Лабораторное занятие № 4

Тема: Исследование сапонинов в лекарственном растительном сырье

Цель занятия: Приобретение навыков исследования сапонинов в лекарственном растительном сырье

Задание:

1. Провести качественные реакции и хроматографическое обнаружение сапонинов в ЛРС.

2. Провести количественное определение сапонинов в сырье (определение пенного индекса).

Необходимые приборы, оборудование, химическая посуда, реактивы:

Реактивы:

1) 0,1 н р-ра HCl

2) 0,1 н р-ра NaOH

3) ацетон

4) этанол

приборы, оборудование:

1) плоскодонная колбы 25-30 мл

2) штатив с пробирками

3) хромотографическая камера

4) стеклянные воронки диаметром 5 см для фильтрования

5) бумага для фильтрования

6) фарфоровые чашки

7) аналитические лабораторные весы

8) весы ручные

9) баня водяная лабораторная

10) шкаф лабораторный сушильный

11) измерительные пипетки на 25 мл

12) хромотографическая камера

13) бюксы с притертой крышкой

14) сита, диаметр отверстий которых 1 мм

15) фарфоровая лабораторная ступка с пестиком

16) электрический измельчитель

Методические рекомендации к выполнению лабораторной работы:

1) **Реакция, основанная на биологических свойствах сапонинов.**

**Гемолиз эритроцитов**

Приготовить извлечение: взять плоскодонную колбу на 30 мл, по­местить в нее 0,5 г измельченного сырья. Добавить 10 мл изотонического раствора хлорида натрия. Нагреть на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения профильтровать через ватный тампон.

К 1 мл извлечения добавить 1 мл 2% взвеси эритроцитов в изотоническом растворе. Раствор становится прозрачным, ярко-красным.

**2*) Реакция, основанная на физических свойствах сапонинов.***

Приготовить извлечение: взять плоскодонную колбу на 30 мл, по­местить в нее 0,5 г измельченного сырья. Добавить 25 мл дистиллированной воды. Нагреть на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения профильтровать через ватный тампон. Использовать для качественных реакций и количественного определения.

***Проба пенообразования***

В 2 пробирки одинакового диаметра и высоты внести по 0,5 мл извлечения № 2. В одну пробирку прибавить 1 мл 0,1 н р-ра HCl, в другую - 1 мл 0,1 н р-ра NaOH, затем пробирки сильно встряхнуть. В обеих пробирках образуется стойкая пена (сапонины).

***Реакции, основанные на химических свойствах сапонинов.***

***Осаждение сапонинов***

· К 0,5 мл извлечения прибавить 3 капли насыщенного раствора среднего ацетата свинца. Образуется осадок (тритерпеновые сапонины).

· К 0,5 мл извлечения прибавить 3 капли насыщенного раствора основного ацетата свинца. Образуется осадок (стероидные сапонины).

***Реакция окрашивания***

К 1 мл извлечения прибавить равный объем хлороформа и 6-8 капель концентрированной серной кислоты. Нижний слой окрашивается в желтый цвет.

***Обнаружение сапонинов в ЛРС методом хроматографии в тонком слое.***

Поместить в пробирку 0,2 г измельченного сырья, добавить 3 мл 70 % этанола, нагреть до кипения на спиртовке и после настаивания в течение 10 минут отфильтровать.

На стартовую линию хроматографической пластинки "Силуфол" нанести капилляром спиртовое извлечение и рядом "свидетель" (спиртовой р-р чистого сапонина). Пластинку поместить в хроматографическую камеру с системой растворителей:

АЦЕТОН : ЭТАНОЛ : ВОДА : ГИДРОКСИД АММОНИЯ (20:7:2:6).

Хроматографирование вести 60 мин (пробег растворителя 13 см), затем хроматограмму высушить на воздухе под тягой.

Хроматограмму обработать 25 % спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты и прогреть в сушильном шкафу при температуре 105-1100С в течение 5 минут.

Отметить характер окраски пятен, рассчитать величины Rf и сравнить их со свидетелем.

Хроматограмму зарисовать и результаты записать в протокол.

**Задание 2.** Провести количественное определение сапонинов в сырье (определение пенного индекса).

Приготовить разведения исходного раствора от 1:100 до 1: 1000000. Взять 4 пробирки, пронумеровать их. В первую поместить 5 мл исходного извлечения (полученного в п. «реакция, основанная на физических свойствах») и 5 мл воды, аккуратно перемешать. В остальные поместить по 9 мл дистиллированной воды. Из пробирки №1 взять 1 мл извлечения, перенести в пробирку №2, аккуратно перемешать. Повторить операцию 2 раза.

Интенсивно встряхивать все пробирки одновременно в течение 15 секунд. Оставить в штативе на 15 минут. Оценить наличие пены и высоту ее столбика в каждой из пробирок. Отметить разведения, в которых пена отсутствует. Наибольшее разведение из тех, в которых реакция пенообразования положительна, составит пенный индекс.

Сделать заключение о доброкачественности сырья.

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Определение понятия «сапонины».

2. Распространение сапонинов в растительном мире, локализация по органам и тканям.

3. Химическая структура сапонинов и их классификация.

4. Физико-химические и биологические свойства сапонинов.

5. Методы выделения сапонинов из ЛРС и способы их очистки.

6. Методы обнаружения и количественного определения сапонинов в ЛРС.

7. Применение ЛРС и препаратов, содержащих сапонины.

Форма отчетности: составить отчет о выполненной работе, устный опрос.