

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з дисципліни

«Фітохімія»

для студентів спеціальності

226 «Фармація, промислова фармація»

Затверджено

Вченою радою

Навчально-наукового інституту

хімічних технологій та інженерії,

протокол № 3 від 30.11.2021 р.

Харків

НТУ «ХПІ»

2021

Методичні вказівки до лабораторних занять з дисципліни «Фітохімія» для студентів спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація» денної та заочної форм навчання / уклад.: Л.Г. Савченко, Т.В. Фалалєєва, С.В. Тимофєєв. – Харків: НТУ «ХП», 2021. – 36 с.

Укладачі: Л.Г. Савченко, Т.В. Фалалєєва, С.В. Тимофєєв

Рецензент: С.В.Тимофєєва, начальник ВТК ТОВ «КФК «Грін Фарм Косметік»»

Кафедра органічного синтезу і нанотехнологій

ВСТУП

Використання рослинної сировини належної якості, яка відповідає вимогам діючої нормативної документації (НД), є невід'ємною частиною фармацевтичного виробничого процесу по виготовленню лікарських форм рослинного походження.

Фітохімічний аналіз включає в себе проведення якісного аналізу – якісні реакції на основні групи діючих речовин або хроматографічні проби (дійсність — це відповідність досліджуваного об'єкту найменуванню, під яким він потрапив на аналіз) і кількісного аналізу – кількісне визначення діючих речовин і числових показників (вологості, зольності, екстрактивних речовин, подрібненості, наявності припустимих домішок).

При виділенні і розділенні суміші БАР, отриманих з рослинної сировини, з метою їх ідентифікації і кількісного визначення використовують методи фізичного, хімічного і фізико-хімічного аналізу, частіше за все – тонкошарову паперову і колонкову хроматографію. Для дослідження БАР в сировині застосовують методи газорідинної і високоефективної рідинної хроматографії (ГРХ, ВЕРХ, УФ-, ІЧ-, ЯМР- і хромато-мас-спектроскопії, спектрометрії, титриметрії, гравіметрії. В окремих випадках можуть бути використані методи морфолого-анатомічного дослідження. Здобувачі вищої освіти за спеціальністю «Фармація, промислова фармація» повинні оволодіти знаннями в галузі сучасних методів аналізу лікарської рослинної сировини у відповідності до вимог НД, а також правилами розробки нормативної документації на лікарську рослинну сировину. Майбутній фахівець повинен вміти аналізувати лікарську рослинну сировину на вміст діючих речовин і оцінювати її доброякісність у відповідності до сучасних вимог.

Лабораторна робота № 1

Фітохімічне дослідження полісахаридів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення полісахаридів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: 20 % розчин ацетату свинцю, розчин хлориду окисного заліза, етанол 96 %, пікринова кислота, спектрофотометр.

Полісахариди (або поліози) – це вуглеводи, молекули яких при гідролізі розпадаються з утворенням молекул моносахаридів. Усі полісахариди побудовані за типом глікозидів.

Полісахариди нерозчинні в спирті і неполярних органічних розчинниках, розчинність у воді варіює. Полісахариди підлягають кислотному або ферментативного гідролізу з утворенням моно- або олігосахарів.

Ідентифікація

В якості осаджувати частіше за все використовують 96 % етанол, рідше – 20 % розчин ацетату свинцю, розчин хлориду окисного заліза. Крім того, виділення слизів з водно-колоїдних витягів можливо шляхом висолювання; для цього частіше за все використовують амонію сульфат.

1. **Осаджування полісахаридів етанолом.** Виявлення полісахаридів в лікарській рослинній сировині проводять шляхом осадження їх етанолом. Для цього до концентрованих водних витягів додають трикратний об'єм 96 % етилового спирту, що призводить до випадіння пухких осадів. Отримані осадки відділяють, промивають спиртом і висушують. Потім їх використовують для проведення реакції з реактивом Фелінга і розчином міді сульфату. Позитивні реакції свідчать про наявність у сировині полісахаридів.

2. **Хроматографічний аналіз.** Метод хроматографії широко використовується для аналізу моносахаридного складу полісахаридів і включає в себе декілька стадій:

1). *Екстракція полісахаридів і сировини.* Проводиться шляхом екстрагування

лікарської рослинної сировини відповідними екстрагентами при кімнатній температурі або при нагріванні:

- водою (для водорозчинних полісахаридів);
- водними розчинами органічних або мінеральних кислот (суміш 0,5 % розчинів щавлевої кислоти і оксалату амонію 1:1 – для пектинових речовин);
- водними розчинами NaOH, KOH (7-15 % для геміцелюлоз).

2). *Виділення полісахаридів.* Проводиться шляхом осадження полісахаридів із концентрованих витягів етиловим спиртом:

- для осадження водорозчинних полісахаридів використовують 3-кратну кількість 96 % етанолу по відношенню до витягу;
- для пектинових речовин 5-кратну кількість 96 % етанолу по відношенню до витягу.

3). *Гідроліз полісахаридів.* Для розщеплення полісахаридів до моносахаридів використовують гідроліз сірчаної кислотою (1 моль/л) при 100 °С на протязі 6 годин (для водорозчинних полісахаридів) і 24 годин (для пектинових речовин).

4). *Аналіз гідролізолатів.*

4.1. *Розділення в системі розчинників.* Для розділення використовують паперову або тонкошарову хроматографію у наступних системах розчинників:

- етилацетат-піридин-вода (8:2:1 або 10:4:3);
- н-бутанол-бензол-піридин-вода (5:1:3:3);
- етилацетат-оцтова кислота-вода (18:7:8);
- етилацетат-оцтова кислота-мурашина кислота-вода (18:8:3:9 або 18:3:1:4);
- н-бутанол- оцтова кислота-вода (4:1:1);
- н-бутанол-піридин-вода (6:4:3).

4.2. *Детектування хроматограм.* Проводять найчастіше анілінгідрофтатним реактивом (склад: 1,66 фталевої кислоти, 0,75 аніліну розчинити в 100 мл насиченого розчину бутанолу). Після обробки, висушування хроматограм та їх нагрівання у сушильному шкафу при 100 °С на протязі 10-15 хв. повинні з'явитися червонувато-коричневі плями.

Хроматографічне визначення інуліну (на прикладі сировини дев'ясилу високого) проводиться безпосередньо у екстракті без виділення і проведення гідролізу і включає наступні стадії:

1. Екстракція водою при нагріванні.
2. Аналіз отриманого екстракту.
 - 2.1. Хроматографічне розділення.

Проводиться методом ПШХ (пластинки «Силуфол») у системі розчинників: 96% етанол.

- 2.2. Детектування хроматограм.

Проводиться шляхом їх послідовної обробки 20 % спиртовим розчином тимолу і розведеною сірчаною кислотою. Після висушування на повітрі і нагрівання у сушильній шафі при 100-105 °С на хроматографії повинна бути видна основна пляма оранжево-червоного кольору з R_f біля 0,76.

Кількісне визначення

Визначення вмісту полісахаридів в лікарській рослинній сировині має наступні етапи:

1. Екстракція полісахаридів із сировини;
2. Кількісне визначення полісахаридів.

Для кількісного визначення полісахаридів використовують наступні методи:

1. *Гравіметричний.* Цей метод оснований на екстракції полісахаридів із сировини, їх осадження і наступним визначенням маси отриманого осаду. У фармакопейному аналізі гравіметрично визначають вміст полісахаридів у листях подорожнику великого, у траві череди трьохроздільної, у слані ламінарії (ДФ XI, вид. 2).

2. *Спектрофотометричний метод.* Цей метод заснований на вимірі оптичної щільності продуктів взаємодії моносахаридів, які утворюються після гідролізу полісахаридів, з пікриновою кислотою у лужному середовищі. Даний метод не є фармакопейним, однак, розроблені і запропоновані методики спектрофотометричного визначення полісахаридів для деяких видів сировини (листя мати-й-мачухи, квітки липи та ін.), а також слизи алтею.

Для стандартизації коренів кульбаби розроблена методика прямого спектрофотометричного визначення фруктозанів після їх кислотної трансформації, яка основана на здібності цукрів (фруктози, сахарози) при нагріванні з концентрованими кислотами утворювати продукти, які мають поглинання в області 200-380 нм.

3. *Титриметричний метод*. Цей метод якісної та кількісної оцінки виділеної з рослин полісахаридної фракції запропонований по реакції утворення комплексу полісахаридів з йодом (оборотне йодометричне титрування) і опробований для водорозчинних полісахаридів подорожнику і мати-й-мачухи.

Потенціометричне титрування використовують для визначення пектинових речовин.

Лабораторна робота № 2

Фітохімічне дослідження жирних олій

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення жирних олій у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: 1 % спиртовий розчин фенолфталеїну 0,1 н спиртовий розчин NaOH та KOH, бюретки, піпетки.

Показники якості жирів

Розчинність. Жири і олії розчинні у хлороформі, метилен-хлориді, дихлоретані, бензині, бензені, ацетоні, діетиловому та петролейному етері. Вони малорозчинні в етанолі та метанолі, за винятком рицинової олії, яка добре розчиняється у спирті. У присутності емульгаторів жирні олії утворюють емульсії з водою. Між собою ліпіди та жирні олії змішуються у будь-яких пропорціях .

В'язкість олій відносно невисока, окрім рицинової .

Питома вага (густина) більшості жирів і олій — у межах 0,910–0,954. При зберіганні та окисненні ця константа збільшується .

Рефракція. Жирні олії характеризуються значною рефракцією; показник (індекс, або коефіцієнт) заломлення світла у них росте зі збільшенням кількості поліненасичених жирних кислот у тригліцеридах. Наприклад, показник заломлення масла какао складає 1,457, олії мигдальної – 1,470, льняної – 1,482.

Жирні олії є **оптично неактивними**, якщо вони не містять залишків оптично активних речовин. Винятком є рицинова олія, оскільки вона містить рицинолеву, або гідроксіолеїнову, кислоту.

Температура плавлення (Тпл.) твердих жирів нечітка, вона зростає із збільшенням числа атомів карбону в кислоті.

Температура кипіння жирів не визначається у зв'язку з тим, що при нагріванні до 250 °С вони руйнуються з утворенням акролеїну (продукту окиснення гліцерину) .

Омилення жирів. Тригліцериди жирних кислот при нагріванні з лугом омилюються з розщепленням ефірних зв'язків і утворенням гліцерину та солей жирних кислот. Розчинні солі вищих жирних кислот називають **милами**. Натрієві солі мають тверду консистенцію, калієві – рідку.

Реакція омилення широко використовується для виробництва мила, встановлення складу жирів і контролю їх якості .

Згіркнення – це складний хімічний процес псування жирів при зберіганні під впливом ферментів, вологи, світла і підвищеної температури. Жири при розкладанні набувають гіркуватого смаку і неприємного запаху. У процесі зберігання жирів може відбуватися омилення тригліцеридів до вільних жирних кислот, окиснення жирних кислот до кетонів, альдегідів, перекисів, гідроперекисів та інших продуктів. Окиснення можливе як за місцем подвійного зв'язку, так і за кінцевою карбоксильною групою з декарбоксілюванням.

Далі відбувається розрив вуглецевого ланцюга за місцем колишнього подвійного зв'язку, внаслідок чого утворюються альдегіди і кислоти з короткими ланцюгами типу кислоти масляної з неприємним запахом.

Наявність **мікробної контамінації** сприяє згіркненню олій.

Методи визначення основних показників якості жирів

Для характеристики згіркнення жирів використовують методи визначення вільних жирних кислот за кислотним числом (ДФУ), за числом Рейхерта–Мейссля (летких, розчинних у воді кислот) і за числом Поленське (летких, нерозчинних у воді). Зв'язані жирні кислоти характеризуються **ефірним числом**. Характеристика окиснювального згіркнення жиру проводиться за визначенням **перекисного числа**, яке виражається у відсотках йоду, витраченого на руйнування перекисів .

Кислотне число – це кількість міліграмів калію гідроксиду (KOH), яка необхідна для нейтралізації вільних кислот, що містяться в 1 г досліджуваного жиру. Воно показує кількість вільних кислот у досліджуваному жирі та не є константою, яка характеризує жири. За величиною кислотного числа можна судити про доброякісність жиру. Свіжі жири мають майже нейтральну рН.

Методика. 1,0 масла поміщають у колбу на 100 мл і додають 30 мл попередньо нейтралізованої по фенолфталеїну суміші ефіру і 95 % етилового спирту (1:1) і розчиняють масло. Після цього в колбу додають 1 мл 1 % спиртового розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н спиртовим розчином NaOH до появи яскраво-рожевого забарвлення.

Розрахунок кислотного числа проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times 5,61 \times T}{m},$$

де а – кількість 0,1 н розчину NaOH, яка необхідна на титрування, мл;

Т – виправний коефіцієнт;

m – наважка масла, г;

5,61 – кількість мг KOH, яка відповідає 1 мл 0,1 н розчину NaOH.

Кислотне число може збільшуватись при тривалому зберіганні насіння олійних культур і при проростанні насіння внаслідок гідролізу жирів. Тому НД у всіх випадках вимагає, щоб кислотне число не перевищувало певної для кожного масла величини.

Число омилення – це кількість міліграмів калію гідроксиду (KOH), яка необхідна для нейтралізації вільних кислот і омилення естерів, що містяться в 1 г досліджуваного жиру. Воно характеризує загальну кількість кислот (вільних і зв'язаних у тригліцериди), що входять до складу жиру.

Ефірне число – кількість міліграмів калію гідроксиду (KOH), яка необхідна для омилення естерів, що містяться в 1 г досліджуваного жиру. Ефірне число дорівнює різниці між числом омилення і кислотним числом. Величина його залежить від молекулярної маси кислот, які входять до складу жиру.

Висихання. Жири поведуться на повітрі по-різному: одні залишаються рідкими, другі поступово перетворюються на м'яку смолоподібну плівку, яка не розчиняється в органічних розчинниках, треті утворюють тверду щільну плівку.

Олії, які не утворюють плівку, називаються *невисихаючими*. Основною їх складовою є гліцериди олеїнової кислоти. Прикладами таких олій є оливкова, мигдальна, персикова, рицинова.

Олії, які утворюють щільну плівку, називаються *висихаючими* (містять гліцериди лінолевої кислоти). Висихаючою є льняна олія.

Олії, які утворюють м'яку плівку, називаються *напіввисихаючими* (містять гліцериди лінолевої кислоти). До таких олій належать соняшникова, кукурудзяна, арахісова, бавовняна.

Висихання – складний фізико-хімічний процес, до якого входять процеси окиснення і полімеризації. Здатність олій до висихання використовується в народному господарстві. Критерієм висихання олій є визначення *йодного числа* — кількості грамів галогену у перерахунку на йод, яка приєднується за місцем подвійних зв'язків ненасичених жирних кислот у 100 г жиру.

Йодне число дозволяє визначити ступінь насиченості жирних кислот, що входять до складу жирів. Чим більша ненасиченість кислот, тим більше значення йодного числа. Йодне число твердих жирів невелике, частіше за все 20-60. Невисихаючі жирні олії мають йодне число 80-100, напіввисихаючі –

100-140, висихаючі – 140-200.

Йодне число є однією з найважливіших хімічних констант жирів, яка дає можливість відрізнити їх окремі групи: невисихаючих, напіввисихаючих і висихаючих та установити їх справжність і доброякісність.

Кількісне визначення

Вміст жирної олії в рослинній сировині визначають в апараті Сокслета. Метод визначення заснований на здатності ліпідів розчинятися в органічних розчинниках.

Наважку ЛРС розміщують всередині екстрактора, колбу-приймач наповнюють розчинником і нагрівають. Пари розчинника потрапляють в екстрактор, проходять крізь нього до холодильника і конденсуються, стікаючи на дно екстрактора. Поступово розчинник покриває патрон з сировиною, і відбувається екстракція. Коли рівень розчинника, насиченого ліпідами, сягне верхнього коліна сифонної трубки та заповнить його, рідина стікає в колбу-приймач, де розчинник знову випарюється, а виділені ліпофільні речовини залишаються.

Екстракція триває 6–8 годин до повного виснаження рослинної сировини. Розрахунок вмісту проводиться за кількістю олії, що екстрагувалася, та масою знежиреної сировини. Склад та вміст жирних кислот в олії визначають методом газової хроматографії та ВЕРХ.

Лабораторна робота № 3

Фітохімічне дослідження ефірних олій

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення ефірних олій у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: 1 % спиртовий розчин фенолфталеїну, розчин КОН, етанол, бюретки, піпетки.

Ефірні олії являють собою багатокomпонентні суміші летких речовин, що утворюються в різних органах рослин, та випаровуються при звичайній

температурі. До їх складу входять вуглеводні, а також оксигеновмісні сполуки, такі як спирти, кетони, альдегіди, кислоти аліфатичні та циклічні, етери та естери. Оскільки ефірні олії здатні випаровуватися, їх можна отримувати з природних джерел методом перегонки.

Фізичні властивості ефірних олій

Хоча ефірні олії істотно відрізняються між собою за своїм хімічним складом, у них є низка спільних фізичних властивостей. За рідкісним винятком, ефірні олії являють собою безбарвні рідини, нерозчинні у воді, здатні переганятися з водяною парою. Вони характеризуються приємним запахом і є оптично активними.

Запах. Ефірні олії мають приємний характерний запах, який визначають шляхом нанесення 1 або 2 крапель ефірної олії на шматочок фільтрувального паперу. Експерт може судити про якість олії порівнюючи її запах із запахом вірогідного зразка.

Природний стан. Ефірні олії при звичайних температурах, як правило, мають стан рідини. Деякі з них тверднуть при температурі трохи нижче від кімнатної. Наприклад, анісова олія твердне при температурі 15 °С і плавиться при 17 °С, трояндова олія твердне при температурі 18 °С і плавиться при 19 °С.

У деяких ефірних оліях при охолодженні з'являється твердий осад, який називається *стеароптеном*. Наприклад, ментол випадає в осад з олії м'яти перцевої, а тимол — з олії чебрецю. Рідка частина ефірної олії називається *олеоптеном*.

Леткість. Ефірні олії є леткими майже повністю, за винятком небагатьох із них, наприклад лимонної, яка містить невелику частину смолистих речовин. Вони також легко відганяються з парою. Ефірні олії випаровуються при нанесенні на шматочок фільтрувального паперу та не залишають плям. У цьому вони повністю відрізняються від жирних олій, які не є леткими.

Колір. Як правило, ефірні олії безбарвні, особливо якщо вони свіжі, але при зберіганні можуть окиснюватися, і тоді їх колір стає темнішим. Щоб

уникнути цього, ефірні олії слід зберігати в сухому прохолодному місці у щільно закритій тарі, бажано в повному контейнері з темного скла.

Показник заломлення. Ефірні олії характеризуються високими показниками заломлення — від 1,43 до 1,61 (показник заломлення чистої води при 20 °С складає 1,333) . Порівнюючи показники заломлення досліджуваної олії та стандартного зразка можна зробити висновок, є вона справжньою чи фальсифікованою.

Оптична активність. Більшість з ефірних олій є оптично активними . Питоме обертання часто є цінним діагностичним показником. При помещенні їх у пучок поляризованого світла мають властивість обертати площину поляризації вправо – (+) - правообертальні або вліво – (–) - лівообертальні. Ця властивість пов'язана з хімічним складом ефірної олії. Оптичне обертання також показує, є олія аутентичною чи фальсифікованою. У деяких випадках за показником оптичного обертання можна визначити різновид олії. Наприклад, французький скипидар є ліво-, а американський – правообертальним. Цей показник може також указати, яке походження має речовина – природне або синтетичне. Наприклад, природний ментол є лівообертальним, синтетичний може бути лівообертальним або рацемічним; природна камфора є правообертальною, а синтетична – ліво- або рацемічною.

Питома вага. Питома вага ефірних олій коливається від 0,8-1,17, і більшість офіційних ефірних олій легше від води (питома вага менша 1). Важча, ніж вода, ефірна олія кориці (питома вага 1,04), гвоздична олія (1,03–1,06). Цей показник може дати вказівку на хімічний склад ефірної олії: олія з питомою вагою менше 0,9 містить більш високий відсоток терпенів та інших аліфатичних вуглеводнів, тоді як ефірна олія з питомою вагою більше 0,9 і менше 1,0 містить компоненти, що належать до різних класів БАР, а олії з питомою вагою понад 1,0 містять в основному ароматичні сполук .

Розчинність. Ефірні олії, як правило, не змішуються з водою, але вони достатньо розчинні, щоб надати свій запах і смак воді, ароматичні води існують саме завдяки цій властивості. Ефірні олії є легкорозчинними у більшості

органічних розчинників, наприклад, етері, хлороформі, абсолютному спирті, сірководню, гексані, етилацетаті та ацетоні. Крім того, вони змішуються з ліпідами і ліпофільними розчинниками і є розчинними у петролейному етері, за винятком коричневого альдегіду і олії, що його містить. Вони достатньо розчинні у розбавленому спирті. Розчинність у спирті різної концентрації використовується для виявлення фальсифікації ефірних олій. Наприклад, жирна олія або петролейний естер при додаванні до ефірної олії зменшують її розчинність у спирті.

Для проведення цього тесту 1 мл ефірної олії вміщують у мірний циліндр і додають спирт відомих концентрацій (95, 90, 80, 70, 60, 50 %) аж до визначення повної розчинності. Отримані розчини описують такими термінами: розчинний, опалесцентний, мутний тощо (наприклад, «добре розчинний в 3-х об'ємах 40 % спирту і до 10-ти об'ємів»).

Хімічні показники якості ефірних олій

Кислотне число (кількість міліграмів калію гідроксиду, яка необхідна для нейтралізації вільних кислот в 1 г ефірної олії) вказує на кількість присутніх вільних кислот. Високі значення кислотного числа властиві згірклій олії.

Ефірне число (кількість міліграмів калію гідроксиду, яка необхідна для омилення естерів в 1 г ефірної олії) дозволяє оцінити вміст естерів у олії.

Ефірне число після ацетилювання визначається для ефірних олій, які характеризуються кількістю спиртів, таких як ліналоол, гераніол, цитронелол.

Гідроксильне число визначається кількістю міліграмів калію гідроксиду, еквівалентного кількості кислоти оцтової, яка у певних умовах реагує з вільними гідроксильними групами, що містяться в 1 г ефірної олії. Цей показник характеризує вміст гідроксильних груп у перерахунку на 1 г олії.

Визначення вмісту ефірної олії у рослинній сировині

Визначення вмісту ефірної олії у ЛРС в лабораторних умовах є необхідним для оцінки якості сировини. Таке дослідження проводять у

спеціальному апараті, який був розроблений О .С . Гінзбергом. Цей апарат має такі переваги: компактність, можливість повторно використовувати дистиляційну воду, точне визначення вмісту ефірної олії при використанні невеликої кількості рослинної сировини.

Наважку сировини вміщують у круглодонну колбу для перегонки з термостійкого скла ємністю 1 літр разом із рідиною для перегонки, як правило, водою або сумішшю води і гліцерину у кількості 300 мл. У верхній частині колби розміщують приймач. Колбу з'єднують з вертикальним кульковим холодильником і нагрівають до кипіння протягом зазначеного у відповідних МКЯ на ЛРС часу. Отриманий за цей час дистилят проходить крізь приймач, закріплений у верхній частині колби. Після закінчення перегонки і охолодження вимірюють об'єм шару ефірної олії і розраховують її вміст у сировині у об'ємно-вагових відсотках. За ДФУ визначення вмісту ефірної олії проводять апаратом Клевенджера, який відрізняється тим, що приймач винесений за межі колби.

Лабораторна робота № 4

Фітохімічне дослідження серцевих глікозидів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення серцевих глікозидів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: кислота 3,5-динітробензойна, натрію нітропрусид, кислота пікринова, кислота 3,5-динітробензойна, спектрофотометр.

Серцеві глікозиди – це група біологічно активних речовин, похідних циклопентанпергідрофенантрени, з високою специфічною вибірковою дією на серцевий м'яз .

Ідентифікація

Для ідентифікації серцевих глікозидів використовують кольорові реакції на відповідну частину молекули.

Реакції на стероїдну частину базуються на здатності стероїдного ядра кардіоглікозидів піддаватися дегідратації.

Реакція Лібермана–Бурхарда проводиться шляхом додавання суміші оцтового ангідриду та кислоти сульфатної концентрованої у співвідношенні 50:1, при цьому утворюється пурпурове забарвлення, яке поступово перетворюється на синьо-зелене.

Реакція з реактивом Чугаєва відбувається з використанням цинку хлориду та ацетилхлориду в кислоті оцтовій, в результаті чого утворюється рожеве забарвлення з максимумом поглинання при $\lambda = 562$ нм .

Реакція Розенгейма. Карденоліди, які мають дієнову групу у своїй структурі або здатні її утворювати під дією кислоти трихлороцтової, забарвлюються в рожевий колір з максимумом поглинання при $\lambda = 562$ нм, який з часом переходить у ліловий або синій.

Стероїдну структуру можна підтвердити кольоровими реакціями з кислотами сульфатною та фосфатною.

Реакції на ненасичене лактонне кільце відбуваються за рахунок здатності лактонного кільця кардіоглікозидів окиснюватися полінітросполуками у лужному середовищі з утворенням забарвлених продуктів реакції.

Реакція Кедде є специфічною на лактонне кільце карденолідів. При додаванні кислоти 3,5-динітробензойної утворюється фіолетово-червоне забарвлення.

Реакція Легаля. При додаванні натрію нітропрусиду виникає червоне забарвлення.

Реакція Раймонда. При наявності замісників при C₂₁ лактонного кільця карденолідів під дією *m*-динітробензену в бензені утворюється фіолетове забарвлення.

Реакція Бальє. Під дією кислоти пікринової карденоліди забарвлюються у червоно-оранжевий колір.

На двічі ненасичене шестичленне лактонне кільце специфічних реакцій немає. Для ідентифікації буфадієнолідів використовують метод УФ-спектроскопії з максимумом поглинання при $\lambda = 300$ нм.

Реакції на цукрову частину молекули проводять після гідролізу.

Реакції на моносахариди. Використовуються всі кольорові реакції, характерні для вуглеводів (реактив Фелінга, реакція «срібного дзеркала»).

Реакції на специфічні дезоксицукри

Реакція Келлера–Кіліані: суміш двох реагентів – кислоти оцтової льодяної зі слідами ферум (III) сульфату та кислоти сульфатної концентрованої зі слідами ферум (III) хлориду – дозволяє отримати синє забарвлення. Проте К-строфантин- β та строфантозид (ди- і триглікозиди) не дають цієї реакції. Тому для їх ідентифікації попередньо проводять гідроліз кислотою трихлороцтовою, після якого вільний 2-дезоксицукор з *n*-нітрофенілгідразином у лужному середовищі дає блакитне забарвлення.

Реакція зі ксантгідролом: при нагріванні реакційної суміші ксантгідролу в кислоті оцтової льодяній у присутності 1 % кислоти хлоридної утворюється червоне забарвлення.

Методом ПХ (паперової хроматографії) 2-дезоксицукри можна ідентифікувати зі спиртовим розчином *n*-диметиламінобензальдегіду в кислоті фосфатній та спиртовим розчином ваніліну в кислоті фосфатній за появою плям блакитного кольору.

Достовірне підтвердження наявності кардіоглікозидів у ЛРС можна отримати після одержання позитивного результату якісних реакцій на всі частини молекули.

При використанні методу ТШХ необхідно враховувати хімічну будову сполук. Для ідентифікації серцевих глікозидів, характерних для роду Строфант, використовують систему розчинників етилацетат–піридин–вода (5:1:4), а розділення глікозидів наперстянки проводять методом двомірної ТШХ у системах розчинників етилацетат–метанол–вода (16:1:1) та хлороформ–піридин

(6:1). Щоб досягти проявлення речовин, використовують реактиви для виявлення стероїдної та лактонної частин молекули.

Аналіз кардіоглікозидів можна проводити з використанням УФ-, ІЧ-, мас- та ЯМР-спектроскопії.

Кількісне визначення

Специфічним методом визначення кількісного вмісту кардіоглікозидів є ***біологічна стандартизація***. Метод полягає у встановленні біологічної активності серцевих глікозидів на лабораторних тваринах (кішках, жабах, голубах), яку виражають в одиницях дії (котячих – КОД, жаб'ячих – ЖОД, голубиних – ГОД). За одиницю дії приймають найменшу кількість речовини, яка досліджується (1 мг речовини або 1 мл витяжки з ЛРС), що спричиняє систолічну зупинку серця у тварини протягом 1 години. Проте нині цей метод не є фармакопейним і майже не використовується через трудомісткість, обмежену доступність (висока собівартість), малу точність (10-25 %) та складність.

УФ-спектрофотометрія дає можливість визначити кількісний вміст серцевих глікозидів завдяки утворенню забарвлених продуктів реакцій з кислотовмісними реагентами. ЄФ та БФ рекомендують спектрофотометричний метод для кількісного визначення карденолідів у листі наперстянки. При цьому вимірюють поглинання при $\lambda = 540$ нм червоно-фіолетового розчину, одержаного в результаті реакції з кислотою 3,5-динітробензойною; при $\lambda = 495$ нм – червоно-оранжевого розчину після реакції Бальє; при $\lambda = 470$ нм – червоного розчину після взаємодії з натрію динітропрусидом.

Часто для визначення вмісту серцевих глікозидів використовують ***флуориметричний метод***, оскільки він є більш чутливим та селективним. Цей метод базується на утворенні структур, здатних до резонансу.

В основі полярографічного методу лежить здатність карденолідів та буфадієнолідів відновлюватись на меркурій-крапельному електроді.

Серед ***хроматографічних методів*** кількісного визначення кардіостероїдів використовують ТШХ з подальшим елююванням плям, після

чого проводять флюорометричний, колориметричний методи визначення, ГХ (газовохроматографічний) або ВЕРХ.

Лабораторна робота № 5

Фітохімічне дослідження алкалоїдів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення алкалоїдів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: розчин вісмуту нітрату основного в калію йодиді, калію трийодид, насичений розчин кислоти пікринової, формальдегід, кислота сульфатна, кислота нітратна, колориметр або спектрофотометр.

Алкалоїди – це група органічних азотовмісних речовин переважно рослинного походження, що мають переважно лужний характер та високий фізіологічний вплив на організм людини і тварин та містять один або декілька атомів нітрогену в гетероциклах молекули.

Ідентифікація

Загальноосадові реакції. Є кілька загальних реакцій, які можуть бути використані для перевірки наявності алкалоїдів чи допомогти в їх ідентифікації. Вони включають в себе реакції осадження та реакції забарвлення. Крім того, існують кілька спеціальних реакцій, які можуть бути використані для визнання і підтвердження певного алкалоїду.

Багато алкалоїдів у малих кількостях у розчинах можуть утворювати осадки або каламуті з певними реактивами, в тому числі дубильними речовинами. Реактиви осадження іноді використовуються при перевірці наявності або відсутності алкалоїдів у сировині, екстрактах із рослинної сировини та у процедурі перевірки повноти екстракції алкалоїдів. Негативна реакція (відсутність осаду або помутніння) може бути прийнятною з причини відсутності алкалоїдів, але позитивний тест може або не може бути пов'язаний

з наявністю алкалоїдів, тому що білки, пурини, солі амоніаку, бетаїн також можуть дати позитивну реакцію з осадовими реактивами.

Серед осадових реактивів, які найчастіше використовуються для визначення алкалоїдів є:

- 1) **реактив Майєра** (розчин меркурію дихлориду та калію йодиду);
- 2) **реактив Вагнера та Бушарда** (калію трийодид);
- 3) **реактив Драгендорфа** (розчин вісмуту нітрату основного в калію йодиді);
- 4) **реактив Марме** (розчин кадмію йодиду та калію йодиду);
- 5) **реактив Шейблера** (розчин кислоти фосфорновольфрамної);
- 6) **реактив Хагера** (насичений розчин кислоти пікринової);
- 7) **реактив Бертрана** (розчин кислоти кремневольфрамної);
- 8) **розчин таніну**.

Кольорові реакції. Кольорові реакції є неспецифічними, але вони часто дуже чутливі й зазвичай залежать від дегідратації або окиснення алкалоїдів з утворенням характерного кольору. До складу більшості реагентів входить концентрована кислота сульфатна у поєднанні з такими сполуками, як кислота селенова, амонію ванадат, формальдегід, диметиламінобензальдегід.

Реактивами для кольорових реакцій є:

- 1) **реактив Фреде** (розчин амонію молібдату в кислоті сульфатній);
- 2) **реактив Маркі** (формальдегід, кислота сульфатна);
- 3) **реактив Манделіна** (розчин амонію ванадату в кислоті сульфатній);
- 4) **реактив Ердмана** (кислота нітратна, кислота сульфатна);
- 5) **реактив Мекке** (кислота селениста, кислота сульфатна).

Специфічні реакції. Деякі групи алкалоїдів дають характерні кольори з деякими специфічними реактивами. У певних випадках при стандартних умовах інтенсивність кольору, що утворюється в лінійній пропорції може бути використана в кількісному визначенні цих груп алкалоїдів. Алкалоїди маткових ріжок з реактивом **Ван Урка** (**реактив Ерліха**, *n*-диметиламінобензальдегід у 65 % кислоті сульфатній) забарвлюються у синій колір; алкалоїди беладонни

дають позитивну кольорову реакцію з реактивом *Віталі–Морена* (з концентрованою кислотою нітратною і спиртовим розчином калію гідроксиду).

Кількісне визначення

Для кількісного визначення вмісту алкалоїдів використовують об'ємний, гравіметричний і фізико-хімічні методи аналізу.

Усі способи кількісного визначення алкалоїдів складаються із 3 кроків:

- 1) виділення;
- 2) очистка;
- 3) установлення кількісного вмісту.

Проводять екстракцію сухого порошкоподібного матеріалу одним зі способів, описаних вище. Алкалоїди після процесу очищення зазвичай титрують кислотою, надлишок якої відтитровують лугом.

Іноді використовують титрування в неводних розчинниках, таких як кислота оцтова льодяна, хлороформ та інші.

У вагових методах зважують сухий залишок або комплекс, який утворився внаслідок реакції алкалоїдів із реактивом осадження.

Об'ємному визначенню, як правило, надають перевагу перед гравіметричним, оскільки процес є більш швидким.

Колориметричний та спектрофотометричний методи застосовуються з використанням спеціального кольорового реактиву. Вимірювання проводять на колориметрі або спектрофотометрі при певній довжині хвилі. Наприклад, у випадку тропанових алкалоїдів використовують кольорову реакцію Віталі–Морена, для алкалоїдів маткових ріжків – *n*-диметиламінобензальдегід; для морфіну — кислоту нітритну та аліфатичні аміни.

Лабораторна робота № 6

Фітохімічне дослідження флавоноїдів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення флавоноїдів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: розчин NaOH, ферум (III) хлорид, 1% розчин ваніліну в кислоті хлоридній концентрованої, алюмінію (III) хлорид, розчин кислоти борної в ацетоні, 1-2 % розчин плюмбуму ацетату, спектрофотометр.

Флавоноїди – поліфенольні сполуки, що містять два ароматичних кільця, з'єднаних тривуглецевим містком (дифенілпропановий фрагмент C₆-C₃-C₆). Свою назву даний клас сполук отримав від лат. *flavus* – жовтий, оскільки перші виділені флавоноїди мали жовте забарвлення.

Ідентифікація

Для ідентифікації всіх груп флавоноїдів не існує універсальної реакції, чим пояснюється різноманіття використовуваних реагентів.

1. **Ціанідинова проба (проба Шинода)** заснована на відновленні флавоноїдів атомарним воднем у кислому середовищі у присутності металічного магнію (іноді використовують цинк). Реакція типова для флаванонів, флавононів, флавонолів, які дають червоне, рожеве, фіолетове або синє забарвлення залежно від кількості та положення гідроксильних груп. Реакцію **не дають аурони та халкони**, проте з концентрованою кислотою хлоридною дають червоне забарвлення за рахунок утворення оксонієвих солей.

Модифікація ціанідинової проби за Бріантом дозволяє визначити агліконову або глікозидну природу флавоноїдів у екстракті. До забарвленого розчину – продукту ціанідинової реакції – додають рівний об'єм *n*-октанолу або *n*-бутанолу та струшують. Глікозиди залишаються у водному шарі, а аглікони переходять до органічного.

2. **З розчином лугу** флавоноли, флаванони набувають жовтого забарвлення, полігідроксифлавоноли (6 і більше OH-груп) – червоного або синього, халкони та аурони – жовто-оранжевого або оранжево-червоного.

3. **З ферум (III) хлоридом** утворюється забарвлення від зеленого (флавоноли) до коричневого (флаванони, халкони, аурони) та червоно-бурого (флавоноли).

4. **Реакція діазотування.** При додаванні свіжоприготованого розчину діазотованого сульфаніламідру в 10 % розчині лугу утворюється червоно-

оранжеве забарвлення. 7-Гідроксифлаволи, 7-гідроксифлавоноли та 7-гідроксіізофлаволи реагують відразу, а 7-гідроксифлаванони, 7-глікозиди після гідролізу в парах 25 % гарячої кислоти хлоридної – через 1-2 хв.

5. Реакція з 1 % розчином ваніліну в кислоті хлоридній концентрованій або сульфатній (реакція Запрометова). Катехіни дають червоно-фіолетове забарвлення, димери флавоноїдів – малинове, лейкоантоціанідини – червоне або оранжеве (після нагрівання), флаволи та флавоноли – яскраво-жовте, естери катехінів – рожеве, галокатехіни – яскраво- червоне.

6. Реакція з алюмінію (III) хлоридом. При використанні 1-3 % розчину $AlCl_3$ у спирті етиловому утворюється жовте забарвлення з флавонами, флавонолами, халконами та аурунами, в УФ-світлі при 254 нм флаволи набувають жовто-коричневого, халкони – жовтого, флавоноли – жовто-зеленого та ауруни – зеленого кольору. При використанні 5 % розчину $AlCl_3$ та пари амоніаку в УФ-світлі при 254 нм халкони флуоресціюють червоним, ізофлаволи – коричнево-жовтим, ауруни – оранжевим кольором.

7. Реакція з кислотою борною. При додаванні насиченого розчину кислоти борної в оцтовому ангідриді (реактив Димрота) при температурі 100 °С 5-гідроксифлавоноли та їх метилові естери в УФ-світлі при 254 нм мають жовте або оранжеве забарвлення. Розчин кислоти борної в ацетоні дає жовте забарвлення з 5-гідроксифлавонами. Усі флавоноїди реагують з 3-5 % розчинами кислоти борної з утворенням білого або жовтуватого осаду; додавання кислоти лимонної посилює забарвлення розчинів або осадів.

8. Реакція Вільсона (кислоти борна та лимонна в безводному ацетоні при нагріванні) характерна для 5-гідрокси-, 5-метоксифлавонів та флавонолів, які утворюють яскраво-жовте забарвлення у видимому та жовто-зелене – в УФ-світлі. Дигідрохалкони в УФ-світлі набувають жовтого забарвлення.

9. Реакція з 1-2 % розчином плюмбуму ацетату характерна для флавонолів (червоний осад), флавонів, халконів, аурунів (жовтий), антоціанідинів (червоний або синій).

10. *Реакція з кислотою хлоридною або сульфатною* є характерною для флавонів, флавонолів, які мають жовте забарвлення, та ізофлавонів, які забарвлюються у жовто-коричневий або червоно-коричневий колір.

11. *Реакція з цинком у 18 % розчині кислоти хлоридної* дає червоне або яскраво-оранжеве забарвлення з флавонами, дигідроксифлавонолами та рожеве з флавонолами, флаванонолами, 3-глікозидами флавонів.

Для ідентифікації флавоноїдів широко використовують *різні види хроматографії* – ПХ, ТШХ, ГРХ, ВЕРХ. Ураховують забарвлення плям у видимому та УФ-світлі до та після обробки хроматограм реактивами прояву.

При хроматографуванні використовують такі системи розчинників: етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (100:11:11:26); для менш полярних сполук – толуен–етилформіат–кислота мурашина (50:40:10) або толуен–діоксан–кислота оцтова льодяна (90:25:4). Поєднання гідрофобних органічних розчинників, таких як *n*-гексан або хлороформ, з більш полярними (етилацетат або метанол), з додаванням кислоти оцтової або мурашиної (наприклад *n*-гексан–етилацетат–кислота оцтова (31:14:5) або хлороформ–метанол–кислота мурашина (44:3,5:2,5)) можуть бути використані для аналізу.

Виявлення флавоноїдів на ПХ та ТШХ проводять у видимому та УФ-світлі при 254 або 366 нм з подальшою обробкою хроматограм реактивами проявлення (парами амоніаку, діазореактивом, ваніліном у кислоті хлоридній, алюміній (III) хлоридом, ферум (III) хлоридом, розчинами лугів та кислот). Для попередньої ідентифікації часто проводять аналіз плям у видимому та УФ-світлі до та після обробки парами амоніаку.

Кількісне визначення

Для кількісного визначення флавоноїдів використовують методи гравіметрії, спектрофотометрії, полярографії, флуориметрії, кислотно-основного титрування в неводних розчинниках і амперометричного титрування. Спектрофотометричне визначення проводять у розчинах або безпосередньо з хроматограм після закріплення забарвлення плям специфічними проявниками.

ВЕРХ використовують для більш точного якісного аналізу, а також для визначення кількісного вмісту кожного з компонентів суміші флавоноїдів.

Лабораторна робота № 7

Фітохімічне дослідження дубильних речовин

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення дубильних речовин у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: 1 % розчин желатину, 1 % розчин алкалоїду, 1% розчин залізо-амонійного галуону, 10 % розчин ацетату свинцю, розчин індигосульфокислоти, 0,1н розчин перманганату калію.

Дубильні речовини (таніни) – це комплекс низько- та високомолекулярних поліфенолів, генетично зв'язаних між собою, що мають дубильні властивості, в'яжучий смак, осаджують білки та алкалоїди з розведених розчинів.

Якісний аналіз:

- **із розчином желатину.** До 2 г досліджуваної витяжки додайте краплинами 1 % розчин желатину, не допускаючи його надлишку;
- **із розчином алкалоїду.** До 2 г досліджуваної витяжки додайте краплинами 1 % розчин алкалоїду (хініну гідрохлориду, цитозину);
- **із солями заліза.** До 2 г досліджуваної витяжки додайте 4-5 краплин залізо-амонійного галуону; хімічну групу дубильних речовин визначте за забарвленням утвореного комплексу;
- **із розчином ацетату свинцю.** До 2 г досліджуваної витяжки додайте 4 мл 10 % розчину ацетатної кислоти і 2 мл 10% розчину ацетату свинцю. Утворюється осад (яка група дубильних сполук?), який відфільтруйте. До фільтрату додайте кілька краплин 1 % розчину залізо-амонійного галуону;
- **із бромною водою.** Реакцію виконуйте під витяжкою. До 5 г досліджуваної витяжки додайте краплинами 2 % розчин бромної води до появи запаху бромиду.

Кількісне визначення

Біля 2 г (точну наважку) подрібненої сировини, просіяної через сито діаметром 3 мм, залити 250 мл киплячої води і нагрівати на киплячій водяній бані із зворотним холодильником на протязі 30 хв. Рідину охолодіть до кімнатної температури і профільтруйте через вату. 25 мл водної витяжки перенесіть у конічну колбу на 750 мл, додайте 500 мл води, 25 мл розчину індигосульфокислоти і протитруйте при постійному перемішуванні 0,1н розчином перманганату калію до появи золотисто-жовтого забарвлення.

1 мл 0,1 н розчину перманганату калію відповідає 0,004157 г дубильних речовин у перерахунку на танін. Паралельно проведіть контрольний дослід. Для цього протитруйте 25 мл індигосульфокислоти в 525 мл води. Розрахунок кількості дубильних речовин проведіть за формулою:

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

де: V - кількість мл 0,1 н розчином перманганату калію, який пішов на титрування дубильних речовин у наважці рослинної сировини;

V_0 - кількість мл 0,1 н розчином перманганату калію, який пішов на титрування 25 мл індигосульфокислоти в контрольному досліді;

K – коефіцієнт поправки до 0,1 н розчину перманганату калію;

m – наважка рослинної сировини;

0,004157 – кількість дубильних речовин у перерахунку на танін, що відповідає 1 мл 0,1 н розчину перманганату калію.

Лабораторна робота № 8

Фітохімічне дослідження сапонінів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення сапонінів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: розчин гідроксидів барію або магнію, солей міді, ацетату свинцю, спиртового розчину холестерину, 0,5 % хлористоводневої кислоти, розчину натрію гідроксиду, ацетату свинцю, 10 % розчину нітриту натрію, фотоколориметр.

Сапоніни – біологічно активні сполуки рослинного походження, більшість яких виявляє поверхневу, гемолітичну активність і токсичність щодо холоднокровних тварин. Водні розчини сапонінів або витяжки із сапоніноносною сировини утворюють при їх струшуванні стійку піну, внаслідок чого ці речовини одержали назву сапоніни (лат. “sapo” – мило). За хімічною природою належать до групи глікозидів. Сапогеніни – поліядерні сполуки, що містять гідроксильні, метильні, карбоксильні групи. Залежно від хімічної структури аглікону сапоніни розділяють на дві групи: **тритерпенові та стероїдні**.

Ідентифікація

Для виявлення сапонінів у рослинній сировині користуються реакціями, які можна розділити на три групи:

- 1) реакції, що ґрунтовані на фізичних властивостях сапонінів;
- 2) реакції, що ґрунтовані на хімічних властивостях сапонінів;
- 3) реакції, що ґрунтовані на біологічних властивостях сапонінів.

До першої групи реакцій відноситься **реакція (проба) на піноутворення**: це не тільки чутлива проба, але й доволі характерна, бо інших речовин, які мають таку здібність до піноутворення, в рослинах не зустрічається.

До другої групи якісних реакцій відносяться реакції **осаджування сапонінів і кольорові реакції**. З водних розчинів сапоніни випадають в осад під дією гідроксидів барію і магнію, солей міді, ацетату свинцю. При чому **тритерпенові** сапоніни осаджуються середнім ацетатом свинцю, а **стероїдні** – основним.

Із спиртових витягів (або розчинів) стероїдні сапоніни і тритерпенові сапоніни випадають в осад при додаванні спиртового розчину холестерину у вигляді холестеридів.

Стероїдні сапоніни, а також серцеві глікозиди, дають *реакцію Лібермана-Бурхарда*.

Для якісних реакцій готують водний настій 1:10, нагріваючи подрібнену рослинну сировину на водяній бані на протязі 10 хв. Настій після охолодження фільтрують і проводять з ним необхідні реакції.

Враховуючи, що більшість з перерахованих хімічних реакцій можуть давати і інші сполуки, проводять ще й *біологічні дослідження*. Більшість сапонінів визивають гемоліз еритроцитів крові.

Для проведення цієї реакції із рослинної сировини готують настій на ізотонічному розчині.

Якісні реакції:

- *визначення хімічної природи сапонінів*, для чого випробування проводять одночасно в кислому і лужному середовищі реакція (Фонтан-Кандела): у 2 пробірки однакового кольору і діаметру вносять по 2 мл досліджуваного витягу; в одну пробірку додають 2 мл 0,5 % хлористоводневої кислоти (рН = 1), а в другу – 2 мл розчину натрію гідроксиду (рН= 13), після чого обидві пробірки енергійно струшують, відмічають висоту піноутворення і стійкість піни. За наявності стероїдних сапонінів у лужному середовищі утворюється більш стійка і об'ємна піна.

Реакції осадження:

- до 2 мл водного витягу додають кілька краплин ацетату свинцю, утворюються об'ємний осад;
- до 2 мл водного витягу додають декілька краплин насиченого розчину барію гідроксиду.

Реакції утворення забарвлених розчин речовин:

- *реакція Лафона*. 2 мл витяжки випаровуються у фарфоровій чашці, залишок розчиняють у суміші рівних частин концентрованої сірчаної кислоти й етанолу при нагріванні (спостерігається жовте забарвлення). Додають 1 краплину 10 % розчину сульфату заліза (II);

- до 2 мл витягу додають 1 мл 10 % розчину нітриту натрію і 1 краплину концентрованої сірчаної кислоти.

Кількісне визначення

Існує три основних методи кількісної оцінки вмісту сапонінів у ЛРС – біологічний, фізичний, хімічний. ***Біологічний метод*** (гемолітичний індекс) полягає у визначенні граничного розведення, при якому зберігається здатність розчину сапоніну викликати гемоліз еритроцитів. ***Фізичний*** (індекс піноутворення) полягає у визначенні граничного розведення, при якому зберігається здатність розчину до піноутворення. ***Хімічні методи*** полягають у використанні різних хімічних властивостей сапонінів (переважно здатності утворювати забарвлені комплекси) для їх кількісного визначення.

Лабораторна робота № 9

Фітохімічне дослідження вітамінів

Мета: засвоїти методи якісного і кількісного визначення вітамінів у лікарській рослинній сировині; набути необхідні практичні навички та вміння робити відповідні висновки.

Необхідні реактиви та матеріали: розчин калію перманганату, розчин натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту, лужний розчин аргентуму нітрату, етанольний розчин кислоти фосфорномолібденової, розчин феруму (II) сульфат, кислота хлоридна, сульфатна, фосфатна, нітратна, мурашина і три хлороцтова; матеріали для проведення ТШХ.

Ідентифікація методом ТШХ

Для якісного виявлення вітамінів найчастіше використовують ТШХ. Вітаміни на хроматограмах виявляють за забарвленням у видимому світлі (у каротиноїдів – від яскраво-червоного до жовтого), флуоресценцією в УФ-світлі як до, так і після прояву спеціальними реактивами.

У сировині ***кислоту аскорбінову*** в основному визначають методом ТШХ після екстракції водою. Після хроматографування пластинку висушують і для виявлення кислоти аскорбінової обробляють такими реактивами:

- *розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту* (кислота аскорбінова проявляється у вигляді білих плям на рожевому фоні);
- *лужним розчином аргентуму нітрату* (проявляється у вигляді темно-сірих плям);
- *етанольним розчином кислоти фосфорномолібденової* (проявляється у вигляді темно-синіх плям на жовто-зеленому фоні) .

Якісне визначення кислоти аскорбінової засноване на її високій відновній здатності.

1. Реакція з калію перманганатом. До 1 мл реактиву розчину калію перманганату по краплях додають витяжку із сировини, що містить кислоту аскорбінову. Спостерігають знебарвлення розчину калію перманганату внаслідок відновлення мангану до Mn^{2+} .

2. Реакція з розчином йоду. До 1 мл реактиву розчину йоду по краплях додають витяжку із сировини, що містить кислоту аскорбінову. Спостерігають знебарвлення розчину.

3. Реакція з феруму (II) сульфатом. До 1 мл витяжки додають 1 мл розчину натрію гідрокарбонату і 1 мл феруму (II) сульфату. Спостерігають утворення феруму аскорбінату фіолетового кольору.

4. Реакція з розчином аргентуму нітрату. При цьому відбувається відновлення аргентуму, а кислота аскорбінова окиснюється у кетоформу. До витяжки додають 1 мл розчину аргентуму нітрату, при цьому випадає осад аргентуму металевого.

Каротиноїди. Для якісного виявлення каротиноїдів на хроматограмі використовують їх властивості утворювати з кислотами продукти різного кольору. Для цього застосовують кислоти хлоридну, сульфатну, фосфатну, нітратну, мурашину і трихлороцтову:

- β -каротин з *кислотою нітратною концентрованою* забарвлюється в синій колір, що переходить в зелений, потім у жовтий;
- β -каротин з *кислотою сульфатною концентрованою* дає синє забарвлення;

– з розчином стибію (III) хлориду у хлороформі (*реакція Карра–Прайса*) утворюються продукти синього кольору .

У сировині каротиноїди можна визначити за допомогою паперової і тонкошарової хроматографії. Для цього проводять багаторазову екстракцію каротиноїдів із сировини неполярними розчинниками, такими як ацетон, спирт, петролейний етер, або сумішшю етанол–ацетон (1:3) .

Для обробки хроматограм часто застосовують кислоти фосфорномолібденову. У цьому випадку на жовтому фоні каротиноїди проявляються у вигляді синіх плям при нагріванні пластинки до 80 °С.

Вітамін К₁. Наявність цього вітаміну у сировині в основному визначають методом ТШХ після екстракції хлороформом або етиловим спиртом. Флуоресціює в УФ-світлі червоним, потім флуоресценція стає зеленою, а під дією спиртового розчину калію гідроксиду – жовтогарячою.

Для виявлення вітаміну К₁ на хроматографічних пластинах застосовують кислоти 95 % сульфатну, 60 % хлоридну і 65 % нітратну. Вітамін К₁ проявляється у вигляді бурих плям. При обробці хроматограми парою йоду і після змочування її водою вітамін К₁ проявляється у вигляді фіолетової плями. Після обробки 0,25 % розчином родаміну В, вітамін К₁ проявляється в УФ-світлі у вигляді плями фіолетового кольору.

Токофероли в екстрактах визначають за допомогою ТШХ. Їх обробляють розчином кислоти фосфорномолібденової. При цьому токофероли утворюють темно-сині плями; з кислотою нітратною концентрованою при нагріванні хроматограми до 80 °С токофероли дають плями червоного або жовтогарячого кольору.

При взаємодії вітамінів з певними хімічними сполуками спостерігаються характерні кольорові реакції, інтенсивність забарвлення яких пропорційна концентрації вітамінів у досліджуваному розчині. Тому вітаміни можна визначити фотоколориметрично, наприклад, вітамін В₁ – за допомогою діазореактиву тощо. Ці методи дозволяють судити як про наявність вітамінів,

так і про кількісний вміст їх у досліджуваних органах і тканинах тварин і людини.

Лабораторна робота № 10

Підсумковий модульний контроль

Мета: контроль теоретичних знань та практичних навичок за пройденими темами.

1. Письмова робота за теоретичним матеріалом по темам: фітохімічне дослідження полісахаридів, жирних олій, ефірних олій, серцевих глікозидів, алкалоїдів, флавоноїдів, дубильних речовин, сапонінів, вітамінів – індивідуальні завдання для кожного студента.

2. Усна співбесіда з викладачем та вибірково перевірка практичних навичок з ідентифікації та кількісного визначення певної ЛРС; особливості роботи на спектрофотометрі, фотоколориметрі, методами ПХ, ТШХ, ГРХ, ВЕРХ.

Список літератури

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 2. – 724 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 3. – 732 с.
4. Кудашкина, Н.В. Фитохимический анализ: учебное пособие по фармакогнозии для студентов / Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, С.А. Мещерякова. - Уфа: ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВа, 2007. - 281 с.
5. Фармакогнозія : базовий підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. (фармац. ф-тів) IV рівня акредитації / В. С. Кисличенко, І. О. Журавель, С. М. Марчишин та ін.; за ред. В. С. Кисличенко. – Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2015. – 736 с.
6. Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини : навч. посіб. / [В. М. Ковальов, С. М. Марчишин, О. П. Хворост та ін.]; за ред. В. М. Ковальова, С. М. Марчишин. – Тернопіль : ТДМУ, 2014. – 264 с.
7. Практикум по фармакогнозии : учеб. пособ. для студ. вузов / В. Н. Ковалев, Н. В. Попова, В. С. Кисличенко и др.; под общ. ред. В. Н. Ковалева. – Х. : Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 512 с.
8. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2007. - 654 с.
9. Ковальов В. М. Фармакогнозія с основами біохімії рослин: підруч. [для студ. вищ. фарм. установ освіти та фарм. факультетів вищ. мед. установ освіти III-IV

рівнів акредитації] / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Х. : “Прапор”,
вид-во НФаУ, 2000. – 704 с.

10. Практикум по фармакогнозии: учебное пособие для студентов вузов / В.Н.
Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко [и др.]; под общ. ред. В.Н. Ковалева. –
Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы: МТК – Книга, 2004. – 512 с.

11. Хелдт, Г.-В. Биохимия растений: пер. с англ. / Г.-В. Хелдт. – М.: БИНОМ.
Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Лабораторна робота № 1. Фітохімічне дослідження полісахаридів.....	4
Лабораторна робота № 2. Фітохімічне дослідження жирних олій.....	7
Лабораторна робота № 3. Фітохімічне дослідження ефірних олій.....	11
Лабораторна робота № 4. Фітохімічне дослідження серцевих глікозидів.....	15
Лабораторна робота № 5. Фітохімічне дослідження алкалоїдів.....	19
Лабораторна робота № 6. Фітохімічне дослідження флавоноїдів.....	21
Лабораторна робота № 7. Фітохімічне дослідження дубильних речовин.....	25
Лабораторна робота № 8. Фітохімічне дослідження сапонінів.....	26
Лабораторна робота № 9. Фітохімічне дослідження вітамінів.....	29
Лабораторна робота № 10. Підсумковий модульний контроль.....	32
Список літератури.....	33

Навчальне видання

Методичні вказівки

до лабораторних занять з дисципліни

«Фітохімія»

для студентів спеціальності

226 «Фармація, промислова фармація»

Укладачі:

САВЧЕНКО Людмила Григорівна

ФАЛАЛЄЄВА Тетяна Василівна

ТИМОФЕЄВ Сергій Вікторович

Відповідальний за випуск (завідувач кафедри) Валерія АНАН'ЄВА

Роботу рекомендував до друку (експерт РВР)

Комп'ютерна верстка

Редактор

План 2021 р., поз.

Підп. до друку (дата підпису проректора)

Гарнітура Times New Roman.

Видавничий центр НТУ «ХП».

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.

61002, Харків, вул. Кирпичова, 2
