

Тема занятия:

«Качественный и количественный анализ лекарственного растительного сырья, содержащего различные группы биологически активных веществ (флавоноиды)»

Цель:

1. Освоить методики качественного и количественного анализов лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.
2. Научиться проводить качественные реакции на флавоноиды с целью идентификации данной группы биологически активных веществ.
3. Научиться проводить количественный анализ флавоноидов методом спектрофотометрии.

Работа 1. Проведение качественных реакций на обнаружение флавоноидов лекарственного растительного сырья «Зверобоя трава».

Возьмите у преподавателя на анализ образец сырья.

Проведите выделение суммы флавоноидов по следующей методике: 3 г высушенного и измельченного сырья и 30 мл 70 % этанола помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и проводят экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 10-15 минут. Извлечение охлаждают, фильтруют через вату и проводят качественные реакции.

Для идентификации флавоноидов в лекарственном растительном сырье проведите следующие реакции:

1. Проба Синода (цианидиновая проба)

Берут две пробирки с одинаковым количеством экстракта, в каждую прибавляют по 3 капли концентрированной соляной кислоты. Затем в одну из пробирок добавляют несколько крупинок магния или цинка. Обе пробирки нагревают на водяной бане до кипения и оставляют на 5 - 10 минут. Если есть флавоноиды, то в пробирке с магнием появляется оранжевое или ярко-красное окрашивание. Если в экстракте присутствуют антоцианы, халконы,

ауруны и катехины, то вследствие образования оксониевых солей они дают окраску с концентрированной кислотой без добавления металлического магния.

Флавоны обычно дают неяркие оранжево-красные окраски, флавонолы и флаваноны развивают глубокую розовую, алую или малиновую окраску.

Окрашивание развивается в следствие того, что происходит восстановление флавонов и флавонолов до антоцианидинов, которые в кислой среде образуют окрашенные оксониевые соли.

2. Проба с 5 % спиртовым раствором хлорида алюминия.

К 0,5 мл спиртового извлечения добавляют несколько капель реактива. Флавоноиды, имеющие 2 оксигруппы, в C₃ и C₅ положениях, образуют лимонно-желтое окрашивание (желто-зеленое).

3. Реакция со щелочью

К 0,5 мл спиртового извлечения добавляют несколько капель 10 % спиртового раствора щелочи. Флавоны и флавонолы растворяются в щелочах с образованием желтой окраски. Халконы и ауруны сразу же образуют со щелочами красные или пурпурны растворы (эта реакция для них очень специфична).

4. Проба с 1 % спиртовым раствором хлорного железа

К 1 мл фильтрата прибавляют 2-3 капли 1 % раствора хлорного железа. Ортодифенольные группы в молекулах флавоноидов обуславливают зеленую, а триоксифенольные группы в рядовом положении - синюю окраску.

5. Реакция с раствором основного ацетата свинца

К 1 мл извлечения добавляют 3-5 капель 2 % основного ацетата свинца. Появление желто-оранжевого окрашивания свидетельствует о наличии флавоноидов.

6. Борно-лимонная реакция

5-оксифлавоны и 5-оксифлаванолы взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной (или щавелевой), образуя ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией.

7. Реакция с раствором аммиака

К 1 мл фильтрата добавляют 3-5 капель реактива. Флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванолы дают желтое окрашивание при нагревании переходящее в оранжевое или красное. Халконы и ауруны тотчас же дают красное или пурпурное окрашивание. Чистые катехины окрашивания не дают, однако присутствие даже в небольшом количестве примесей (продуктов окисления) вызывает появление желтой окраски. Антоцианы в присутствии аммиака или карбоната натрия дают синее или фиолетовое окрашивание.

8. Реакция с 1 %-ным ванилином в концентрированной соляной кислоте

Катехины образуют красно-малиновое окрашивание (производные флороглюцина и резорцина).

Результаты исследования оформите в виде протокола.

Работа 2. Определение влажности лекарственного растительного сырья «Зверобоя трава».

Возьмите у преподавателя на анализ образец сырья.

Проведите определение влажности и вычислите ее процентное содержание в исследуемом образце сырья.

Сравните полученный результат с данными фармакопейной статьи «Зверобоя трава». Сделайте вывод.

Результаты исследования оформите в виде протокола.

Работа 3. Проведение количественного анализа флавоноидов лекарственного растительного сырья «Зверобоя трава».

Изучите методику количественного определения флавоноидов методом спектрофотометрии в лекарственном растительном сырье.

Возьмите у преподавателя на анализ образец сырья.

Проведите определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин согласно методике и вычислите их процентное содержание в исследуемом образце сырья.

Сравните полученный результат с данными фармакопейной статьи «Зверобоя трава». Сделайте вывод.

Результаты исследования оформите в виде протокола.

Протокол анализа лекарственного растительного сырья

Дата _____

Название ЛРС рус./лат. _____

Название производящего растения рус./лат. _____

Название семейства рус./лат. _____

Результаты качественных реакций:

Определение влажности:

Показатель влажности по нормативной документации:

Расчеты:

Количественное определение флавоноидов:

Стандартизация сырья по нормативной документации:

Расчеты:

Вывод: _____

Методика количественного определения флавоноидов методом спектрофотометрии

Количественное определение суммы флавоноидов проводят согласно методике ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава»

Навеску сырья массой 1 г, измельченную до размеров частиц 1 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, приливают 30 мл спирта этилового 50%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания экстракционной смеси. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляют 30 мл спирта 50%. Экстракцию повторяют еще дважды, фильтруют извлечение в ту же колбу. После охлаждения объем извлечения доводят спиртом 50% до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора).

Далее 1 мл полученного испытуемого раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, доводят объем раствора до метки спиртом 50% и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Параллельно готовят раствор сравнения таким же образом – в мерной колбе на 25 мл к 1 мл испытуемого раствора А добавляют 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30%, доводят до метки спиртом 50%.

Для протекания реакции комплексообразования колбу оставляют на 40 минут в темном месте.

Измерение оптической плотности проводят спектрофотометрическим методом в диапазоне длин волн 200 – 600 нм.

Содержание суммы флавоноидов определяют в пересчете на тот флавоноид, к спектральным характеристикам которого был близок максимум

поглощения полученного спиртового извлечения с использованием удельного показателя поглощения (рутин).

Определение суммы флавоноидов производят по следующей формуле:

$$X = \frac{A_x \times 100 \times 25 \times 100}{A_{1cm}^{1\%} \times \alpha \times 1 \times (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора;

$A_{1cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 248 (для сырья зверобоя);

α – масса навески исследуемого сырья, г;

W – показатель влажности, %.