

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

Сипкина Е.И.

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАВ ИЗ ПРИРОДНЫХ
ИСТОЧНИКОВ**

Лабораторный практикум

Направление подготовки: **19.04.01 Биотехнология**

Магистерская программа:
Технология биологически активных веществ

Присваиваемая квалификация:
Магистр

Иркутск, 2026

Технология получения БАВ из природных источников: методические указания по организации лабораторных работы магистрантов, направление 19.04.01 «Биотехнология», магистерская программа «Технология биологически активных веществ», Составитель: Сипкина Е.И.. 2026, - 40 с. Электронный вариант

Содержание

1	Введение	3
2	Лабораторная работа 1 «Лекарственные растения и сырье, содержащие алкалоиды»	9
3	Лабораторная работа 2 «Качественное обнаружение и количественное определение дубильных веществ (таннидов) в растительном сырье»	14
4	Лабораторная работа 3 «Качественное обнаружение кумаринов в растительном сырье»	18
5	Лабораторная работа 4 «Качественное обнаружение и количественное определение флавоноидов в растительном сырье»	21
6	Лабораторная работа 5 «Основы подбора сырья, его подготовки и составления рецептур для производства БАД»	26
7	Лабораторная работа 6 «Исследование процесса экстракции БАВ из сырья растительного происхождения»	32

Введение

В основе изучения предмета технологии получения БАВ из природных источников лежат знания о способах и средствах проведения производственных процессов получения биологически активных веществ (БАВ) как из простых химических соединений, так и в процессе обмена веществ в живом организме.

При разработке новых технологий синтеза и биосинтеза БАВ необходимы знания в области микробиологии, биотехнологии, биохимии, основного и тонкого органического синтеза, а также инженерных наук для промышленной реализации синтеза и биосинтеза БАВ.

Потребность в биологически активных веществах на современном этапе тесно связана с решением широкого круга проблем интенсификации производства и экологическим оздоровлением окружающей среды, а именно:

- получение новых видов продуктов различного назначения и в первую очередь препаратов профилактического и терапевтического действия;
- утилизация отходов промышленности и сельского хозяйства;
- получение экологически безопасных средств защиты сельскохозяйственных растений от болезней, вредителей, сорных растений для повышения их биологической продуктивности.

В настоящее время промышленностью производится широкий ассортимент биологически активных веществ медицинского, пищевого, сельскохозяйственного назначения (антибиотики, вакцины, ферменты, полисахариды, гормоны, гликозиды, кормовые и пищевые добавки, белки, аминокислоты, витамины, алкалоиды, пестициды, дефолианты и другие). Многие БАВ впервые были получены из природного растительного и животного сырья путем специальной его обработки. В Древнем Риме врач Клавдий Гален (131-201гг.) использовал природные БАВ в качестве лекарственных препаратов, которые широко применяются в медицине и до настоящего времени. Такие препараты часто называют галеновыми.

Галеновые препараты, как правило, содержат комплекс химических веществ различного действия на живой организм. Для получения аналогов природных БАВ используют химические и биохимические методы.

Теоретическое введение

Традиционное понятие биологически активных веществ как химических веществ, необходимых для поддержания жизнедеятельности живых организмов, их физиологической активности, не полностью отражает функции БАВ.

При изучении действия антибиотиков на живой организм и оценке их активности в работе [1] была дана оценка антибиотика как биологически активного вещества. На наш взгляд, это определение можно использовать для характеристики всех типов БАВ.

Биологически активные вещества – химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов,

обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов или их клеткам, злокачественным опухолям, избирательно задерживая (или ускоряя) их рост или полностью подавляя их развитие.

За единицу биологической активности химического вещества принимают минимальное количество этого вещества, способное подавлять развитие или задерживать рост определенного числа клеток, тканей стандартного штамма (биотеста) в единице питательной среды.

В настоящее время известен широкий спектр биологически активных веществ различного назначения, которые могут быть либо получены из природных живых организмов, либо синтезированы с помощью различных химических превращений.

Природные БАВ образуются в процессе жизнедеятельности живых организмов. Они могут образовываться в процессе обмена веществ, выделяясь в окружающую среду (экзогенные) или накапливаться внутри организма (эндогенные). Эффективность синтеза БАВ зависит от физиологических особенностей живых организмов, экологических факторов.

К экзогенным природным БАВ можно отнести:

- *колины* – органические соединения, выделяемые высшими растениями через корневую систему, вызывающие угнетение низших растений;
- *фитонциды* – летучие органические соединения, выделяемые высшими растениями в атмосферный воздух, вызывающие гибель патогенных микроорганизмов;
- *антибиотики* – органические вещества – продукты жизнедеятельности микроорганизмов в процессе обмена веществ, выделяющиеся в окружающую среду или накапливающиеся внутри клетки, подавляющие или угнетающие другие виды микроорганизмов;
- *маразмины* – органические вещества, выделяемые микроорганизмами, вызывающие угнетение низших растений.

Воздействие одних живых организмов на другие за счет продуцирования БАВ называется *аллелопатией*.

Микотоксины – биологически активные вещества, вырабатываемые грибами (рода *Fusarium*, *Aspergillus* и др.) в процессе обмена веществ, которые выделяются в организм высших растений (злаковых) при их совместном развитии, и вызывающие заболевание последних. Опасность микотоксинов связана с их устойчивостью при хранении, термической обработке, способностью быстро распространяться в органах и тканях организма, вызывая ингибирование синтеза белка, поражение сердечно-сосудистой системы, клеток костного мозга, лимфатических узлов. Многие микотоксины обладают канцерогенными свойствами.

Душистые вещества – органические вещества, обладающие характерным приятным запахом.

Природные душистые вещества представляют сложные смеси различных веществ, чаще всего представлены эфирными маслами (розовое, гераниевое, лавандовое), экстрагированные из цветков растений.

Душистые вещества используют для получения косметических и парфюмерных композиций. Как правило, эти экстракты содержат сложные смеси различных веществ. Для получения стойких парфюмерных композиций необходимы стабилизаторы запаха. К природным стабилизаторам запаха относятся мускусные препараты.

К эндогенным БАВ можно отнести: белки, жиры, углеводы, аминокислоты, витамины, ферменты, гормоны, красители.

Белки – природные полимеры, молекулы которых построены из остатков аминокислот. По своему строению белки делятся на простые и сложные.

Протеины (от греч. protas – первый, важный) представляют собой простые белки. К ним относятся альбумины, глобулины, глютемины.

Протеиды относятся к сложным белкам, которые кроме белковых макромолекул содержат в своем составе небелковые молекулы. К ним относятся *нуклепротеиды* (кроме белка содержат нуклеиновые кислоты), *липпротеиды* (кроме белка содержат липиды), *фосфолипиды* (кроме белка содержат фосфорную кислоту). Белки играют ключевую роль в жизни клетки. Они необходимы для образования клеток, тканей организма, составляют основу биомембран, а также поддержания жизненных функций живых организмов. Белки выполняют каталитические (ферменты), регуляторные (гормоны), транспортные (гемоглобин, миоглобин), структурные (колаген, фиброин), двигательные (миозин), защитные (иммуноглобулин, интерферон) функции, позволяющие снизить риск инфекционных или стрессовых ситуаций, а также запасные (казеин, альбумин), биоэнергетические функции. В свою очередь биологическая активность белков тесно связана с аминокислотным составом. В состав белков входят 20 аминокислот и два амида (аспаргин, глутамин). Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ – углекислоты, воды и минеральных солей. В организм животных и человека некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи. Такие кислоты называются незаменимыми. К ним относятся: валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Длительное отсутствие в организме хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека и животных. Все необходимые аминокислоты должны содержаться в белках в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. Если хотя бы одна аминокислота содержится в недостатке, то другие аминокислоты, оказавшиеся в избытке, не используются для синтеза белков. Биологически полноценными считаются белки, имеющие оптимальное содержание аминокислот.

Недостающее до нормы количество какой-либо аминокислоты балансируют добавлением "чистых" препаратов дефицитных аминокислот или белковой массы, имеющей более высокое содержание данной аминокислоты по сравнению с эталоном. В растениях концентрация белковых веществ варьируется в зависимости от условий выращивания, климата,

погоды, типа почвы, агротехники и других. Высокой интенсивностью синтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот.

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, обладающие высокой биологической активностью и выполняющие роль биорегуляторов. Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных групп входят в состав каталитических центров ферментов или являются переносчиками функциональных групп.

При недостатке этих веществ понижается активность соответствующих ферментов и, как следствие, ослабляются или полностью прекращаются биохимические процессы, происходящие с участием данных ферментов, что приводит к серьезным заболеваниям. Организмы человека и животных не способны к синтезу витаминов. Основным источником их поступления в организм человека и животных являются растения и микроорганизмы, которые синтезируют почти все витамины (за исключением В₁₂). Почти все витамины содержат гидроксильную группу (-ОН) или карбонильную группу (-C=O). Различают жирорастворимые и водорастворимые витамины.

Жирорастворимые витамины хорошо растворяются в органических растворителях. К ним относятся витамины групп **А, Д, Е, Ф**. Для таких витаминов характерно наличие в молекуле гидрофобных заместителей. Наибольшей биологической активностью обладают незаменимые жирные кислоты – витамины группы **Ф** (линолевая, линоленовая, олеиновая, стеариновая, пальмитоолеиновая, пальмитиновая, миристиновая, арахидоновая). Функциональная активность обычно связана с биологическими мембранами. Незаменимые жирные кислоты участвуют в процессе усвоения жиров и жировом обмене кожных покровов. При недостатке незаменимых жирных кислот снижается интенсивность роста, угнетается репродуктивная функция, понижается сопротивляемость организма инфекции. Как правило, эти кислоты содержат по 18 или 20 атомов углерода и от 2 до 4 изолированных непредельных связей с полной цис-конформацией. Эфиры и амиды этих кислот используются при синтезе спазмолитических средств.

Водорастворимые витамины хорошо растворимы в воде. К ним относятся витамины групп **С, В, Д**.

Липиды – это сложная смесь органических соединений с близкими физико-химическими свойствами, которые участвуют в построении клеточных мембран. Являются обязательным компонентом клетки. Их общий признак – наличие в молекуле длинноцепочечных углеводородных радикалов и сложноэфирных группировок. По химической природе жиры представляют собой эфиры глицерина и жирных кислот, которые отличаются по природе жирных кислот.

В растениях жиры накапливаются в плодах и семенах, в животных и рыбах – концентрируются в подкожных жировых тканях, брюшной полости и тканях, окружающих многие важные органы (сердце, почки), а также в мозговой и нервных тканях. Длительное отсутствие в живом организме

приводит к нарушению центральной нервной системы, снижается устойчивость к инфекциям, сокращается продолжительность жизни. Для извлечения липидов необходимо разрушить их связь с белками, углеводами и другими компонентами клетки. При извлечении из природного сырья липидов получают смесь, состоящую из липидов и жирорастворимых веществ (пигменты, витамины, стероиды).

Ферменты (лат. fermentum – закваска), или **энзимы** (enzyme – дрожжи) – биокатализаторы белковой природы, ускоряющие обмен веществ в клетках и имеющие молекулярную массу от 15000 до 1000000.

Различают однокомпонентные (мономерные) ферменты, состоящие только из белка ("складчатых" полипептидных цепочек), и двухкомпонентные, состоящие из белковых макромолекул и небелковых молекул. Активность фермента определяется структурой белковой части. Ферменты используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Основным поставщиком ферментов долгое время были грибы. В настоящее время все более широкое применение находят ферменты бактерий. Уровни накопления ферментов в клетках могут быть повышены в 100-1000 раз путем генетического обмена и подбора питательных сред. Культивирование продуцентов ферментов экономично только тогда, когда ферментационные циклы коротки, сравнительно дешевы питательные среды, а также высока специфичность внутри- или внеклеточных ферментных белков. Микробные ферменты используются как терапевтические средства при проведении клинических анализов, а также в качестве кормовой добавки (0,1-1,5% от сухой массы кормов) для улучшения эффективности использования растительных кормов (зерна, силоса, грубых кормов и др.) сельскохозяйственными животными, содержащих трудноперевариваемые вещества: клетчатку, лигнин, гемицеллюлозу. Так, например, у жвачных животных клетчатка переваривается на 40-65%, растительные белки на – 60-80%, липиды на – 60-70%, крахмал и полифруктозиды на – 70-80%. Кроме того, ферментные препараты используются при приготовлении кормов методом силосования для ускорения молочно-кислого брожения.

Препараты протеиназ применяются при лечении воспалительных процессов и ожогов, разрушающих некротизированные ткани, клетки, способствуя заживлению ран, а также при лечении тромбозов. При терапевтическом лечении злокачественных новообразований используют бактериальную L-аспаргиназу, превращающую L-аспаргин, необходимый лейкоцитным клеткам, в L-аспаргиновую кислоту, в результате чего рост опухоли значительно замедляется. Микробные ферментные препараты находят широкое применение в ветеринарии для лечения и диагностики многих заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц (сальмонеллез и популороз у птиц, эндометриты у коров и другие).

Углеводы образуются в растениях в пластидах в процессе фотосинтеза под действием квантов солнечной энергии из углекислого газа, воды,

минеральных солей благодаря ассимиляции хлорофилла. По химическому строению углеводы делятся на *моносахариды* и *полисахариды*.

Наибольшей биологической активностью обладают моносахариды, которые являются сильными восстановителями. В природных условиях моносахариды в присутствии ферментов распадаются до углекислого газа, воды или спирта (дыхание).

Углеводы выполняют пластические функции (входят в состав тканей и жидкостей), защитные (гепарин предотвращает свертывание крови в сосудах). При длительном отсутствии углевода глюкозы в крови происходит нарушение поведения, бред, потеря сознания, структурные изменения в мозге и в конечном итоге может наступить смерть.

Полисахариды (крахмал, клетчатка, пектиновые вещества) относятся к так называемым балластным веществам. Они ускоряют процесс выведения из организма токсичных продуктов.

Наибольшей биологической активностью обладают производные моносахаридов – *гликозиды*, молекулы состоят из остатков моносахаридов и спиртов, ароматических соединений, стероидов. В семенах черной горчицы, корнях хрена содержится *гликозид синиргин*, придающий им специфический запах и горький вкус. В косточках персика, абрикоса, слив, вишен, яблок, груш, семенах горького миндаля, листьях лавровишни содержится *гликозид амигдалин*. При ферментативном гидролизе гликозидов образуются моносахариды и соответствующие несахаридные составляющие, многие из которых токсичны.

Фитогормоны – вещества, которые синтезируются в растениях в процессе обмена веществ, транспортируются по ним и способны вызывать ростовые или формативные эффекты (деформации), так называемые регуляторы роста и развития растений, или *фиторегуляторы*. Фитогормоны играют важную роль в реализации наследственной программы и адаптации к меняющимся условиям среды, отвечают за формирование и развитие стебля, листа и корня, ускоряя дифференцирование клеток, клеточные деления, образование новых тканей и органов, темпы роста и развития растений, их продуктивность и качество урожая. Гормональные эффекты реализуются путем конформационных изменений белковых молекул (варьирование формы и пространственной структуры) за счет образования гормоно-рецепторного активного комплекса. Такие белки могут функционировать как рецепторы фитогормонов, выполняя роль преобразователя сигнала между рецептором и определенной ферментативной системой. Большинство фитогормонов образуется из органических кислот, в частности аминокислот.

Биологические особенности транспортировки фитогормонов заключаются в том, что, образовавшись в одном органе (например, в апикальной меристеме стебля), они должны регулировать рост в другом органе (корне). Ускорение или замедление роста начинает проявляться при концентрации 10^{-13} – 10^{-7} М. По физиологическому действию фитогормоны подразделяют на ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую кислоту, этилен, brassinosteroids. Фитогормональными свойствами обладают

некоторые органические кислоты (жасминовая, салициловая), олигосахариды, полиамины, фенольные соединения.

Лабораторная работа 1

«Лекарственные растения и сырье, содержащие алкалоиды»

Алкалоиды относятся к высокоактивным в фармакологическом отношении природным веществам. Они характеризуются избирательным действием не только по отношению к той или иной системе или органу, но и к отдельным группам клеток, как например, окончаниям тех или иных нервов, отдельных центров головного мозга или продолговатого мозга, гладкой мускулатуре и т.д. Избирательность действия алкалоидов является причиной широкого спектра применения алкалоидов в медицине. Они используются как возбуждающие, успокаивающие ЦНС, как отхаркивающие, кровоостанавливающие средства, и т.д., что более детально отмечается при изучении объектов. Алкалоидами называют группу азотсодержащих органических соединений основного характера, имеющих обычно довольно сложный состав, чаще всего гетероциклического строения и часто обладающих сильным специфическим физиологическим действием. Название «алкалоид» происходит от арабского «алкали» - щелочь и греческого «ейдос», т.е. щелочеподобный. Алкалоиды имеют горький вкус, без запаха, большинство из них оптически активные вещества, по окраске бесцветные, некоторые из них окрашенные, например, берберин, резерпин, имеют желтую окраску. Константы диссоциации алкалоидов колеблются в очень больших пределах от 1:10⁻¹ до 1:10⁻¹² и более. Соответственно этому алкалоиды образуют соли различной степени прочности. Алкалоиды с очень малой величиной диссоциации, например, кофеин, колхицин не образуют прочных солей, особенно в водных растворах. Соли алкалоидов, как правило, хорошо растворимы в воде и спирте, но плохо или не растворимы в органических растворителях (хлороформ, эфир, дихлорэтан и др.). Однако имеются исключения: например, некоторые соли алкалоидов, плохо растворимы в воде (сульфат хинина) лучше растворимы в органических растворителях. Основания алкалоидов в большинстве случаев хорошо растворимы в органических растворителях и нерастворимы или плохо растворимы в воде. Здесь также имеются исключения: так, цитизин, метилцитизин, кофеин, хорошо растворимы в воде и органических растворителях. В растениях алкалоиды находятся чаще всего в виде солей и растворены в клеточном соке. Они связаны с органическими кислотами щавелевой, яблочной, лимонной, винной и другими. Встречаются и специфические органические кислоты. Например, меконовая кислота (в опиум), хемедоновая кислота (в чистотеле). Некоторые алкалоиды могут быть связаны с сахарными молекулами, т.е. они встречаются в виде гликоалкалоидов. Примером может быть дольчатый

паслен, где содержатся гликоалкалоиды и при ферментативном расщеплении дают сахар и алкалоиды.

Алкалоидные лекарственные растения и сырье классифицируются на основании химической структуры алкалоидов (по Орехову). Сырье, содержащее алкалоиды производные пирролидина, пирролизидина, пиридина, хинолина, изохинолина, акридина, имидазола, пурина, хиназолина, индола, алкалоиды стероидного строения, дитерпеновые алкалоиды, алкалоиды с азотом в боковой цепи, алкалоиды неуставленного строения.

1.1. Качественные реакции для обнаружения алкалоидов

Для проведения качественных реакций приготавливают уксусно-кислые извлечения из алкалоидного сырья (по Юрашевскому). Для этого навески грубо измельченного сырья помещают в колбу емкостью 150мл и доливают 2% раствором уксусной кислоты, до покрытия сырья и нагревают до 7 кипения. Затем смесь охлаждают и отфильтровывают. 1-2 капли фильтрата помещают на часовые или предметные стекла и рядом по 1 капле используемого реактива осторожно перемешивая капли, наблюдая в местах слияния эффект реакции. Если возникает легкая муть, то результаты обозначают одним «+», если муть сильная двумя «+» и появление осадка тремя «+++».

Качественное обнаружение алкалоидов проводится при помощи общеосадочных и специфических реактивов.

Общеосадочные реактивы делятся на 3 группы:

1. Комплексные йодиды (реактивы Вагнера, Марме, Бушарда, Майера).
2. Комплексные кислоты (реактив Зонненштейна, Бернтрона, Шайблера).

3. Органические вещества с кислым характером (растворы танина и пикриновой кислоты).

4. Соли тяжелых металлов (растворы сулемы, хлорного золота и хлорной платины). Обнаружение того или иного алкалоида проводят при помощи специфических реактивов. При этом проводятся качественные реакции сконцентрированными кислотами, окислителями и восстановителями. В результате проведения реакции образуются окрашенные продукты, подтверждающие идентичность алкалоидов. Для примера приводим качественные реакции на стрихнин и бруцин.

Реакции на стрихнин. 1-2мл спиртового извлечения из семян чили бухив фарфоровой чашке выпаривают до сухого остатка и добавляют 1-2 капли конц. H_2SO_4 и по кислоте проводят линии кристалликами $K_2Cr_2O_7$ (бихроматкалия) при этом образуется красно-фиолетовая полоса.

Реакции на бруцин. 1-2мл спиртового извлечения из семян чилибухи в фарфоровой чашке выпаривают до сухого остатка и добавляют 1-2 капли конц. HNO_3 – появляется оранжево-красное окрашивание.

Алкалоиды N-оксидной формы с обще осадочными реактивами на алкалоиды реакцию не дают. Чтобы их обнаружить, вначале восстанавливают водородом ($\text{Zn} + 2 \text{HCl}$) и затем производят качественные реакции с обще осадочными реактивами на алкалоиды. Помимо этого, для обнаружения их существует специфическая реакция – реакция Альберти. Для этого сырье обрабатывают 2% уксусной кислотой в течение 6 часов, затем подщелачивают раствором аммиака и подогревают до 70°C . При этом выпадает осадок, его отделяют и обрабатывают кипящим спиртом. Спирт отгоняют и осадок растворяют в 20 мл уксусной кислоты и добавляют реактив Альберти (конц. $\text{H}_2\text{SO}_4 + 1\%$ формальдегид); образуется красно- фиолетовое окрашивание.

Хроматографический анализ

Приготовление извлечения из растительного сырья.

1г измельченного растительного сырья (травы термопсиса ланцетовидного, листья красавки, листья дурмана обыкновенного и др.) помещают в колбу емкостью 100мл, заливают 25мл 1%-ной HCl и оставляют на 1 час при периодическом перемешивании или нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через вату в делительную воронку емкостью 100мл. Фильтрат подщелачивают концентрированным раствором аммиака до щелочной реакции по фенолфталеину, а алкалоиды извлекают 5мл хлороформа.

1. Хроматография на бумаге (травы термопсиса ланцетовидного). На полоску хроматографической бумаги (длина 30-40см, ширина 12см) на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 2-3см от нижнего края, капилляром или специальной пипеткой наносят около 0,1мл извлечения травы термопсиса. Расстояние от бокового края полоски хроматографической бумаги и между пятнами – 2см. Диаметр пятен не должен превышать 5мм. Полоску хроматографической бумаги с нанесенными на нее растворами (после высушивания) помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно (за сутки) налита разделительная система: $\text{H-бутанол} - \text{уксусная кислота} - \text{вода}$ (5:1:4). Нижний край хроматограммы погружают в жидкость примерно на 3-5мм (экспозиция – 14-15ч). После высушивания хроматограмму обрабатывают (опрыскивают из пульверизатора) модифицированным реактивом Драгендорфа. На желтом фоне появляются оранжевые и оранжево-красные пятна алкалоидов.

2. Хроматография в тонком слое сорбента (листья красавки). На стеклянную пластинку (размером 12×9см) с закрепленным силикагелем марки КСК или силуфол на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 1,5см от нижнего края, наносят капилляром или специальной пипеткой 0,1мл

извлечения из листьев красавки и раствор атропина. Расстояние от бокового края и между пятнами около 1,5см. Диаметр пятен не должен превышать 5мм. После высушивания пластинку помещают в хроматографическую камеру, в которую предварительно налита разделительная система: хлороформ – ацетон – диэтиламин (5:4:1)-система 1 или ацетон – раствор аммиака (95:5) – система 2. Толщина слоя жидкости около 5мм. Экспозиция 30-40мин. После тщательного высушивания хроматограмму обрабатывают (опрыскивают из пульверизатором модифицированным реактивом Драгендорфа. На желтом фоне появляются оранжевые пятна (алкалоиды). После высушивания вычисляют $R_f = a/b$; (измеряют расстояние от линии старта до середины пятна - a, затем до финиша - b).

Примечание: Приготовление модифицированного реактива Драгендорфа. В 40мл воды растворяют 0,85г основного азотнокислого висмута. К полученному раствору прибавляют 10мл ледяной уксусной кислоты и 50мл 50% раствора калия йодида. Взбалтывают до полного растворения, прибавляют 20мл ледяной уксусной кислоты и доводят спиртом до 100мл.

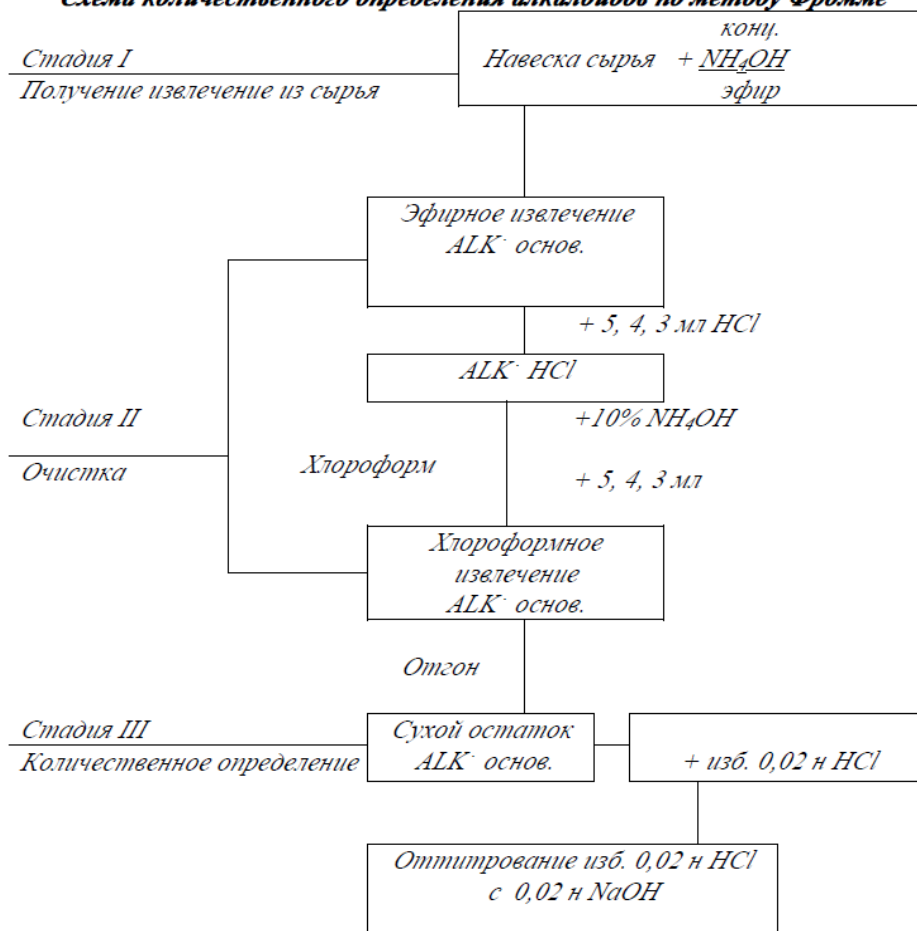
Обще осадочные реактивы и результаты реакции на алкалоиды

№	Название реактива	Состав реактивов	Среда	Результаты реакции-осадки
I	1 Вагнера	$I_2 + KI$	Кислая	Бурые
	2 Бушарда	$I_2 + KI$	Кислая	Бурые
	3 Майера	$HgI_2 + KI (K_2Hg_2I_4)$	Кислая	Бурые или желтые
	4 Марме	$CdI_2 + KI (K_2Cd_2I_4)$	Кислая	Бурые или желтые
	5 Драгендорфа	$BiI_3 + KI (KBiI_4)$	Кислая	Оранжево-кирпично-красн.
II	6 Зонненштейн а	К-та фосфорно-молибденовая $H_2BO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$	Кислая	Желтовато или зелено-желтые
	7 Шейблера	К-та фосфорно-вольфрамовая $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$	Кислая	Белые
	8 Бертрана	К-та кремне-вольфрамовая $SiO_2 \cdot 12WO_3 \cdot 4H_2O$	Кислая	Белые
III	9 Р-р танина	10%	Кислая	Беловатые или желтоватые
	10 Пикриновая кислота	1%	Кислая	Желтые осадки пикратов
IV	11 Р-р хлорной платины	5% H_2PtCl_6	Кислая	Белые
	12 Р-р сулемы	5% $HgCl_2$	Кислая	Белые
	13 Р-р хлорного золота	5% $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$	Кислая	Белые

1.2. Количественное определение алкалоидов по ГФ Х (метод Фромме)

2,5 г измельченных листьев красавки, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия 1мм, помещают в склянку с притертой пробкой, емкостью 250 мл, прибавляют 3,75 мл раствора аммиака и 37,5 мл эфира и в течение одного часа смесь часто и энергично взбалтывают. Эфирное извлечение быстро фильтруют через вату в склянку емкостью 200 мл, прикрывая воронку часовым стеклом. К фильтрату прибавляют 5 мл воды, энергично взбалтывают и оставляют в покое до просветления эфирного слоя, после чего отмеривают с помощью мерного цилиндра эфирного извлечения и количественно переносят в делительную воронку емкостью 200 мл. Цилиндр дважды споласкивают эфиром порциями 2,5 мл, которые присоединяют к эфирному извлечению в делительной воронке. Из эфирного извлечения 10 алкалоиды извлекают последовательно 5,4,3 мл. 1% раствора соляной кислоты до полного их извлечения (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтруя через смоченный водой фильтр во вторую делительную воронку такой же емкости.

Схема количественного определения алкалоидов по методу Фромме



Фильтр промывают дважды 1% раствором HCl по 5мл, присоединяя промывную жидкость к общему кислотному извлечению. Кислотное

извлечение подщелачивают раствором аммиака до щелочной реакции фенолфталеину и алкалоиды извлекают последовательно 5,4,3мл хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Каждую порцию хлороформного извлечения фильтруют через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 4-5 г безводного сульфата натрия, смоченного хлороформом. Фильтр промывают хлороформом дважды по 5 мл. Хлороформ отгоняют на водяной бане до 1-2 мл, остаток в колбе удаляют продуванием воздуха до полного исчезновения запаха хлороформа. Сухой остаток растворяют в 5мл 0,02 м раствора HCl (при подогревании на водяной бане) и оттитровывают избыток последней 0,02 м раствором NaOH до появления желтой краски (индикатор метиловый красный 1 мл 0,02 м раствора HCl соответствует 0,005780г алкалоидов (считая на гиосциамин), которых в листьях красавки должно быть не менее 0,3 %. Содержание алкалоидов в пересчете на абсолютно сухой вес в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot 0,00578 \cdot 100 \cdot 100}{P(100 - e)}$$

где, а - объем 0,02 м раствора HCl, б - объем 0,02 м раствора NaOH, израсходованного на титрование, в мл, Р - навеска, высчитанная поотмеренному объему эфирного извлечения в граммах, в - влага в процентах. При содержании алкалоидов более 0,3% для приготовления лекарственных форм листья красавки берут соответственно в меньшем количестве.

Контрольные вопросы:

1. Характеристика алкалоидов.
2. Количественное определение алкалоидов.
3. В каких формах встречаются алкалоиды в растениях?
4. Физико-химические свойства алкалоидов.
5. На какие группы делятся обще осадочные реактивы.
6. Хроматографический анализ алкалоидов.
7. При помощи каких реактивов проводится качественное обнаружение алкалоидов.
8. Как проводят реакцию на стрихнин.
9. Как проводят реакцию на бруцин.
10. Классификация алкалоидов.

Лабораторная работа 2 «Качественное обнаружение и количественное определение дубильных веществ (танинов) в растительном сырье»

Дубильные вещества относятся к группе танинов и получили свое название за способность дубить кожи и делать их водонепроницаемыми. Обычно для этого использовали кору дуба, поэтому данный процесс

обработки кожи был назван дублением, а сами вещества дубильными. Дубильные вещества представляют собой производные многоатомных фенолов и содержатся почти во всех широко известных растениях. «Дубильные соединения определяются в различных органах растений, но преимущественно в коре и древесине деревьев и кустарников, а также в корнях и корневищах различных травянистых растений (дуб, береза, черемуха, зверобой, полынь, ревень, черника, пижма). Дубильные вещества обычно мало токсичны. Некоторые растения, содержащие особенно много танинов, применяют как вяжущие и бактерицидные средства при желудочно-кишечных заболеваниях, для полоскания горла. Противовоспалительный эффект дубильных соединений основан на взаимодействии белковых веществ с танинами, при этом на слизистых оболочках образуется защитная пленка, препятствующая дальнейшему развитию воспалительного процесса. Танины, нанесенные на обожженные места, ссадины и раны, также свертывают белки с образованием защитной пленки, поэтому используются как местные кровоостанавливающие и противовоспалительные средства. Кроме того, танины применяются при отравлении алкалоидами и солями тяжелых металлов».

2.1. Качественное обнаружение дубильных веществ в растительном сырье

1. Экстракция 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.

Реакции обнаружения дубильных веществ

Реакция с раствором 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 желатин таннатов, которые растворимы в 44 избытке реактива. Результаты анализа наблюдают на черном фоне, сравнивая с исходным извлечением.

Реакция с солями алкалоидов

К 3-5 мл извлечения добавляют 2-3 капли 1% раствора солей кодеина, хинина или другого алкалоида. При наличии таннидов выпадает осадок или наблюдается помутнение раствора.

Реакция с калия дихроматом

К 3-5 мл извлечения добавляют 2-3 капли 5% раствора калия бихромата. При наличии таннидов наблюдается потемнение раствора или выпадение желто-коричневого осадка.

Реакция со свинцом основным уксуснокислым

К 3-5 мл извлечения добавляют раствор свинца основного уксуснокислого. При наличии танидов выпадает осадок.

Реакция с реактивом Фолина-Дениса (смесь фосфомолибденовой и фосфовольфрамовой кислот)

К 3-5 мл извлечения добавляют 3-5 капель реактива Фолина-Дениса и небольшое количество натрия карбоната. При наличии танидов образуется вольфрамовая или молибденовая синь. Окраска устойчива. Эта реакция может быть использована для количественного определения дубильных веществ.

Результаты реакций фиксируют и указывают, какие реакции являются специфическими.

Реакции отличия групп танидов:

Реакция с солями железа (III)

К 2-3 мл извлечения добавляют 3 капли 1% раствора железоаммонийных квасцов. Гидролизующиеся дубильные вещества дают при этом черно-синее окрашивание, конденсированные - черно-зеленое.

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 желтооранжевый осадок, а гидролизующиеся выпадают в осадок только при добавлении избытка бромной воды (постепенно).

Реакция свинца ацетата среднего в уксусной среде

К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 10% уксусной кислоты и 1 мл 10% раствора свинца ацетата среднего. При наличии 45 гидролизующихся дубильных веществ выпадает белый осадок, осадок отфильтровывают; к фильтрату добавляют 10 капель 1% раствора железоаммонийных квасцов и 0,5 г натрия ацетата (не встряхивать!). При наличии в сырье конденсированных дубильных веществ фильтрат окрашивается в черно-зеленый цвет.

Реакция с формальдегидом и концентрированной хлористоводородной кислотой

К 25 мл извлечения прибавляют 5 мл 40% раствора формальдегида и 3 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Смесь кипятят 30 минут в колбе с обратным холодильником. При наличии конденсированных дубильных веществ и галловой кислоты образуется осадок кирпично-красного цвета; после охлаждения осадок отфильтровывают.

К 10 мл фильтрата в пробирке добавляют 1 мл 1 % раствора железоаммонийных 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.

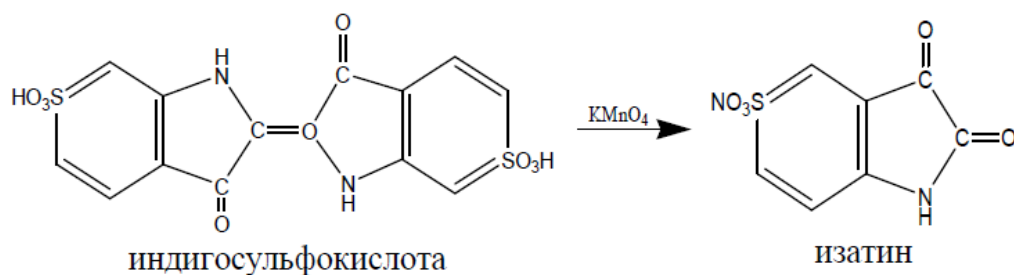
Результаты реакций фиксируют и делают заключение о характере дубильных веществ в анализируемом сырье.

2.2. Количественное определение дубильных веществ в растительном сырье

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

Методика. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 200 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на плитке с закрытой спиралью в течение 30 минут при периодическом перемешивании.

Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают в мерную колбу вместимостью 250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Сырье в колбе ополаскивают 30-40 мл теплой воды и фильтруют в ту же мерную колбу. Экстракт доводят до метки водой. Затем отбирают мерной пипеткой 25 мл полученного извлечения в 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. Реакция образования изатина в эквивалентной точке титрования:



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

$$X = \frac{(V_0 - V) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{25 \times m \times (100 - W)},$$

где V_0 - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах; V - объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; m - масса сырья, в граммах; 0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) в пересчете на танин, в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах; 250 - общий объем извлечения, в миллилитрах; 25 - объем извлечения, взятого для титрования, в миллилитрах.

Примечание. Приготовление раствора индигосульфокислоты. 1 г индигокармина растворяют в 25 мл концентрированной серной кислоты, затем прибавляют дополнительно 25 мл концентрированной серной кислоты и разбавляют водой до 1000 мл, осторожно вливая полученный раствор в воду, в мерной колбе вместимостью 1000 мл.

Контрольные вопросы:

1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций и количественного определения дубильных веществ?
2. Какие реакции на дубильные вещества являются специфическими?
3. Какими реакциями можно доказать наличие в сырье гидролизуемых и конденсированных таннидов?
4. Почему титрование калия перманганатом нужно проводить медленно и при большом разведении?
5. Для чего ставится контрольный опыт при определении количественного содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье?
6. Преимущество и недостатки перманганатометрического метода количественного определения дубильных веществ перед другими методами?

Лабораторная работа 3 «Качественное обнаружение кумаринов в растительном сырье»

Кумарин играет ключевую роль в фармацевтической промышленности. Основным предметом исследований в последнее время было производство антикоагулянтов на основе кумарина, анальгетиков, антиоксидантов, а также средств, обладающих антимикробным (противовирусным, противогрибковым и антипаразитарным), противоопухолевым, противодиабетическим и

противовоспалительным действием. Препараты, изготовленные из соединений кумарина, обладают низкой токсичностью, малым спектром побочных эффектов и меньшей лекарственной устойчивостью.

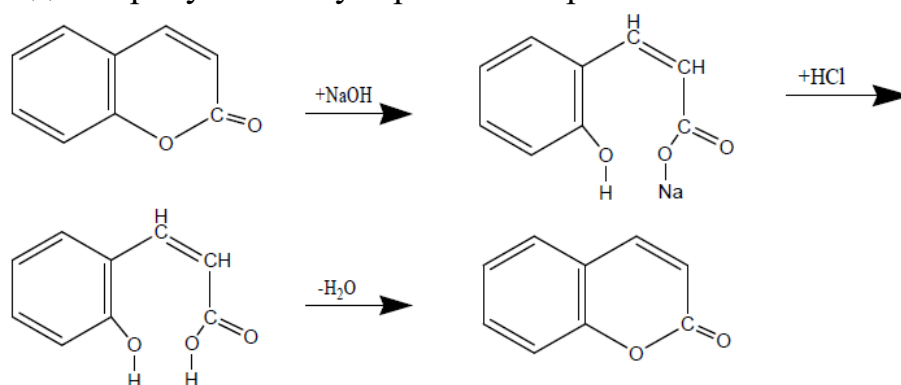
3.1. Получение извлечения из растительного сырья, содержащего кумарины

0,5 г измельченного сырья помещают в колбу на 50 мл, заливают 15 мл 95% спирта и нагревают с воздушным холодильником на кипящей водяной бане 10 мин. Содержимое колбы фильтруют через вату. С полученным извлечением проводят качественные реакции на кумарины и хроматографическое исследование.

3.2. Качественное обнаружение кумаринов в растительном сырье

1. Лактонная проба

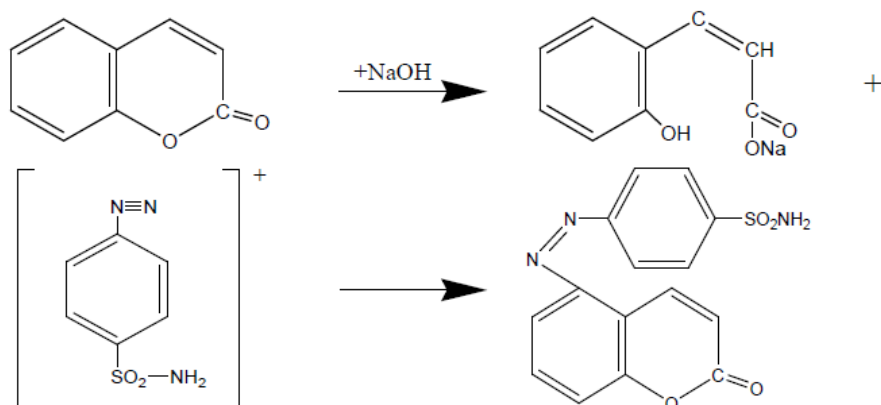
Реакция основана на способности кумаринов при нагревании в щелочной среде, образовывать соли желтого цвета, растворимые в воде, которые при подкислении превращаются в исходные продукты, не растворимые в воде. В пробирку наливают 1 мл исходного раствора, добавляют 0,5 мл 10% раствора натрия или калия гидроксида, нагревают на кипящей водяной бане. В присутствии кумаринов появляется желтое окрашивание. Содержимое пробирки охлаждают, добавляют 4 мл дистиллированной воды, 10% раствор хлористоводородной кислоты до кислой реакции (по лакмусу). Появление осадка или помутнение раствора подтверждает присутствие кумаринов в сырье.



2. Реакция азосочетания

Реакция основана на способности кумаринов образовывать с ароматическими аминами окрашенные продукты. К 1 мл исходного раствора добавляют 3 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л), нагревают на водяной бане, охлаждают и смешивают с 1 мл свежеприготовленного диазотированного раствора сульфаниловой кислоты (готовится путем смешения 1 мл сульфаниловой кислоты и 2 мл 10% раствора натрия нитрита). В присутствии кумаринов в зависимости от их химической

структуры появляется окрашивание от красно-оранжевого до вишнево-красного.



Примечание: приготовление диазореактива: а) приготовление раствора сульфаниловой кислоты: 42 4,5 г сульфаниловой кислоты и 45 мл конц. хлористоводородной кислоты в 500 мл воды. б) приготовление раствора натрия нитрита: 10 г натрия нитрита растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл.

3.3 Идентификация кумаринов методом хроматографии в тонком слое сорбента

На стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол» наносят капилляром спиртовое извлечение из сырья и раствор известного кумарина (свидетеля). После нанесения каждой капли дают возможность ей подсохнуть. Разделение проводят в камере, в системе хлороформ-этанол (9:1). После поднятия фронта растворителя на 15-18 см, хроматограммы вынимают из камеры, подсушивают под тягой, а затем высушивают при 100-120°C. Хроматограммы просматривают в УФ-свете. Кумарины в зависимости от структуры флуоресцируют ярко-голубым, зеленовато-голубым, фиолетовым, зеленым цветом. Пятна кумаринов отмечают простым карандашом. Хроматограмму на пластинке «Силуфол» проявляют путем опрыскивания 10% спиртовым раствором натрия гидроксида, подсушивания при 100-120°C и опрыскивания диазотированной сульфаниловой кислотой. Появляются пятна кумаринов от оранжево-красного до синефиолетового цвета. Рассчитывают величину R_f , сравнивая с R_f достоверных образцов кумаринов, идентифицируют компоненты исследуемого извлечения и делают заключение о качественном составе кумаринов. Зарисовывают схему хроматограммы.

Контрольные вопросы:

1. Как получить извлечение кумаринов из сырья и очистить его от сопутствующих веществ?
2. Почему для извлечения кумаринов из ЛРС не используют воду?

3. Что происходит при взаимодействии кумаринов со щелочью? Напишите схему реакции, укажите аналитический эффект.
4. Как провести реакцию азосочетания и является ли она специфической для кумаринов? Напишите схемы реакций.
5. Какую флуоресценцию проявляют кумарины в УФ-свете?

Лабораторная работа 4 «Качественное обнаружение и количественное определение флавоноидов в растительном сырье»

К настоящему времени установлена структура и описаны физико-химические характеристики более 7500 природных флавоноидов. Наиболее богаты флавоноидами (от 1 до 30%) растения семейств: сложноцветные (астровые), бобовые, зонтичные (сельдерейные), губоцветные (яснотковые), розоцветные, гречишные, рутовые, березовые и др. Локализуясь главным образом в цветках, листьях, плодах, в меньшем количестве - в стеблях и корнях, флавоноиды достигают максимума содержания в фазе бутонизации и цветения. Значительно реже флавоноиды встречаются в микроорганизмах и тканях насекомых. Таким образом, флавоноиды – соединения широко распространенные в природе. Примерами флавоноидов, значимых для человека являются рутин и кверцетин.

Рутин – органическое соединение из группы флавоноидов, обладающее витаминной активностью. Основные функции рутина: антиоксидантные, противовоспалительные, антиканцерогенные, антитромбические, противоязвенные, антиаллергические, противоотечные, спазмолитические, сахароснижающие, желчегонное действие; уменьшение венозного отека; сдерживание агрегации тромбоцитов; защита от токсинов и др. К основным природным источникам рутина относятся: листья гречихи, листья чайного куста, черная смородина, шиповник, клюква, соки черники и рябины, можжевельник (ягоды), боярышник (бутоны), ромашка (цветы), календула.

Кверцетин является агликоном рутина. К основным функциям кверцетина относятся: антиоксидантное, противоотечное, спазмолитическое, антигистаминное, противовоспалительное, диуретическое, противоязвенное, гипотензивное, иммуностимулирующее, противодиабетическое, гипогликемическое, противовирусное, ранозаживляющее, герпротекторное, анаболическое действия; снижение проницаемости стенок капилляров; повышение тонуса сосудов; блокада синтеза лейкотриенов и других воспалительных медиаторов; процессы ремоделирования костной ткани; эстрогено-подобное действие; нормализация выработки кортизона и инсулина; защита ЛНП-холестерина от окисления; улучшение реологии крови; угнетение синтеза тромбосана; поддержка миокарда; стабилизация клеточных мембран; стимуляция ферментных систем; улучшение функций фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов; транспорт калия и натрия; адаптация к гипоксии; апоптоз раковых клеток.

В организме человека кверцетин, как и рутин, не вырабатывается. К основным источникам кверцетина природного происхождения относятся: брусника, черная смородина, малина, ежевика, клюква, черника, рябина, облепиха.

4.1. Качественное обнаружение флавоноидов в растительном сырье

0,5 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 30 мл с воздушным холодильником, заливают 15 мл 70% этанола и нагревают на кипящей бане в течение 10 мин.

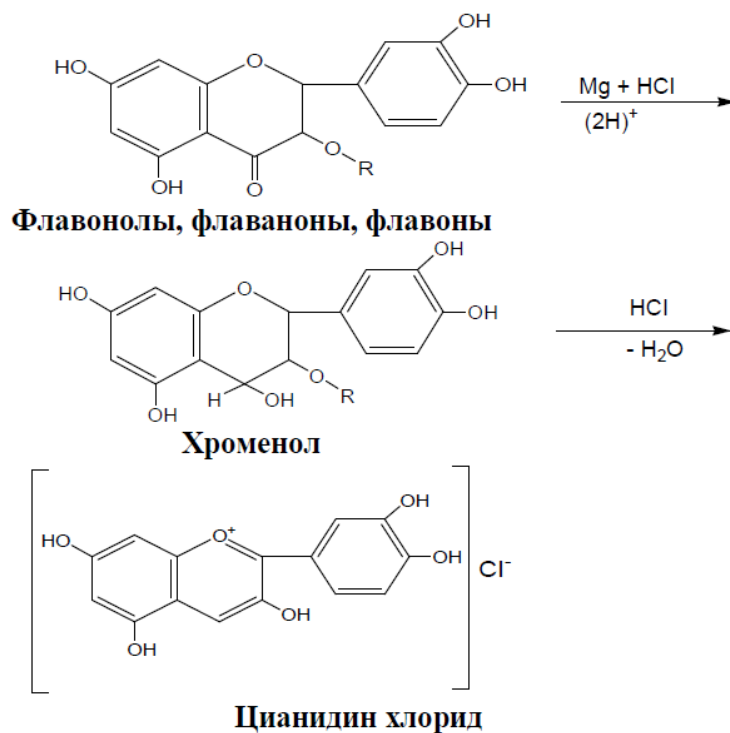
После охлаждения жидкость фильтруют и проводят качественные реакции на флавоноиды.

1. Цианидиновая реакция или проба Синода

В три пробирки наливают по 1 мл фильтрата. В одну пробирку добавляют порошок магния, во вторую - цинка, в 34 третью - только фильтрат. Затем во все три пробирки добавляют по 5-7 капель концентрированной хлористоводородной кислоты. При наличии значительного количества флавоноидов в пробирках с магнием и цинком сразу же появляется розовое, оранжевое или красное окрашивание. При малом количестве флавоноидов необходимо нагревание. Для этого пробирки помещают в водяную баню на 10 минут, а затем наблюдают окраску.

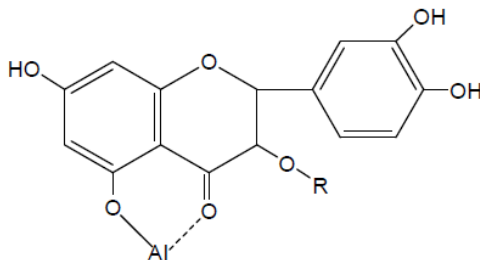
Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием или цинком в присутствии хлористоводородной кислоты дают розовое, красное или оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов.

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



2. Реакция с алюминия хлоридом

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



3. Реакция с аммиаком, натрия гидрокарбонатом, щелочью

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

4. Реакция с солями железа (III)

К 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли 1% раствора железа (III) хлорида или железоммонийных квасцов. При наличии флавоноидов с орто-диоксигруппировкой в кольце В появляется черно-синее окрашивание и осадок. Эту реакцию дают и другие фенольные соединения. Из приведенных

реакций специфическими являются цианидиновая проба и реакция с алюминия хлоридом.

Результаты качественных реакций запишите в таблицу.

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

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

5. Хроматографическое исследование флавоноидов

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

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

4.2. Количественное определение флавоноидов в растительном сырье

1. Количественное определение флавоноидов в траве горца птичьего (спорыша)

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0,5 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, фильтр промывают 70% спиртом и доводят объем фильтрата до метки (раствор А). 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты, 2 мл 2%

раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 20 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин и абсолютно-сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 100 \times 25}{330 \times m \times (100 - W)},$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; 330 - удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм; m - масса сырья, в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах. Запишите кратко методику определения, рассчитайте содержание флавоноидов и сделайте вывод о соответствии сырья требованиям ФС.

2. Количественное определение флавоноидов в цветках василька синего

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, колбу выдерживают на водяной бане при температуре 40-45°C в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл.

Вату с сырьем снова помещают в колбу, прибавляют 100 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, предварительно смывая частицы сырья с воронки в колбу, и повторяют это экстрагирование указанным выше способом. Затем содержимое колбы фильтруют через вату в ту же мерную колбу и после охлаждения доводят до метки 1% раствором хлористоводородной кислоты. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата, и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 1% раствор хлористоводородной кислоты.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно-сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 250 \times 100}{453 \times m \times (100 - W)},$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; 453 - удельный показатель поглощения цианидин-3,5- дигликозида в 1% растворе хлористоводородной кислоты; m - масса сырья, в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

3. Количественное определение флавоноидов в траве зверобоя

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. 0,5 г (точная навеска) сырья помещают в колбу на 100 мл, прибавляют 20 мл 50% спирта. Колбу нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через вату в мерную колбу на 50 мл. Вату с сырьем возвращают в колбу, прибавляют 20 мл 50% спирта и проводят повторную экстракцию. Фильтруют извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят 50% спиртом до метки и перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, 1 каплю разведенной уксусной кислоты, 1 мл раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95 % спиртом до метки. Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. 39 Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно-сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X_3 = \frac{D \times c \times 50 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 100 \times (100 - W)},$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 - оптическая плотность раствора ГСО рутина; m - масса сырья, в граммах; c - масса ГСО рутина, в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Примечание: приготовление раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина: около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 ч, растворяют в 85 мл 95% спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают.

Контрольные вопросы:

1. Как получить извлечение из сырья для проведения качественных реакций?
2. Назовите качественные реакции на флавоноиды, на каких свойствах флавоноидов они основаны? Химизм реакций. Почему при проведении пробы Синода 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 методы и основные этапы количественного определения флавоноидов в ЛРС.

Лабораторная работа 5 «Основы подбора сырья, его подготовки и составления рецептур для производства БАД»

Задание № 1. Руководствуясь соответствующей нормативной документацией, установите соответствие ЛРС требованиям соответствующего ГОСТа и статьям Государственной фармакопеи:

1. Листья мать-и-мачехи (цельные), крупные, округлые, имеют густое опушение на верхней стороне. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней - беловато-серый. Запах свойственный растению. Вкус слабо-горьковатый с ощущением слизистости. Влажность 8 %; зола общая - 23%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 9%; органические примеси - 2, 3%; минеральные примеси 1,5%. Наличие побуревших листьев – 6 8,5 %. Упакованы в бумажные пакеты по 15 кг. Обозначенный срок годности - 5 лет.

2. Листья мяты перечной размером до 10 мм с примесью цветков и бутонов. Край листа пильчатый с неравными острыми зубцами; поверхность голая. Цвет листьев от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах отсутствует. Вкус горьковато-сладкий. Эфирное масло - 0,5 %; влажность - 13%; зола общая - 9%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 6,6%; почерневшие листья – 5,8 %; стебли - 8 %. Органические примеси - 3%; минеральные примеси - 1,6 %. Упакованы в мешки тканевые по 10 кг нетто. Обозначенный срок годности 24 мес.

3. Цветки ромашки частично осыпавшиеся, цветочные корзинки полушаровидной формы, с остатками цветоносов длиной 4 см. Размер корзинки (без язычковых цветков) 2-3 мм в поперечнике. Цвет язычковых цветков желтый. Запах сильный, ароматный. Вкус пряный, горьковатый, слегка слизистый. Эфирное масло – 0,5%, влажность - 10%; зола общая - 11%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 3%; листья, стебли, корзинки с остатками цветоносов длиннее 3 см - 5%; корзинки

побуревающие -10%. Органические примеси – 3%; минеральные примеси - 0,5%. Упакованы в мешки тканевые по 5 кг нетто. Обозначенный срок годности 18 мес.

4. Корневища и корни девясила (целое сырье) цилиндрические длиной 2-20 см, толщиной 0,5-3 см, твердые, в изломе слабозернистые, с заметными буроватыми блестящими точечками - вместилища с эфирным маслом. Цвет снаружи серовато-бурый, на изломе - желтовато-белый или желтовато-серый. Запах ароматный. Вкус сладковато-медовый. Влажность - 11%; зола общая - 9%; дряблые корневища и корни – 6 %; корневища и корни, потемневшие в изломе – 3 %; куски корней длиной менее 2 см не более 10 %. Органические примеси 3%; минеральные примеси - 0,5%. Упакованы в мешки тканевые по 30 кг нетто. 7

5. Травы хвоща полевого измельченная проходит сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус слегка сладковатый. Влажность не более 12%; зола общая - 23%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 15%; другие части растения - 1,5%; частиц, не прошедших сито с отверстиями диаметром 7 мм – 25 %; частиц, прошедших сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - 15%. Органические примеси 2%; минеральные примеси - 0,5%. Упакованы в мешки тканевые по 10 кг нетто. Обозначенный срок годности – 4 года.

6. Травы чабреца - смесь цельных или частично измельченных тонких веточек, листьев, кусочков стеблей. Листья короткочерешковые, голые с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. Кусочки веточек тонкие, зеленовато-коричневого цвета, с фиолетовым оттенком. Цветки мелкие, одиночные. Венчик длиной 5-8 мм, тычинок 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью. Цвет листьев - серовато-зеленый; чашечки - буровато-красный; венчика - синевато-фиолетовый. Запах ароматный. Вкус ярко жгучий. Влажность - 13%; зола общая - 11%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 4%; стебли толщиной более 0,5 мм - 5 %; органические примеси - 1%; минеральные примеси - 1%. Упакована в мешки тканевые по 15 кг нетто. Обозначенный срок годности - 2 года.

7. Корневища и корни девясила (целое сырье) цилиндрические длиной 2-20 см, толщиной 0,5-3 см, твердые, в изломе слабозернистые, с заметными буроватыми блестящими точечками - вместилища с эфирным маслом. Цвет снаружи серовато-бурый, на изломе - желтовато-белый или желтовато-серый. Запах ароматный. Вкус сладковато-медовый. Влажность - 11%; зола общая - 9%; дряблые корневища и корни – 6 %; корневища и корни, потемневшие в изломе – 3 %; куски корней длиной менее 2 см не более 10 %. Органические примеси 3%; минеральные примеси - 0,5%. Упакованы в мешки тканевые по 30 кг нетто.

8. Травя хвоща полевого измельченная проходит сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус слегка сладковатый. Влажность не более 12%; зола общая - 23%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 15%; другие части растения - 1,5%; частиц, не прошедших сито с отверстиями диаметром 7 мм – 25 %; частиц, прошедших сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, - 15%. Органические примеси 2%; минеральные примеси - 0,5%. Упакованы в мешки тканевые по 10 кг нетто. Обозначенный срок годности – 4 года.

9. Травя чабреца - смесь цельных или частично измельченных тонких веточек, листьев, кусочков стеблей. Листья короткочерешковые, голые с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. Кусочки веточек тонкие, зеленовато-коричневого цвета, с фиолетовым оттенком. Цветки мелкие, одиночные. Венчик длиной 5-8 мм, тычинок 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью. Цвет листьев - серовато-зеленый; чашечки - буровато-красный; венчика - синевато-фиолетовый. Запах ароматный. Вкус ярко жгучий. Влажность - 13%; зола общая - 11%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - 4%; стебли толщиной более 0,5 мм - 5 %; органические примеси - 1%; минеральные примеси - 1%. Упакована в мешки тканевые по 15 кг нетто. Обозначенный срок годности - 2 года.

Порядок выполнения и оформления работы по заданию 1

- Выписать условие задания.
- Ознакомиться с требованиями соответствующего стандарта и статьи Государственной фармакопеи, распространяющихся на ЛРС, указанное в задании, в части вопроса, касающегося его качества. Составить таблицу по указанной ниже табличной форме, вписать в нее необходимые сведения.
- Проанализировать данные таблицы и сделать вывод о стандартности (нестандартности) ЛРС.

Таблица 1 – Показатели качества ЛРС

Показатели	Характеристика и нормы по требованиям		Характеристика показателей по условиям задания	Вывод о стандартности по каждому показателю
	ГОСТа (номер, название)	статьи фармакопеи №		

Задание № 2 Письменно ответить на вопросы:

1. Какие вещества относятся к биологически активным?
2. Что такое шрапнельный эффект?

3. Какие вещества называют «действующими», какие «кажущимися неактивными»?
4. Фармакогнозия – что это?
5. Дайте определение «сопутствующим веществам».
6. Дайте определение «балластным веществам»
7. Возможен ли переход веществ из группы «кажущиеся неактивными» в группу «действующих веществ»? А наоборот?
8. Назовите три основные группы веществ, входящих в состав любого растения.
9. Какова доля неорганических веществ в сухом остатке растений? Как определяют это количество?
10. На чем основывается деление неорганических веществ растений на макро- и микроэлементы? Назовите представителей?
11. Перечислите примеры растений, в состав которых входят микроэлементы, проявляющие фармакологическую (фарм.) активность.
12. Назовите примеры использования золы ЛРС в научной медицине.
13. Все органические вещества лекарственных растений можно разделить на две большие группы. Какие?
14. Относятся ли вещества вторичного синтеза к БАВ?
15. Назовите функции веществ «кажущихся неактивными». Приведите примеры.
16. Какие виды экстракционных препаратов из ЛРС Вы знаете?
17. На примере травы сушеницы топяной раскройте значение совместного участия в фарм. эффекте различных групп БАВ.
18. Как влияют технологические приёмы извлечения БАВ на эффективность их действия? Приведите пример.
19. Приведите пример использования технологии последовательного извлечения БАВ.
20. Что такое обмен веществ?
21. Что такое первичный метаболизм?
22. Расшифруйте понятие «продукты вторичного метаболизма». Каковы их особенности?
23. Гликозилирование – что это? Что образуется в результате такой реакции.
24. Перечислите вещества первичного синтеза.
25. Белки и АК ЛРС
26. Перечислите сложные белки, входящие в состав ЛРС.
27. Липиды ЛРС
28. Нуклеиновые кислоты ЛРС
29. Ферменты ЛРС
30. Органические кислоты ЛРС. Приведите пример фарм. активных органических кислот ЛРС.
31. Витамины ЛРС.

32. Углеводы ЛРС.
33. Слизи и камеди ЛРС.
34. Перечислите, какие группы веществ относятся к веществам вторичного метаболизма?
35. Что такое диссимилиация?
36. Каковы особенности сбора коры лекарственных растений (ЛР)?
37. Каковы особенности сбора корней и корневищ ЛР?
38. Каковы особенности сбора листьев, травы, цветков ЛР?
39. Каковы особенности сбора плодов ЛР?
40. Каковы особенности сбора почек ЛР?
41. Каковы характерные особенности правильно высушенных частей ЛР?
42. Перечислите факторы, которые необходимо учитывать при разработке БАД в современных условиях.
43. Перечислите современные задачи создания новых БАД.
44. Обозначьте основные требования по количественному содержанию различных групп БАВ в БАД.
45. Каковы особенности производства, упаковывания и маркирования БАД

№ варианта	№№ заданий для		№ варианта	№№ заданий для	
	задания № 1	задания № 2		задания № 1	задания № 2
1	1, 6	3, 10, 22, 30, 45	9	2, 5	1, 16, 25, 22, 37
2	2, 5	4, 12, 29, 34, 44	10	4, 1	2, 10, 24, 36, 40
3	3, 4	5, 14, 28, 39, 43	11	3, 4	3, 11, 23, 35, 41
4	1, 2	6, 15, 27, 30, 42	12	2, 3	4, 12, 22, 34, 43
5	5, 1	1, 7, 15, 26, 41	13	1, 6	6, 13, 20, 33, 44
6	6, 2	8, 17, 25, 35, 40	14	3, 6	7, 14, 19, 32, 45
7	2, 1	4, 9, 24, 39, 42	15	4, 1	8, 15, 18, 26, 31
8	3, 4	3, 10, 23, 38, 44	16	6, 1	9, 16, 19, 28, 32

Задание № 3

С учетом рекомендуемых уровней потребления пищевых и биологически активных веществ, а также теоретических основ из части 3, оценить способность БАД «Сквален-Лецитин» нормализовать пищевой статус человека при его употреблении в количестве 5, 12, 18 и 25 г в сутки. Данные расчётов привести в виде таблицы 2, обосновать адекватное количество суточного потребления БАД «Сквален-Лецитин».

Таблица 2 - Состав физиологически функциональных ингредиентов БАД «Сквален-Лецитин»

№	Наименование физиологически функциональных ингредиентов	Суточная потребность по МР 2.3.1.19150-04	Количество ингредиента по рецептуре в составе БАД	Обеспечение суточной потребности, % от нормы				
				100 г	25 г	18 г	12 г	5 г
1	Сквален, мг	400	510	127				
Аминокислоты, г								
2	лейцин	4,6	4,30	93,5				
3	изолейцин	2,0	2,80	140				
4	валин	2,5	3,20	128				
5	лизин	4,1	4,70	115				
6	треонин	2,4	2,70	112				
7	метионин+цистин	1,8	3,20	178				
8	фенилаланин+тирозин	4,4	5,30	120				
9	гистидин	2,1	1,70	81				
10	аргинин	6,1	5,60	92				
11	серин	8,3	5,30	64				
12	Фосфолипиды, г	7	25,20	360				
Макроэлементы, мг:								
13	фосфор	800	520	65				
14	магний	400	260	65				
Микроэлементы, мг:								
15	медь	1	3	300				
16	железо	15	15,8	105				
17	марганец	2	4	200				
Витамины, мг:								
18	Е	15	12	80				

Лабораторная работа 6 «Исследование процесса экстракции БАВ из сырья растительного происхождения»

Задания:

1. Определить влажность растительного сырья (свежего и свежемороженого)
2. Получить контрольные образцы экстрактов из каждого вида сырья (п. 1.2).
3. Получить опытные образцы экстрактов (п. 1.3).

По п. 1.4:

4. Определить содержание экстрактивных веществ в водных экстрактах, полученных при T=20 °C в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мяты перечной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороженных.
5. Определить содержание экстрактивных веществ в водных экстрактах, полученных при T=40 °C в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мяты перечной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороженных.
6. Определить содержание экстрактивных веществ в водных экстрактах, полученных при T=20 °C в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев Melissa officinalis: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороженных.

7. Определить содержание экстрактивных веществ в водных экстрактах, полученных при $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мелиссы лекарственной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежеморожено-ных.
8. Определить содержание экстрактивных веществ в водно-спиртовых экс-трактах, полученных при $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мяты перечной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороже-ных.
9. Определить содержание экстрактивных веществ в водно-спиртовых экстрактах, полученных при $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мяты перечной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороже-ных.
10. Определить содержание экстрактивных веществ в водно-спиртовых экс-трактах, полученных при $T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мелиссы лекарственной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороженных.
11. Определить содержание экстрактивных веществ в водно-спиртовых экстрактах, полученных при $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 мин из листьев мелиссы лекарственной: 1) высушенных; 2) свежих; 3) свежемороженных.
12. Построить графики зависимости выхода экстрактивных веществ (%), от продолжительности экстрагирования (мин) для всех экспериментальных образцов (рис. 4).
13. Определить оптимальные параметры экстракции для каждого вида сырья.
14. Сравнить показатели выхода экстрактивных веществ в контрольном об-разце с образцом, полученным наиболее оптимальным способом экстрагирования.
15. Ответить на контрольные вопросы

Выполнение работы:

Содержание экстрактивных веществ является одной из важных характеристик, которая дает возможность установить качество экстракта, получаемого из лекарственного растительного сырья. Известно, что процесс извлечения экстрактивных веществ зависит от ряда факторов, таких как качество сырья, продолжительность экстракции и температура. Ввиду этого возникает необходимость изучения влияния технологических факторов на выход экстрактивных веществ из лекарственного растительного сырья, позволяющий выбрать наиболее предпочтительный режим экстрагирования.

Объекты исследования – листья мяты перечной и мелиссы лекарственной или другого ЛРС.

Исходное сырье: высушенные, свежие и свежемороженые листья или др. части растений. Размер частиц: 1-3 мм.

Экстрагенты: вода, спирт (40 % и 70 %-й концентрации).

1.1. Определение влажности растительного сырья

Арбитражный метод

Под влажностью сырья понимают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в сырье при высушивании до постоянной массы.

Техника определения. Берут две навески хорошо измельченного сырья массой 3-5 г, взвешенные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску помещают в предварительно высушенный и взвешенный вместе с крышкой бюкс 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 проводят через 2 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.

Влажность сырья (X, %) вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m},$$

где m - масса сырья до высушивания, г;

m_1 - масса сырья после высушивания, г.

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%.

Экспресс-метод определения массовой доли влаги на приборе ВЧ конструкции К.Н. Чижовой

Для быстрого удаления влаги используют высушивание с помощью инфракрасных лучей, которые воспринимаются не только поверхностью, но и проникают вглубь продукта на 2-3 мм, обуславливая его интенсивный прогрев. Одним из источников инфракрасных лучей могут быть нагретые металлические поверхности.

На этом принципе работает прибор ВЧ (рис. 1), представляющий собой две массивные металлические плиты (сплав алюминия и чугуна) круглой или прямоугольной формы, между которыми помещается тонкий слой высушиваемого материала. Плиты соединены между собой шарниром и нагреваются электрическими элементами, расположенными с внешних сторон прибора, что обеспечивает быстрое обезвоживание продукта. В процессе работы расстояние между плитами прибора составляет 2 мм, температура контролируется термометрами. Нагрев плит может быть как сильным, так и слабым. Сильный нагрев используется при первоначальном разогревании прибора, слабый - для поддержания требуемой температуры. Переключают

сильный нагрев на слабый специальным переключателем. Контактный термометр обеспечивает постоянство заданной температуры в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$.

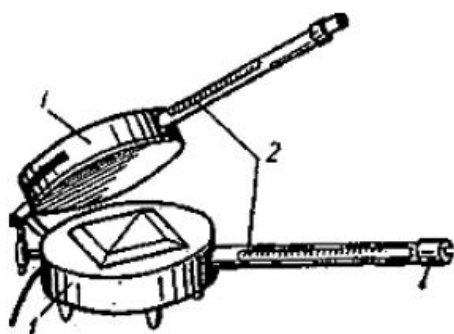


Рисунок 1 - Прибор ВЧ

(конструкция К.Н. Чижовой): 1 - металлические плиты; 2-термометры, заключенные в гильзы

Высушивают объект в пакетах треугольной или прямоугольной формы, которые готовят из газетной или фильтровальной бумаги.

Пакеты для прибора прямоугольной формы готовят следующим образом (рис. 2). Лист бумаги форматом 20 x 14 см складывают пополам, а открытые с трех сторон края пакета загибают на 1,5 см; размер готовых пакетов 8,5 x 11 см. Для прибора круглой формы бумагу форматом 15 x 15 см складывают по диагонали, загибая края на 1,5 см. В приборе легко помещаются два таких пакета, что позволяет проводить одновременно параллельные определения.

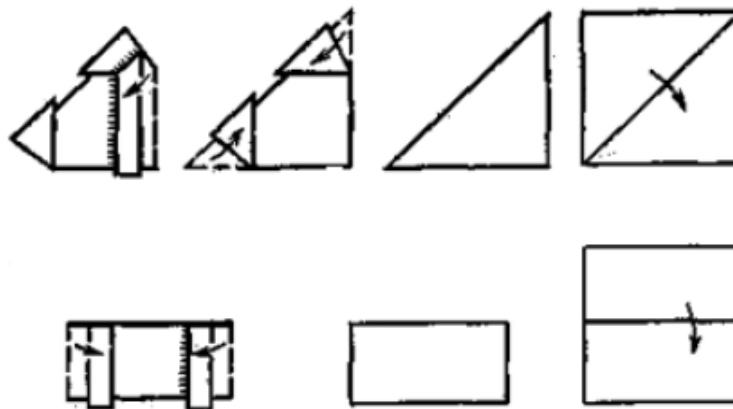


Рисунок 2 – Порядок подготовки бумажных пакетов для прибора ВЧ

При определении влажности сочного растительного сырья в бумажный пакет помещают дополнительный лист из фильтровальной бумаги размером 11 x 24 см, сложенный в три слоя так, чтобы два слоя помещались на нижней стороне пакета, а один слой - на верхней стороне.

Материалы, реактивы, оборудование. ЛРС, фарфоровая ступка с пестиком, пакеты из газетной бумаги, технические весы, эксикатор, прибор ВЧ.

Техника определения. Подготовленные пакеты предварительно высушивают в приборе при температуре 160°C в течение 3 мин, охлаждают 2-3 мин в эксикаторе и взвешивают с точностью $\pm 0,01$ г.

В высушенный и взвешенный бумажный пакет на технических весах взвешивают 3 г образца, помещают его между плитами прибора, нагретого до 160°C, и выдерживают при этой температуре в течение 3 мин. Затем, охладив в эксикаторе в течение 2 мин, пакет с пробой взвешивают.

Массовую долю влаги в образце W , % определяют по формуле:

$$W = \frac{m - m_1}{m - m_2} \cdot 100,$$

где m - масса пакета с навеской до высушивания, г;

m_1 - масса пакета с навеской после высушивания, г;

m_2 - масса пакета, г.

1.2. Приготовление контрольных экстрактов

Навеску по 2 г измельченного сырья (высушенного, свежего и свежемороженого) помещают каждое в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл 70%-го спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют содержимое через бумажный фильтр в колбу. В полученных экстрактах определяют концентрацию экстрактивных веществ методом рефрактометрии.

1.3. Приготовление опытных экстрактов

2 г измельченного до определенных размеров частиц 1-3 мм растительного сырья (высушенного, свежего, свежемороженого) помещают в коническую колбу со шлифом, объемом 250 мл и заливают 60 мл экстрагента. В качестве экстрагента используют воду и этиловый спирт с концентрацией 40%. Затем колбы плотно закрываются, и сырье оставляют настаиваться при периодическом встряхивании (по возможности) при температуре 20 °C / 40 °C в течение 5, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, мин. По истечении каждого промежутка времени берется проба на определение концентрации экстрактивных веществ методом рефрактометрии (см. пункт 4). Полученные данные вносятся в таблицы 1-4 для водных и водно-спиртовых экстрактов растительного сырья.

Таблица 1 – Экспериментальные данные рефрактометрии испытуемых водных экстрактов (водно-спиртовых экстрактов) растительного сырья

τ, мин.	Концентрация экстрактивных веществ в экстракте из высушенного сырья		τ, мин.	Концентрация экстрактивных веществ в экстракте из свежего сырья		τ, мин.	Концентрация экстрактивных веществ в экстракте из свежемороженого сырья	
	t=20°C	t=40°C		t=20°C	t=40°C		t=20°C	t=40°C
5			5			5		
20			20			20		
40			40			40		
60			60			60		
90			90			90		
120			120			120		
150			150			150		
180			180			180		

1.4. Определение содержания экстрактивных веществ

В зависимости от экстрагента настраивают рефрактометр на работу со спиртом или водой.

Перед работой на рефрактометре открывают заслонку 7 (рис. 3) осветительной призмы 6 и протирают смоченной эфиром, спиртом или ацетоном ватой гипотенузные плоскости осветительной 6 и измерительной призмы 11 (сильно смачивать не следует). Дают растворителю испариться и на плоскость измерительной призмы 11 наносят стеклянной палочкой или капилляром несколько капель исследуемого вещества. При этом палочка не должна касаться призмы. Закрывают заслонку 7 и поворотом зеркала, расположенного ниже измерительной призмы и зеркала, расположенного на левой стороне рефрактометра, добиваются наилучшей освещенности шкалы.

Глядя в зрительную трубу, фокусируют окуляр 4 так, чтобы шкала прибора и перекрестие были отчетливо видны. Вращением маховика 2 (рис. 3) находят границу светотени в поле зрения окуляра. Если граница размыта, то с помощью маховика 2, вращая его в любом направлении, необходимо добиться, чтобы граница раздела света и тени была четкой. Затем при помощи вращения маховика 5 добиваются исчезновения окраски граничной линии.

Наблюдая в окуляр, маховиком 2 необходимо совместить границу светотени точно на перекрестие и снять отсчет по шкале показателей преломления. Индексом для отсчета служит неподвижный вертикальный штрих призмы. Снятые показания заносят в таблицы 1-4.

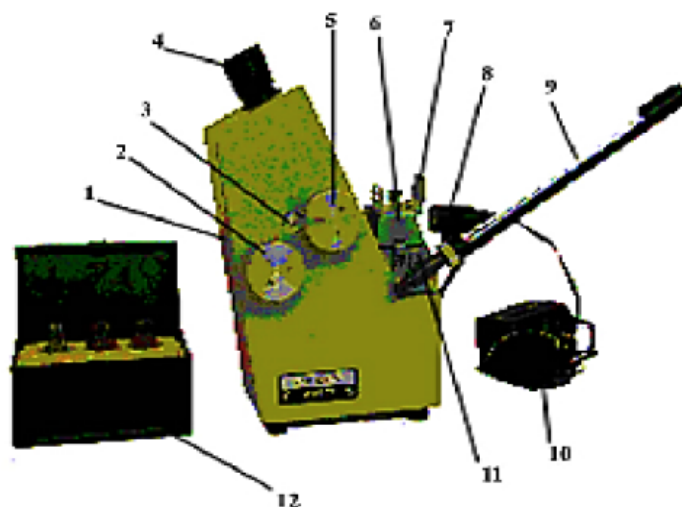


Рисунок 3 - Внешний вид рефрактометра

1 – корпус; 2 – маховик; 3 – заглушка; 4 – окуляр; 5 – маховик;
 6 – оправа осветительной призмы; 7 – заслонка;
 8 – осветитель; 9 – термометр; 10 – блок питания;
 11 – оправа измерительной призмы; 12 – упаковка

1.5. Пример построения графиков по результатам работы

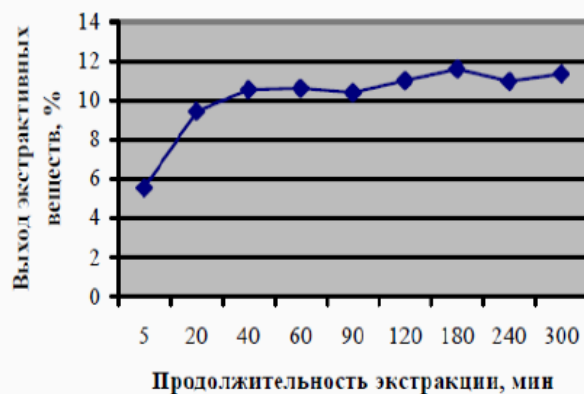


Рисунок 4 - График зависимости выхода экстрактивных веществ от продолжительности экстрагирования (водный экстракт высушенных листьев мяты перечной, $t=20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Контрольные вопросы:

1. Что такое экстракция? Основные стадии процесса экстракции.
2. Какие факторы влияют на полноту и скорость экстрагирования?
3. Как влияет степень измельчения сырья на диффузионный процесс?
4. Какую роль играет температура и вязкость экстрагента при экстракции растительного сырья?

5. Чем определяется выбор экстрагента?
6. Какое оборудование используется для экстракции?
7. Какие методы экстракции используются в производстве экстрактов?
8. Из каких стадий состоит технологическая схема производства сухих экстрактов?
9. В чем заключается сущность метода циркуляционного экстрагирования?
10. В каких случаях используют спиртоочистку?
11. Каковы преимущества и недостатки экстракции сжиженными газами и сверхкритической экстракции?
12. Какие методы используют для определения концентрации вещества в растворе?
13. Что является движущей силой диффузионного процесса при экстрагировании растительного сырья?
14. Какой принцип действия аппарата Сокслета при получении экстрактов?
15. С какой целью производят экстракты-концентраты?

Библиографический список

1. Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н., Исайкина Н.В., Коломиец Н.Э. Методы фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья. В 2-х ч. Ч. II. Химический анализ: учебное пособие. – Томск: СибГМУ, 2008. – 55 с.
2. Землякова Е. С. Биологически активные добавки и композиции из сырья растительного происхождения: учеб.-методич. пособие по лаб. работам для студ., обучающихся в бакалавриате по направлению подгот. 19.03.01 – Биотехнология: в 2 ч. – Калининград: ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», 2021. – Ч. 1. – 138 с.
3. Алёшин М.А. Химия растений: практикум. – Пермь: ИПЦ «Прокрость», 2023. – 64 с.
4. Ильючок И.А. Биологически активные вещества: электронный учебно-методический комплекс. – Пинск: ПолесГУ, 2022. – 236 с.
5. Громова Н.Ю., Косивцов Ю.Ю., Сульман Э.М. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84 с.