Лабораторное занятие № 8

Тема: Исследование основных биологически активных веществ в экстрактах лекарственных растений

Цель занятия: приобретение навыков исследования биологически активных веществ в экстрактах лекарственных растений

Задание:

- изучить методику исследования содержания действующих веществ в полученных экстрактах;

- на основе изученной методики исследования содержания действующих веществ в полученных экстрактах описать принцип работы спектрофотометра.

Необходимые приборы, оборудование, химическая посуда, реактивы:

Прибор:

1. Спектофотометр;
2. Водяная баня;
3. Обратный холодильник.

Химическая посуда:

1. Колба вместимостью 100 мл;
2. Колба вместимостью 50 мл;
3. Колба вместимостью 250 мл;
4. Мерная колба вместимостью 25 мл.

Реактивы:

1. Хлороформ;
2. Концентрированный раствор аммиака
3. Едкий натр;
4. Соляная кислота;
5. Метиловый красный;
6. 1% раствор п-диметиламинобензальдегида;
7. 95 %-ный этиловый спирт.

Методические рекомендации к выполнению лабораторной работы:

Количественное определение алкалоидов

Аналитическую пробу помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл хлороформа и 5 мл концентрированного раствора аммиака, закрывают пробкой и встряхивают на вибрационном встряхивателе в течение 2 ч или оставляют при комнатной температуре на 15 ч (после чего встряхивают еще 30 мин).

Хлороформную вытяжку фильтруют через вату. 50 мл фильтрата переносят в колбу вместимостью 100 мл и хлороформ удаляют поместив колбу с фильтратом на водяную баню при температуре 65-70 ºС до объема 1-2 мл.

К остатку прибавляют 2 мл раствора 0,1 моль/л натра едкого и растирают стеклянной палочкой до полного исчезновения комочков, затем прибавляют 8 мл воды и перемешивают 2-3 мин.

К содержимому прибавляют 10 мл 0,1моль/л раствора соляной кислоты, осторожно перемешивают и оставляют на 8-10 мин, затем встряхивают на вибрационном встряхивателе 8-10 мин и фильтруют через тройной бумажный складчатый фильтр.

10 мл фильтрата переносят в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды, 2 капли раствора метилового красного, и оттитровывают избыток кислоты 0,1 моль/л раствором натра едкого до появления желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

В колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл 0,1 моль/л раствора натра едкого, прибавляют 4 мл воды и 5 мл 0,2 моль/л раствора соляной кислоты, перемешивают, прибавляют 2 капли раствора метилового красного, и оттитровывают избыток кислоты 0,1 моль/л раствором натра едкого до появления желтого окрашивания.

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

$$\frac{\left(V\_{1 }- V\_{2}\right)×0.0244×100×20×100×100}{50×10×m×\left(100-W\right)}=\frac{\left(V\_{1}-V\_{2}\right)×0.0244×4×100×100}{m×\left(100-W\right)} \left(1\right)$$

где V1- объем раствора натра едкого (0,1 моль/л), пошедшего на титрование контрольного опыта, в миллилитрах; V2 - объем 0,1 моль/л раствора натра едкого, пошедшего на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах; 0,0244 - количество алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты, в граммах; m - масса сырья в граммах; W *-* потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Количественное определение сапонинов

1,0 м сырья (точная навеска) 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. 5 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл.

Объем раствора доводят до метки 95% спиртом и тщательно перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А переносят в стеклянную пробирку с нормальным шлифом и сюда же прибавляют пипеткой 5 мл 1% раствора п-диметиламинобензальдегида в 4 моль/л спиртовом растворе хлористоводородной кислоты.

Пробирку закрывают стеклянной пробкой, резиновым колпачком, встряхивают для перемешивания жидкости и нагревают в течение 2 часов в термостате при температуре 58 ± 0,5 °С. Раствор охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл 4 моль/л спиртового раствора соляной кислоты, который также выдерживают в ультратермостате при указанной выше температуре.

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

$$X= \frac{a\*0.0101\*50\*10\*100\*100}{m\*\left(100-w\right)\*K}= \frac{a\*50\*500}{m\*\left(100-w\right)\*K} \left(2\right)$$

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

0,0101- коэффициент пересчета концентрации кобальта хлорида на концентрацию фуростаноловых гликозидов; 50 - исходный объем извлечения, мл; 10 - число разведения; m - масса сырья, г;

w - потеря в массе при высушивании сырья, %; К - поправочный коэффициент на титр кислоты.

Количественное определение флавоноидов

1 мл сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта, содержимое колбы встряхивают и взвешивают с погрешностью 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После этого колбу охлаждают до комнатной температуры, вновь взвешивают и при необходимости добавляют 70% спирт до первоначальной массы. Вытяжку 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 фильтрата и 0,1 мл концентрированной уксусной кислоты, доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

Сонымен қатар, дәл осындай жағдайларда рутиннің стандартты үлгісіндегі ерітіндінің оптикалық тығыздығы анықтау керек, осы жағдайда ерітінді ретінде 95% спиртпен өлшенеді.

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

$$x=\frac{D\*m\_{0 }\*100\*100\*100}{D\_{0}\*m\*1\*\left(100-w\right)\*100}=\frac{D\*m\_{0}\*10000}{D\_{0}\*m\*(100-w)} \left(3\right)$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; m0 - масса рутина, г; D0 - оптическая плотность стандартного образца рутина; m - масса сырья, г; w - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Приготовление эталонного раствора стандартного образца рутина.

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

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

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Какие вещества относятся к БАВ;
2. Что такое действующие вещества лекарственных растений
3. Какие вещества относятся к алкалоидам
4. Значение алкалоидов
5. Какие вещества относятся к сапонинам
6. Значение сапонинов
7. Какие вещества относятся к флаваноидам
8. Значение флаваноидов

Форма отчетности: Описать в письменной форме принцип работы спектрофотометра для определения действующих веществ в экстракте.