном объеме спирта. При окислении масел растворимость в спирте уменьшается.

Задание 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;

б) 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 окрашивается в фиолетово-розовый цвет;

в) определите примесь жирных и минеральных (вазелиновое) масел: 1 мл эфирного масла взбалтывают в 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.

Задание 3. Определение химических констант (ГФ Х1, вып. 1, с. 191):

а) определите кислотное число. Для определения кислотного числа навеску 1,5—2 г (50—60 капель), взятую с погрешностью до 0,01 г, растворяют в 5 мл спирта, нейтрализованного по фенолфталеину. К раствору прибавляют 1 мл раствора фенолфталеина и титруют при постоянном помешивании 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 сек. Кислотное число (к.ч.) рассчитывают по формуле:

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

где: a — количество мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л), израсходованное на титрование,

b — навеска масла в г;

5,61 — количество миллиграммов калия гидроксида, соответствующее 1 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

б) определите эфирное число (ГФ Х1, вып. 1, с.288). Эфирным числом называют количество миллиграммов калия гидроксида, 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 калия гидроксида (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 калия гидроксида (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 калия гидроксида титруют раствором кислоты хлористоводородной (0,5 моль/л) до обесцвечивания (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число X вычисляют по формуле:

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

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

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

v — навеска вещества в граммах;

28,05 — количество миллиграммов калия гидроксида, соответствующее 1 мл калия гидроксида (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 калия гидроксида.

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

в) определите эфирное число после ацетилирования (ГФ Х1, вып. 1, с. 289—290). Эфирным числом после ацетилирования обозначают количество миллиграммов калия гидроксида, 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 натрием 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 калия гидроксида (0,5 моль/л) и определяют эфирное число, как описано выше (индикатор фенолфталеин).

Эфирное число после ацетилирования X_2 вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{28,05 \cdot V_1}{b},$$

где V_1 — объем раствора калия гидроксида (0,5 моль/л), израсходованного на омыление эфиров после ацетилирования, мл;

b — масса навески, г;

28,05 — количество миллиграммов калия гидроксида, содержащихся в

1 мл спиртового раствора калия гидроксида (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 калия гидроксида;

$\left[1 - \frac{(X_2 - X) \cdot 42}{56,1 \cdot 1000}\right]$ — 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.

Полученные при анализе эфирного масла данные занесите в таблицу (см. ниже). Сделайте выводы о наличии и характере примесей (спирт, жирное масло), дайте заключение о влиянии примесей на химические константы. Сделайте общее заключение о подлинности, чистоте и доброкачественности масла (в конце работы).

Наименование масла	Цвет	Запах	Вкус	Примеси		Кислотное число	Эфирное число
				спирт	жирное или минеральное масло		

Ниже приводим данные НД по величине кислотного и эфирного числа для различных эфирных масел.

Название масла	Кислотное число	Эфирное число
1. Кориандровое Oleum Coriandri	не > 2	4—17
2. Мятное Oleum Menthae	не > 1,5	не < 11,5 (ГФ X)
3. Сосновое Oleum Pini	не > 3,0	не < 30,0
4. Лавандовое Oleum Lavandulae	не > 1,0	не < 100,0
5. Пихтовое Oleum Abietis	не > 1,0	

Задание 4. Определите количественное содержание эфирного масла в растительном сырье (ГФ Х1, вып. 1, с. 290) по методу 1.

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

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 при помощи тонкой проволоки 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 НД. По истечении срока, указанного в статье на анализируемое сырье, выключить прибор. Вынув и остудив прибор Гинзберга (У-образную трубку) до комнатной температуры, определить количество делений, занятых маслом, вычислить его содержание в сырье.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

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

где V — объем эфирного масла в миллилитрах;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

По результатам работы сделать заключение о соответствии содержания эфирного масла требованиям НД.

Зарисовать приборы, с помощью которых определяют количественное содержание эфирного масла по методу 1 и 2.

Студент показывает преподавателю результаты всех проб, реакций; оформляет протокол анализа, защищает работу, отвечая на вопросы преподавателя.

ТЕМА 3. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о полисахаридах (гомогликозидах), строение, классификация.

Крахмал: понятие, строение, физические и химические свойства; качественный анализ. Источники крахмала.

Инулин: понятие, строение, физические и химические свойства, качественный анализ.

Слизи: понятие, строение, классификация, физические и химические свойства, качественный и количественный анализ.

Пектиновые вещества: понятие, строение, классификация; физические и химические свойства. Качественный и количественный анализ.

Латинские названия сырья, производящих растений и семейств, содержащих полисахариды. Фрагменты формул амилозы, амилопектина, инулина, пектиновых веществ; формулы D-глюкозы, D-галактозы, D-маннозы, D-фруктофуранозы, D-ксилозы, L-арабинозы, L-рамнозы, D-глюкуроновой, D-маннуроновой, D-галактуроновой, L-гулуруновой кислот.

Контрольные вопросы для проверки усвоения материала

1. Как провести качественные реакции на крахмал, инулин, слизь, пектиновые вещества?

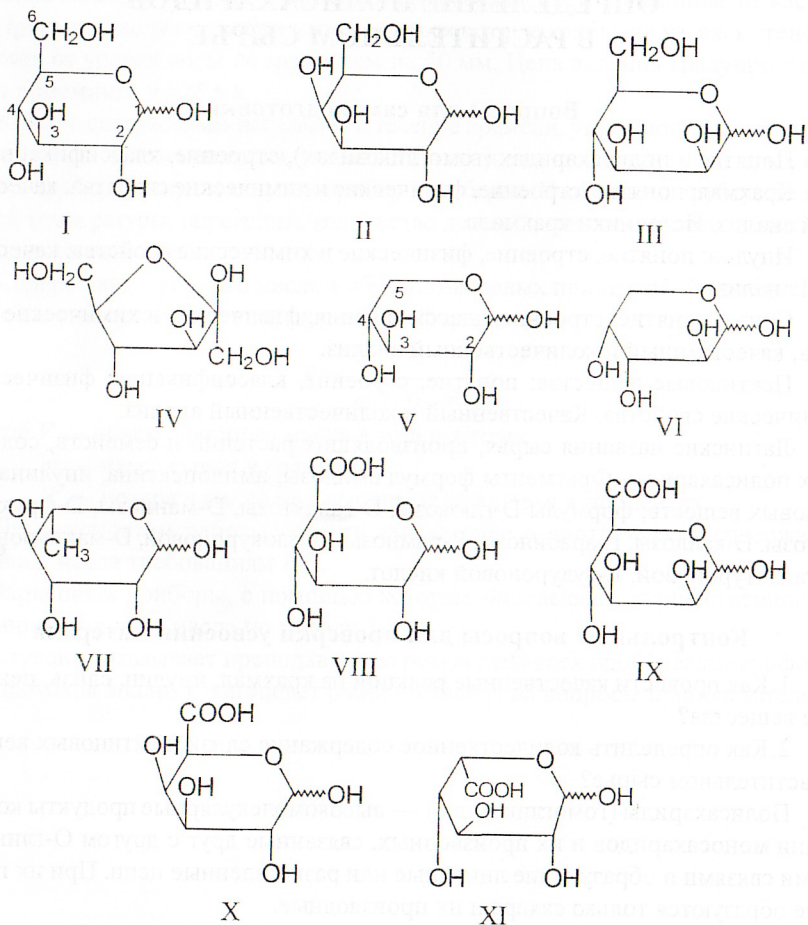
2. Как определить количественное содержание слизи, пектиновых веществ в растительном сырье?

Полисахариды (гомогликозиды) — высокомолекулярные продукты конденсации моносахаридов и их производных, связанные друг с другом O-гликозидными связями и образующие линейные или разветвленные цепи. При их гидролизе образуются только сахара и их производные.

Полисахариды (ПС), состоящие из одного вида моносахарида, относят к гомополисахаридам (гомополимерам): крахмал, клетчатка, а состоящие из двух и более видов моносахаридов — к гетерополисахаридам: инулин, пектиновые вещества, слизи, камеди. Число моносахаридных остатков может быть от 5 до тысяч единиц; молекулярная масса — от нескольких тысяч до миллионов единиц.

В составе ПС обнаружено более 20 различных видов моносахаридов и их производных. Наиболее часто встречаются гексозы: D-глюкоза (1), D-галактоза

(II), D-манноза (III), β-D-фруктофураноза (IV); пентозы: D-ксилоза (V), D-арабиноза (VI) и др.; дезоксисахара: L-рамноза (VII) и др.; уоновые кислоты: D-глюкуроновая (VIII), D-маннуриновая (IX), D-галактуриновая (X), L-гулуриновая (XI); спирты: маннит и др.



О-гликозидная связь образуется за счет полуацетального (гликозидного) - гидроксильного одного моносахарида и водорода гидроксильного другого моносахарида, расположенного в положениях 2, 3, 4, 6.

Все ПС — это твердые аморфные вещества, не растворяются в спирте и органических растворителях; некоторые растворяются в воде с образованием высокомолекулярных растворов (амилоза, слизи, пектиновые кислоты), другие в воде не растворяются.

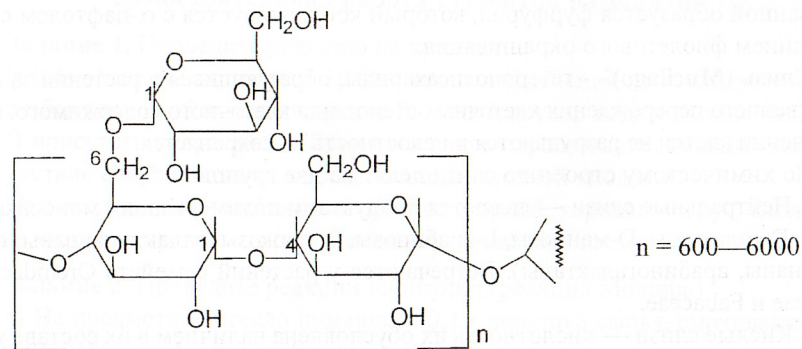
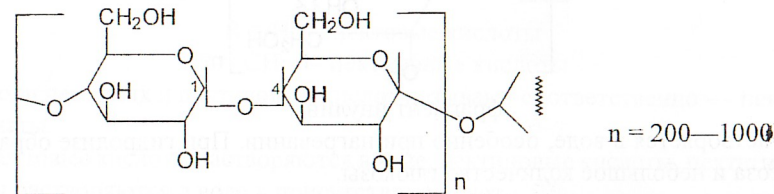
ПС гидролизуются под действием ферментов и кислот с образованием моно- и олигосахаридов (содержат 2—4 моносахарида).

Анализ ПС основан на их физико-химических свойствах.

Обычно для количественного определения используют гравиметрический метод, основанный на осаждении ПС из водных растворов спиртом.

При количественном определении пектиновых веществ их извлекают из растительного сырья при нагревании обычно с раствором фосфорной или другой кислоты; экстракт концентрируют. Для очистки используют свойство пектиновых веществ образовывать соли с металлами — пектаты и пектинаты, из которых пектиновые вещества освобождают действием кислот. Количественное определение проводят гравиметрическим методом (осаждение спиртом), методом потенциометрического титрования, основанного на взаимодействии пектовой кислоты с кальция гидроксидом и др.

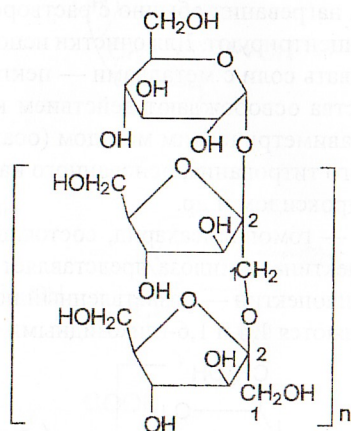
Крахмал (Amylum) — гомополисахарид, состоящий из двух полисахаридов — амилозы и амилопектина. Амилоза представляет собою линейный полимер 1,4-α-D-глюкан, а амилопектин — разветвленный полимер, в котором молекулы α-D-глюкозы соединяются 1,4 и 1,6-гликозидными связями.



Крахмал — белый аморфный порошок без запаха и вкуса, плотность 1,5—1,6; не растворяется в холодной воде. При нагревании до 68—75 °С с водой образуется крахмальный клейстер. При гидролизе под действием кислот сначала

образуются декстрины, затем дисахарид мальтоза, а при полном гидролизе α -D-глюкоза. С раствором Люголя образуется синее окрашивание.

Инулин — гетерополисахарид, линейная цепь которого состоит из 34—35 остатков D-фруктозы (около 86 %), связанных друг с другом β -2,1-связями, а заканчивается α -D-глюкозой. Встречается у растений семейства Asteraceae и Complanulaceae.



фрагмент инулина

Растворяется в воде, особенно при нагревании. При гидролизе образуется фруктоза и небольшое количество глюкозы.

Обнаруживают реакцией Молиша, которую можно провести в двух модификациях (см. Качественный анализ). Под действием кислоты серной концентрированной образуется фурфурол, который конденсируется с α -нафтолом с образованием фиолетового окрашивания.

Слизь (Mucilago) — гетерополисахариды, образующиеся в растении за счет естественного перерождения клеточных стенок или клеточного содержимого. При ослизнении клетки не разрушаются и целостность их сохраняется.

По химическому строению слизи делят на две группы:

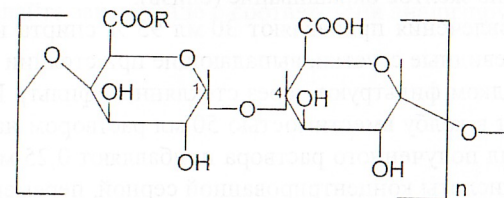
1. Нейтральные слизи — являются продуктами полимеризации моносахаридов — D-галактозы, D-маннозы, L-арабинозы, D-глюкозы (галактоманнаны, глюкоманнаны, арабиногалактаны). Встречаются у растений семейств Orchidaceae, Liliaceae и Fabaceae.

2. Кислые слизи — кислотность их обусловлена наличием в их составе урновых кислот, имеющих свободные незамещенные карбоксильные группы (слизь семян льна, корней алтея и др.).

Слизь — твердые аморфные вещества, хорошо растворимые в воде и не растворимые в спирте и неполярных растворителях. Осаждаются из водных растворов спиртом, солями Pb^{2+} , Fe^{3+} . При действии раствора гидроксида калия,

натрия, аммиака образуется желтое окрашивание, а метиленовой сини — синее; тушь слизь не окрашивает. На этих физических и химических свойствах основаны методы выделения, очистки и анализа слизей. Количественное определение проводят гравиметрическим методом, осаждая слизи из водных растворов, чаще всего спиртом (листья подорожника, трава череды).

Пектиновые вещества — высокомолекулярные гетерополисахариды, главным структурным компонентом которых является α -D-галактуроновая кислота (полигалактуронид). Кроме галактуроновой кислоты в значительно меньших количествах (10—17 %) в составе пектиновых веществ присутствуют также D-галактоза, L-арабиноза, L-рамноза и другие нейтральные моносахариды.



R = H — пектовые кислоты

R = CH_3 — пектиновые кислоты

Соли пектовых и пектиновых кислот называют соответственно — пектаты, пектинаты.

Пектовые кислоты растворяются в воде, пектиновые кислоты, пектаты, пектинаты растворяются в воде в присутствии кислот.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Проведите реакцию на крахмал.

К 0,5—1 мл охлажденного 10 %-водного извлечения из исследуемого сырья прибавляют 2—5 капль реактива Люголя (раствор йода в йодиде калия).

В присутствии крахмала образуется синее окрашивание. Реакции мешают присутствие спирта, щелочи, танина, хлора, азотной кислоты.

При исследовании подземных органов (корней, корневищ и др.) каплю реактива можно нанести непосредственно на излом или соскоб (порошок).

Задание 2. Проведите реакции на инулин (реакция Молиша).

а) На предметное стекло помещают 0,1 г порошка сырья, смачивают 1—2 каплями 20 % спиртового раствора альфа-нафтола, резорцина или тимола, через 1—2 мин добавляют каплю кислоты серной концентрированной; появляется фиолетовое окрашивание от альфа-нафтола, оранжево-красное от резорцина и тимола. О наличии инулина можно судить только при отсутствии крахмала.

б) К 0,5—1 мл 10 % охлажденного водного извлечения добавляют 2—3 капли вышеназванных реактивов и осторожно по стенке пробирки наслаивают 0,5 мл

кислоты серной концентрированной. В присутствии инулина наблюдают соответствующее окрашивание (см. реакцию «а»).

Задание 3. Проведите экстракцию полисахаридов из растительного сырья. 5 г измельченного сырья (2 мм) помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 25 мл воды, кипятят 5 мин, фильтруют. Полученное извлечение используют для качественных реакций.

Задание 4. Проведите качественные реакции на слизь и галактуроновою кислоту (пектиновые вещества).

а) К 3 мл извлечения добавляют 1 мл 5 % раствора щелочи или аммиака. Образуется лимонно-желтое окрашивание (слизь).

б) К 10 мл извлечения прибавляют 30 мл 95 % спирта и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие при стоянии (полисахариды).

Раствор с осадком фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносят в колбу вместимостью 50 мл раствором натрия гидроксида (0,1 моль/л). К 1 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл 0,5 % раствора карбазола и 5 мл кислоты концентрированной серной, перемешивают, нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин; появляется красно-фиолетовое окрашивание (галактуроновая кислота, пектиновые вещества).

Задание 5. Проведите количественное определение полисахаридов в листьях подорожника большого.

Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья (диаметром 2 мм) помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяют еще 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй 100 мл воды. Водные извлечения объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытой водой. Фильтр промывают водой и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95 % спирта, перемешивают, подогревают на водяной бане до 30 °С в течение 5 мин. Через час содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13—16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100—105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносят на фильтр и последовательно промывают 15 мл раствора 95 % спирта в воде (3:1), 10 мл ацетона, 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100—105 °С до постоянной массы.

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

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

где m_1 — масса фильтра в граммах;

m_2 — масса фильтра с осадком в граммах;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Запишите результаты качественных реакций и сделайте заключение о наличии соответствующих групп полисахаридов. По результатам количественного определения сделайте заключение о соответствии анализируемого образца требованиям НД.

ТЕМА 4. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ (СЕРДЕЧНЫХ) ГЛИКОЗИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о кардиотонических гликозидах (КГ), их строение, классификация.

Физические и химические свойства.

Применение в медицине.

Экстракция КГ 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.

Количественное определение: биологические и физико-химические методы анализа. Какой метод является ведущим и почему?

Латинские названия сырья, производящих растений, семейств, химический состав, препараты и применение видов наперстянки, горицвета весеннего, видов ландыша, строфанта, желтушника раскидистого (ж.серого), морского лука.

Формулы: пурпуреагликозиды А и В, дигитоксин, гитоксин, дигиланиды А, В, С, дигоксин, строфантозид, К-строфантин-β, цимарин, конваллотоксин, эризимин, адонитоксин, глюкоцилларен, сцилларен А; глюкоза, рамноза, цимароза, дигитоксоза.

Контрольные вопросы для проверки усвоения материала

1. На каких свойствах кардиотонических гликозидов основаны качественные реакции и методы количественного определения?

2. Какие реакции можно использовать для идентификации 5-членного лактонного кольца, стероидной структуры и углеводного компонента? Химизм этих реакций, специфичность, условия выполнения.

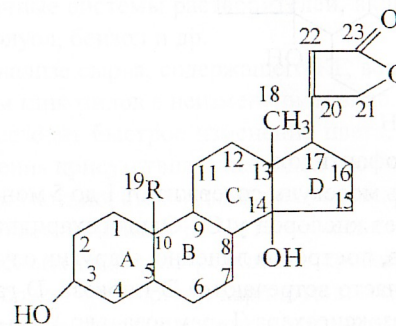
3. Состав реактивов Кедде, Балье, Легалья, Розенгейма, Либермана-Бурхардта.

4. Какие меры принимаются для того, чтобы исключить присутствие сахаров при проведении реакции Балье?

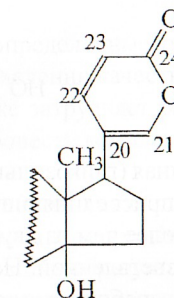
5. Назовите принцип биологической стандартизации кардиотонических гликозидов в растительном сырье. Что такое единица действия, валор?

6. Основные этапы количественного определения КГ физико-химическими методами; на чем они основаны, количественное определение КГ.

Кардиотонические гликозиды (или сердечные гликозиды) — это гетерозиды, агликоны которых являются стероидами, т.е. производными циклопентанпергидрофенантрена, имеющими у 17-го углеродного атома ненасыщенное лактонное кольцо: пятичленное бутенолидное (карденолиды) или шестичленное, так называемое кумалиновое, кольцо (буфадиенолиды).



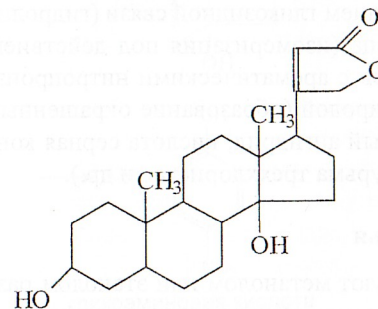
структура карденолида



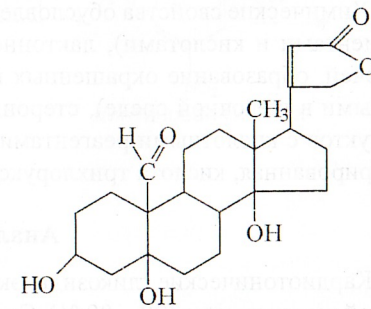
фрагмент формулы буфадиенолида

Все агликоны кардиотонических гликозидов имеют у C_3 и C_{14} гидроксильные группы, а у C_{13} — метильную. При C_{10} может быть β-ориентированная метильная, альдегидная, карбинольная или карбоксильная группа.

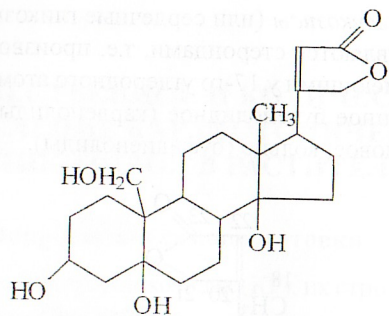
Агликоны КГ могут иметь дополнительные гидроксильные функции у C_1 , C_2 , C_{11} , C_{12} , C_{15} , C_{16} ; OH-группы у C_{16} могут быть ацилированы муравьиной, уксусной, изовалериановой кислотами. Кольца А/В могут иметь как *cis*-, так и *trans*-сочленение. Кольца С/Д в отличие от других известных природных стероидов имеют *cis*-сочленение. Выделены также агликоны, содержащие в стероидной части молекулы двойные С=С-связи, кетогруппы, эпоксидные кольца и др.



дигитоксигенин

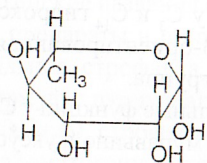


строфантиндин

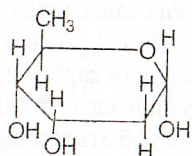


строфантидол

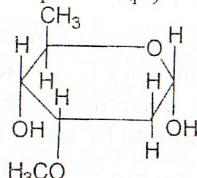
Углеводная (гликозильная) часть молекулы содержит от 1 до 5 моносахаридов, всегда присоединяющихся через кислород у C_3 . Олигосахаридная часть, состоящая более чем из двух сахаров, построена линейно, в других случаях может быть разветвленной. Наиболее часто встречаются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-арабиноза, а также 6-дезоксисахара (L-рамноза и др.), 2,6-дезоксисахара и их 3-O-метилвые эфиры (D-дигитоксоза, D-цимароза и др.).



L-рамноза



D-дигитоксоза



D-цимароза

Кардиотонические гликозиды — бесцветные, оптически активные, кристаллические, реже аморфные вещества, растворимые в этаноле и метаноле, воде, хлороформе и нерастворимые в петролейном и диэтиловом эфире.

Химические свойства обусловлены наличием гликозидной связи (гидролиз ферментами и кислотами), лактонного кольца (изомеризация под действием щелочей, образование окрашенных продуктов с ароматическими нитропроизводными в щелочной среде), стероидной природой (образование окрашенных продуктов с кислотными реагентами: уксусный ангидрид, кислота серная концентрированная, кислота трихлоруксусная, сурьма треххлористая и др.).

Анализ сырья

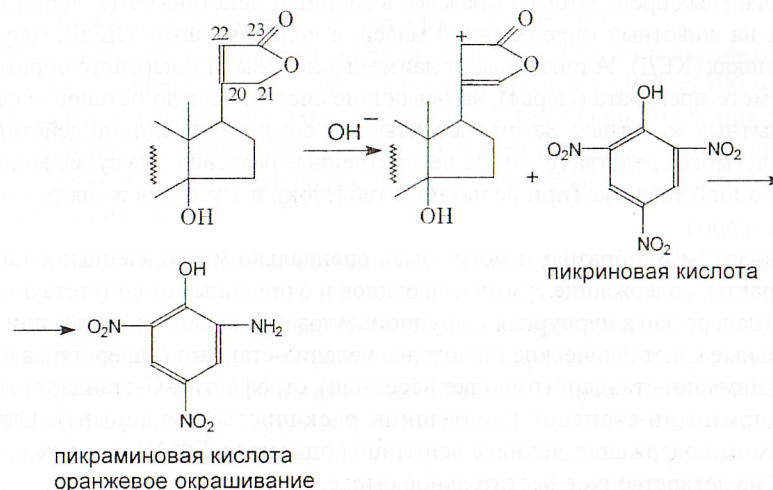
Кардиотонические гликозиды экстрагируют метанолом или этанолом различной концентрации (20—80 %). Сопутствующие вещества (различные фенольные соединения) осаждают раствором ацетата свинца; от свободных сахаров, которые также дают реакцию с ароматическими нитропроизводными, освобождаются, извлекая кардиотонические гликозиды спирто-хлороформной смесью

(1:3). Для отделения гликозидов от сопутствующих веществ широко используют сорбционные методы очистки на алюминия оксиде, силикагеле, целлюлозе. Очищенные гликозиды растворяют в 96 % этаноле, хлороформе.

Гликозиды разделяют методами тонкослойной, колоночной и бумажной (с предварительным пропитыванием бумаги формамидом) хроматографии. Используют различные системы растворителей, включающие хлороформ, метанол, н-бутанол, толуол, бензол и др.

При анализе сырья, содержащего КГ, возникают определенные трудности с выделением гликозидов в неизменном виде. При проведении качественных реакций происходит быстрое изменение цвета, что также затрудняет работу. Для подтверждения присутствия гликозидов необходимо провести комплекс реакций: на лактонное кольцо, стероидный цикл и сахара.

Качественный анализ. На присутствие *бутенолидного* (пятичленного лактонного) кольца проводят реакции с ароматическими нитропроизводными в щелочной среде, с которыми кардиотонические гликозиды образуют окрашенные продукты за счет частичного восстановления нитропроизводных образующимся протоном при изомеризации лактонного кольца под влиянием щелочи определенной концентрации. Проводят реакции: реакция Балье (Бальета, Бальжета) — с пикриновой кислотой (оранжевое окрашивание), реакция Легалья — с нитропруссидом натрия (красное окрашивание), реакция Раймонда — с метадинитробензолом (фиолетово-синее окрашивание) и др. Рассмотрим механизм реакций на примере реакции Балье (Бальета):



На кумалиновое кольцо до сих пор не найдено специфических реактивов.

На *стероидную* часть структуры КГ проводят реакции с кислотными реагентами — образуются сопряженные ненасыщенные системы, имеющие различ-

ные окраски: реакция Либермана-Бурхардта — с уксусным ангидридом и кислотой серной концентрированной (50:1) (розовое-зеленое-синее окрашивание), реакция Розенгейма — с 90 % водным раствором кислоты трихлоруксусной (розовое-лиловое окрашивание), с 20 % раствором сурьмы треххлористой в хлороформе (для проявления хроматограмм).

Среди реакций на углеводную часть более специфическими являются реакции на дезоксисахара: реакция Келлер-Жилиани — с кислотой уксусной ледяной, содержащей следы железа сульфата, и кислотой серной концентрированной (вазильково-синее окрашивание). Реакция положительна, если 2-дезоксисахар занимает крайнее положение в молекуле гликозида или находится в свободном виде.

Для идентификации кардиотонических гликозидов на хроматограммах используют реактивы на бутенолидное кольцо, стероидную структуру.

Для идентификации буфадиенолидов обязательно снятие их УФ-спектров, где они имеют характерную полосу поглощения при 300 нм. Пятичленное лактонное кольцо в этих условиях проявляет интенсивное поглощение при 215—220 нм.

Количественную оценку качества сырья проводят методом *биологической стандартизации* (для всех видов) или с использованием физико-химических методов анализа (для сырья, из которого получают индивидуальные КГ).

Биологическая стандартизация основана на способности кардиотонических гликозидов вызывать в токсических дозах систолическую остановку сердца животных. Активность сердечных средств оценивают в сравнении с активностью стандартных препаратов и выражают в единицах действия (ЕД). Испытания проводят на животных определенной массы и пола: лягушках (ЛЕД), голубях (ГЕД), кошках (КЕД). Устанавливают наименьшие дозы стандартного образца и исследуемого препарата (сырья), вызывающие систолическую остановку сердца подопытных животных. Затем рассчитывают содержание единиц действия в 1 г исследуемого средства (если это лекарственные растения или сухие концентраты), в одной таблетке (при испытании таблеток), в 1 мл (для жидких лекарственных форм).

Стандартными образцами могут быть специально изготовленные спиртовые экстракты, содержащие сумму гликозидов и очищенные от сопутствующих веществ (наперстянка пурпурная и крупноцветковая, ландыш майский) или индивидуальные кристаллические гликозиды: целанид-стандарт (наперстянка шерстистая); пимарин-стандарт (горичвет весенний), строфантин-Г-стандарт (строфанты); эризимин-стандарт (желтушник раскидистый (ж.серый)). Отбор животных, их содержание, техника испытания описаны в ГФ XI, а также в частных ФС на лекарственное растительное сырье.

Физико-химические методы основаны на сочетании хроматографического разделения очищенного экстракта, полученного из сырья, элюировании индивидуальных гликозидов и их количественном определении различными методами

(фотоэлектроколориметрическим, спектрофотометрическим, флуориметрическим и др.). Физико-химические методы не всегда дают результаты, совпадающие с результатами, полученными путем определения биологической активности, так как они не позволяют определить молекулу гликозида в целом, а обычно какую-то ее часть (лактонное кольцо, стероидную структуру, углеводный компонент); не учитывают характер сочленения колец, ориентацию функциональных групп, характер углеводного компонента и т.д., от которых зависит сила и скорость кардиотонического действия.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Проведите 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, сапонины, алкалоиды и др.). Образовавшийся осадок нагревают на водяной бане до полной коагуляции, 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 дважды обрабатывают в течение 2—3 минут 20 мл спирто-хлороформной смеси в соотношении 1 : 3 (свободные сахара остаются в водном растворе).

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

Задание 2. Проведите качественные реакции на кардиотонические гликозиды.

а) Реакции на 5-членное лактонное (бутенолидное) кольцо:

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 Легаля. 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.

б) Реакции на стероидную структуру

Реакция Либермана-Бурхардта. 1 мл спиртового раствора выпаривают на водяной бане в фарфоровой чашке, сухой остаток растворяют в смеси уксусного ангидрида и концентрированной кислоты серной (50 : 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 % кислоты трихлоруксусной. В присутствии кардиотонических гликозидов, содержащих дневную группу или способны ее образовывать под действием кислоты трихлоруксусной, появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в синее.

в) Реакции на углеводный компонент

Реакция Келлера-Киллиани (на 2-дезоксисахара): 1 мл спиртового извлечения выпаривают на водяной бане в выпарительной чашке, сухой остаток растворяют в 20 каплях раствора А и осторожно, по стенке чашки прибавляют 1 каплю реактива Б. В присутствии кардиотонических гликозидов, содержащих 2-дезоксисахара, появляется синее окрашивание, переходящее в сине-зеленое*.

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

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

Запишите результаты реакций, укажите, на каких свойствах они основаны. 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.

*К-строфантин-β и строфантозид (ди- и тригликозиды) не дают этой реакции. Для подобных случаев проводят гидролиз гликозида кислотой трихлоруксусной, а свободный 2-дезоксисахар обнаруживают по голубому окрашиванию после реакции с п-нитрофенилгидразином в щелочной среде

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 ксантгидрольным реактивом;
- определение оптической плотности на спектрофотометре или фотоэлектродетекторе.

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 °С под вакуумом (до вспенивания раствора). Содержимое колбы количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл и обрабатывают четыреххлористым углеродом 6 раз по 40 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-метилловый 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 °С. Сухой остаток растворяют в 3 мл смеси хлороформ-метилловый спирт (1 : 1) и полученный раствор хроматографируют.

Лист хроматографической бумаги марки «С» размером 16×50 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 (РСО) 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), насыщенную формамидом. Хроматографирование проводят при температуре 20—25 °С 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 °С 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 °С 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 Rf около 0,79 и желто-зеленую флюоресценцию; дигиланид В — Rf около 0,55 и голубовато-зеленую флюоресценцию; дигиланид С — Rf около 0,39 и голубую флюоресценцию.

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 в отдельные пробирки 2×20 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 °С 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:

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

где C — масса целанида в 1 мл фотометрируемого раствора, найденная по калибровочному графику, мкг;

m — масса сырья, г;

w — потеря в массе при высушивании сырья, %.

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 °С в темном месте.

3. Приготовление 25 % раствора кислоты трихлоруксусной с хлораминном. 25,0 г кислоты трихлоруксусной 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.

ТЕМА 5. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САПОНИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о сапонинах, строение, классификация, физико-химические свойства.

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, почечного чая, диоскореи nipпонской, якорцев стелющихся, видов юкки, агавы.

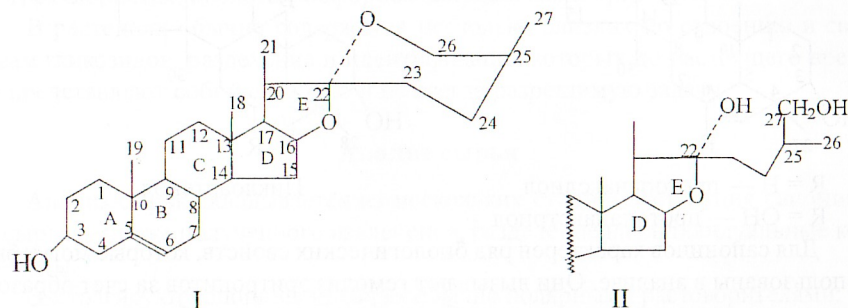
Формулы диосгенина, глицирризиновой кислоты, протопанаксдиола, протопанакстриола, панаксозида А, урсоловой и олеаноловой кислот, α - и β -амирина, дазиантогенина.

Контрольные вопросы для проверки усвоения материала

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?
5. На каких химических свойствах сапонинов основаны качественные реакции?
6. Хроматография сапонинов: системы растворителей, детектирование сапонинов на хроматограммах.
7. По каким качественным реакциям можно достоверно судить о наличии сапонинов в растительном сырье?

Сапонины, сапонизиды — гликозиды (гетерозиды), производные стероидов и тритерпеноидов, обладающие гемолитической и поверхностной активностью и токсичностью для холоднокровных животных. В зависимости от химического строения агликона (сапогенина) их классифицируют на стероидные и тритерпеновые.

Стероидные сапонины относят к C_{27} стеролам, производным циклопентанпергидрофенантрена; боковая цепочка из подверглась метаболическим изменениям с образованием спирокетальной системы спиростванолового (I) и фурастонолового (II) типов.



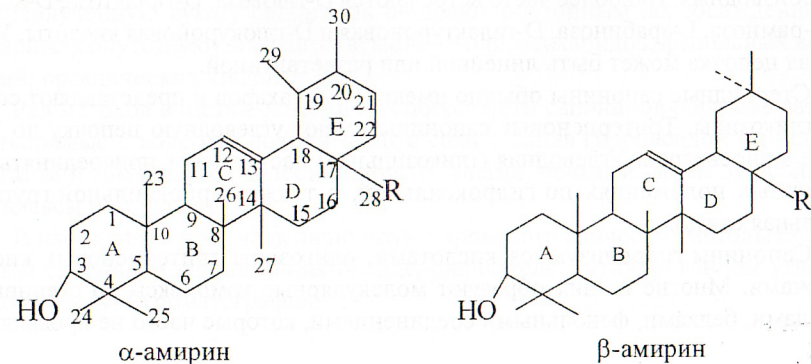
Агликоны их всегда имеют OH-группу у C_3 и иногда в положениях C_1 , C_2 , C_5 и C_{12} . У многих стероидных сапонинов в положении 5-6 имеется двойная связь.

Тритерпеновые сапонины с общей формулой $(C_5H_8)_6$ делят на пентациклические и тетрациклические.

Пентациклические агликоны можно разделить на 4 группы: производные урсана (α -амирин), олеанана (β -амирин), лупана (лупеол), гопана.

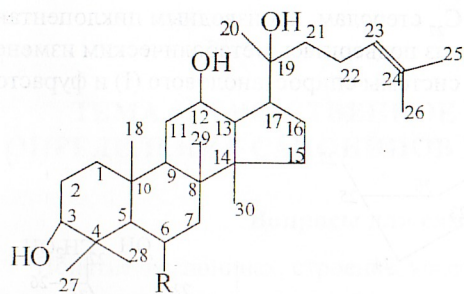
Тетрациклические агликоны можно подразделить на производные даммарана (протопанаксдиол и протопанакстриол), циклоартана (циклоартенол), зуфана.

Сапогенины тритерпеновых сапонинов могут иметь гидроксильные группы в положениях C_3 , C_{16} , C_{21} , C_{22} , C_{24} ; карбоксильные — C_{28} , C_{29} ; карбонильные — C_3 , C_{11} , а также альдегидные, лактонные, эфирные. Двойная связь чаще встречается в положении 12—13. Тритерпеновые сапонины могут быть нейтральными и кислотными. Кислотные свойства обусловлены наличием карбоксильных групп сапогенина и углеводной части молекулы. Гидроксильные группы могут быть ацилированы уксусной, тиглиновой, пропионовой, ангеликовой и другими кислотами.



α -амирин
R = COOH — урсоловая кислота

β -амирин
R = COOH — олеаноловая кислота



R = H — протопанаксдиол
R = OH — протопанакстриол

Для сапонинов характерен ряд биологических свойств, которые могут быть использованы в анализе. Они вызывают гемолиз эритроцитов за счет образования комплексов с холестерином мембран, вследствие чего оболочка эритроцита из полупроницаемой становится проницаемой и гемоглобин выходит в плазму крови, окрашивая ее в красный цвет («лаковая» кровь); нарушают функционирование жабр холоднокровных животных и ядовиты для них.

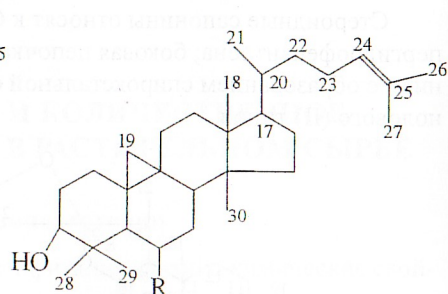
Сапонины — бесцветные, желтоватые кристаллические или аморфные гигроскопические вещества с высокой температурой плавления (с разложением). Водные растворы их при встряхивании образуют обильную устойчивую пену, вследствие способности понижать поверхностное натяжение. Растворимость в гидрофильных растворителях (вода, метанол и этанол различной концентрации) увеличивается с возрастанием количества моносахаридов в гликозильной части молекулы сапониона. Нерастворимы в бензоле, хлороформе, диэтиловом эфире. Оптически активны.

Отдельные сапонины могут не обладать совокупностью перечисленных выше свойств.

Углеводная часть сапонинов может содержать от 1 до 11 моносахаридов и их производных. Наиболее часто встречаются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабиноза, D-галактуроновая и D-глюкуроновая кислоты. Углеводная цепочка может быть линейной или разветвленной.

Стероидные сапонины обычно имеют 1—5 сахаров и представляют собой 3-O-гликозиды. Тriterпеновые сапонины имеют углеводную цепочку до 10 и более моносахаров. Углеводная (гликозильная) часть может присоединяться в различных положениях по гидроксильной, а также карбоксильной группам (ацильная связь).

Сапонины гидролизуются кислотами, олигозиды тритерпеновых кислот щелочами. Многие из них образуют молекулярные комплексы со стеринами, липидами, белками, фенольными соединениями, которые часто не проявляют



Циклоартенол

гемолитических свойств и могут быть разрушены неполярными растворителями: хлороформом и др.

Тритерпеновые сапонины (кислые) образуют комплексы с солями Pb, Cu, гидроксидами Ba, Mg; образуют окрашенные продукты (полиены) с кислотными реагентами (концентрированная кислота серная, уксусный ангидрид, сурьма треххлористая, кислота фосфорномолибденовая и др.).

В растениях обычно содержится несколько близких по строению и свойствам гликозидов, разделение и идентификация которых до настоящего времени представляют собой сложную и не всегда разрешимую задачу.

Анализ сырья

Анализ сырья складывается из нескольких стадий: экстракция сапонинов из сырья, очистка полученного извлечения, разделение на индивидуальные компоненты.

Экстрагируют сапонины из сырья обычно полярными растворителями: метанолом и этанолом различной концентрации, водой, 0,9 % раствором натрия хлорида. Иногда сырье перед экстракцией обрабатывают хлороформом, петroleйным эфиром, четыреххлористым углеродом, диэтиловым эфиром для разрушения нерастворимых в полярных растворителях комплексов сапонинов со стеринами, белками, фенольными соединениями.

Очистку полученных извлечений проводят различными способами, что зависит от структуры сапонинов. Полярные сапонины плохо растворимы в этиловом и метиловом спиртах, выпадают в осадок при охлаждении, длительном стоянии спиртового экстракта или при добавлении этанола. Гликозиды с небольшой углеводной цепочкой обычно плохо растворимы в воде и выпадают в осадок при разбавлении спиртовых экстрактов водой. Кислые тритерпеновые сапонины растворимы в водных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении. Кроме того, из спиртовых растворов тритерпеновые сапонины можно осажать диэтиловым эфиром, ацетоном, этилацетатом, иногда бутиловым и изоамиловым спиртами.

Полученную сумму сапонинов очищают повторным переосаждением от полярных сопутствующих веществ: моно- и олигосахаридов, фенольных соединений, органических кислот и др.

Ряд методов очистки основан на способности сапонинов образовывать нерастворимые в воде или водном спирте соли с бария гидроксидом или свинца ацетатом и комплексы с холестерином, танидами, белками. Затем эти соли или комплексы разрушают.

В настоящее время чаще используют хроматографические методы очистки суммы сапонинов на алюминия оксиде, силикагеле, активированном угле или ионообменной хроматографии.

Для хроматографического разделения применяют различные системы растворителей: н-бутанол, кислоту уксусную, хлороформ, метанол, водный аммиак, н-пропиловый спирт и др. в различных соотношениях.

После предварительного хроматографического разделения сапонины идентифицируют, обрабатывая хроматограммы кислотными реагентами (20 % раствор кислоты серной, п-диметиламинобензальдегид в 4 М кислоте хлористоводородной, 25 % раствор кислоты фосфорномолибденовой, растворы сурьмы трех- и пятихлористой и др.) с последующим нагреванием при различной температуре. Сапонины образуют с этими реагентами ненасыщенные сопряженные соединения (полиены), окрашенные от розового до красно-фиолетового цвета в зависимости от характера реагента и структуры сапониона.

Для установления структуры сапонинов широко используют УФ-, ИК-, ПМР и масс-спектроскопию. Например, стероидные сапонины имеют характерные полосы поглощения при длинах волн 852, 900, 922, 987 см^{-1} (ИК-спектроскопия).

Для обнаружения сапонинов в растительном сырье используют реакции, которые можно разделить на три группы: реакции, основанные на физических свойствах сапонинов (реакция пенообразования); реакции, основанные на биологических свойствах (гемолиз); реакции, основанные на химических свойствах сапонинов.

Для проведения качественных реакций готовят водный настой (реакция пенообразования) или настой на изотоническом растворе натрия хлорида (реакция гемолиза) 1 : 10, при нагревании на водяной бане.

На биологических свойствах сапонинов основана реакция гемолиза с 2 % взвесью эритроцитов в изотоническом растворе. Кровь становится прозрачной, ярко-красной. Но нужно иметь в виду, что не все сапонины образуют стойкую пену, вызывают гемолиз крови. Эти же свойства могут проявлять некоторые эфирные масла, спирты, кислоты.

Из химических реакций можно использовать реакцию с 1 % раствором холестерина (осадок), реакцию Лафона с кислотой серной концентрированной, содержащей следы 10 % железа сернокислого (сине-зеленое окрашивание), с 10 % раствором натрия нитрата и кислотой концентрированной серной (крово-красное окрашивание), реакцию Либермана-Бурхарда с уксусным ангидридом и кислотой концентрированной серной (быстро переходящая окраска от розовой до зеленой и синей). Эта реакция более специфична для стероидных сапонинов.

Для отличия стероидных и тритерпеновых сапонинов можно использовать реакцию с ацетатом свинца. Тритерпеновые сапонины дают осадки со средним ацетатом свинца, стероидные — с основным.

Стероидные сапонины от тритерпеновых можно отличить по реакции Санье: с 1 % раствором сурьмы треххлористой, кислотой концентрированной серной, содержащей уксусный ангидрид образуется желтое окрашивание.

Можно также использовать реакцию: берут две пробирки с водным извлечением, в одну добавляют 5 мл 0,1 моль/л HCl, в другую — 5 мл 0,1 моль/л NaOH и сильно встряхивают. Если образуется стойкая пена в обеих пробирках или в пробирке с кислотой — это говорит о кислых тритерпеновых сапонионах. Стероидные сапонины дают обильную, стойкую пену в щелочной среде.

Единого метода *количественного определения* сапонинов в сырье нет. Используемые гравиметрические методы, основанные на образовании комплексов с бария гидроксидом, солями меди, свинца, холестерина, а также осаждении малополярными растворителями, дают завышенные результаты и малоспецифичны.

В настоящее время чаще используют физико-химические методы. Они позволяют определить как сумму сапонинов, так и отдельные компоненты после хроматографического разделения суммы сапонинов. Для этой цели используют чаще спектрофотометрические методы (каштан конский, женьшень, диоскорея японская). Параллельно строится калибровочный график по ГСО (эсцин) или кобальта хлориду, окраска которого в различных концентрациях соответствует определенному содержанию сапонинов (диоскорея японская, якорцы стелющиеся и др.).

Суммарная фракция сапонинов, производных *тритерпеновых* кислот, может быть определена *титриметрическими* методами. Используются методы *потенциометрического* титрования (корни аралии маньчжурской), титрования в *неводных средах*, формольное титрование (кислота глицирризиновая и др.). Диосгенин в корневищах с корнями диоскореи дельтовидной определяют методом *газовой* хроматографии.

Ранее для количественной оценки сырья использовали определение гемолитического индекса и пенного числа.

Гемолитический индекс — наименьшая концентрация извлечения из 1 г сырья или раствора чистого сапониона, которая вызывает гемолиз эритроцитов, содержащихся в 1 мл 1 % раствора дефибринированной крови барана. Извлечение готовится на изотоническом растворе. Для определения можно использовать кровь других животных. Для расчета поправочного коэффициента параллельно определяют гемолитический индекс со стандартным раствором сапониона (0,02 % раствор дигитонина).

Пенное число — наименьшая концентрация извлечения из 1 г сырья, при встряхивании которого в течение 15 с образуется пена высотой 1 см, устойчивая в течение 15 мин.

Эти методы дают результаты, которые нельзя сравнивать, так как пенообразующие и гемолитические свойства не коррелируют друг с другом. Они не дают представления о процентном содержании сапонинов в сырье.

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 кислоты хлористоводородной (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.

Сделайте вывод о характере сапонинов в анализируемом сырье.

Задание 3. Получите спиртовое извлечение из растительного сырья и проведите качественные реакции.

1 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл 90 % спирта, настаивают при медленном кипении на водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, фильтруют через складчатый фильтр и проводят качественные реакции в фарфоровых чашках после упаривания 0,5 мл извлечения на водяной бане.

— *Реакция Либермана-Бурхарда.* Сухой остаток в выпарительной чашке смачивают 5 каплями уксусного ангидрида и по стенке спускают 1 каплю кислоты серной концентрированной. В присутствии сапонинов образуется розовое окрашивание, переходящее в зеленое и синее.

— *Реакция Лафона.* К 2 мл извлечения прибавляют 1 каплю 10 % раствора меди сернокислой и 1 мл кислоты серной концентрированной и нагревают. В присутствии сапонинов появляется сине-зеленое окрашивание (при нагревании).

— К сухому остатку прибавляют 5 капель 10 % раствора натрия нитрата и 1 каплю кислоты серной концентрированной. В присутствии сапонинов появляется красное окрашивание.

Запишите результаты реакций и сделайте вывод о присутствии сапонинов и их характере.

Задание 4. Проведите хроматографическое разделение сапонинов в тонком слое на пластинках «Силуфол» («Сорбфил»).

5—6 капель спиртового извлечения, оставшегося после проведения качественных реакций, последовательно наносят на стартовую линию пластинки.

Хроматографируют в системе н-бутанол-этанол-25 % аммиак (7:2:5). После окончания хроматографирования пластинку вынимают из камеры, отмечают карандашом линию фронта растворителя, высушивают под тягой и проявляют 20 % спиртовым раствором кислоты фосфорновольфрамовой, высушивают на воздухе под тягой. Затем хроматограмму помещают в сушильный шкаф на несколько минут при температуре 105 °С. Сапонины проявляются в виде розово-фиолетовых пятен.

Запишите результаты исследования, сделайте вывод о наличии сапонинов; приведите значения R_f. Зарисуйте хроматограмму.

Задание 5. Определите количественное содержание сапонинов одним из методов:

Метод 1. Количественное определение сапонинов в семенах каштана конского (ТУ 4-4-75-87).

Спектрофотометрический метод основан на способности сапонинов образовывать окрашенные продукты с кислотными реагентами (кислота ледяная уксусная, серная концентрированная и кобальта хлорид). Оптическую плотность определяют при длине волны 381 нм.

2 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц 2 мм помещают в патрон из фильтровальной 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 кислоты хлористоводородной (1 моль/л) и извлекают смесью н-пропиловый спирт-хлороформ (20:50) 2 раза по 70 мл в течение 5 мин. 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 кислоте ледяной уксусной и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора кислотой ледяной уксусной до метки (раствор А). 0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем раствора кислотой ледяной уксусной до метки (раствор Б). В пробирку помещают 2 мл раствора Б, 2 мл раствора кобальта двуххлористого, 2 мл кислоты концентрированной серной, 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 кислоты ледяной уксусной, 2 мл раствора кобальта двуххлористого и 2 мл кислоты серной концентрированной, 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 НД.

Построение калибровочного графика. 0,05 г предварительно высушенного эсцина (ВФС 42-368-74) взвешивают с погрешностью 0,0002 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50–70 мл кислоты ледяной уксусной, 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; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 мл раствора эсцина и доводят объем растворов кислотой ледяной уксусной до метки. В пробирки помещают по 2 мл полученного раствора, 2 мл раствора кобальта двуххлористого, 2 мл кислоты концентрированной серной 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.

Метод 2. Количественное определение сапонинов в корневищах с корнями диоскореи ниппонской (ФС 42-1521-80).

Спектрофотометрический метод основан на способности сапонинов образовывать окрашенные продукты при взаимодействии с *p*-диметиламино-бензальдегидом в спиртовом растворе кислоты хлористоводородной (4 моль/л). Оптическую плотность определяют при длине волны 518 нм.

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 остеклованный 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 пипет-

кой 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 *p*-диметиламино-бензальдегида в спиртовом растворе кислоты хлористоводородной (4 моль/л). Пробирку закрывают стеклянной пробкой, резиновым колпачком, встряхивают для перемешивания жидкости и нагревают в течение 2 часов в ультратермостате при температуре $58 \pm 0,5$ °С. Раствор охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл спиртового раствора кислоты хлористоводородной (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:

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

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;

w — 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 НД.

Построение калибровочного графика. 5 г кобальта хлорида помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют дистиллированную воду, 1 каплю кислоты концентрированной хлористоводородной и объем раствора доводят дистиллированной водой до метки. В мерные колбы на 25 мл отмеривают из бюретки 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15 мл исходного раствора и объем доводят до метки водой. Полученные растворы содержат соответственно 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 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.

ТЕМА 6. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛОГЛИКОЗИДОВ 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.

Формулы ди- и триоксифенолов, арбутина, салидрозид (родиолозида).

Контрольные вопросы для усвоения материала

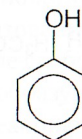
1. На каких свойствах арбутина основано его количественное определение?
2. С какой целью прибавляется порошок цинка при количественном определении арбутина?
3. Для чего добавляется к извлечению раствор свинца ацетата основного?
4. Как проводится гидролиз арбутина?
5. Зачем после нейтрализации жидкости добавляют еще 2 г натрия гидрокарбоната?
6. Качественные реакции на арбутин.
7. Классификация фенольных соединений.
8. Химические свойства фенольных соединений.
9. Качественное обнаружение салидрозид.
10. Количественное определение салидрозид.

В соответствии с классификацией фенольных соединений к фенологликозидам (простым фенольным гликозидам) относят соединения со структурой углеродного скелета C_6 , $C_6 - C_1$, $C_6 - C_2$.

Фенологликозиды — группа гликозидов, имеющих в качестве агликона ароматическое бензольное кольцо, содержащее одну или несколько гидроксигрупп, также в качестве радикалов могут быть оксиметильная, оксиэтильная, карбоксильная группы. Их классифицируют на следующие группы:

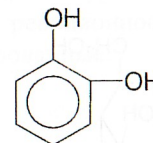
1. Соединения C_6 -ряда:

монооксипроизводные

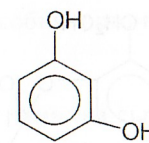


фенол

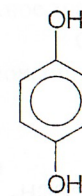
диоксипроизводные



пирокатехин

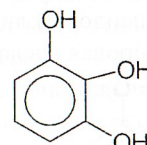


резорцин

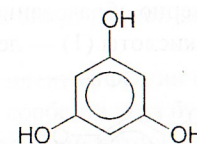


гидрохинон

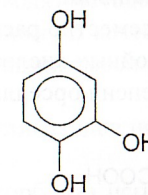
триоксипроизводные



пирогаллол



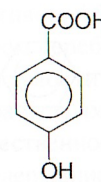
флороглуцин



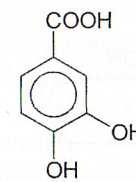
гидроксигидрохинон

2. Соединения со структурой $C_6 - C_1$ -ряда (оксibenзойные кислоты и их производные):

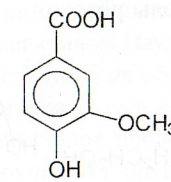
Среди бензойных кислот почти повсеместное распространение имеют п-оксибензойная (1), протокатеховая (2), ванилиновая (3) кислоты.



1

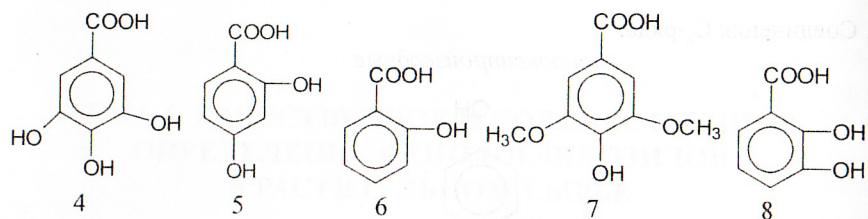


2

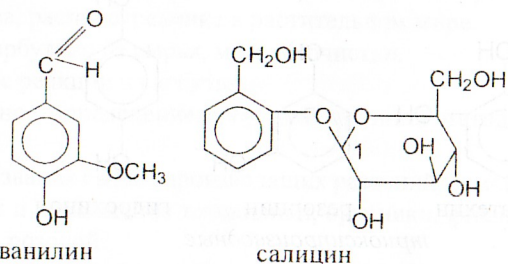


3

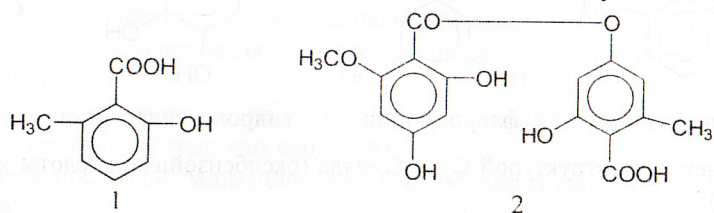
Довольно часто встречаются галловая (4) и гентизиновая (5) кислоты. Значительно реже — салициловая (6), сиреневая (7), о-пирокатеховая (8) кислоты.



Альдегиды и спирты $C_6 - C_1$ -ряда встречаются в высших растениях сравнительно редко. Наиболее известен альдегид — ванилин, а также гликозиды оксibenзойных кислот.

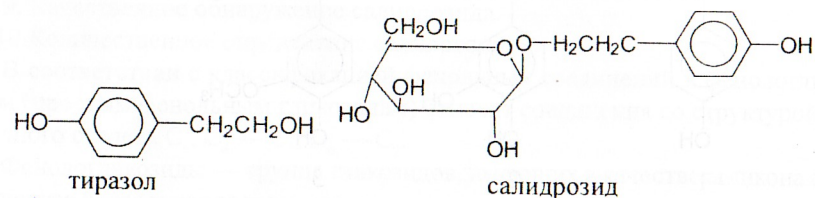


Салицин повсеместно распространен в растениях семейства Salicaceae. Для оксibenзойных кислот характерно образование депсидов. В лишайниках встречается депсид орселлиновой кислоты (1) — леканоровая кислота (2).



3. Соединения $C_6 - C_2$ -ряда.

Сюда относится спирт тиразол, который в виде гликозида содержится в подземных органах родиолы розовой.



Физические свойства. Фенологликозиды — кристаллические вещества, растворимые в воде, этаноле, ацетоне, нерастворимы в этиловом эфире и хлороформе. Агликоны наоборот лучше растворимы в эфире и хлороформе. Обладают

оптической активностью. Флуоресцируют в УФ-свете. Имеют четкую температуру плавления.

Химические свойства. Фенологликозиды подвергаются кислотному и ферментативному гидролизу с образованием агликона и углевода.

Фенологликозиды, имеющие свободную гидроксигруппу, дают все реакции, характерные для фенолов. Они образуют характерные окраски с железоаммониевыми квасцами, вступают в реакцию азосочетания. В случае, если гидроксил гликозилирован, реакции проводят после гидролиза гликозида.

Гидроксирование бензольного кольца увеличивает реакционную способность и придает ему характерные свойства. Важное значение имеет число и расположение гидроксигрупп.

Наиболее реакционноспособны орто-гидроксипроизводные, менее — метагидроксированные.

Анализ сырья

Из растительного сырья фенольные соединения извлекают водой, этиловым и метиловым спиртами (95 %, 70 %, 40 %).

Выделение индивидуальных соединений проводят методом адсорбционной хроматографии на полиамиде, силикагеле, целлюлозе. В качестве элюантов используют воду, этиловый спирт разной концентрации, смеси органических растворителей.

Для обнаружения и идентификации фенологликозидов используют хроматографию в тонком слое сорбента и на бумаге.

При хроматографировании в тонком слое сорбента используют системы растворителей: хлороформ-метанол (8:2), *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5). При хроматографировании на бумаге применяют 10, 15 % кислоту уксусную.

Фенольные соединения, которые имеют свободную гидроксигруппу дают все реакции, характерные для фенолов: с солями Fe^{+3} , реакцию азосочетания.

Тонкослойные хроматограммы можно обработать, кроме перечисленных выше реактивов, 4 % раствором кислоты серной в абсолютном этиловом спирте, раствором серебра нитрата и щелочью, реактивом Паули.

В зависимости от реактива фенольные соединения обнаруживаются в виде желтых, оранжевых, голубых, красных, коричневых пятен.

Количественное определение фенологликозидов проводят различными методами. Содержание арбутина в листьях толокнянки и брусники по гФ-Х1 определяют йодометрическим методом, основанном на окислении йодом гидрохинона, полученного после извлечения и гидролиза арбутина. Содержание салидрозидов в подземных органах родиолы розовой определяют спектрофотометрическим методом. Полученное водное извлечение очищают от сопутствующих веществ раствором свинца ацетата. Затем к фильтрату добавляют диазотированный сульфат

фанил, раствор натрия карбоната и определяют оптическую плотность раствора при длине волны 486 нм.

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 красновато-фиолетовое, затем темно-фиолетовое окрашивание и, наконец, темно-фиолетовый осадок (арбутин).

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

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

Задание 2. Определите количественное содержание *арбутина* (ГФ Х1, вып. 2, с. 276).

Метод количественного определения арбутина основан на гидролизе арбутина с образованием гидрохинона, который количественно определяется йодом в щелочной среде, которая создается натрия 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. Остаток на фильтре промывают дважды горячей водой (по 10 мл). Ко всему фильтрату прибавляют 3 мл свинца ацетата 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 кислоты концентрированной серной, колбу взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ 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 кислоты серной. Затем жидкость нейтрализуют по лакмусу натрия гидрокарбонатом (около 1—1,5 г), 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 воды очищенной 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, %.

Задание 3. Качественная реакция на *салидрозид*.

В колбу вместимостью 20 мл помещают 1 г измельченного сырья (см. раздел «Количественное определение»), прибавляют 10 мл метилового спирта и нагревают на водяной бане при температуре 65 °С в течение 20 мин с обратным холодильником. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр. На линию старта пластинки «Силуфол УФ-254» микропипеткой наносят 0,002 мл полученного фильтрата. Пластинку с нанесенной пробой помещают в камеру, которую предварительно насыщают не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ-метилловый спирт-вода (26 : 14 : 3) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 13 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме должно обнаруживаться доминирующее пятно фиолетового цвета с Rf около 0,4 (розавин); допускается наличие других пятен. Хроматограмму опрыскивают 10 % раствором натрия карбоната, помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 2 мин, затем опрыскивают диазотированным сульфацилом и нагревают при температуре 110 °С в течение 2 мин. На хроматограмме должно проявиться пятно красноватого цвета с Rf около 0,42 (салидрозид); допускается наличие других пятен.

Примечание. Подготовка пластинок: пластинки «Сигуфол УФ-254» 15×15 см разрезают поперек линий накатки на 3 части размером 15×5 см и перед нанесением извлечения высушивают в сушильном шкафу при 110° С в течение 1 часа.

Количественное определение. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин.

Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. Экстракцию повторяют еще 3 раза по 10 мл воды, нагревая каждый раз в течение 10 мин и фильтруя в ту же мерную колбу.

К охлажденному фильтрату прибавляют 6 мл 10 % раствора свинца ацетата, 2 мл насыщенного раствора натрия сульфата, тщательно перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через бумажный фильтр. Первые 15 мл фильтрата отбрасывают.

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 5 мл полученного фильтрата, прибавляют 2,5 мл 2 % раствора натрия карбоната, 2,5 мл диазотированного сульфанила, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и через 5 мин измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 486 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

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

$$X = \frac{D \cdot 250 \cdot 100}{253 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D — оптическая плотность анализируемого раствора;

253 — удельный показатель поглощения ($E_{1\%}^{1\text{см}}$) салидрозидов;

m — масса сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Примечание

1. Приготовление диазотированного сульфанила. 7 г сульфанил-натрия растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют 9 мл кислоты концентрированной хлористоводородной и доводят объем раствора водой до метки; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, ставят на лед, прибавляют 50 мл воды, 0,2 мл 10 % раствора натрия нитрита, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. Раствор применяют свежеприготовленным.

2. Приготовление насыщенного раствора натрия сульфата: 60 г натрия сульфата заливают 100 мл воды и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч.

ТЕМА 7: 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, псорален костянковой, пастернака посевного, вздутоплодника сибирского, виснаги морковевидной (амми зубной), инжира.

Формулы кумарина, псоралена, ангелицина, бергаптена, ксантотоксина, лигидросамидина, виснадина, келлина (фуранохромона).

Контрольные вопросы для усвоения материала

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?

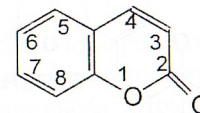
3. Как провести реакцию азосочетания и является ли она специфической для кумаринов?

4. Почему нельзя использовать для извлечения кумаринов воду?

5. Назовите основные этапы и методы количественного определения кумаринов. Укажите, на каких свойствах кумаринов они основаны.

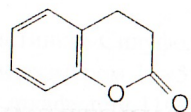
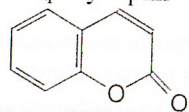
6. Какую флуоресценцию обнаруживают кумарины в УФ-свете?

Кумарины — природные органические вещества, производные 9,10-бензо- α -пирона.

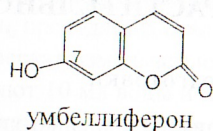


По классификации Шпета природные кумарины по химическому строению делят на следующие группы.

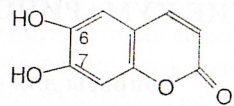
1. Кумарин, дигидрокумарин



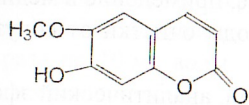
2. Окси-, метокси-, метилendioксикумарины



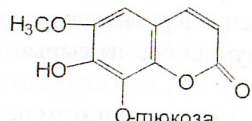
умбеллиферон



эскулетин

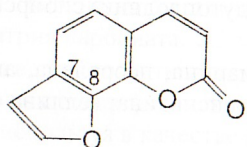
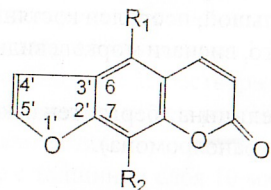


скополетин



фраксин

3. Фурокумарины (кумарон- α -пироны), содержащие ядро фурана, сконденсированное с кумарином в положении 6,7; 7,8.



псорален (фуру 2',3':7,6-кумарин)

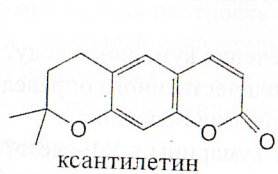
R_1 — OCH_3 , R_2 — H — бергаптен

R_1 — H , R_2 — OCH_3 — ксантотоксин

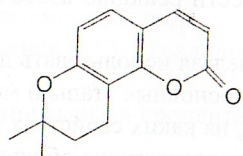
$R_1 = R_2$ — OCH_3 — изопимпинеллин

изопсорален (фуру 2',3':7,8-кумарин)

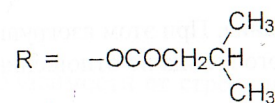
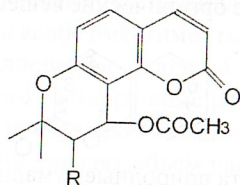
4. Пиранокумарины, содержащие ядро 2,2-диметилпирана, сконденсированное с кумарином в положении 5,6; 6,7 или 7,8.



ксантилетин

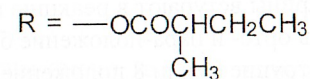


сезелин

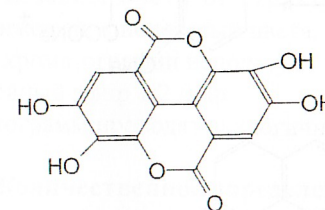


дигидросамидин

5. 3,4-бензокумарины

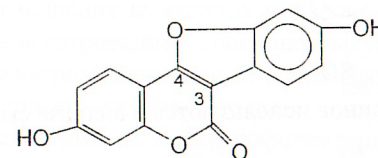


виснадин



эллаговая кислота

6. Кумэстаны — содержат систему бензофурана, сконденсированную с кумарином в положении 3,4.

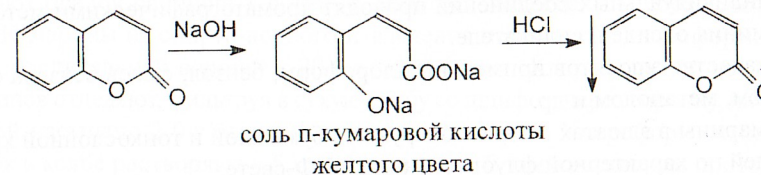


кумэстрол

Физические свойства. Кумарины — твердые, кристаллические вещества бесцветные или желтоватые. Оксикумарины, метоксикумарины и их гликозиды хорошо растворимы в этаноле, метаноле, воде. Кумарины остальных групп растворяются в органических растворителях (ацетоне, хлороформе, спирте) и практически нерастворимы в воде. Хорошо растворимы в жирах и жирных маслах. Обладают способностью возгоняться при нагревании до 100 °С.

В УФ-свете флуоресцируют ярко-голубым, синим, голубовато-зеленым светом, под действием паров аммиака флуоресценция усиливается.

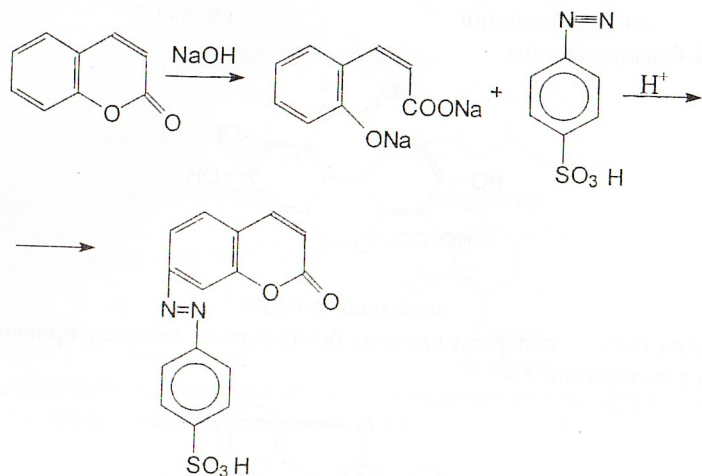
Химические свойства обусловлены наличием бензольного ядра и лактонного кольца. При нагревании со щелочью лактонное кольцо раскрывается и образуется соль коричной кислоты желтого цвета.



соль *p*-кумаровой кислоты
желтого цвета

При подкислении кольцо снова закрывается и образовавшийся кумарин выпадает в осадок.

Кумарины вступают в реакцию азосочетания. При этом азогруппа присоединяется в орто- и пара-положение бензольного кольца по отношению к гидроксильной группе (6 или 8 положение).



Эти свойства кумаринов используются в анализе сырья.

Анализ сырья

Выделение кумаринов из сырья производят различными растворителями: этанолом, метанолом, хлороформом и петролейным эфиром или диэтиловым эфиром.

Целесообразнее извлекать сумму кумаринов из сырья, предварительно обработанного хлороформом или петролейным эфиром.

Ранее для удаления сопутствующих веществ (фенольных соединений и др.) сконцентрированный экстракт обрабатывали 0,5 % водным раствором КОН; после чего кумарины с помощью 5 % водно-спиртового раствора КОН переводили в соли кумариновых кислот. Щелочной раствор подкисляли и образовавшиеся кумарины извлекали диэтиловым эфиром.

В настоящее время очистку кумаринов от сопутствующих веществ и выделение индивидуальных соединений проводят хроматографическими методами на алюминия оксиде и силикагеле.

В качестве элюентов применяют хлороформ, бензол, смесь бензола с этилацетатом, метанолом и др.

Кумарины в элюатах можно обнаружить бумажной и тонкослойной хроматографией по характерной флуоресценции в УФ-свете.

Хроматографирование проводят в системах петролейный эфир-бензол-метанол (5:4:1) на импрегнированной этиленгликолем, пропиленгликолем и др. бумаге.

В зависимости от строения кумарины имеют голубую, синюю, фиолетовую, зеленую, желтую флуоресценцию. После обработки щелочью флуоресценция усиливается. Иногда хроматограммы обрабатывают раствором диазотированного сульфамида. В зависимости от структуры они окрашиваются в оранжевый, красно-оранжевый, фиолетовый цвета.

При тонкослойной хроматографии используют системы этилацетат-бензол 1:2, хлороформ-петролейный эфир 1:2 и др.

Проявление хроматограмм проводят аналогично.

Количественное определение

Количественное определение можно проводить разными методами. При количественном определении кумаринов используется способность лактонного кольца к обратимому размыканию и замыканию в зависимости от pH среды.

Специфическое отношение кумаринов к щелочи лежит в основе метода нейтрализации (обратное титрование). Способность кумаринов давать устойчивое окрашивание с диазотированными сульфопроизводными в щелочной среде используется в колориметрических методах.

В настоящее время применяют спектрофотометрические методы. Можно использовать флуориметрический и полярографический методы. Фотоэлектроколориметрическим, спектрофотометрическим и др. методам часто предшествует хроматографическое разделение кумаринов на бумаге и в тонком слое сорбента.

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 5 мл 10 % раствора свинца ацетата. 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 и добавляют 10 мл воды. Кумарины из спирто-водного извлечения переводят в хлороформ, взбалтывая в делительной воронке с 20 мл хлороформа. Хлороформное извлечение кумаринов отделяют, фильтруя в сухую колбу со шлифом через воронку, на фильтр которой насыпано 2,0 г безводного сульфата натрия. Хлороформ отгоняют, а остаток в колбе растворяют в 5 мл 95 % спирта. 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 кислоты хлористоводородной 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 аминопроизводными 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 кислоты сульфаниловой. 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 кислоты сульфаниловой (4,5 г кислоты сульфаниловой и 45 мл кислоты концентрированной хлористоводородной 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 растворы свидетелей. После нанесения каждой капли дают возможность ей подсохнуть. В случае хроматографии на бумаге ее предварительно пропитывают раствором Na_2HPO_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 30—40 см бумажные хроматограммы вынимают из камеры, подсушивают на воздухе, а затем высушивают при 100—120 °С. 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 пластинке «Силуфол» проявляют путем опрыскивания 10 % раствором натрия гидроксида в метаноле, подсушивания при 100—120 °С и опрыскивания диазотированной кислотой суль-

фаниловой. Хроматографическую бумагу проявляют без предварительной обработки щелочью. Появляются пятна кумаринов от оранжево-красного до сине-фиолетового окрашивания.

Рассчитайте величину R_f , сравните с R_f 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 (хромато-спектрофотометрический метод).

Количественное определение кумаринов в плодах амми большой (ФС 42-1996-83).

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 °С в предварительно насыщенной растворителями в течение 30 мин вертикальной камере вместимостью 360 мл. Подвижная фаза — петролейный эфир ($t_{кип} = 40—70$ °С) 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_0 — усредненное значение оптической плотности элюата зоны раствора стандартного образца аммифурина;

m — масса стандартного образца аммифурина, г;

m_1 — 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».

Примечания

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 13×2 см, которую после этого сушат на воздухе в течение суток.

ТЕМА 8. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о флавоноидах, строение, классификация по строению трехуглеродного фрагмента, 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, видов липы, шизмы обыкновенной, пустырника сердечного и пятилопастного, стальника полевого, сушеницы топяной, хвоща полевого, череды трехраздельной, шлемника байкальского.

Формулы катехина, флавана, лейкоантоцианидина, антоцианидина, флаванона, флаванонола, флавона, флавонола, оксихалкона, изофлавона, апигенина, лютеолина, нарингенина, кемпферола, кверцетина, мирицетина, витексина, оонина, рутина, гиперозида, авикулярина, гнафалозида, байкалина, скутелярина, квинквелозида.

Контрольные вопросы для усвоения материала

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?

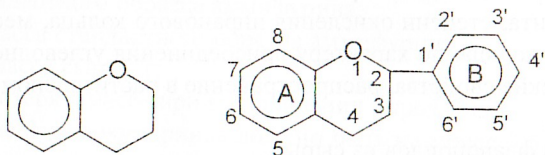
4. Какую флуоресценцию развивает большинство флавоноидов в УФ-свете?

5. Какие качественные реакции могут быть использованы для количественного определения флавоноидов?

6. Назовите основные этапы количественного определения флавоноидов.

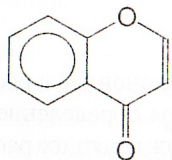
7. Назовите методы количественного определения флавоноидов. На каких свойствах флавоноидов они основаны?

Флавоноиды принадлежат к соединениям $C_6-C_3-C_6$ ряда, в их молекулах имеются два бензольных ядра А и В, соединенных трехуглеродным фрагментом. Большинство флавоноидов можно рассматривать как производные хромана или флавана, хромона или флавона.

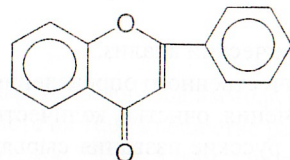


хроман

флаван (2-фенилхроман)



хромон = бензо-*g*-пирон

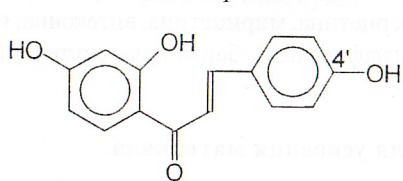


флафон (2-фенилхромон)

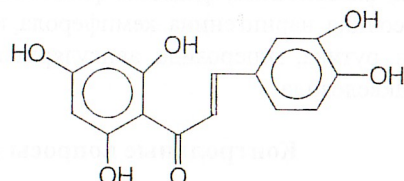
Классификация

1. По строению трехуглеродного фрагмента флавоноиды можно разделить на:

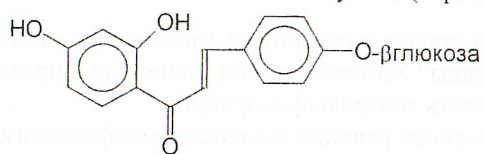
- собственно флаваны и флавоны
- халконы, дигидрохалконы



изоликвиритигенин



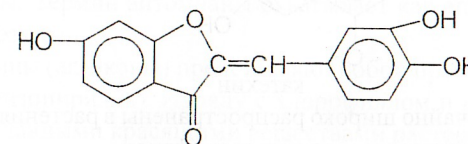
бутеин (кореопсин)



изоликвиритин

Благодаря наличию хромофорной группировки (карбонильная группа и конъюгированная с ней C_2-C_3 двойная связь) халконы окрашены в желтый цвет. В парах аммиака их окраска становится оранжево-красной.

— ауроны

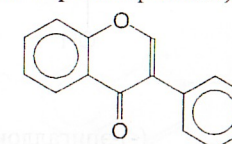
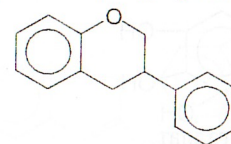


сульфуретин

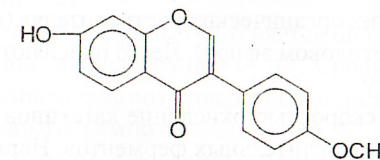
2. По месту присоединения фенильного радикала их делят на:

— собственно флаваны и флавоны, когда фенильный радикал присоединяется при C_2 ;

— изофлавоноиды (3-фенилхромоны или 3-фенилхроманы)

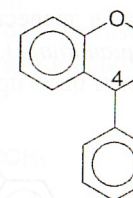


Основные классы изофлавоноидов представлены изофлаванами, изофлавононами, изофлавонами и др. Характерны для растений сем. Fabaceae.



формонетин

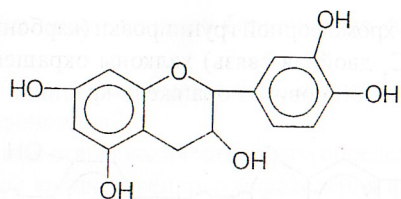
— неофлавоноиды = 4-фенилхроманы



Характерны для растений сем. Guttiferae, Fabaceae, Rubiaceae, Polypodiaceae, Passifloraceae.

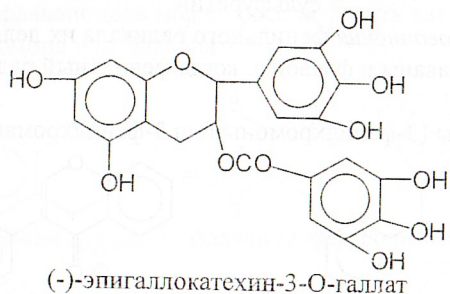
3. По степени окисленности трехуглеродного фрагмента флавоноиды делят на:

1. Флаван-3-олы (катехины) содержат два ассиметричных атома углерода (C_2 и C_3), поэтому каждый из катехинов может быть представлен четырьмя оптическими изомерами и двумя рацематами.



катехин

Катехины чрезвычайно широко распространены в растениях. Из более сложных катехинов встречаются их галлоильные эфиры.



(-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат

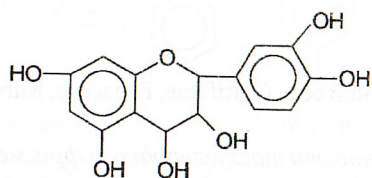
Реже они образуют гликозиды.

Катехины представляют бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде и многих органических растворителях (нижние спирты, ацетон, этилацетат, хуже в диэтиловом эфире). Легко окисляются при нагревании и на прямом солнечном свете.

С особенно большой скоростью окисление катехинов протекает в щелочной среде и под действием окислительных ферментов. Наряду с флаван-3,4-диолами катехины являются родоначальниками дубильных веществ конденсированного ряда.

Катехины широко распространены в древесине, плодах, листьях.

2. Флаван-3,4-диолы (лейкоантоцианидины). Они содержат три ассиметрических атома углерода (C_2 , C_3 , C_4) и могут быть представлены восемью изомерами и четырьмя рацематами.



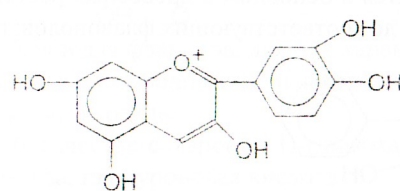
лейкоцианидин

Бесцветные аморфные вещества хорошо растворимы в воде, этаноле, ацетоне, хуже в этилацетате.

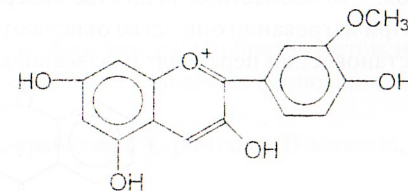
Под действием хлористоводородной кислоты переходят в ярко окрашенные флавиловые соли (антоцианидины).

3. Антоцианы. Термин антоцианы охватывает как агликоны антоцианидины, так и их гликозиды.

Антоцианидины (агликоны) представляют собой производные катиона флавилилия (2-фенилбензопирилия). Наряду с хлорофиллом и каротиноидами, антоцианы являются главными красящими веществами растений, придавая плодам, листьям, цветкам окраску разных оттенков от розовой до черно-фиолетовой. Локализуются в вакуолях. Окраска антоцианов обусловлена многими факторами: строением агликона, степенью гидроксирования и метилирования; комплексобразованием с ионами металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} способствуют развитию синей окраски); адсорбцией на полисахаридах и др.



цианидин

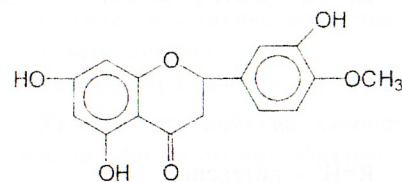


пеонидин

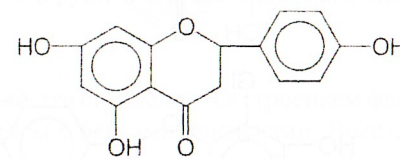
Многочисленность этой группы объясняется большим числом агликонов и гликозидов. Сахара присоединяются при C_3 , C_5 . Среди монозидов больше глюкозидов, реже галактозидов, рамнозидов, ксилозидов, арабинозидов. Из дисахаридов — рутиноза (глюкоза-рамноза) и др.

Широко распространены дисахариды и ацилированные гликозиды. Ацильные заместители представлены оксикоричными кислотами, уксусной, п-оксибензойной, малоновой, янтарной.

4. Флаваноны — содержат один ассиметричный атом углерода C_2 и могут существовать в виде двух изомеров и одного рацемата.



гесперетин

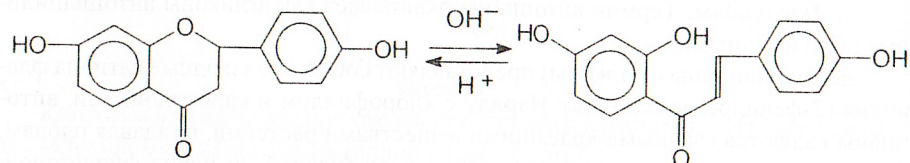


нарингенин

(один из наиболее распространенных в растениях)

Бесцветные вещества, в растениях часто встречаются в виде гликозидов. Сахарные остатки представлены глюкозой, рамнозой, рутинозой, неогесперидозой, которые присоединяются при C_3 или C_5 . Часто со строением дисахаридов связан вкус плодов цитрусовых. Сами агликоны (нарингенин, гесперетин) безвкусные, гликозиды являются горькими веществами.

Для многих флаванонов, у которых отсутствует оксигруппа при C₅ или она гликозидирована, характерна их способность к изомеризации в соответствующие халконы.

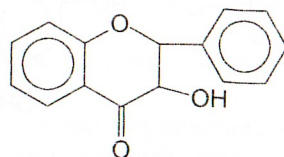


ликвиритигенин

изоликвиритигенин

Щелочные условия способствуют образованию халконов.

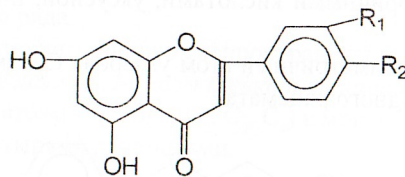
5. **Флаванолы** (дигидрофлаванолы) содержат два (C₂ и C₃) ассиметрических атома углерода и могут существовать в виде четырех изомеров и двух рацематов. Это бесцветные вещества содержатся в основном в древесных растениях. При нагревании они легко окисляются до соответствующих флавонолов; при восстановлении переходят в флаванолы.



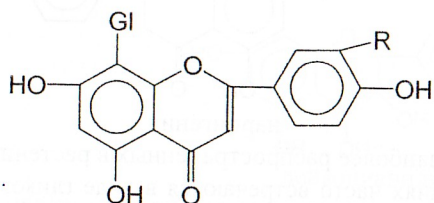
флаванол

6. **Флавоны** имеют желтую окраску благодаря наличию конъюгированной с двойной связью кетогруппы в пирановом гетероцикле.

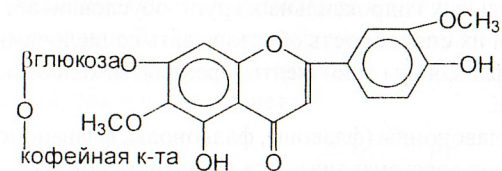
Очень широко распространенная группа, которая встречается в виде O- и C-гликозидов, а также ацилированных производных.



R₁, R₂=OH — лютеолин
R₁=H, R₂=OH — апигенин

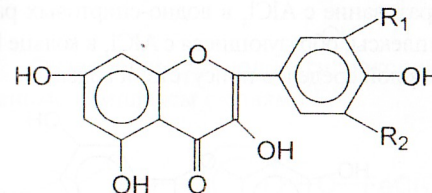


R=H — витексин
R=OH — ориентин



гнафалозид A

7. **Флавонолы** желтые пигменты, широко распространенные в растениях.



R₁=R₂=H — кемпферол
R₁=OH, R₂=H — кверцетин
R₁=OCH₃, R₂=H — изорамнетин
R₁=R₂=OH — мирицетин

Как и для флавонов, для них характерно большое разнообразие метоксилированных производных. Большинство из них — это гликозиды (монозиды, биозиды, дигликозиды).

В качестве сахаров — D-глюкоза, L-арабиноза, L-рамноза, D-ксилоза, D-галактоза, глюкуроновая кислота.

Наряду с мономерными соединениями встречаются димерные (производные флавона, флаванона (аментофлавоны). Катехины и лейкоантоцианидины образуют олигомерные и полимерные соединения (см. дубильные вещества).

Физические свойства. Кристаллические, реже аморфные вещества, бесцветные (катехины, лейкоантоцианы, флаваноны, флаванолы), желтые (флавоны, флавонолы); халконы, ауруны — оранжево-красные, антоцианы — красные, синие, фиолетовые.

Агликоны флавоноидов хорошо растворимы в низших спиртах, ацетоне, диэтиловом эфире. Гликозиды растворимы в горячей воде, спирте, не растворимы в хлороформе, бензоле, эфире.

Оптически активные вещества. Флуоресцируют в УФ-свете желтым, желто-зеленым, синим светом.

Температура плавления 150—350 °С.

Химические свойства. Химические свойства определяются строением флавоноидов. Многие из них образуют комплексы с белками, лигнанами. Восстановленные флавоноиды легко окисляются и конденсируются под действием света и щелочей с образованием высокомолекулярных соединений.

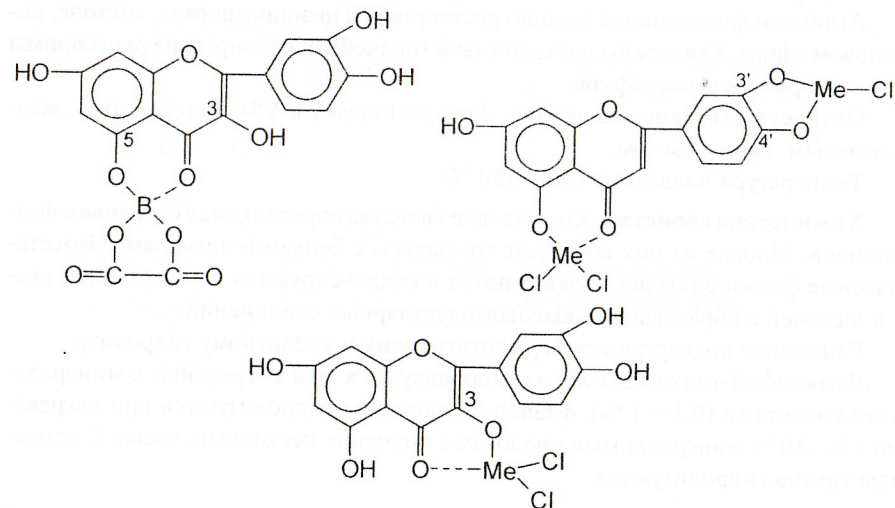
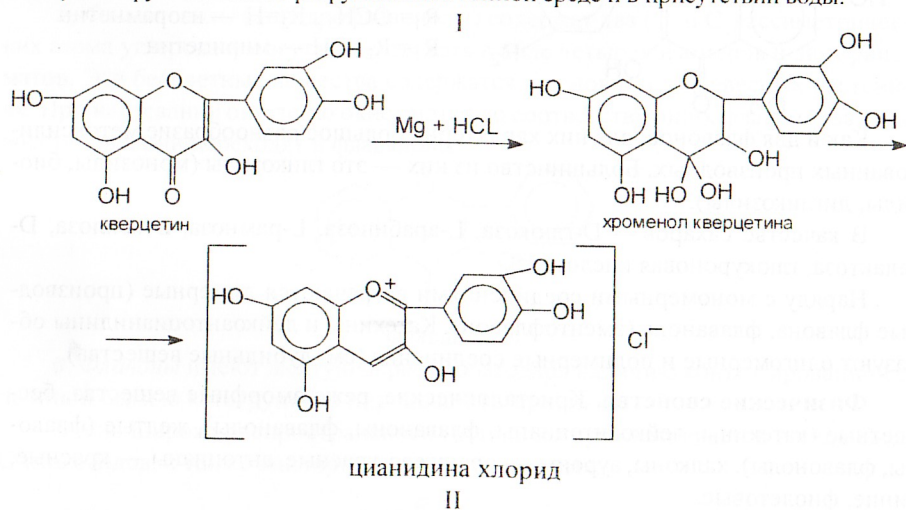
Гликозиды подвергаются ферментативному и кислотному гидролизу.

Флаванол-3-гликозиды легко гидролизуются при нагревании с минеральными кислотами (0,1—1%), флавоны-7-гликозиды гидролизуются при нагревании с 5—10% минеральными кислотами в течение нескольких часов. С-гликозиды трудно гидролизуются.

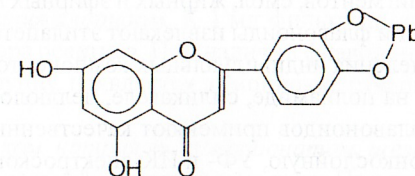
Наличие фенольных гидроксильных групп обуславливает кислотные свойства флавоноидов и их способность образовывать со щелочами феноляты. Флавоны, флавонолы, флаваноны дают желтые феноляты, халконы, ауруны — оранжевые или красные.

Окисленные флавоноиды (флавоны, флавонолы, флаванолы) под действием металлов и кислот восстанавливаются до антоцианов (I).

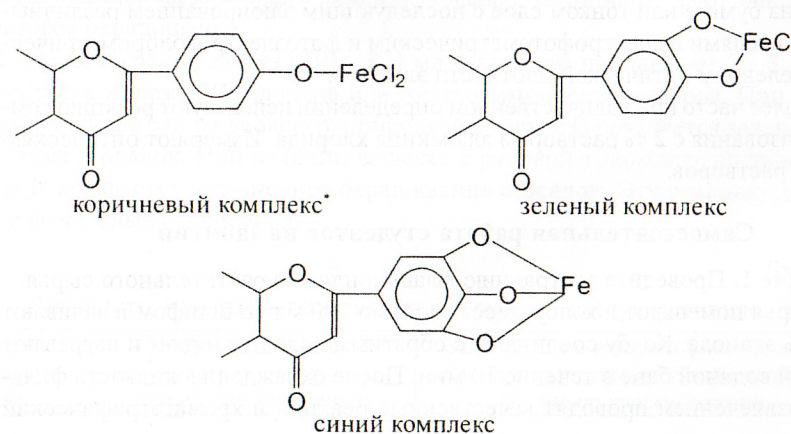
Флавоноиды (флавоны, флавонолы) образуют окрашенные комплексы с Al^{3+} , Zr^{4+} , Sb^{3+} , с борной кислотой(II). Этими реакциями можно определить положение свободных гидроксигрупп у C_5 , C_3 . Комплексообразование с $AlCl_3$ в водно-спиртовых растворах может идти по C_5 и C_4 , C_3 и C_4 . Комплексы, образующиеся с $AlCl_3$ в кольце В с гидроксигруппами легко разрушаются в кислой среде и в присутствии воды.



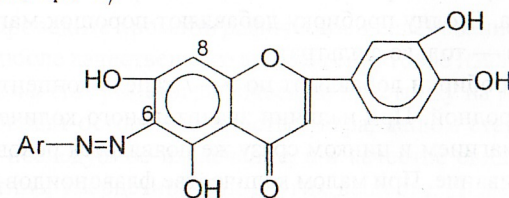
Флавоноиды (флавоны, халконы, ауруны), содержащие свободные орто-гидроксильные группы в кольце В, образуют окрашенные желтые или красные комплексы со свинца ацетатом средним. Антоцианы образуют соединения, окрашенные как в красный, так и в синий цвета.



Флавоноиды, имеющие гидроксильные группы в кольце В, образуют окрашенные комплексы с солями Fe^{3+} .



Флавоноиды присоединяют соли диазония при C_6 или C_8 . Если C_5 или C_7 замещено, то реакция будет отрицательная. Этой реакцией можно доказать замещенный радикал при C_7 .



Восстановленные флавоноиды (катехины, лейкоантоцианидины) можно обнаружить 1 % раствором ванилина и конц. HCl .

Халконы, ауруны, антоцианы в кислой среде дают красное окрашивание, антоцианы в щелочной среде дают сине-зеленое окрашивание.

* Окраска может маскироваться за счет образования комплекса по OH (C_5) и $C=O$ (C_4)

Анализ сырья

Выделяют флавоноиды из лекарственного растительного сырья этанолом различной концентрации. Предварительно сырье обрабатывают неполярным растворителем для удаления пигментов, смол, жирных и эфирных масел и др. Спиртовое извлечение упаривают и флавоноиды извлекают этилацетатом, бутанолом, этиловым эфиром. Для выделения индивидуальных компонентов применяют колоночную хроматографию на полиамиде, силикагеле, целлюлозе.

Для идентификации флавоноидов применяют качественные реакции, хроматографию на бумаге и тонкослойную, УФ- и ИК-спектроскопию.

Количественное определение суммы флавоноидов проводят различными методами. Иногда применяют хроматографическое разделение на полиамидном сорбенте, на бумаге или тонком слое с последующим элюированием различными растворителями и спектрофотометрическим и фотоэлектродетекторным определением оптической плотности элюатов.

Наиболее часто при количественном определении используют реакцию комплексообразования с 2 % раствором алюминия хлорида. Измеряют оптическую плотность растворов.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Проведите 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 добавляют порошок магния, во вторую — цинка, в третью — только фильтрат.

Затем во все три пробирки добавляют по 5—7 капель концентрированной кислоты хлористоводородной. 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 на водяную баню на 10 минут, а затем наблюдают окраску.

Флавонолы, флаваноны и флавоны, при восстановлении магнием или цинком в присутствии кислоты хлористоводородной, 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 ауранов, которые при добавлении только одной концентрированной кислоты хлористоводородной образуют красное окрашивание за счет образования оксоневых 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 C_3, C_5 ОН-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 флавоноидов, флаванолов, флаванонов и флаванололов появляется желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное; антоцианы дают синее или фиолетовое окрашивание.

Реакция с *солями железа (III).* К 1 мл фильтрата прибавляют 2—3 капли 1 % раствора железа (III) хлорида или железоаммониевых квасцов. При наличии флавоноидов с орто-диоксигруппировкой в кольце В появляется зеленое окрашивание и осадок. При наличии веществ с рядовой триоксигруппировкой в кольце В появляется черно-синее окрашивание и осадок. Эту реакцию дают и другие фенольные соединения.

Таблица

Результаты качественных реакций оформите в следующем виде: 4

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 Сохлета хлороформом или другим органическим растворителем.

Задание 3. Проведите хроматографическое исследование флавоноидов.

Оставшееся после качественного анализа спиртовое извлечение упаривают до половины объема. На хроматографическую пластинку на расстоянии 3 см от нижнего края проводят осторожно простым карандашом стартовую линию, на которую наносят исследуемое извлечение, а в качестве свидетелей — спиртовые растворы рутина, кверцетина или других веществ. Диаметр пятна не должен превышать 5 мм. Хроматографируют в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (БУВ) 4:1:2 пока фронт растворителя не дойдет 3 см от верхнего края пластины. Хроматограмму 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 флавоноидов в лекарственном растительном сырье фотоколориметрическим методом.

0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл 40 % этилового спирта.

Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут с момента закипания содержимого колбы. Колбу охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр в колбу и первые 10 мл фильтрата используют для качественных реакций. Затем 0,5 мл фильтрата помещают в кювету, прибавляют 1 мл 2 % раствора алюминия хлорида и объем раствора доводят 40 % этиловым спиртом до метки. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 440 нм (с синим светофильтром) в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве сравнения раствор, состоящий из 0,5 мл извлечения, доведенного в кювете до метки 40 % этиловым спиртом.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 25 \cdot 100}{m} \cdot \frac{100}{100 - w},$$

где C — содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в 0,5 мл колориметрируемого раствора, найденное по калибровочному графику в мг/мл;

m — масса сырья в граммах;

w — влажность сырья, %.

Количественное определение суммы флавоноидов в *цветках арники* (ГОСТ 13399-89).

1 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц до 2 мм помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70 % этилового спирта, содержимое колбу 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 кислоты концентрированной уксусной, 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:

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

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 — оптическая плотность стандартного образца рутина;

m — масса сырья, г; m_0 — масса рутина, г;

W — потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление эталонного раствора стандартного образца рутина.

0,05 г (точная навеска) стандартного образца рутина, предварительно высушенного при температуре 130—135 °С в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95 % 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) (ГФ X1, вып. 2, ст. 56, с. 331).

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 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 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю

разведенной кислоты хлористоводородной 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:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 125}{330 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

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

m — масса сырья, г;

W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

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

Количественное определение флавоноидов в траве сушеницы топяной (ГФ Х1, вып. 2, ст. 51, с. 321).

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в патрон из фильтровальной бумаги и экстрагируют 95 % спиртом в аппарате Сокслета с экстрактором вместимостью 150 мл на кипящей водяной бане в течение 5 ч (20—25 сливов). Извлечение упаривают досуха по частям в круглодонной колбе вместимостью 100 мл на кипящей водяной бане в течение 2 мин, растирая осадок стеклянной палочкой до растворения. После охлаждения раствор количественно переносят на колонку с полиамидным сорбентом. Операцию проводят еще два раза. Слив производят через воронку с ватным тампоном, предварительно смоченным водой.

Колонку промывают 10 мл воды, затем убирают ватный тампон и промывают колонку еще 20 мл воды. Водный элюат отбрасывают. Флавоноиды элюируют 50 мл 95 % спирта со скоростью 4 мл/мин. Когда темно-желтая зона (в УФ-свете) подойдет к нижней части сорбента, элюат собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем извлечения доводят до метки 95 % спиртом и тщательно перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл переносят 1 мл извлечения, объем доводят до метки 95 % спиртом и перемешивают. Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 338 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором.

Параллельно определяют оптическую плотность раствора стандартного образца вещества сравнения (СОВС) кали дихромата по сравнению с раствором серной кислоты (0,005 моль/л).

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 0,2020 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1,03 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot 1000} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 0,2020 \cdot 250 \cdot 1,03 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца калия дихромата;

m — масса сырья, г;

m_0 — масса калия дихромата, г;

0,2020 — коэффициент пересчета калия дихромата на гнафалозид А;

1,03 — поправочный коэффициент на неполное элюирование гнафалозид А с полиамидного сорбента;

W — потеря в массе при высушивании, %.

Примечания

1. Приготовление колонки. 1,5 г полиамидного сорбента (ТУ 6-09-10-822-73) помещают в стаканчик вместимостью 50 мл, заливают 30 мл воды, перемешивают и выливают через воронку диаметром 3,5 см в колонку шириной 1,2 см и высотой 25 см, в нижнюю часть которой помещают небольшой ватный тампон, предварительно смоченный водой. Колонку заполняют при открытом кране. Элюирование проводят со скоростью 4 мл/мин.

2. Приготовление контрольного раствора. Контрольный раствор получают аналогично определяемой сумме флавоноидов путем пропускания 50 мл 95 % спирт через колонку в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят 95 % спиртом до метки.

3. Приготовление стандартного раствора калия дихромата. Около 0,03 г (точная навеска) калия дихромата, высушенного до постоянной массы, растворяют в растворе кислоты серной (0,005 моль/л) в мерной колбе вместимостью 1 л, доводят объем раствора тем же раствором до метки и перемешивают.

4. Приготовление 0,005 мол раствора кислоты серной. К 1 мл воды приливают 0,28 мл кислоты концентрированной серной и перемешивают.

ТЕМА 9. 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.

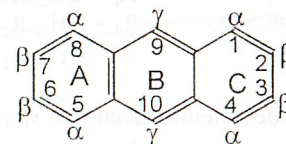
Формулы антрацена, антранола, антрона, оксиантрона, антрахинона, франгуляроза, глюкофрангулина, франгулина, реум-эмодина, сеннозидов, реина, ализарина, рубэритриновой кислоты, гиперидина, алоина, алоэ-эмодина.

Контрольные вопросы для усвоения материала

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?

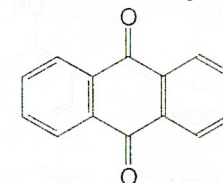
Антраценпроизводные — группа природных фенольных соединений, в основе строения которых лежит антрацен различной степени окисленности.



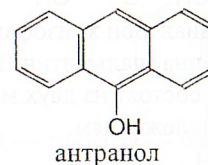
Антраценпроизводные классифицируют по степени окисленности и структуре углеродного скелета.

По степени окисленности кольца В из делят на две подгруппы:

— окисленные — производные 9,10 антрахинона

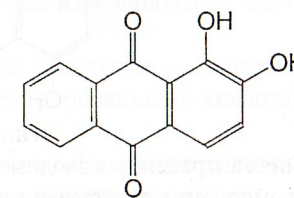
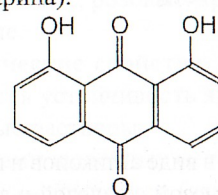


— восстановленные — производные антранола и антрона

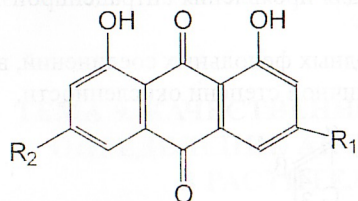


Восстановленные формы антраценпроизводных очень лабильны и легко окисляются кислородом воздуха до антрахинонов. В растениях могут быть окисленные и восстановленные формы.

Большинство антраценпроизводных являются диоксипроизводными, т.е. содержат гидроксигруппы в 1 и 8 положениях (п/гр хризацина) и 1 и 2 положениях (п/гр ализарина).



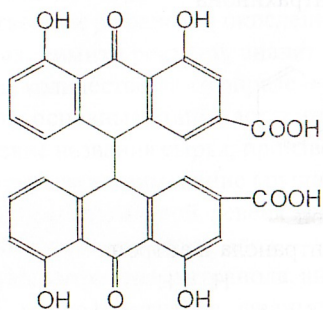
Производные хризанина (истизина) широко представлены в растениях.



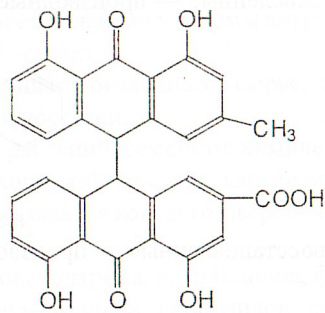
$R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ — хризофанол
 $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{H}$ — реин
 $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{H}$ — алоэ-эмодин
 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}$ — реум-эмодин
 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OCH}_3$ — фицион

Перечисленные выше соединения являются мономерами.

Димеры образуются при соединении двух мономеров, чаще конденсируются антрон и антранолпроизводные по γ -положению; при соединении окисленных форм конденсация идет по α - и β -положениям. При конденсации одинаковых мономеров образуются диантроны, диантранолы, диантрахиноны, разных — гетеродиантроны, гетероантранолы, гетероантрахиноны.

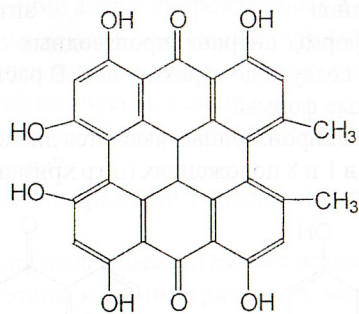


диантрон реина (сеннидин А)



гетеродиантрон хризофанола и реина (пальмитин В)

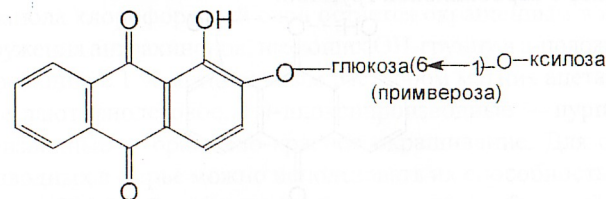
Конденсированные антраценпроизводные состоят из двух мономеров (1,8-диоксиантрахинонов) соединенных по α - и β -положениям.



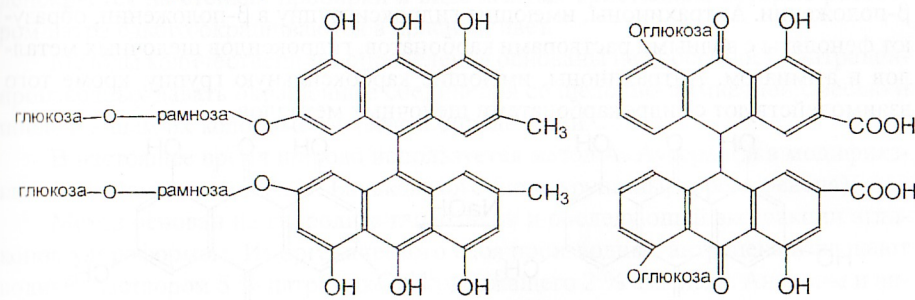
гиперицин

В растениях антраценпроизводные могут быть в виде агликонов и гликозидов. Углеводный компонент представлен глюкозой, рамнозой, ксилозой и арабинозой.

Среди гликозидов могут быть моно-, дигликозиды, биоциды, O-гликозиды и C-гликозиды.

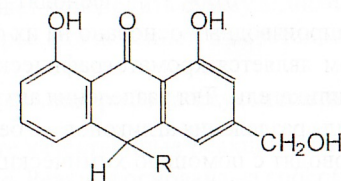


рубепритриновая кислота



франгулярозид

сеннозид А



R — глюкоза — барбалоин R — арабиноза — алоин

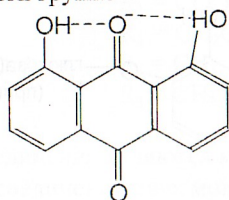
Физические свойства. Кристаллические вещества, окрашенные в желтый, оранжевый и красный цвета. Агликоны хорошо растворимы в этиловом эфире, хлороформе, бензоле и др. неполярных растворителях; а гликозиды хорошо растворимы в полярных растворителях и воде. При нагреве до 210 °С сублимируются. Оптически активные вещества. В УФ-свете флуоресцируют: антрахиноны — оранжевые, розовые, красные; антроны и антранолы — желтые, голубые, фиолетовые.

Химические свойства. Характерным свойством всех антраценпроизводных является устойчивость ядра. С концентрированными кислотами они дают окрашенные растворы.

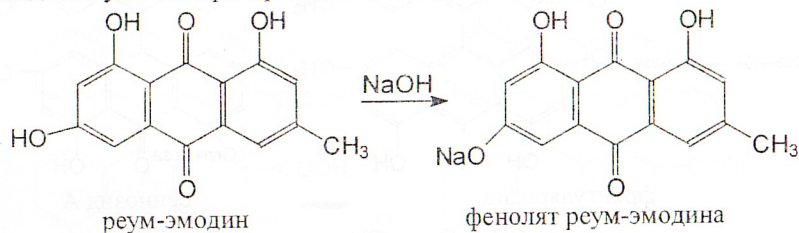
С ионами щелочных металлов образуют соли, с солями тяжелых металлов (Al, Cr, Sn) — комплексы (лаки) или очень устойчивые соли.

Окисленные антраценпроизводные относятся различно к щелочам. Антрахиноны, имеющие гидроксилы в α -положении, образуют феноляты только с гид-

роксидами щелочей, так как α -гидроксилы образуют внутримолекулярную водородную связь с карбонильной группой.



Вследствие этого они менее реакционноспособны, чем гидроксигруппы в β -положении. Антрахиноны, имеющие гидроксигруппу в β -положении, образуют феноляты с водными растворами карбонатов, гидроксидов щелочных металлов и аммиаком. Антрахиноны, имеющие карбоксильную группу, кроме того взаимодействуют с гидрокарбонатами щелочных металлов.



Разделение антраценпроизводных основано на их физико-химических свойствах. Основным методом является хроматографический. В качестве сорбента применяют полиамид и силикагель. Для разделения антрагликозидов используют водно-спиртовые смеси, для разделения агликонов — бензол, толуол, хлороформ.

Идентификацию проводят с помощью химических и физических методов. Из физических методов применяют УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопию, они позволяют установить класс соединений, наличие и характер заместителей.

Анализ сырья

Антрагликозиды из растительного сырья экстрагируют водой и водно-спиртовыми смесями, а свободные агликоны — спиртом или хлороформом. Для выделения связанных агликонов гликозиды подвергают гидролизу кислотой или ферментативному расщеплению, после чего извлекают свободные агликоны этиловым эфиром, бензолом или хлороформом.

Для обнаружения антраценпроизводных наиболее широко используется реакция Борнтрегера, основанная на способности антрагликозидов подвергаться щелочному гидролизу с образованием свободных агликонов. Одновременно происходит окисление антрон- и антранолпроизводных до антрахинона. После подкисления гидролизата агликоны извлекают органическим растворителем (хлороформом или эфиром). Хлороформный слой отделяют, встряхивают с аммиаком,

который окрашивается в вишнево-красный (1,8-диоксиантрахиноны), пурпурный (1,4-диоксиантрахиноны), фиолетовый (1,2-диоксиантрахиноны) цвета. Причем в аммиачный слой переходят антрахиноны, имеющие β -ОН группу. В случае хризофанола хлороформный слой остается окрашенным в желтый цвет.

Для обнаружения антрахинонов, имеющих ОН-группу в α -положении, можно использовать реакцию с 1 % метанольным раствором магния ацетата. 1,2-диоксипроизводные дают фиолетовое, 1,4-диоксипроизводные — пурпурное, 1,6 и 1,8-диоксипроизводные — оранжево-красное окрашивание. Для обнаружения антраценпроизводных в сырье можно использовать их способность возгоняться при нагревании до 210 °С. Возгонку проводят в сухой пробирке. Сублимиат конденсируется на стенках пробирки в виде желтых кристаллов, которые раствором натра едкого окрашиваются в красный цвет.

Методы количественного определения основаны на способности антраценпроизводных давать окрашенные соединения со щелочно-аммиачной смесью и последующем их колориметрическом определении.

В настоящее время широко используется метод А. Аутерхофа в модификации А. С. Романовой и А. И. Баньковского (кора крушины, корень ревеня).

Метод основан на гидролизе гликозидов и последующей экстракции агликонов хлороформом. Из органического слоя производные антрацена извлекают водным раствором 5 % натра едкого, содержащего 2 % аммиака. Антроны и антранолы окисляют при нагревании на водяной бане. После чего раствор колориметрируют. Метод позволяет определить сумму агликонов (свободных и связанных), содержащихся в сырье в окисленной и восстановленной форме.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Проведите качественные реакции на антраценпроизводные.

Реакция Борнтрегера. 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 кислоты хлористоводородной до слабокислой реакции (по лакмусу). При этом исчезает красное окрашивание, раствор становится мутным за счет выпадения в осадок агликонов антрахинонов, 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, содержащих гидроксигруппу в β -положении, аммиачный слой окрашивается в вишнево-красный цвет, а хлороформный слой остается окрашенным в желтый цвет (хризофанол).

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

Примечание.

Оставшееся хлороформное извлечение используйте для идентификации антрагликозидов методом тонкослойной хроматографии.

— Реакция с 1 % спиртовым раствором магния ацетата.

1,0 г сырья помещают в колбочку вместимостью 50 мл со шлифом, добавляют 10 мл 95 % спирта и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной 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. 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 тонкослойной хроматографии.

Хлороформное извлечение, оставленное после проведения реакции Борнтрагера, переносят в стаканчик вместимостью 30—50 мл; 5—6 капель извлечения по капле (каждая капля должна высохнуть) наносят на стартовую линию, осторожно проведенную простым карандашом на расстоянии 2 см от нижнего края пластины. На расстоянии 2 см от первого пятна наносят раствор суммы агликонов ревеня. Хроматограмму помещают в камеру с системой гексан-этилацетат 7 : 3, чтобы край пластины погрузился в нее на 0,5—1 см. После окончания хроматографирования (фронт растворителя не доходит до края пластины 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_f . Сделайте заключение о качественном составе антраценпроизводных исследуемого сырья. Зарисуйте схему хроматограммы.

Примечание.

R_f реина — 0; реум-эмодин — 0,40; алоэ-эмодин 0,65; хризофанола 0,98.

Задание 3. Проведите 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 кислотой ледяной уксусной.

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 присоединяют к обратному холодильнику, 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 минут, 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, соединяют 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 (агликонов) в процентах (X) в пересчете на абсолютно-сухое сырье вычисляют по формуле:

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

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

200 — объем всего щелочно-аммиачного извлечения, мл;

w — потеря в массе при высушивании сырья, %;

b — масса сырья, г;

K — коэффициент разбавления.

Сделайте заключение о соответствии анализируемого сырья требованиям НД.

Примечания.

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

2. Построение калибровочного графика. 50 г кобальта хлорида, высушенного до постоянной массы, помещают в мерную колбу на 500 мл, растворяют в 250 мл воды, прибавляют 1 мл кислоты хлористоводородной 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 — концентрацию 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 натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды. После охлаждения раствора прибавляют 80 мл концентрированного раствора аммиака и перемешивают. Раствор годен в течение суток.

ТЕМА 10. 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 галлы, сумаха дубильного, скумпии кожевенной, видов дуба, лапчатки прямостоячей, кровохлебки лекарственной, горца змеяного, 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.

Контрольные вопросы для усвоения материала

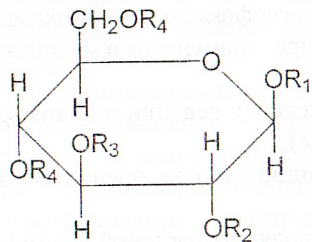
1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций и количественного определения?
2. Какие реакции на дубильные вещества являются специфическими?
3. Какие соединения образуют окрашенные в черно-синий или черно-зеленый цвет продукты с солями железа (III)? От чего зависит характер окраски?
4. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье гидролизуемых 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?

Дубильные вещества или таниды — растительные фенольные высокомолекулярные соединения, способные осаждать белки, алкалоиды и обладающие вяжущим вкусом.

По Фрейденбергу дубильные вещества подразделяют на 2 группы:

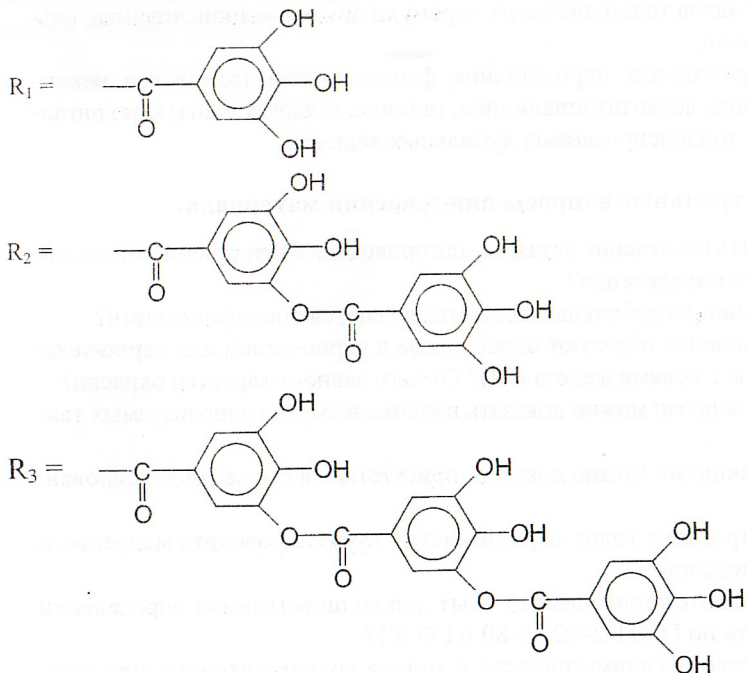
1. Гидролизуемые — сложные эфиры сахаров и фенолкарбоновых кислот, которые под действием кислот и энзимов распадаются на составные части. К ним относят галлотанины, эллаготанины, сахараидные эфиры карбоновых кислот.

Галлотанины — сложные эфиры гексоз (D-глюкозы) и галловой кислоты.

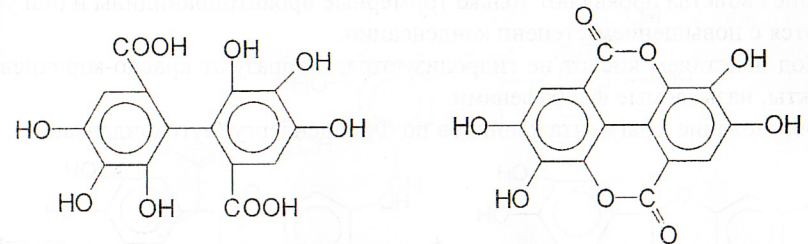


R₁ = галловая кислота
 R₂=R₄= м-дигалловая кислота
 R₅= R₃ = м-тригалловая кислота

Структура китайского танина
 (нона-галлоилглюкоза)

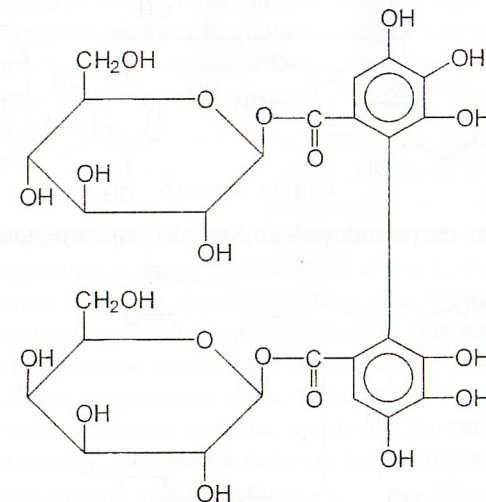


Эллаготанины — сложные эфиры D-глюкозы и гексаоксидифеновой, хебуловой, бревифолинкарбоновой и др. кислот, имеющих биогенетическое родство с эллаговой кислотой, например альнитаннин из соплодий ольхи.



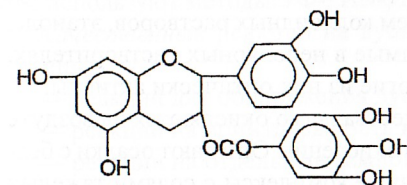
Гексаоксидифеновая кислота

Эллаговая кислота

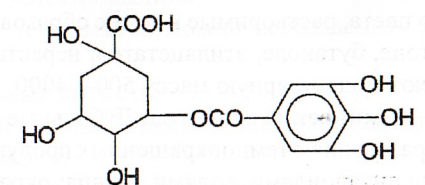


Альнитаннин

Несахаридные эфиры карбоновых кислот представляют эфиры галловой кислоты с хинной, оксикоричными (хлорогеновой, кофейной и др.) кислотами, а также флаванами.



Катехингаллат

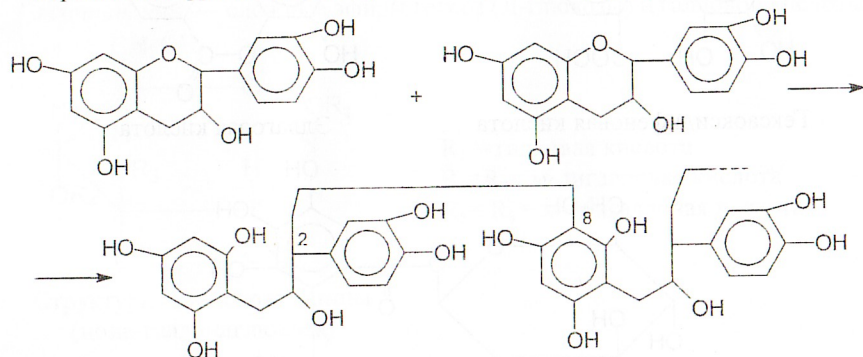


Теогаллин

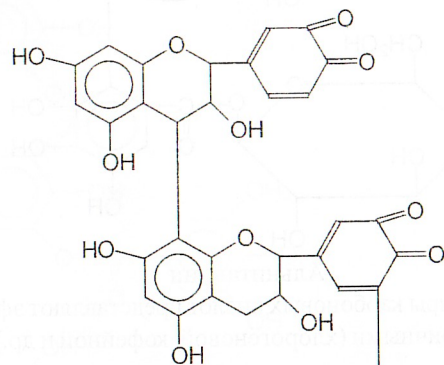
2. **Конденсированные** дубильные вещества представляют собой олигомеры и полимеры флаван-3-ола, флаван-3,4-диола и оксистильбена. Все мономеры соединены -С-С-связями в положениях C₂-C₆, C₂-C₈, C₄-C₈, C₂-C₅, C₂-C₆ и др. Дубящие свойства проявляют только тримерные проантоцианидины и они усиливаются с повышением степени конденсации.

Под действием кислот не гидролизуются, а образуют красно-коричневые продукты, называемые флобафенами.

Образование фрагмента танинов по Фрейденбергу (аутоконденсация):



Образование фрагмента танинов по Хатуэй (окислительная конденсация):

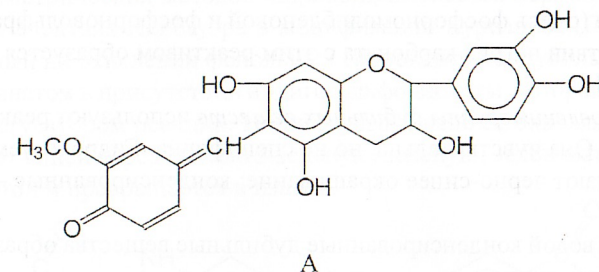


Физические свойства. Танины — аморфные вещества желтого или бурого цвета, растворимые в воде с образованием коллоидных растворов, этаноле, ацетоне, бутаноле, этилацетате и нерастворимые в неполярных растворителях. Имеют молекулярную массу 500—4000. Многие из них оптически активны.

Химические свойства. Дубильные вещества легко окисляются на воздухе с образованием темноокрашенных продуктов окисления. Они дают осадки с белками, алкалоидами, солями свинца; окрашенные комплексы с солями тяжелых металлов (Fe³⁺). При этом гидролизуются танины дают синее окрашивание, конденсируемые — зеленое. Как фенольные соединения дубильные вещества

вступают в реакцию сочетания с диазониевыми соединениями с образованием окрашенных продуктов.

Отдельные мономеры, например катехин, с 1 % спиртовым раствором ванилина в конц. HCl образует соединение (А) малиново-красного цвета.



Свободная эллаговая кислота дает красно-фиолетовую окраску с несколькими кристаллами натрия нитрита и тремя-четырьмя каплями кислоты уксусной. Гексаоксидифеновая или связанная эллаговая кислоты с 0,1 М раствором H₂SO₄ или HCl и кристаллами натрия нитрита образуют карминно-красную окраску, переходящую в синюю.

Анализ сырья

Дубильные вещества представляют собой смесь различных полифенолов, имеют сложную структуру, и очень лабильны. В связи с этим установление их строения представляет большие трудности. Из сырья дубильные вещества извлекают водой, этиловым или метиловым спиртами. Для удаления балластных веществ сырье или полученное извлечение обрабатывают петролевым эфиром, бензолом, хлороформом или смесью этих растворителей.

При этом удаляют пигменты, липиды, стеринны и другие вещества. Широко распространено выделение дубильных веществ осаждением из водных и водно-спиртовых растворов солями ацетата свинца.

Полученный осадок затем обрабатывают разбавленной кислотой серной.

Индивидуальные компоненты выделяют с помощью хроматографических методов (адсорбционная хроматография на колонках целлюлозы, полиамида; ионообменная, распределительная хроматография и др.). Для установления структуры используют методы УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии.

Качественные реакции на дубильные вещества можно подразделить на 3 группы:

- реакции для обнаружения дубильных веществ;
- реакции на принадлежность к той или иной группе дубильных веществ;
- реакции на отдельные компоненты.

Для обнаружения дубильных веществ проводят реакцию осаждения 1 % раствором желатина в 10 % растворе натрия хлорида. Образуются комплексные

соединения желатин-таннагов, которые дают желтоватый осадок или помутнение извлечения. Это наиболее специфическая реакция. Можно использовать реакции осаждения алкалоидами, основным ацетатом свинца (серовато-белый осадок), дихроматом калия (бурый осадок). Можно использовать также реактив Фолина-Дениса (смесь фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот). В присутствии натрия карбоната с этим реактивом образуется синее окрашивание.

Для установления группы дубильных веществ используют реакцию с солями железа (III). Она чувствительна, но не специфична. Гидролизуемые дубильные вещества дают черно-синее окрашивание; конденсированные — черно-зеленое.

С бромной водой конденсированные дубильные вещества образуют желто-оранжевый осадок сразу.

При взаимодействии с кристаллическим натрием нитратом и 0,1 М кислотой хлористоводородной гидролизуемые дубильные вещества дают коричневое окрашивание.

Для установления смешанной группы дубильных веществ в сырье используют реакцию Стиасни (40 % формальдегид и кислота хлористоводородная концентрированная). Реакция идет при нагревании с обратным холодильником. Конденсированные дубильные вещества полностью выпадают в осадок красно-бурого цвета. Его отфильтровывают и к фильтрату добавляют 1 г кристаллического натрия ацетата и 10 капель 1 % раствора железоаммониевых квасцов. Гидролизуемые дубильные вещества образуют сине-фиолетовое окрашивание.

Можно также использовать реакцию с 10 % раствором свинца ацетата и 10 % кислотой уксусной. При наличии гидролизующих дубильных веществ сразу образуется белый осадок. Его отфильтровывают и к фильтрату добавляют 0,5 г кристаллического натрия ацетата и 10 капель 1 % раствора железоаммониевых квасцов. При наличии конденсированных дубильных веществ фильтрат окрашивается в черно-зеленый цвет (не встряхивать).

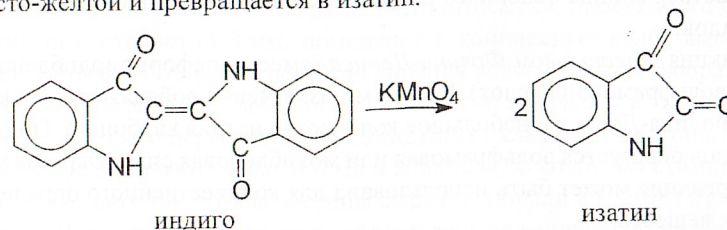
Для обнаружения отдельных компонентов (катехинов, лейкоантоцианидинов) используют реакции с 1 % раствором ванилина в кислоте хлористоводородной концентрированной (ярко-красное окрашивание); с калия персульфатом (красно-фиолетовое окрашивание).

Для количественного определения дубильных веществ существует ряд методов: — гравиметрические; — оксидиметрические; — колориметрические.

Из гравиметрических методов наиболее часто используется метод с применением кожного (гольевого) порошка. Он применяется в кожевенной промышленности для оценки растительных дубильных экстрактов. Метод основан на способности таннидов давать необратимые соединения с коллагеном кожи. По

разности содержания экстрактивных веществ в растительных экстрактах до и после адсорбции таннидов кожным порошком определяют количество дубильных веществ в сырье. Можно аналогично использовать метод осаждения желатином, меди ацетатом.

Из оксидиметрических методов широко применяется перманганатометрический метод Левенталя-Нейбауэра в модификации Курсанова (ГФ XI, ч. 1, с. 286), основанный на окислении фенольных гидроксигрупп дубильных веществ калия перманганатом в присутствии индигосульфокислоты, которая является индикатором и регулятором реакции. Индигосульфокислота, окисляясь, изменяет свою окраску от синей через синевато-зеленую, зеленую, зеленовато-желтую до золотисто-желтой и превращается в изатин.



Индигосульфокислота препятствует окислению балластных веществ, так как ее окислительный потенциал стоит сразу за дубильными веществами. Титрование ведут медленно, при постоянном перемешивании.

Недостаток метода в том, что титруется часть сопутствующих веществ (например, другие фенольные соединения); расчет для всех видов сырья ведется на танин, не учитываются особенности строения дубильных веществ анализируемого сырья.

Из колориметрических методов можно использовать метод, основанный на взаимодействии таннидов в реактиве Фолина-Дениса.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Проведите 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. Проведите качественные реакции на дубильные вещества.

1. Реакции обнаружения дубильных веществ.

а) реакция в растворе желатина. К 3—5 мл извлечения добавляют 2—3 капли 1 % раствора желатина в 10 % растворе натрия хлорида.

При наличии таннидов образуется белый осадок или помутнение раствора от образовавшихся желатинтаннагов, 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 кодеина, хинина или другого алкалоида. При наличии танинов выпадает осадок или наблюдается помутнение раствора;

в) реакция с *калия дихроматом*. К 3—5 мл извлечения добавляют 2—3 капли 5 % раствора калия дихромата. 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 фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой 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* (III). 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 со *свинца ацетатом средним* в уксуснокислой среде. К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 10 % кислоты уксусной и 1 мл 10 % раствора свинца ацетата среднего. При наличии гидролизующих 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 *кислотой* концентрированной хлористоводородной. К 25 мл извлечения прибавляют 5 мл 40 % раствора формальдегида и 3 мл кислоты концентрированной хлористоводородной. Смесь кипятят 30 мин в колбе с обратным холодильником. При наличии конденсированных дубильных веществ и кислоты галловой образуется осадок кирпично-красного цвета. После охлаждения осадок отфильтровывают; к 10 мл фильтрата в пробирке прибавляют

1 мл 1 % раствора железоаммониевых квасцов и 1 г кристаллического натрия ацетата (не взбалтывать!). При наличии в сырье дубильных веществ гидролизующей 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 (ГФХ1, вып. 1, с. 286—287).

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 индиго-число). 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:

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

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

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

0,004158 — количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) в пересчете на танин, г;

m — масса сырья, г;

W — потеря в массе при высушивании сырья, %;

250 — общий объем извлечения, мл;

25 — объем извлечения, взятого для титрования, мл.

Рассчитайте содержание дубильных веществ и сравните с требованиями НД. Сделайте заключение о качестве анализируемого сырья.

ТЕМА 11. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие об алкалоидах, строение, виды классификации, физико-химические свойства, правила хранения сырья.

Экстракция алкалоидов из сырья, методы очистки. На каких свойствах алкалоидов они основаны?

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, гиосцимина, морфина, кодеина, папаверина, глауцина, колхамина, колхицина, лизергиновой кислоты, эрготамина, резерпина, соласодина, пилокарпина, хинина, берберина, пеганина, кофеина.

Контрольные вопросы для усвоения материала занятия

1. На каких свойствах алкалоидов основаны методы их экстракции из сырья, качественного и количественного анализа?

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

3. Назовите общеалкалоидные реактивы, их состав и укажите окраску образовавшихся осадков? Химизм реакций.

4. Назовите этапы количественного определения алкалоидов?

5. Для чего нужно измерять объем полученного экстракта при количественном определении алкалоидов?

6. Почему для подщелачивания используется чаще всего раствор аммиака, а не щелочи?

7. Как проверить полноту извлечения алкалоидов при переводе их из органического растворителя в водную фазу и из водного извлечения в хлороформ?

8. Как рассчитывается значение R_f ?

9. Назовите методы количественного определения алкалоидов в сырье. Принцип методов, их сравнительная оценка.

Алкалоиды — большая группа органических азотсодержащих соединений основного характера, встречающихся в растительных организмах и обладающих сильным физиологическим действием.

Название «алкалоид» происходит от двух слов: арабского «alcali» — щелочь и греческого «eidos» — подобный. Название было предложено Мейснером в 1819 г. для вещества, выделенного из семян сабадиллы (*Schoenocaulon officinale* (Schl.) A.Gray).

В основу классификации алкалоидов могут быть положены различные принципы, поэтому различают следующие классификации:

1. Ботаническая — в зависимости от того, к какому семейству или роду относятся растения, содержащие алкалоиды. Например, алкалоиды спорыньи, алкалоиды амариллисовых, пасленовых.

2. Фармакологическая — по характеру фармакологического действия. Например, алкалоиды обладающие спазмолитическим действием.

3. Биогенетическая (классификация Хегнауэра). В основе этой классификации лежит представление о характере предшественников алкалоидов и путях биосинтеза алкалоидов.

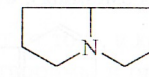
4. Химическая — по характеру азотсодержащего гетероцикла. Ее чаще всего и используют в фармакогнозии.

В зависимости от строения углеродноазотного цикла А. П. Орехов разделил алкалоиды на несколько групп.

1. Алкалоиды, производные пирролидина, пирролизидина: платифиллин (крестовник плосколистный).



пирролидин



пирролизидин

2. Алкалоиды, производные пиридина и пиперидина, делятся на несколько групп.



Пиридин

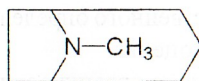


пиперидин

а) простые производные пиридина и пиперидина: лобелин (лобелия вздутая), конинин (болиголов пятнистый).

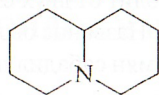
б) бициклические неконденсированные системы: анабазин (анабазис безлистный), никотин (табак).

в) бициклические конденсированные системы пиперидина и пирролидина (тропановые алкалоиды): скополамин, гиосциамин (растения семейства пасленовых).



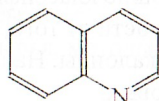
тропан

3. Алкалоиды, производные хинолизидина: термопсин, цитизин (виды термопсиса), пахикарпин (софора толстоплодная).



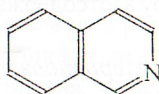
хинолизидин

4. Алкалоиды, производные хинолина: хинин (хинное дерево).



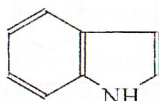
хинолин

5. Алкалоиды, производные изохинолина. Очень большая группа делится на несколько подгрупп. К этой группе относятся морфин, папаверин, кодеин (макснотворный), глауцин (мачок желтый), хелеритрин, берберин, сангвинарин, протопин (чистотел большой, виды мака).



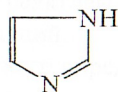
изохинолин

6. Алкалоиды, производные индола: эргометрин, эрготамин (спорынья), зерпин, аймалин (раувольфия змеиная), стрихнин (чилибуха) и др.



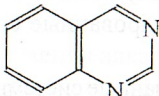
индол

7. Алкалоиды, производные имидазола: пилокарпин (род пилокарпус).



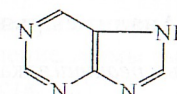
имидазол

8. Алкалоиды, производные хиназолина: пеганин (гармала обыкновенная).



хиназолин

9. Алкалоиды, производные пурина: кофеин, теобромин (чай, кофе, шоколадное дерево).



пурин

10. Дитерпеновые алкалоиды (алкалоиды аконитов и живокостей).

11. Стероидные алкалоиды (алкалоиды чемерицы, паслена дольчатого).

12. Алкалоиды с азотом в боковой цепи или ациклические алкалоиды (без гетероциклов): эфедрин (эфедра хвоцевая), колхамин, колхицин (безвременник великолепный), капсаицин (перец стручковый).

13. Алкалоиды неустановленного строения.

На основании этой классификации классифицируется и сырье, содержащее алкалоиды.

В состав большинства алкалоидов входят углерод, водород, азот и кислород. Кроме того, некоторые алкалоиды содержат в своем составе еще и серу (алкалоиды кубышки желтой).

Большинство кислородосодержащих алкалоидов — твердые кристаллические вещества, реже аморфные, без запаха, горького вкуса, как правило бесцветные, лишь некоторые алкалоиды окрашены — берберин в желтый, сангвинарин в оранжевый цвет.

Небольшая группа бескислородных алкалоидов представлена летучими жидкостями, перегоняющимися с водой, с сильным неприятным запахом (кониин, никотин, пахикарпин). Алкалоиды оптически активны, большая часть вращает плоскость поляризованного луча влево.

Растворимость алкалоидов зависит от того, в какой форме они встречаются. Алкалоиды-основания хорошо растворимы в органических растворителях (исключение кофеин) и нерастворимы в воде (исключение кофеин, эфедрин, эргометрин).

Алкалоиды-соли хорошо растворимы в воде (исключение хинина сульфат) и нерастворимы в органических растворителях (исключение папаверина гидрохлорид — растворим в хлороформе).

Благодаря основному характеру, алкалоиды при взаимодействии с кислотами образуют соли. В растениях алкалоиды находятся обычно в виде солей. Это свойство широко используется при выделении и очистке алкалоидов, их количественном определении и получении препаратов. Другими общими химическими свойствами всех алкалоидов является образование осадков с солями тяжелых металлов, с комплексными соединениями, с некоторыми органическими соединениями кислого характера (пикриновая кислота, таннин). Образующиеся комплексные соединения мало или совсем нерастворимы в воде. Эти свойства алкалоидов используются для их обнаружения.

Кроме того, каждому алкалоиду присущи свои химические свойства, зависящие от его строения (тип фенолов, сложных эфиров и т.п.).

Анализ сырья

Для проведения *качественных реакций* алкалоиды извлекают из сырья обычно 1—5 % кислотой хлористоводородной в соотношении 1:10 при настаивании на кипящей водяной бане.

С фильтратом проводят качественные реакции с общеалкалоидными реактивами. Эти реакции позволяют установить наличие алкалоидов даже при незначительном их содержании. Основаны они на том, что алкалоиды при взаимодействии с реактивами образуют нерастворимые в воде соединения по типу солей аммония.

Все эти реакции мало специфичны и позволяют лишь ориентировочно делать выводы о присутствии алкалоидов.

Общеалкалоидные реактивы:

- Вагнера-Бушарда (раствор йода в калия йодиде) — бурый осадок;
- Майера ($\text{HgCl}_2 \cdot 2\text{KI}$) — белый или желтоватый осадок;
- Драгендорфа ($\text{BiI}_3 \cdot \text{KI}$) — оранжево-красный осадок;
- Марме ($\text{CdI}_2 \cdot 2\text{KI}$) — белый или желтоватый осадок, растворимый в избытке реактива;
- кислота фосфорномолибденовая ($\text{H}_7\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) — желтоватый осадок;
- кислота кремневольфрамовая ($\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) — беловатый осадок;
- кислота пикриновая — желтый осадок;
- таннин — желтоватый.

Хроматограммы алкалоидов чаще всего проявляют (детектируют) реактивом Драгендорфа, парами йода.

Групповые и специфические реакции проводят, если необходимо установить наличие определенного алкалоида или определенной группы алкалоидов в растительном сырье. Специфические реакции проводят с индивидуальными алкалоидами или с очищенной суммой алкалоидов. В качестве специфических реактивов на алкалоиды, при проведении реакций окрашивания, довольно часто используют кислоты концентрированные серную и азотную, а также кислоту концентрированную серную, содержащую формалин (реактив Марки), аммония молибдат (реактив Фреде) и др.

В последнее время для открытия и изучения алкалоидов используются хроматографические методы анализа, УФ-, ИК-, ЯМР-спектры.

* Не дают осадков алкалоиды, не имеющие третичного атома азота: эфедрин, колхамин, капсаицин

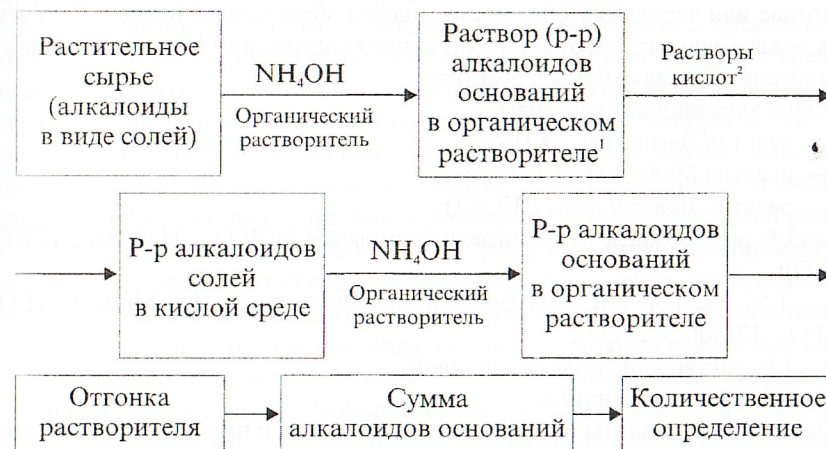
Весь процесс количественного определения алкалоидов в растительном сырье можно разделить на три основные стадии:

- 1) извлечение алкалоидов из сырья;
- 2) очистка извлеченных алкалоидов от сопутствующих веществ: смолы, пигменты, жиры, пектиновых веществ и др.;
- 3) количественное определение суммы выделенных и очищенных алкалоидов или индивидуальных веществ.

Извлечение алкалоидов и их очистка основаны на том, что почти все основания алкалоидов нерастворимы в воде, но растворимы в органических растворителях. Соли же алкалоидов нерастворимы в органических растворителях, но растворимы в воде.

Извлечение алкалоидов из растений можно проводить в виде солей и в виде оснований. Чаще используют методы извлечения алкалоидов из сырья в виде оснований после предварительного перевода солей алкалоидов в основания. Метод извлечения алкалоидов в виде солей (метод Стасс-Отто) применяется в токсикологической химии.

Схема извлечения и очистки алкалоидов



¹ хлороформ, дихлорэтан, диэтиловый эфир и др

² 1 % HCl, 2 % H₂SO₄, 10 % CH₃COOH и др

Практически для каждого вида лекарственного растительного сырья, содержащего алкалоиды, разработаны индивидуальные методы количественного определения алкалоидов, описанные в соответствующих нормативных документах.

Наиболее часто используются следующие методы:

- титриметрический (прямое и обратное титрование, титрование в неводной среде) — сырье сем.пасленовых, трава термопсиса ланцетного;

— гравиметрия (в виде оснований и солей) — дурман индийский (в виде пикратов);

— фотокolorиметрия* — алкалоиды спорыньи;

— спектрофотометрия* — берберин, цитизин и др.

Самостоятельная работа студентов на занятии

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

1 г измельченного растительного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл 1 % раствора кислоты хлористоводородной и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

Задание 2. Проведите качественные реакции на алкалоиды.

1 каплю извлечения помещают на часовое или предметное стекло и добавляют каплю соответствующего реактива 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.

Общеалкалоидные реактивы:

— реактив Вагнера ($I_2 \cdot 2KI$);

— реактив Майера ($HgCl_2 \cdot 2KI$);

— реактив Драгендорфа ($BiI_3 \cdot KI$);

— 1 % раствор кислоты кремневольфрамовой $H_8Si(W_2O_7)_6 \cdot H_2O (SiO_2 : 12WO_3 \times 4 H_2O)$;

— 1 % раствор кислоты фосфорномолибденовой $H_7P(Mo_2O_7)_6 \cdot H_2O \times (H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2 H_2O)$;

— 1 % раствор кислоты пикриновой;

— 10 % раствор таннина.

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 X1, 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 отверстием диаметром 1 мм, взвешивают на ручных весах с погрешностью не более 0,01 г, высыпают в склянку с притертой пробкой вместимостью

* Эти методы часто используются в сочетании с предварительным хроматографическим разделением алкалоидов

250 мл. Под склянку подкладывают лист бумаги для избежания просыпания сырья. Приливают в склянку 150 мл дихлорэтана* (хлороформа), 7 мл раствора аммиака, содержимое 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 в делительную воронку вместимостью 200 мл, добавляют 10 мл воды (удаление аммиака), взбалтывают; хлороформный раствор сливают в мерный цилиндр для измерения объема экстракта*. 15 мл хлороформенного экстракта соответствуют 1 г растительного материала.

Затем вытяжку из цилиндра переливают в делительную воронку вместимостью 200 мл, дважды ополаскивают цилиндр органическим растворителем по 10 мл, который присоединяют к измеренному извлечению. Из экстракта алкалоиды извлекают 1 % раствором кислоты хлористоводородной, взбалтывая экстракт каждый раз по 2 минуты последовательно с 20, 15, 10 и 5 мл 1 % раствора кислоты хлористоводородной 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 или колбу. Органический слой выливают в первую делительную воронку, прибавляют соответствующее количество кислоты и повторяют операцию по извлечению алкалоидов следующей порцией кислоты. Полноту извлечения алкалоидов кислотой проверяют общеалкалоидными реактивами, например, кислотой кремневольфрамовой. Для этого на часовое стекло помещают 5 капель из последнего извлечения и добавляют каплю реактива. Отсутствие осадка или помутнения свидетельствуют о полном извлечении алкалоидов. Затем фильтр дважды промывают 1 % раствором кислоты хлористоводородной 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 с притертой пробкой вместимостью 100 мл. Для проверки полноты извлечения выпаривают на часовом стекле 5 капель последнего хлороформного извлечения, растворяют остаток в 1 % растворе кислоты хлористо-

* Диэтиловый эфир заменен на хлороформ или дихлорэтан

** При работе с делительными воронками необходимо смазывать кран и стеклянную пробку вазелином

водородной, добавляют каплю общелкалоидного реактива, например, кислоты кремневольфрамовой; не должен образоваться осадок или помутнение. После проверки полноты извлечения фильтр промывают дважды хлороформом по 5 мл. Хлороформ отгоняют на кипящей водяной бане, остаток его удаляют продуванием воздухом с помощью груши до полного исчезновения запаха хлороформа. Сухой остаток растворяют при нагревании на кипящей водяной бане в 15 мл растворы кислоты хлористоводородной (0,02 моль/л), избыток последней оттитровывают раствором натрия гидроксида (0,02 моль/л) до желтого окрашивания (индикатор — метиленовый красный). Оттитрованную жидкость не выбрасывают, а используют для хроматографии (задание 4).

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

Содержание алкалоидов в сырье в процентах (X) в пересчете на гиосциамин и 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 натрия гидроксида (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 НД и сделайте заключение о соответствии сырья требованиям НД.

Задание 4. Проведите идентификацию алкалоидов методом распределительной хроматографии.

Оттитрованную жидкость, оставшуюся после количественного определения, подщелачивают аммиаком по фенолфталеиновой бумаге, переносят в делительную воронку и извлекают алкалоиды в течение 3 мин 10 мл хлороформа. Хлороформное извлечение отделяют, 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 слое (Силуфол, Сорбфил).

На линию старта (2 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, отмечают линию фронта растворителя, высу-

шивают 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 растворителя и рассчитывают значения R_f .

2. Хроматография на бумаге.

На полосе хроматографической бумаги проводят графитным карандашом на расстоянии 3—4 см от края стартовую линию и на ней намечают 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 камеру, на дне которой 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.

Ниже приводим пример количественного определения алкалоидов спектрофотометрическим методом в корнях барбариса обыкновенного (ФС 42-1152-78).

Количественное определение. Для определения содержания берберина от средней пробы цельного сырья, отобранного по ГФ XI, ч. 1, отделяют не менее 1 кг, который измельчают до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, тщательно перемешивают, отбирают не менее 250 г сырья, которые измельчают до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. Затем отделяют около 25 г сырья и доводят его измельчение до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

0,5 г (точная навеска) сырья помещают в коническую плоскодонную колбу емкостью 100 мл (с притертой пробкой), прибавляют 0,5 мл 25 % раствора едкого натра, тщательно перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной увлажненной массы, закрывают пробкой и оставляют при комнатной температуре на 2 часа. Затем в колбу прибавляют 50 мл эфира, закрывают пробкой

и взвешивают. Содержимое колбы осторожно взбалтывают круговыми движениями в течение 10 минут и оставляют на ночь. Затем вновь взбалтывают 10 минут, взвешивают и потерю массы пополняют эфиром. Содержимое колбы вновь осторожно перемешивают, дают отстояться, затем берут осторожно, не взмучивая сырья, пипеткой 15 мл эфирного извлечения, помещают в делительную воронку емкостью 100 мл и проводят извлечение алкалоидов 2 % раствором кислоты серной порциями 20, 10 и 10 мл (до отрицательной реакции с кислотой кремневольфрамовой). Объединенные кислотные извлечения помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят объем раствора до метки 2 % раствором кислоты серной. После тщательного перемешивания определяют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны около 420 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

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

$$X = \frac{50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot D}{15 \cdot 128 \cdot (100 - B) \cdot a},$$

где 50 — объем эфирного извлечения, в миллилитрах;

50 — объем сернокислотного извлечения, в миллилитрах;

15 — объем эфирного извлечения, взятого для анализа, в миллилитрах;

128 — удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$ берберина бисульфата при длине волны 420 нм;

D — оптическая плотность сернокислотного извлечения;

a — навеска в граммах;

B — потеря массы сырья при высушивании, в процентах.

Содержание берберина бисульфата должно быть не менее 0,5 %.

ТЕМА 12. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Вопросы для самоподготовки

Понятие о витаминах. Классификация, строение; физико-химические свойства.

Методы обнаружения витаминов в растительном сырье.

Методы количественного определения витаминов.

Латинские и русские названия сырья, производящих растений и семейств; химический состав, препараты и применение видов растений, содержащих витамины: виды шиповника, рябина обыкновенная, ноготки лекарственные, крапива двудомная, кукуруза, пастушья сумка, черная смородина, земляника лесная, облепиха крушиновидная, калина обыкновенная.

Формулы кислоты аскорбиновой, витамина K_1 , β -каротина.

Контрольные вопросы для усвоения материала

1. Как классифицируют витамины по физическим свойствам, химической структуре и фармакологическому действию?
2. Какая структура лежит в основе строения витамина K_1 ?
3. Какие методы предложены для качественного и количественного определения витамина K_1 ?
4. Какая структура лежит в основе строения аскорбиновой кислоты?
5. Какой реактив используют для обнаружения аскорбиновой кислоты? Химизм реакции. Количественное определение аскорбиновой кислоты
6. Какая структура лежит в основе строения β -каротина?
7. Какие качественные реакции используют для обнаружения каротиноидов?
8. Какой метод применяют для количественного определения каротиноидов в сырье?

Витамины — природные незаменимые органические вещества разного химического строения, синтезируемые главным образом растениями, частично микроорганизмами, которые участвуют в обмене веществ в составе ферментных систем.

В клетках растений витамины могут быть в свободном состоянии или связанном (фосфорилированные, протеинизированные и др.). Для них характерна

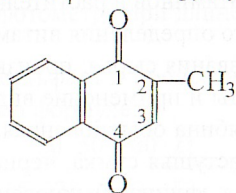
высокая биологическая активность. Отсутствие или недостаток витаминов приводит к развитию гипо- или авитаминозов.

Первая классификация витаминов была буквенная в соответствии с латинским алфавитом и связана с физиологическим действием витаминов (А, В, С, D, Е и т.д.). Несколько позднее их стали классифицировать по физическим свойствам: водорастворимые (В₁, В₂, кислота аскорбиновая, витамин Р и др.) и жирорастворимые (каротиноиды, филлохинон, токоферолы и др.).

По химическому строению их делят на: алифатические (С, В₃, F и др.), ароматические (К), гетероциклические (Е, Р, РР, группа В).

Витамин К₁ (филлохинон)

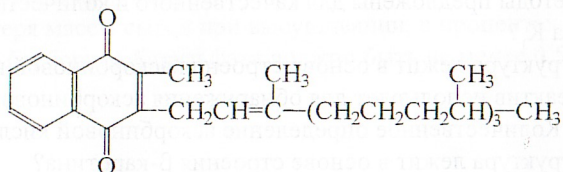
В основе строения витамина К₁ лежит структура 2-метил-1,4-нафтохинон.



Природные витамины группы К в положении С₃ имеют изопреноидную цепочку. Известно три витамина К — К₁, К₂, К₃, которые различаются физическими свойствами и строением изопреноидной цепочки.

Витамины К₂ и К₃ являются кристаллическими веществами и содержатся главным образом в микроорганизмах.

Витамин К₁ содержится в растениях и его изопреноидная цепочка представлена фитолом.



Витамин К₁ — светло-желтая маслянистая жидкость, которая кристаллизуется при температуре -20 °С, кипит при 115—145 °С в вакууме. Хорошо растворим в хлороформе, этиловом спирте, в неполярных растворителях, жирах. Его растворы поглощают УФ-свет.

Витамин К₁, являясь первичным метаболитом, участвует в окислительно-восстановительных процессах. Это свойство витамина К₁ используется при количественном определении его полярографическим методом.

Сырье, содержащее витамин К₁, стандартизуют по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70 % этанолом (трава пастушьей сумки, столбики с рыльцами кукурузы). Для обнаружения витамина К₁ можно использовать тонко-

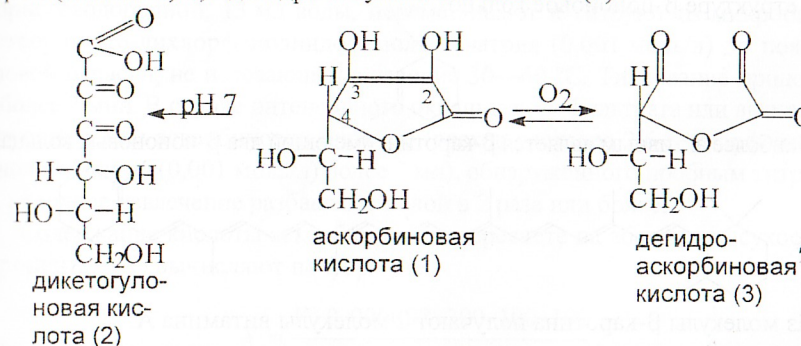
слойную хроматографию на пластинках Силуфол. В УФ-свете витамин К₁ обнаруживается в виде зеленовато-желтого пятна.

На основе этой реакции разработан хроматоспектрофотометрический метод количественного определения содержания витамина К₁ в листьях крапивы.

Витамин К₁ извлекают при комнатной температуре гексаном (1:10), хроматографируют на пластинках «Силуфол» (система бензол-петролейный эфир 1:1). Хроматограммы просматривают в УФ-свете, через 2-3 мин витамин К₁ начинает флуоресцировать в виде зеленовато-желтого пятна. Вещество элюируют дважды гексаном и определяют оптическую плотность раствора при 249 нм в кювете с толщиной слоя 1 мм.

Аскорбиновая кислота (витамин С, антицинготный фактор)

Витамин С имеет эмпирическую формулу С₆Н₈О₆, он является внутренним эфиром (лактоном) 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты (1).



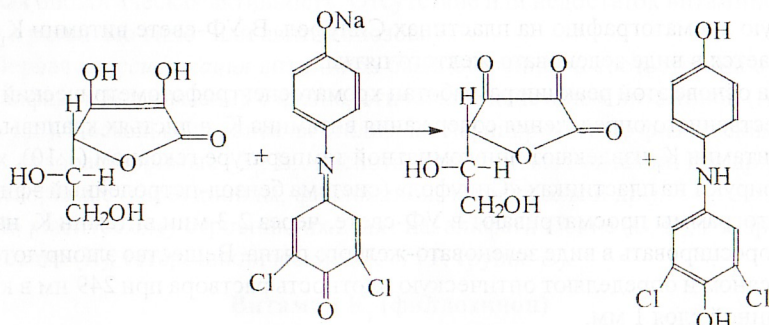
Аскорбиновая кислота отличается большой неустойчивостью и легко разлагается в щелочной среде, при нагревании, кислородом воздуха, окислительными ферментами (оксидазой, аскорбинооксидазой). В щелочной среде она дает дикетогулоновую кислоту (2), которая не обладает витаминной активностью.

Дегидроаскорбиновая кислота (3) образуется при быстром и обратимом окислении витамина С и обладает антицинготным действием.

Витамин С представляет белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде, спирте, нерастворим в органических растворителях (эфир, хлороформ, бензол).

Для обнаружения аскорбиновой кислоты на хроматограммах используют 0,04 % раствор 2,6-дихлорфенолиндофенялята натрия. Она проявляется в виде белого пятна на розовом фоне. Этот реактив используют также при количественном определении аскорбиновой кислоты в сырье.

Готовят водное извлечение из сырья при комнатной температуре настаиванием, фильтруют. Титруют быстро в кислой среде 2,6-дихлорфенол-индофенялятом натрия. Аскорбиновая кислота восстанавливает этот реактив, появляется розовое окрашивание, не исчезающее в течение 30—60 секунд.

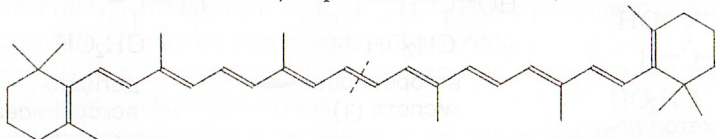


Каротиноиды (провитамин А)

Каротиноиды относятся к классу тетратерпеноидов ($C_{40}H_{56}$) и представлены примерно 70 соединениями. Провитамином А являются 9 веществ, имеющих в своей структуре β -иононовое кольцо.



Наиболее активным является β -каротин, имеющий два β -иононовых кольца.



Из молекулы β -каротина получают 2 молекулы витамина А.

Высокоплавкие желтые, оранжевые, красно-оранжевые вещества, легко растворимые в органических растворителях, жирах, не растворимые в воде. Растворы имеют окраску от желтой до оранжевой и оранжево-красной с желтовато-зеленой флуоресценцией. Это свойство используется при количественном определении каротиноидов. Они легко окисляются кислородом воздуха, разрушаются на свету. Кислая среда ускоряет окисление каротиноидов.

Из сырья каротиноиды извлекают хлороформом, фильтруют. К хлороформному извлечению прибавляют кислоту концентрированную серную. Появляется синее окрашивание, переходящее в слой кислоты.

При использовании кислоты концентрированной азотной появляется синее окрашивание, переходящее в зеленое и грязно-желтое.

Для обнаружения каротиноидов можно использовать тонкослойную хроматографию на силикагеле. Хроматограммы проявляют 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этиловом спирте (+60—80 °С). На желто-зеленом фоне каротиноиды обнаруживаются в виде пятен синего цвета.

Количественное содержание каротиноидов в сырье определяют спектрофотометрическим методом при длине волны 450 нм с синим светофильтром в

цвете с толщиной слоя 10 мм. Измеряют оптическую плотность стандартного образца (раствора дихромата калия). Из сырья каротиноиды извлекают абсолютным спиртом или петролевым эфиром. Высушивают над безводным сульфатом натрия.

Самостоятельная работа студентов на занятии

Задание 1. Количественное определение кислоты аскорбиновой в плодах шиповника (ГФ XI, ч. 2, с. 295).

Из грубо измельченной аналитической пробы плодов берут навеску массой 20 г, помещают в фарфоровую ступку, где тщательно растирают со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивают 10 мин. Затем смесь размешивают и извлечение фильтруют. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2 % раствора кислоты хлористоводородной, 13 мл воды, перемешивают и титруют из микроюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30—60 °С. Титрование продолжают не более 2 мин. В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты (расход раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) более 2 мл), обнаруженного пробным титрованием, исходное извлечение разбавляют водой в 2 раза или более.

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

$$X = \frac{V \cdot 0,000088 \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

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

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

m — масса сырья в граммах; W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

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

Установка титра. Несколько кристаллов (3—5) кислоты аскорбиновой растворяют в 50 мл 2 % раствора кислоты серной; 5 мл полученного раствора тит-

руют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 1—2 мин.

Другие 5 мл этого же раствора кислоты аскорбиновой титруют раствором калия йодата (0,001 моль/л) в присутствии нескольких кристаллов (около 2 мг) калия йодида и 2-3 капель раствора крахмала до появления голубого окрашивания.

Поправочный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = \frac{V}{V_1},$$

где V — объем раствора калий йодата (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах;

V_1 — объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, в миллилитрах.

Задание 2. Количественное определение каротиноидов в плодах облепихи (ТУ 64-4-72-88).

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 вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл петролейного эфира (т. кип. 40—70 °С) и перемешивают в течение 30 мин. Извлечение осторожно декантируют в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, остаток в колбе заливают новой порцией (20 мл) того же растворителя. Извлечение таким способом повторяют до тех пор, пока растворитель не перестанет окрашиваться. Объединенные извлечения высушивают безводным натрия сульфатом до исчезновения мутности раствора и фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 200 мл. Натрия сульфат еще раз промывают 20 мл петролейного эфира, который объединяют с извлечением. Объем раствора доводят до метки.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром или спектрофотометре при длине волны 450 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют петролейный эфир.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца калия дихромата, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Содержание суммы каротиноидов в сырье (в мг %) (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 0,00208 \cdot 100 \cdot 100}{D_1 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

D_1 — оптическая плотность раствора стандартного образца калия дихромата;

0,00208 — количество каротина в растворе, соответствующее по концентрации 1 мл раствора стандартного образца калия дихромата, в миллиграммах;

V — объем извлечения в миллилитрах;

m — навеска сырья в граммах;

W — потеря в массе при высушивании в процентах.

Приготовление раствора стандартного образца калия дихромата.

0,3600 г (точная навеска) калия дихромата х.ч. растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки. Раствор такой концентрации соответствует раствору, содержащему 0,00208 мг каротина в 1 мл.

Необходимые реактивы: калий двуххромовокислый (калия дихромат) х.ч. вода дистиллированная.

ТЕМА 13. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Цель занятия. Научиться проводить полный товароведческий анализ ЛРС, оценивать качество сырья согласно требованиям НД.

Задания для самоподготовки и контроля усвоения материала занятия

1. Понятие о товароведческом анализе. Цель анализа. Какими документами руководствуются при его проведении?
 2. Что такое партия и серия сырья? Какими документами они сопровождаются?
 3. Как проводится осмотр поступившей партии ЛРС по ОФС 42-0013-03?
 4. При наличии каких примесей и дефектов ЛРС не подлежит приемке?
 5. Что такое выборка? Как определяют объем выборки?
 6. Что такое точечная, объединенная и средняя пробы? Техника их отбора. Какими документами руководствуются при их отборе?
 7. Сколько аналитических проб и для каких целей выделяется из средней пробы? Техника отбора.
 8. Правила анализа первой аналитической пробы по ГФ Х1.
 9. Как проводится определение измельченности ЛРС по ГФ Х1?
 10. Назовите виды примесей к ЛРС. Техника их определения.
 11. Назовите вредителей ЛРС. Правила определения степени зараженности амбарными вредителями. Пути использования сырья при различной степени зараженности.
 12. Какие пробы, кроме средней, выделяются из объединенной пробы?
 13. Понятие о влажности сырья. Методика определения «товароведческой» и «абсолютной» влажности.
 14. Понятие об общей золе и золе, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной. Методика их определения.
 15. Понятие об экстрактивных веществах. В каких случаях они определяются? Методика их определения.
- Товароведческий анализ имеет целью определить подлинность и доброкачественность ЛРС, пригодность его для медицинского применения. Начинается он с приемки ЛРС, отбора проб. Включает такие виды фармакогностического анализа, как макро- и микроскопический (определение подлинности), химический и биологический, а также определение влаги, золы, измельченности, допус-

тимых примесей, степени зараженности амбарными вредителями, микробиологической чистоты, содержания радионуклидов.

Правила приемки ЛРС и методы отбора проб изложены в ОФС 42-0013-03; анализ на содержание влаги, измельченности, примесей; степени зараженности вредителями изложены в ГФ Х1, ч. 1, с. 275-286, экстрактивных веществ — с. 295; золы — ГФ Х1, ч. 2, с. 24-25*.

В медицинской практике может использоваться сырье, отвечающее всем требованиям НД на конкретный вид ЛРС.

Приемка ЛРС проводится партиями («ангро») или сериями (фасованное сырье).

Партия — определенное количество цельного, обмолоченного, прессованного ЛРС одного наименования, однородное по способу подготовки и показателям качества, оформленное одним документом, удостоверяющим его качество, предназначенное для производства промышленных серий фасованной продукции в упаковке «ангро» и в потребительской упаковке.

Документ содержит:

- номер и дату выдачи документа, адрес отправителя;
- наименование сырья;
- номер партии;
- массу партии (серии);
- год, месяц заготовки (для «ангро»);
- район заготовки (дикорастущие ЛР);
- вид НД на ЛРС;
- подпись лица, ответственного за качество, с указанием фамилии и должности.

Серия ЛРС — определенное количество однородного по всем показателям фасованного ЛРС (цельное, измельченное, порошок), произведенное в течение одного технологического цикла, оформленное одним документом качества. Серия формируется из одной или нескольких (не более 3) партий сырья.

Партия (серия) состоит из единиц продукции (транспортная упаковка: мешки, ящики, тюки и др.).

Транспортная упаковка ЛРС (единицы продукции) — упаковка, представляющая один из видов транспортной тары, указанная в частных фармакопейных статьях.

Потребительская упаковка ЛРС — упаковка лек. средства, поступающая к потребителю, обеспечивающая его сохранность и неизменность свойств в течение установленного срока годности.

* Полный товароведческий анализ проводится обычно на аптечных складах, базах, фармацевтических предприятиях по переработке ЛРС

Фасованная продукция — определенное количество (масса) ЛРС цельного, измельченного или порошка, помещенное в потребительскую упаковку, предназначенное для приготовления настоев и отваров, или в упаковку «ангро», предназначенную для изготовления лекарственных средств (настоек, экстрактов и др.).

Приемка ЛРС включает:

- внешний осмотр упаковки;
- определение ее качества, цельности;
- определение правильности маркировки и оформления сопроводительной документации;
- проверку соответствия тары и упаковки требованиям НД на конкретное сырье;
- отбор проб.

Пробы отбираются только из неповрежденных единиц продукции (ЕП), упакованных согласно стандартам качества.

Не допускается отбор проб одновременно от двух партий или серий.

Виды продукции, подлежащие отбору проб:

- ЛРС «ангро» (партия);
- фасованное ЛРС (серия).

Отбор образцов для испытаний осуществляет представитель анализирующей организации или подразделения. Должны соблюдаться санитарно-гигиенические требования; при отборе проб ядовитого и сильнодействующего ЛРС соблюдают меры предосторожности, предусмотренные соответствующими инструкциями и положениями.

Пробы отбираются в количестве, необходимом для проведения трех анализов (включая арбитражный).

Серия (партия) ЛРС, от которой отобраны образцы на анализ, должна храниться изолированно до получения результатов контроля.

Арбитражные образцы хранятся в течение срока годности ЛРС в специальных помещениях, обеспечивающих их сохранность в условиях, предусмотренных НД. По истечении срока хранения образцы, не удовлетворяющие требованиям стандартов качества, подлежат уничтожению в установленном порядке.

Отбор проб ЛРС «ангро» (партия)

Отбор проб представляет ряд последовательных операций, включающих:

- выборку единиц продукции для взятия проб,
- непосредственный отбор проб,
- маркировку образцов и документальное оформление отбора проб.

Для проверки соответствия качества ЛРС требованиям стандартов качества отбирают методом случайного или систематического отбора выборку из неповрежденных транспортных упаковок (единиц продукции), взятых в количестве, указанном табл. 1. Проверку качества ЛРС в поврежденных единицах продукции производят отдельно от неповрежденных, вскрывая каждую единицу про-

дукции. Выборка — совокупность единиц продукции (транспортных упаковок или упаковок «ангро»), отобранных для проведения анализа из партии ЛРС или серии фасованной продукции.

Неполные 10 единиц продукции приравниваются к 10 единицам (например при наличии в партии 51 единиц продукции объем выборки составляет 6 единиц).

Попавшие в выборку единицы продукции вскрывают и путем внешнего осмотра определяют однородность сырья по способу подготовки (цельное, обмолоченное, прессованное), по цвету, запаху, засоренности; наличию плесени, гнили, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренности ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т.д.) Одновременно невооруженным глазом и с помощью лупы (5—10х) определяют наличие амбарных вредителей.

Таблица 1

Объем выборки лекарственного растительного сырья «ангро»

№ п/п	Количество транспортных упаковок (единиц продукции)	Объем выборки
1	от 1—5	Все транспортные единицы
2	от 6—50	5 транспортных единиц
3	свыше 50	10 % транспортных единиц от партии

При установлении при внешнем осмотре неоднородности ЛРС, наличии плесени и гнили, засоренности посторонними растениями в количествах, явно превышающих допустимые примеси, партия может быть принята только после того, как будет рассортирована и вторично предъявлена к сдаче.

При обнаружении в сырье затхлого, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании, ядовитых растений и посторонних примесей (помет грызунов и птиц, стекло и др.), зараженности амбарными вредителями II и III степеней партия сырья не подлежит приемке.

Из каждой единицы продукции, отобранной для вскрытия, берут, избегая измельчения, 3 точечные пробы: сверху, снизу и из середины. Точечная проба — минимальное количество пробы, отобранное от каждой единицы продукции за один прием для составления объединенной пробы. Из мешков, тюков и кип точечные пробы отбирают на глубине не менее 10 см сверху, затем, после распаривания по шву, из середины и снизу; точечные пробы семян и сухих плодов отбирают зерновым шупом. Из ЛРС, упакованного в ящик, первую точечную пробу отбирают из верхнего слоя, вторую — из середины и третью — со дна ящика. Точечные пробы должны быть примерно одинаковыми по массе. Из всех точечных проб, осторожно перемешивая, составляют объединенную пробу.

В случае, если масса объединенной пробы недостаточна для проведения испытаний, отбор точечных проб повторяют.

Из объединенной пробы методом квартования выделяют следующие пробы в приведенной ниже последовательности:

- пробу для определения степени зараженности амбарными вредителями массой 500 г для мелких видов сырья и массой 1000 г для крупных видов сырья;
- средняя проба (для выделения аналитических проб) в соответствии с указаниями табл. 2 и 3;
- пробу для определения микробиологической чистоты массой 50—200 г;
- пробу для определения радионуклидов в соответствии с указаниями табл. 4 (схема 1).

Для этого ЛРС разравнивают на гладкой, чистой, ровной поверхности в виде квадрата по возможности тонким равномерным по толщине слоем и по диагонали делят на четыре треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют вместе и перемешивают. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не останется количество сырья в двух противоположных треугольниках, соответствующее массе одной из заданных проб. Допустимые отклонения в массе каждой из проб не должны превышать $\pm 10\%$ (рис. 6).

Из средней пробы методом квартования выделяют 3 аналитические пробы для определения:

- подлинности, измельченности и содержания примесей;
- влажности (аналитическую пробу для определения влажности отделяют сразу же после отбора средней пробы и упаковывают герметически);
- содержания золы и действующих веществ.

Для таких видов сырья, как цельная трава, корни, корневища, клубни, после выделения аналитической пробы для определения подлинности, измельченности и содержания примесей часть средней пробы, предназначенную для определения влажности, содержания золы и действующих веществ, измельчают ножницами или секатором на крупные куски, тщательно перемешивают и затем выделяют соответствующие аналитические пробы (схема 1).

Если при выделении аналитических проб в двух противоположных треугольниках масса сырья окажется меньше или больше указанной в табл. 3, следует из оставшихся двух треугольников отделить сырье по всей толщине слоя или таким же образом удалить его из отобранных треугольников. Аналитические пробы должны быть взвешены с погрешностью \pm :

- 0,01 — при массе пробы до 50 г;
- 0,1 — при массе пробы от 100 до 500 г;
- 1,0 — при массе пробы от 500 до 1000 г;
- 5,0 — при массе пробы более 1000 г.

Таблица 2

Масса средних проб ЛРС

Наименование сырья	Масса средней пробы, г
Березы почки	150
Сосны почки	350
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	400
семя лиственничное	200
толокнянки и брусники листья	150
листья резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	200
Цветки цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	300
полюны цитварной цветки	150
погостков цветки, кукурузы столбики с рыльцами	200
бузины черной цветки	75
ромашки аптечной цветки	200
ромашки далматской цветки	400
Трава цельная, побеги, кроме нижеперечисленных:	600
душицы трава	150
анабазиса побеги	200
Трава резаная, обмолоченная, измельченная, порошок	200
Сочные плоды цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200
шиповника плоды	300
стручкового перца плоды	550
Сухие плоды и семена цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	300
дурмана индийского, термопсиса, семена льна	200
амми плоды и джуга семена	150
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	600
марены корневища и корни, лапчатки корневища	400
салепы клубни	200
девясилы корневища и корни	1000
папоротника мужского корневища и ревеня корни	1500
Туркестанский мыльный корень	10300
солодки корни очищенные	2500
солодки корни неочищенные, барбариса корни	6000
корни и корневища резаные, дробленые, измельченные	250
корни и корневища порошок	150
Кора цельная	600
кора резаная, измельченная, порошок	200

Окончание таблицы 2

Прочее растительное сырье:	
ликоподий	100
спорыньи рожки	200
чага	3000
ламинарии слоевища цельные	5000
ламинарии слоевища шинкованные	1000
ламинарии слоевища порошок	400
Сырье животного происхождения:	
бадяга	150

Таблица 3

Масса аналитических проб ЛРС

Наименование сырья	Масса аналитической пробы (г) для определения		
	подлинности, измельченности и примесей	влажности	содержания золы и действующих веществ
Березы почки	50	25	25
Сосны почки	200	25	100
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	200	25	150
сенны листья	100	15	50
толокнянки и брусники листья	50	25	50
листья резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	50	25	100
Цветки цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
полыни цитварной цветки	25	15	50
ноготков цветки, кукурузы столбики с рыльцами	100	25	50
бузины черной цветки	20	15	50
ромашки аптечной цветки	50	25	100
ромашки далматской цветки	300	25	50
Трава цельная, побеги, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
анабазиса побеги	50	25	100
Трава резаная, обмолоченная, измельченная, порошок	50	25	100
Сочные плоды цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	100	50	50
шиповника плоды	200	25	50
стручкового перца плоды	300	25	150

Окончание таблицы 3

Сухие плоды и семена цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
дурмана индийского, термопсиса, семена льна	50	25	100
амми плоды и джута семена	10	25	100
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
марены корневища и корни, лопуха корневища	200	50	100
сапсена клубни	100	25	50
девяссила корневища и корни	600	50	100
панотника мужского корневища и ревеня корни	1000	100	300
туркестанский мыльный корень	10000	200	—
солодки корни очищенные	2000	100	200
солодки корни неочищенные, барбариса корни	5000	100	500
корни и корневища резаные, дробленые, измельченные	100	25	100
корни и корневища порошок	50	15	25
Кора цельная	400	50	100
кора резаная, измельченная, порошок	100	25	50
Прочее растительное сырье:			
ликоподий	50	25	25
спорыньи рожки	50	25	100
чага	2000	500	100
ламинарии слоевища цельные	3000	500	1000
ламинарии слоевища шинкованные	500	100	300
ламинарии слоевища порошок	100	50	200
Сырье животного происхождения:			
бадяга	50	25	25

Пробу для установления степени зараженности амбарными вредителями помещают в плотно закрывающуюся емкость. Среднюю пробу и пробы для определения радионуклидов и микробиологической чистоты упаковывают каждую в полиэтиленовый или многослойный бумажный пакет. К пакету или емкости прикрепляют этикетку, такую же этикетку вкладывают внутрь мешка или емкости.

Таблица 4

Масса пробы ЛРС «ангро» для определения радионуклидов

№ п/п	Наименования	Масса средней пробы (не менее) г
1	Листья	600
2	Трава	600
3	Цветки	600
4	Плоды	1000
5	Семена	1000
6	Кора	1000
7	Корни и корневища	1000
8	Сборы	600
9	Прочее	1000

При установлении в результате испытаний несоответствия качества сырья требованиям нормативной документации проводят его повторную проверку. Для повторного анализа от нескрытых единиц продукции отбирают выборку в соответствии с табл. 1. Результаты повторного анализа являются окончательными и распространяются на всю партию.

Примечание.

Отбор проб корня женьшеня осуществляется в соответствии с частной фармакопейной статьей.

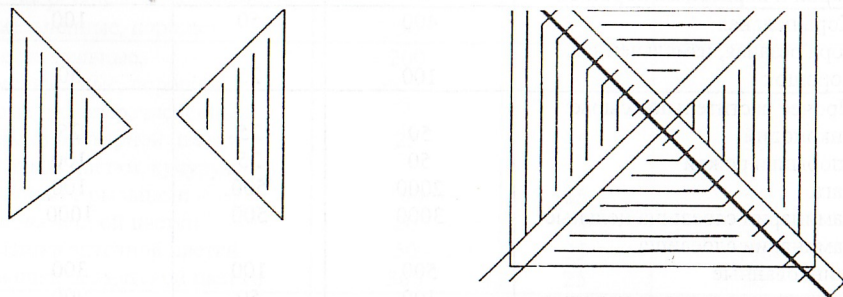


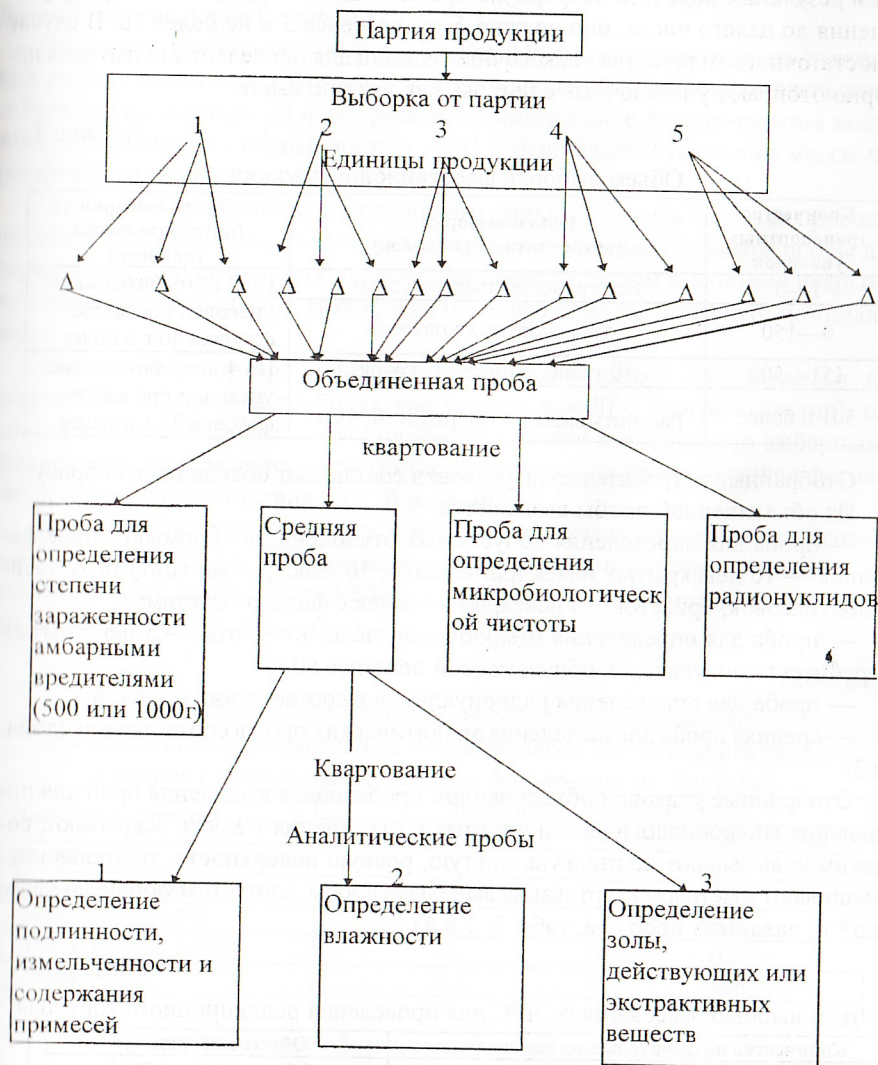
Рис. 6. Выделение проб путем квартования (пояснения в тексте)

Отбор проб ЛРС фасованного (серия)

ЛРС и сборы поступают в обращение расфасованные «ангро» (цельное, измельченное и в виде порошка) и в потребительских упаковках — пачках, пакетах, фильтр-пакетах, в виде брикетов.

Приемку фасованной продукции ЛРС проводят сериями. Единицы продукции в выборку необходимо отбирать случайным образом или методом систематического отбора. Объем выборки зависит от количества транспортных упаковок в серии фасованной продукции.

Схема 1. Порядок отбора проб от партии ЛРС (по ОФС 42-0013-03)



Попавшие в выборку транспортные упаковки продукции вскрывают и из разных мест каждой транспортной упаковки случайным образом или методом систематического отбора отбирают потребительские упаковки в соответствии с табл. 5.

При отборе серии более 500 транспортных единиц для расчета количества транспортных единиц при вскрытии используют формулу:

$0,4\sqrt{n}$, где n — количество упаковочных единиц в одной серии. Полученное в результате подсчета по формуле дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30. В случае недостаточного количества упаковочных единиц для проведения испытания повторно отбирают упаковочные единицы, как указано выше.

Таблица 5

Объем выборки фасованной продукции

Количество транспортных упаковок	Объем выборки (транспортных упаковок)	Объем выборки (потребительских упаковок)
1—5	Все транспортные упаковки	По 2 потребительские упаковки при массе фасовки 40 г и более
6—150	5 транспортных упаковок	По 2 потребительские упаковки при массе фасовки 40 г и более
151—500	10 транспортных упаковок	По 4 потребительские упаковки при массе фасовки 35 г и менее
501 и более	Рассчитывается по формуле $0,4\sqrt{n}$	По 4 потребительские упаковки при массе фасовки 35 г и менее

Отобранные потребительские упаковки составляют объединенную пробу.

Из объединенной пробы выделяется:

— проба для определения допустимых отклонений на промышленное фасование — 10 невскрытых пачек или пакетов, 10 невскрытых контурных ячейковых упаковок, брикетов, 10 невскрытых пачек с фильтр-пакетами;

— проба для определения микробиологической чистоты — 5 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 50 г;

— проба для определения радионуклидов в соответствии с табл. 6;

— средняя проба для выделения аналитических проб в соответствии с табл. 2 и 3.

Отобранные упаковки объединенной пробы после выделения проб для определения микробиологической чистоты и отклонения в массе вскрывают, содержимое высыпают на гладкую, чистую, ровную поверхность, тщательно перемешивают и методом квартования выделяют пробы, соответствующие по массе одной из заданных проб (см. табл. 2, 3 и 6).

Таблица 6

Объем выборки фасованного ЛРС для проведения радиационного контроля

Количество потребительских упаковок, шт.	Объем выборки, шт.
От 100	2 (но не менее 70 г)
от 101 до 200	3 (но не менее 70 г)
от 201 до 500	4 (но не менее 70 г)
от 500 и более	5 (но не менее 70 г)

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов «ангро», а также в пачках и пакетах проводят по ОСТу 64-492-85.

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов в фильтр-пакетах проводят по следующей методике:

10 пачек с фильтр-пакетами пробы для определения допустимых отклонений массы содержимого упаковки при промышленном фасовании вскрывают, отбирают произвольно 20 фильтр-пакетов, содержимое фильтр-пакетов высыпают и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Вычисляют отклонение массы порошка в фильтр-пакете от номинальной.

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов в брикетах проводят по следующей методике: 10 контурных ячейковых упаковок брикетов пробы для определения допустимых отклонений при промышленном фасовании вскрывают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Вычисляют отклонения массы брикета от номинальной.

Выборку и отбор проб из серий фасованного «ангро» ЛРС цельного, измельченного и порошка проводят, как указано для ЛРС «ангро» (партия), исключая выделение пробы для установления степени зараженности амбарными вредителями; определение допустимых отклонений на промышленное фасование проводят в соответствии с ОСТом 64-492-85.

В случае обнаружения живых и мертвых амбарных вредителей в фасованной продукции лекарственного растительного сырья и сборах проводят отбор дополнительной пробы массой 500 г для их определения (методика определения по ГФ XI, в. 1, с. 276).

Таблица 7

Допустимые отклонения массы содержимого упаковки при промышленном фасовании лекарственного растительного сырья и сборов («ангро», пачки, пакеты, фильтр-пакеты, брикеты)

Диапазон измеряемых масс, г	Допустимые отклонения, \pm %	
	для одной упаковки	для десяти упаковок
До 100	5	1,6
Свыше 100 до 200	3	0,9
Свыше 200 до 1000	2	0,6
Свыше 1000 до 10000	1	0,3
Свыше 10000	0,2	0,06

Требования к оборудованию при отборе проб

Для отбора проб продуктов на складах сотрудник должен иметь в своем распоряжении все инструменты, необходимые для вскрытия упаковок, контейнеров и т.д., включая ножи, клещи, пилы, молотки, гаечные ключи, средства для удаления пыли (например, щетки) и материалы для повторного запечатывания упаковок (например, клейкая лента), а также самоклеящиеся этикетки, на которых следует указывать, что часть содержимого из упаковки или контейнера была извлечена.

Все инструменты и приспособления должны содержаться в чистоте. Перед повторным использованием их следует вымыть, прополоскать водой.

В качестве инструмента для отбора проб могут использоваться щупы (ТУ 64-1-2229-76), совки и др.

Требования к персоналу, проводящему отбор проб

Требования к квалификации персонала

Персонал, проводящий отбор проб, должен руководствоваться в своей работе настоящими правилами. Персонал должен владеть знаниями о:

- технических приемах и оборудовании для отбора проб;
- риске перекрестной контаминации;
- подлежащих соблюдению мерах предосторожности в отношении ядовитых и сильнодействующих ЛС;
- важности визуального осмотра исходного сырья, материалов, тары и этикеток;
- важности протоколирования любых непредвиденных или необычных обстоятельств.

Требования к личной гигиене персонала

При отборе проб запрещается принимать пищу, пить, курить, а также хранить еду, средства для курения в специальной одежде или месте отбора проб. Персонал, занятый отбором проб лекарственных средств, должен строго соблюдать инструкции, регламентирующие состояние здоровья и требования личной гигиены, носить технологическую одежду.

Маркировка образцов

На транспортные упаковки, из которых были отобраны пробы, и на тару с пробой ответственный за отбор проб должен наклеить этикетку. На отобранной пробе указывают:

- наименование лекарственного сырья;
- производитель (поставщик);
- номер серии (партии);
- номер сопроводительных документов (сертификата);
- дата и место отбора пробы;
- условия хранения пробы;
- срок хранения пробы, номера емкости (упаковочной единицы), из которой отобрана проба;
- ФИО ответственного за отбор проб;
- номер записи в журнале регистрации отбора проб;
- указание, для какого вида анализа предназначена проба.

Документальное оформление отбора проб.

Отбор проб для проведения контроля качества лекарственных средств должен проводиться комиссионно. Процедура отбора должна быть задокументирована.

На этикетке емкости, из которой отобрана проба, указывают:

- наименование лекарственного сырья, номер серии (партии);
- производитель (поставщик);
- количество отобранной пробы;
- ФИО ответственного за отбор пробы;
- дата и место отбора пробы;
- номер записи в журнале регистрации отбора проб.

После проведения отбора проб составляется акт отбора, в котором указываются лица, производившие отбор (ФИО, должность), дата и место отбора проб, наименование продукции, производитель, номер серии, объем поставки, количество отобранных проб (с учетом архивного образца), срок годности. Один экземпляр акта остается в организации, в которой отбирались образцы, второй — сопровождает образец.

В журнал регистрации отбора проб заносится:

- название ЛС;
- производитель ЛС;
- дата поступления ЛС;
- количество транспортных единиц, из которых отобрана проба;
- дата отбора проб;
- масса отобранной пробы;
- общие замечания (включая все выявленные при внешнем осмотре недостатки);
- ФИО лица, производившего отбор проб.

К образцу прикладывается копия акта отбора средней пробы, сопроводительные документы и вспомогательная документация (сертификаты или аналитический паспорт).

Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья амбарными вредителями

Исследование на наличие амбарных вредителей проводят в обязательном порядке при приемке лекарственного растительного сырья, а также ежегодно при хранении.

Сырье проверяют на наличие живых и мертвых вредителей путем осмотра невооруженным глазом и в помощь лупы (5—10х) при внешнем осмотре, а также при определении измельченности и содержания примесей. При этом обращают внимание на наличие частей сырья, поврежденных амбарными вредите-

лями. Кроме сырья, тщательно просматривают швы, складки упаковочного материала, щели в ящиках. При обнаружении в сырье амбарных вредителей определяют степень его зараженности, используя специально выделенную аналитическую пробу.

Аналитическую пробу сырья просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм. В сырье, прошедшем сквозь сито, проверяют наличие клещей; в сырье, оставшемся на сите, — наличие моли, точильщика и их личинок и других живых и мертвых вредителей. Количество клещей подсчитывают, используя лупу, моли, ее личинок, куколок и других вредителей — невооруженным глазом и с помощью лупы. Количество найденных вредителей и их личинок пересчитывают на 1 кг сырья и устанавливают степень его зараженности.

При наличии в 1 кг сырья не более 20 клещей [клещ мучной (*Tyroglyphus farinae* L.), клещ волосатый (*Glyciphagus destructor* Schrank.), клещ хищный (*Cheyletus eruditus* Schrank.), сухофруктовый клещ (*Carpoglyphus lactis* L.) и др.] зараженность сырья клещем относят к I степени; при наличии более 20 клещей, свободно передвигающихся по поверхности сырья и не образующих сплошных масс, — ко II степени; если клещей много, они образуют сплошные войлочные массы, движение их затруднено — к III степени.

При наличии в 1 кг сырья амбарной моли (*Tinea granella* L.) и ее личинок, а также хлебного точильщика (*Sitotreta granivora* L.) и других вредителей в количестве не более 5 зараженность относят к I степени; при наличии 6—10 вредителей — ко II степени, более 10 вредителей — к III степени.

В случае обнаружения в лекарственном растительном сырье амбарных вредителей его подвергают дезинсекции, после чего просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм (при зараженности клещами) или с диаметром отверстий 3 мм (при зараженности другими вредителями).

После обработки сырье используют в зависимости от степени зараженности. При I степени зараженности сырье может быть допущено к медицинскому применению, при II степени и в исключительных случаях при III степени зараженности сырье может быть использовано для переработки с целью получения индивидуальных веществ.

Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье (1-ая аналитическая проба)

Подлинность сырья, измельченность и содержание примесей определяют в аналитической пробе, масса которой для каждого вида сырья приведена в табл. 3.

Определение подлинности

Подлинность сырья устанавливают по внешним признакам, анатомо-диагностическим признакам при микроскопическом исследовании и качественными реакциями в соответствии с требованиями нормативной документации.

Микроскопическое исследование проводят при затруднении определения подлинности сырья по внешним признакам и качественным реакциям.

Методы определения подлинности приведены в соответствующих статьях («Листья», «Травы», «Кора», «Корни, корневища, луковичи, клубни, клубнелуковичи», «Цветки», «Плоды», «Семена» ГФ XI, ч. 1).

Определение измельченности

Пробу сырья помещают на сито, указанное в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье, и осторожно, плавными вращательными движениями просеивают, не допуская дополнительного измельчения. Просеивание измельченных частей считается законченным, если количество сырья, прошедшего сквозь сито при дополнительном просеве в течение 1 мин, составляет менее 1 % сырья, оставшегося на сите.

Для цельного сырья частицы, прошедшие сквозь сито, взвешивают и вычисляют их процентное содержание к массе аналитической пробы.

Для просеивания резаного, дробленого, порошоканного сырья берут два сита. Пробу сырья помещают на верхнее сито и просеивают. Затем отдельно взвешивают сырье, оставшееся на верхнем сите и прошедшее сквозь нижнее сито, и вычисляют процентное содержание частиц, не прошедших сквозь верхнее сито, и содержание частиц, прошедших сквозь нижнее сито, к массе аналитической пробы. Взвешивание проводят с погрешностью $\pm 0,1$ г при массе аналитической пробы свыше 100 г и $\pm 0,05$ г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Допустимая норма содержания измельченных частиц для каждого вида сырья указана в соответствующей нормативной документации.

Определение содержания примесей

Оставшуюся часть аналитической пробы после отсева измельченных частиц (для цельного сырья) или сход с верхнего и нижнего сит (для резаного, дробленого и другого измельченного сырья) помещают на чистую гладкую поверхность и лопаточкой или пинцетом выделяют примеси, указанные в нормативной документации на лекарственное растительное сырье (см. раздел «Числовые показатели»). Обычно к примесям относят:

— части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду (побуревшие, почерневшие, выцветшие и т.д.);

— другие части этого растения, не соответствующие установленному описанию сырья;

— органическую примесь (части других неядовитых растений);

— минеральную примесь (земля, песок, камешки).

Одновременно обращают внимание на наличие амбарных вредителей.

Каждый вид примеси взвешивают отдельно с погрешностью $\pm 0,1$ г при массе аналитической пробы более 100 г и с погрешностью $\pm 0,05$ г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Содержание каждого вида примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2},$$

где m_1 — масса примеси в граммах;

m_2 — масса аналитической пробы сырья в граммах.

Определение влажности лекарственного растительного сырья (2-ая аналитическая проба)

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

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц около 10 мм, перемешивают и берут две навески массой 3—5 г, взвешенные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску помещают в предварительно высушенную и взвешенную вместе с крышкой бюксу и ставят в нагретый до 100—105 °С сушильный шкаф. Время высушивания отсчитывают с того момента, когда температура в сушильном шкафу вновь достигнет 100—105 °С. Первое взвешивание листьев, трав и цветков проводят через 2 ч, корней, корневищ, коры, плодов, семян и других видов сырья — через 3 ч.

Высушивание проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает 0,01 г.

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

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m},$$

где m — масса сырья до высушивания в граммах;

m_1 — масса сырья после высушивания в граммах.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0,5 %.

Повышенное содержание влажности ведет к порче сырья (плесневению, гниению, появлению устойчивого затхлого запаха, не исчезающего при проветривании).

Определение общей золы (3-ая аналитическая проба)

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

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

Прокаливание ведут при слабом красном калении (около 500 °С) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Определение золы, нерастворимой в 10 % хлористоводородной кислоте

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

Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает 0,0005 г.

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

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - w)},$$

где m — масса золы в граммах;

m_1 — масса сырья в граммах;

w — влажность сырья, %.

Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье (3-ая аналитическая проба)

Определение экстрактивных веществ в сырье проводят в случае отсутствия в нормативной документации метода количественного определения действующих веществ.

Около 1 г измельченного сырья (точная навеска), просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200—250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью $\pm 0,01$ г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150—200 мл. 25 мл фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре 100—105 °С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7—9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушат при температуре 100—105 °С до постоянной массы, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится безводный хлорид кальция, и немедленно взвешивают.

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

$$X = \frac{m \cdot 200 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - w)},$$

где m — масса сухого остатка в граммах;

m_1 — масса сырья в граммах;

w — влажность сырья, %.

Самостоятельная работа студентов на занятиях

Каждый студент получает 3 аналитических пробы ЛРС.

Задание 1. Проведите анализ 1-ой аналитической пробы.

Проверьте соответствие массы аналитической пробы табл. 3 ОФС 42-0013-03.

Определите подлинность ЛРС макро- и микроскопическим методом, с помощью качественных химических реакций.

Проведите определение измельченности и примесей. Рассчитайте их содержание.

Задание 2. Проведите анализ 2-ой аналитической пробы. Определите «товароведческую» влажность сырья (методику см. выше).

Задание 3. Проведите анализ 3-ей аналитической пробы.

Определите содержание общей золы (методику см. выше).

Определите содержание действующих (экстрактивных) веществ.

Определите содержание «абсолютной» влажности ЛРС (для расчета содержания общей золы и действующих (экстрактивных) веществ на абсолютно сухое сырье).

Студент показывает преподавателю результаты анализа всех проб, оформляет акт приемки сырья и результаты анализа 3-х аналитических проб.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

Государственная фармакопея СССР.— М.: Медицина. Вып. 1. —11-е изд. 1987.—334 с.; Вып. 2, 1990.— 398 с.

Государственные стандарты СССР. Лекарственное растительное сырье.— М.: Изд-во стандартов, 1980.—296 с.

Государственная фармакопея СССР.—10-е изд.—М.: Медицина. 1968.— 1079 с.

Растения для нас: Справочное издание/ Под ред. Г. П. Яковлева, К. Ф. Блиновой.—СПб.: Учеб.Кн., 1996.— 653 с.

Муравьева Д. А., Самылина И. А. Яковлев Г. П. Фармакогнозия: Учебник.— изд. 4-е.—М.: Медицина, 2002.

Практикум по фармакогнозии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. Под ред. В. Н. Ковалева. Харьков: НФаУ «Золотые страницы», 2003.— 510 с.

Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия. Учебное пособие / Под ред. Г. П. Яковлева и К. Ф. Блиновой.— СПб.: СпецЛит, 2004.— 756 с.

ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб».

Дополнительная

Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Сир, 1077. 239 с.

Краснов Е. А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. Омск: Изд-во Томского ун-та, 1987. С. 116—137.

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

СОДЕРЖАНИЕ

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	18
ТЕМА 3. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	37
ТЕМА 4. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ (СЕРДЕЧНЫХ) ГЛИКОЗИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	44
ТЕМА 5. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САПОНИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	54
ТЕМА 6. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛГЛИКОЗИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	64
ТЕМА 7. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КУМАРИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	71
ТЕМА 8. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	79
ТЕМА 9. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	94
ТЕМА 10. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ (ТАННИДОВ) В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	103
ТЕМА 11. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	112
ТЕМА 12. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	123
ТЕМА 13. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	130
ЛИТЕРАТУРА	150

Составители:
Н. П. Харитоновна, Р. К. Шагохина

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ
И ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ
ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Зав. издательством *О. Л. Олейник*
Редактор *Н. В. Александрова*
Компьютерная верстка *И. В. Третьяковой*
Печать на ризографе *Н. В. Андриановой*

Сдано в набор 17.10.05. Подписано к печати 8.11.05. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага тип. Печать
ризограф. Гарнитура «Таймс». Уч.-изд. л. 9,3. Печ. л. 9,5. Заказ 578.
Тираж 300 экз.

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