

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Медико-психолого-фармацевтический факультет
Кафедра фармацевтической технологии и фармакогнозии с курсом ПО

Курсовая работа

Дисциплина: "фармакогнозия"

«Физико-химические методы анализа биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье»

Выполнил:

Студент 452 группы

Фармацевтического факультета

Очно-заочного отделения

Шулбаев Валерий Иванович

Проверила: к. фарм. наук

доцент

Савельева Елена Евгеньевна

— — — — — 2020г.

Красноярск - 2020

30.05.20
Подпись
Самостоятельно
выполнила работа

Содержание

Введение.....	3
1 Хроматографические методы	6
2 Фотометрические методы	16
2.1 Ультрафиолетовая спектрофотометрия (УФ- спектрофотометрия)	18
2.2 Фотоэлектроколориметрический метод (ФЭК).....	19
3 Хроматоспектрофотометрический метод.....	26
Заключение	30
Список литературы	32

Введение

Современная нормативная документация на лекарственное растительное сырьё в качестве одного из важнейших показателей обязательно включает обнаружение и нормирование содержания основных биологически активных веществ. Их определение проводится с использованием химических, физико-химических и биологических методов анализа.

Как правило, биологически активные вещества – вещества вторичного обмена (сердечные гликозиды, сапонины, флавоноиды, алкалоиды). Но иногда – компоненты первичного обмена: витамины, углеводы, липиды, аминокислоты.

Анализируемая группа веществ или индивидуальное вещество предварительно извлекаются из растительного сырья. Чаше всего используют экстракцию растворителями, в результате которой получают смесь компонентов; затем проводят очистку от примесей, делят на отдельные фракции и/или выделяют индивидуальные вещества, используя преимущественно хроматографические методы. К химическим можно отнести методы анализа, в основе которых лежат химические реакции. Для идентификации действующих веществ используют групповые цветные и осадительные химические реакции. К традиционным методам количественного химического анализа относятся гравиметрические и титриметрические методы.

Титриметрические (объёмные) методы весьма разнообразны и зависят от химических свойств исследуемых соединений. Для этих целей используются методы прямого и обратного титрования. В основу титриметрических методов могут быть положены реакции следующих типов: кислотно-основные, окислительно-восстановительные, реакции осаждения и образования комплексных соединений. Широко распространены методы

титрования окислителями — перманганатометрия (определение дубильных веществ в сырье), йодометрия (определение арбутина в листьях толокнянки и брусники) и др. Точку эквивалентности фиксируют с помощью цветных индикаторов или потенциометрически (за счёт скачка потенциала индикаторного электрода). Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья используется сравнительно редко, например при количественном определении суммы аралозидов в корнях аралии маньчжурской.

Современные физико-химические методы анализа имеют ряд преимуществ перед классическими химическими методами. Обладают многими достоинствами: быстротой анализа, высокой чувствительностью, возможностью одновременного определения нескольких компонентов, сочетания нескольких методов, автоматизации и использования компьютеров для обработки результатов анализа. Как правило, в инструментальных методах анализа применяются сенсоры (датчики), и, прежде всего химические сенсоры, которые дают информацию о составе среды, в которой они находятся.

На сегодняшний день существует большое количество аналитических приборов, выпускаемых отечественными и зарубежными фирмами и позволяющих анализировать практически любые органические соединения, содержащиеся в лекарственном растительном сырье. Физико-химический анализ объединяет большое число количественных методов, основанных на измерении различных физических свойств соединений или простых веществ с использованием соответствующих приборов.

Цель данной работы — познакомиться с основными физико — химическими методы качественного и количественного анализа биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье на примерах некоторых растений.

Для выполнения поставленной цели необходимо решить ряд задач:

- Рассмотреть и дать краткую характеристику основным физико - химическим методам: хроматографическому, спектрофотометрическому, фотоколориметрическому .
- Выявить, какие методы используются для обнаружения биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье.
- На примере некоторых растений провести качественный и количественный анализ биологически активных веществ.

1 Хроматографические методы

К наиболее широко распространённым в настоящее время современным методам анализа растительного сырья относятся хроматографические методы и методы фотометрического анализа. Важнейшей особенностью этих методов является объективность оценки количественного содержания фармакологически активных веществ, что, в свою очередь, определяет качество растительного сырья.

Хроматографические методы анализа используются для разделения смеси веществ или частиц (например, ионов) и основаны на различии в скорости их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз. Поэтому хроматография применяется как на этапе пробоподготовки (очистки анализируемого компонента или смеси компонентов от сопутствующих примесей), так и в ходе непосредственного качественного и количественного анализов. При этом идентификация компонентов проводится по параметрам их удерживания в сравнении со стандартными образцами (свидетелями). Определение содержания искоемых соединений или их групп в исходной смеси после хроматографического разделения проводится другими физико-химическими методами в зависимости от способа детекции [1. с. 294].

По механизму разделения различают следующие виды хроматографии, применяемые в анализе лекарственного растительного сырья.

Адсорбционная хроматография, в основе которой лежит непрерывный обмен хроматографируемым веществом между неподвижной (твёрдой или жидкой) и подвижной фазами, обусловленный существованием на поверхности раздела фаз динамического равновесия между процессами адсорбции и десорбции хроматографируемого вещества, растворённого в подвижной фазе.

Распределительная хроматография, в основе которой лежит процесс

непрерывного перераспределения хроматографируемого вещества между подвижной и неподвижной фазами, причём это вещество растворимо в каждой из фаз. Другой способ очистки - метод распределительной хроматографии. Метод хроматографии используют для отделения алкалоидов от сопутствующих веществ и разделения алкалоидов травы крестовника плосколистного и листьев катарантуса розового. Алкалоиды крестовника плосколистного идентифицируют по величине R_f , алкалоиды катарантуса розового - в сравнении с эталонным образцом розевина после проявления хромогенными реактивами.

Ионообменная хроматография, в основе которой лежит обратимая хемосорбция ионов анализируемого раствора ионогенными группами сорбента. В зависимости от характера ионогенных групп ионообменные сорбенты (иониты) подразделяются на катионообменные (катиониты) и анионообменные (аниониты). Ионообменная хроматография в современном фармакогностическом анализе применяется весьма ограниченно, главным образом для очистки анализируемых компонентов от сопутствующих примесей [1. с. 339].

В анализе лекарственного растительного сырья применяется несколько методов хроматографического разделения, подразумевающих соответствующее аппаратное оформление.

Адсорбционная хроматография на колонках используется главным образом для очистки анализируемых компонентов от сопутствующих примесей. Классическая хроматографическая колонка представляет собой стеклянную трубку, заполненную сорбентом. Для разделения и очистки соединений растительного происхождения чаще всего используют полиамидный сорбент и силикагель, реже применяют колоночную хроматографию на сефадексе и алюминия оксиде. Так, очистку суммы флавоноидов (лютеолин, апигенин) травы сушеницы топяной (Трава сушеницы топяной – *Herba Gnaphalii uliginosi*; Сушеница топяная - *Gnaphalium uliginosum*; Сем. Астровые – *Asteraceae*) и плодов боярышника

(Fructus Grataegi; Боярышник кроваво-красный, колючий – Grataegus sanguinea, oxyacantha; Сем. Розоцветные – Rosaceae) , суммы ксантонов в траве золототысячника проводят с помощью адсорбционной хроматографии на полиамидном сорбенте. Затем в полученном элюате спектрофотометрическим методом определяют содержание действующих веществ.

Как вариант адсорбционной и/или распределительной колоночной хроматографии для очистки многокомпонентных смесей растительного происхождения в последнее время всё чаще применяется метод твёрдо-фазной экстракции (ТФЭ). ТФЭ отличается от классической колоночной хроматографии прежде всего принудительной подачей элюента под действием вакуума на выходе из хроматографической системы. Для получения разрежения определенной величины используют специальное герметичное устройство-приёмник (манифолд), в верхней части которого крепятся хроматографические «колонок» (патроны и/или картриджи), а к нижней подключен вакуум-насос с электроприводом. На мировом рынке системы для ТФЭ предлагаются фирмой «Supelco» (США).

Тонкослойная хроматография, или ТСХ (адсорбционная хроматография в тонком слое сорбента), чаще всего применяется при качественном анализе лекарственного растительного сырья или на стадии пробоподготовки для очистки анализируемых компонентов [1. с. 322].

Используют хроматографические пластины с закреплённым или незакрепленным слоем сорбента. Наиболее распространены сорбенты на основе силикагеля, реже применяют алюминия оксид, целлюлозу или полиамидный сорбент. Качественный анализ компонентов лекарственного растительного сырья с применением ТСХ проводят путём детекции невооруженным глазом флуоресценции или окраски пятен в УФ и видимом свете при сравнении со свидетелями. Основным параметром при этом, наряду с характерным окрашиванием или флуоресценцией пятен, является относительное удерживание компонентов, или R_f .

Согласно существующей нормативной документации подтверждают присутствие витамина К₁ только в листьях крапивы (Листья крапивы – *Folia Urticae*; Крапива двудомная – *Urtica dioica*; Крапива жгучая – *Urtica urens*; Сем. Крапивные – *Urticaceae*). Метод определения хроматографический. Определение основано на способности витамина К₁ флуоресцировать в УФ-свете. Экстрагируют из растительного сырья витамин К₁ гексаном. Хроматографическое разделение проводят восходящим способом на пластинке «Силуфол» при температуре 40-70 °С. Система растворителей: бензол - петролейный эфир (1:1). Готовую хроматограмму высушивают на воздухе 2-3 мин и выдерживают в УФ-свете при длине волны 360 нм в течение 2 мин, должно появиться пятно с желто-зеленой флуоресценцией. Количественное определение витамина К₁ в сырье не проводится.

Качественное и количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье связано с использованием натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята. Для количественного определения кислоты аскорбиновой в плодах шиповника (Плоды шиповника – *Fructus Rosae*; Шиповник майский - *Rosa majalis*, Шиповник иглистый - *Rosa acicularis*, Шиповник даурский - *Rosa davurica* ; Сем. Розоцветные – *Rosaceae*)

навеску сырья экстрагируют горячей водой и аликвоту экстракта титруют раствором реактива, который имеет синий цвет. Кислота аскорбиновая способна окисляться до дегидроформы раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята и восстанавливать последний до лейкоформы . Точка эквивалентности устанавливается появлением розового окрашивания, не исчезающего в течение 30-60 сек, которое свидетельствует об отсутствии восстановителя, т.е. кислоты аскорбиновой (2,6-дихлорфенолиндофенол имеет в щелочной среде синее окрашивание, в кислой – красное, а при восстановлении обесцвечивается) [2. с.7].

Для качественного определения часть водного экстракта хроматографируют на пластинках «Силуфол» или «Сорбфил», высушивают и

обрабатывают указанным реактивом (нанеся одновременно раствор свидетеля – чистой кислоты аскорбиновой) – пятна кислоты аскорбиновой выглядят бесцветными на синем фоне.

Для качественного обнаружения каротиноидов можно использовать химические реакции и хроматографию на силикагеле. Каротиноиды извлекают из сырья хлороформом и к хлороформному извлечению прибавляют кислоту серную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в слой кислоты серной) или кислоту азотную концентрированную (синее окрашивание, переходящее в зеленое и грязно-желтое). Хроматограммы проявляют 10 % этанольным раствором кислоты фосфорномолибденовой, нагревают в сушильном шкафу при температуре 60-80 °С несколько минут. На желто-зеленом фоне появляются синие пятна каротиноидов.

При качественном анализе лигнанов проводят реакции, основанные на способности лигнанов вступать в химические реакции, характерные для фенолов. Также используют способность флуоресцировать в УФ-свете. Применяют методы бумажной и тонкослойной хроматографии. Хроматограммы обрабатывают последовательно парами хлора и раствором натрия сульфита. Пятна лигнанов окрашиваются в красный цвет.

Например при хроматографическом исследовании спиртового извлечения из сырья родиолы розовой используется тонкослойная хроматография. Проба основана на разделении в тонком слое силикагеля (пластинки «Силуфол») метанольного извлечения из сырья в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (26:14:3) с последующим проявлением хроматограммы диазотированным натрием сульфацилом. Пятно салидрозиды с $R_f = 0,42$ окрашивается в красноватый цвет [3. с. 33].

Использование метода ТСХ на стадии пробоподготовки в количественном анализе лекарственного растительного сырья предусматривает элюирование действующих веществ с хроматографической пластины и последующий анализ элюата другими методами. Например,

разделение суммы флавоноидов цветков боярышника проводят на пластинах «Силуфол» или «Сорбфил», после чего пятно гиперозида элюируют с пластины, а его содержание в элюате определяют спектрофотометрическим методом.

В последнее время активно развивается метод количественной ТСХ с использованием специального прибора — денситометра, работа которого основана на измерении плотности флуоресценции или окраски пятна анализируемого компонента непосредственно на пластине. Для этого денситометр снабжён цифровой видеокамерой или сканером, а обработка полученных результатов производится с помощью специальной программы на компьютере. Применение денситометрии позволяет проводить экспресс-анализ компонентов сырья без их элюирования с пластины. Производство денситометров активно развивается как в России, так и за рубежом. На российском рынке в настоящее время представлена продукция отечественного производителя «ЛенХром», Санкт-Петербург (денситометр «ДенСкан») и швейцарской фирмы «Camag» (спектро-денситометр «CAMAG Scanner 3»).

Использование хроматографии на бумаге (БХ), имеющей как распределительный, так и адсорбционный механизмы разделения компонентов, в настоящее время ограничено и применяется для качественного анализа лекарственного растительного сырья. По способу перемещения подвижной фазы различают восходящую, нисходящую и круговую БХ. Детекцию осуществляют сходным с ТСХ образом. Так, качественный анализ флавонолов листьев вахты трёхлистной (*Folia Menyanthidis trifoliate*; Вахта трёхлистная – *Menyanthes trifoliate*; Сем. Вахтовые – *Menyanthaceae*) проводят с помощью восходящей БХ с последующим проявлением хроматограммы раствором алюминия хлорида.

Для идентификации кумаринов используют методы бумажной и тонкослойной хроматографии. Используют системы растворителей:

- н-гексан-бензол-метанол (5:4:1);

- петролейный эфир-бензол-метанол (5:4:1);
- н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:5).

После высушивания хроматограммы сначала просматривают в УФ-свете. Кумарины в зависимости от структуры имеют голубую, синюю, фиолетовую, зеленую, желтую флуоресценцию. Флуоресцирующие пятна кумаринов отмечают, и хроматограммы обрабатывают 10 % спиртовым раствором щелочи, после чего их высушивают в сушильном шкафу при температуре 110-120 °С в течение 2-3 мин и вновь просматривают в УФ-свете (как правило, флуоресценция усиливается). Затем хроматограммы опрыскивают свежеприготовленным реактивом Паули по Кутачеку (диазореактивом), от действия которого кумарины, в зависимости от структуры, окрашиваются в оранжевый, красно-оранжевый и фиолетовый цвета [4. с. 53].

Для идентификации и разделения флавоноидов используют методы бумажной (БХ), колоночной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ).

Используют различные системы растворителей:

- для БХ чаще всего БУВ (бутанол – кислота уксусная - вода) 4:1:5; 4:1:2;
- для ТСХ - хлороформ-метанол 8:3; 8:2.

Идентифицируют флавоноиды по характерному свечению на хроматограммах в УФ-свете до и после проявления хромогенными реактивами [4. с.19].

Катехины и лейкоантоцианидины не флуоресцируют. Гликозиды флавонов и изофлавонов флуоресцируют голубым или синим цветом, флавонолов - темно-коричневым или черным, агликоны флавонов - коричневым, флавонолов - желтым, халконы и ауроны имеют желтую или оранжевую флуоресценцию.

Для проявления флавоноидов на хроматограммах используют:

1) пары аммиака 25 %. Происходит усиление окраски пятен в УФ-свете или изменение окраски на желтую.

2) 2-5 % спиртовой раствор алюминия хлорида. Наблюдается желто-зеленая флуоресценция в УФ-свете, в видимом свете - желтое окрашивание пятен.

3) Катехины проявляют 1 % раствором ванилина в кислоте концентрированной хлористоводородной, в видимом свете наблюдается красное окрашивание.

Реже используют реактив Вильсона, 2 % метанольный раствор хлорокиси циркония, раствор сурьмы пятихлористой в хлороформе, диазореактив.

В ГФ XI приводится исследование методом бумажной хроматографии халконов и ауранов в траве череды, изофлавонов в корнях стальника; хроматографии в тонком слое сорбента на пластинке «Силуфол» - флавоноидов в цветках и плодах боярышника, флавоон-5-гликозидов в траве хвоща полевого.

Реакцию с реактивом Драгендорфа, согласно действующей НД, используют для обнаружения (проявления) алкалоидов крестовника плосколистного (*Herba Senecionis platyphylloidis*; Крестовник плосколистный - *Senecio platyphylloides*; Сем. Сложноцветные – *Asteraceae*) наибольшее количество алкалоидов (алкалоиды, производные пирролидина и пирролизидина - платифиллин) на хроматограмме в качественном и количественном анализе, алкалоидов травы термопсиса очередноцветкового на хроматограмме в количественном анализе.

В самом общем виде все перечисленные методы хроматографии не требуют специального аппаратного оформления, за исключением количественной ТСХ и твёрдо-фазной экстракции. К строго приборным методам хроматографического анализа относятся газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Газовая хроматография (ГХ) - это хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара. В фармацевтическом анализе находят применение газожидкостная (ГЖХ) и газоадсорбционная хроматографии. В газожидкостной хроматографии неподвижной фазой служит жидкость, нанесённая на твёрдый носитель, т.е. используется распределительный механизм разделения компонентов. В газоадсорбционной хроматографии неподвижной фазой является твёрдый адсорбент [1. с.303].

Метод газовой хроматографии применяется для анализа летучих веществ, в том числе компонентов эфирных масел, например ледола и палюстрола в эфирном масле побегов багульника болотного (Побеги багульника болотного – *Cormi Ledi palustris*; Багульник болотный - *Ledum palustre*; Сем. Вересковые – *Ericaceae*) .

Также возможно проведение химической модификации (дериватизации) компонентов анализируемой смеси с целью получения летучих производных и их последующий анализ методом ГХ. В качестве примера газохроматографического анализа с использованием дериватизации можно привести анализ летучих производных карбоновых кислот и моносахаридов, в том числе и растительного происхождения.

Детектирование на выходе из газохроматографической системы производится несколькими способами. Наиболее часто применяют детекторы теплопроводности (ДТП, или катарометр) и пламенно-ионизационный (ПИД). Реже используют селективные детекторы, такие как электронно-захватный (ЭЗД) и термоионный (ТИД).

На базе колоночной хроматографии возникла высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). От классической колоночной хроматографии ВЭЖХ отличается использованием сорбентов с размером частиц 3-10 мкм, что обеспечивает быстрый массоперенос при очень высокой эффективности разделения. Для обеспечения беспрепятственного прохождения элюента через колонку с ультрамелким сорбентом на входе в

хроматографическую систему создается высокое давление. Поэтому другим названием ВЭЖХ является «жидкостная хроматография высокого давления».

Лидирующее положение занимает обращённо-фазовая ВЭЖХ, в которой используются сорбенты на основе силикагеля с привитыми на его поверхности молекулами неполярных соединений, таких как высокомолекулярные углеводороды, фенолы и их производные. При этом хроматографическое разделение происходит за счёт распределительного (главным образом) и адсорбционного (в меньшей степени) механизмов, детектирование в ВЭЖХ осуществляется с помощью фотометрических и электрохимических методов анализа. Основное значение имеет спектрофотометрическая детекция в УФ области [1. с.326].

Преимуществом ВЭЖХ (особенно обращённо-фазовой) перед газовой хроматографией является возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам. Поэтому подавляющее большинство действующих веществ лекарственного растительного сырья может быть проанализировано этим методом (рис. 6). В фармацевтическом анализе метод ВЭЖХ в настоящее время используется главным образом при анализе препаратов на основе лекарственного растительного сырья, такого как женьшень (Корни женьшеня- *Radices Cinseng*; Женьшень- *Panax ginseng*; Сем. Аралиевые- *Araliaceae*) содержит тритерпеновые тетрациклические сапонины (гинзенозид) , родиола розовая, шиповник (Плоды шиповника –*Fructus Rosae* ; Шиповник майский - *Rosa majalis*, Шиповник иглистый - *Rosa acicularis*, Шиповник даурский - *Rosa davurica*; Сем. розоцветные – *Rosaceae*) и др.

Для проведения анализа методами ГЖХ и ВЭЖХ используются аналитические приборы - хроматографы. Количество отечественных и зарубежных фирм-производителей, выпускающих газовые и жидкостные хроматографы, неуклонно растёт.

2 Фотометрические методы

Фотометрические методы анализа основаны на поглощении электромагнитного излучения индивидуальным веществом или группой анализируемых веществ.

Наибольшее распространение в применении к фармакогностическому анализу получило электромагнитное излучение ультрафиолетового (УФ) и видимого (ВИД) диапазонов (обычно принято считать видимым излучение с длиной волны от 800 до 400 нм, а ультрафиолетовым - от 400 до 200 нм, длина волны меньше 200 нм - далекий УФ).

В зависимости от используемой аппаратуры, различают спектрофотометрический и фотоколориметрический анализ, к последнему близко примыкает колориметрический.

Спектрофотометрический анализ — анализ поглощения веществом монохроматического излучения с определённой длиной волны. Здесь выполняется основной закон поглощения - закон Бугера-Ламберта-Бэра:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot b$$

где I_0 - интенсивность излучения, падающего на раствор; I - интенсивность излучения, прошедшего через раствор; c - концентрация вещества в растворе; b - толщина слоя, см; D - оптическая плотность; k - коэффициент поглощения вещества.

Этот вид анализа выполняется на спектрофотометрах ВИД и УФ диапазона (обычно 200-1100 нм). Регистрируется спектр поглощения (зависимость поглощенного излучения от длины волны) или часть спектра поглощения (отдельная полоса поглощения). Измерение оптической плотности производится на фиксированной длине волны (как правило, в максимуме полосы поглощения) [1. с.50].

В настоящее время рынок выпускаемых фирмами-производителями спектрофотометров УФ и ВИД диапазона очень широк. Все выпускаемые

приборы являются сканирующими, с автоматической записью спектра и управляются компьютерами или встроенными процессорами (для компактных моделей). Они оснащены разнообразными программными продуктами, позволяющими оперативно решать различные спектрофотометрические задачи. Разнообразие выпускаемых приборов определяется целями анализа — рутинный поточный анализ или решение сложных аналитических задач.

Нормативная документация на некоторые виды сырья (листья наперстянки шерстистой) и препараты кардиотонических гликозидов требует определять их количественное содержание физико-химическими (хроматофотоэлектроколориметрическим или хроматоспектрофотометрическим) методами. Они основаны на предварительном хроматографическом разделении кардиотонических гликозидов с последующим фотоэлектроколориметрическим или спектрофотометрическим определением. Недостатками метода биологической стандартизации являются его трудоемкость, высокая стоимость, большая ошибка опыта (до 25 %).

Фотоколориметрический анализ — анализ поглощения веществами монохроматического излучения, которое получается с помощью светофильтров, выделяющих сравнительно узкий интервал длин волн (20-40 нм).

При фотоколориметрическом анализе закон Бугера-Ламберта-Бэра применим с большей или меньшей степенью приближения в зависимости от степени постоянства величины оптической плотности (D) в данном интервале длин волн.

Приборы, используемые для такого вида анализа, позволяют измерить оптическую плотность лишь в интервале длин, выделяемых светофильтрами. Для этих целей используются фотоэлектроколориметры различных типов (например, ФЭК или КФК).

Колориметрический анализ основан на сравнении интенсивностей окрасок растворов разных концентраций визуально или при помощи несложных приборов - колориметров.

Фотометрические измерения обычно проводят в водных или спиртовых растворах.

2.1 Ультрафиолетовая спектрофотометрия (УФ- спектрофотометрия)

Спектрофотометрический метод используется для определения содержания фенилпропаноида -салидрозида в сырье родиолы розовой (Корневище и корни родиолы розовой - *Rhizomata et radices Rhodiolae roseae*; Родиола розовая - *Rhodiola rosea*; Сем. Толстянковые –*Crassulaceae*)

Метод основан на способности окрашенных азокрасителей поглощать монохроматический свет при длине волны 486 нм. Определяют оптическую плотность окрашенного раствора, полученного по реакции салидрозида с диазотированным натрия сульфацилом, с помощью спектрофотометра. Рассчитывают содержание салидрозида с учетом удельного показателя поглощения ГСО салидрозида $E_{1\text{см}}^{1\%} = 253$.

Спектрофотометрическое определение кумаринов основано на способности кумаринов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны в зависимости от концентрации исследуемого раствора.

Кумарины флуоресцируют в УФ- свете желтым, зеленоватым, голубым, фиолетовым цветом. В щелочной среде флуоресценция усиливается. Особенно интенсивно флуоресцируют 7- гидроксикумарины, что связано с образованием хиноидной структуры в щелочной среде. В кислой среде флуоресценция становится менее интенсивной и характер флуоресценции меняется [4. с. 53].

В электронных спектрах поглощения кумаринов наблюдается характеристическая частота (при 210 – 270_{нм} и 290- 350_{нм}).

Характеристичность этих спектров поглощения обусловлена хромофором, включающим в себя сопряженные между собой α - пироновое и бензольное кольцо.

УФ - метод используют для определения содержания простых кумаринов в траве донника лекарственного (не менее 0,4 %) и пиранокумаринов в корневищах и корнях вздутоплодника сибирского (не менее 3 %). Получают хлороформное извлечение из сырья и измеряют у него оптическую плотность с помощью спектрофотометра.

Для обнаружения флавоноидов в экстракте чабреца предложено также использовать ДЕ-вариант дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, и позволяющий выделить полосу поглощения комплекса. Дифференциальный спектр экстракта чабреца по положению длинноволнового максимума поглощения совпадает со спектром лютеолина ($\lambda_{\max} 395 \pm 3 \text{ нм}$) – доминирующего компонента [6. с.2].

2.2 Фотоэлектроколориметрический метод (ФЭК)

Фотоэлектроколориметрический метод (ФЭК) используется для определения суммы хромонов в плодах виснаги морковевидной (*Fructus Visnagae daucoidis*; Виснага морковевидная – *Visnaga daucoidis* ; Сем.Сельдерейные – *Ariaceae*). Получают хлороформное извлечение, удаляют растворитель, сухой остаток хромонов растворяют в кислоте серной и у полученного окрашенного раствора измеряют оптическую плотность с помощью фотоэлектроколориметра.

Фотоэлектроколориметрические методы основаны на способности дубильных веществ образовывать окрашенные соединения с солями трехвалентного железа, кислотой фосфорно-вольфрамовой, реактивом Фолина-Дениса и др.

ФЭК-метод основан на измерении оптической плотности окрашенных растворов, полученных по реакции флавоноидов с солями металлов или азосочетания с солями диазония.

ГФ XI приводит ФЭК-метод для определения содержания суммы флавоноидов в листьях вахты трехлистной. Предварительно сырье очищают от хлорофилла хлороформом, получают спиртовое извлечение флавоноидов, затем проводят реакцию образования азокрасителя с диазотированным стрептоцидом и измеряют оптическую плотность окрашенного раствора с помощью ФЭК. Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному образцу рутина

ФЭК метод количественного определения основан на способности окрашенных антрахинолятов поглощать монохроматический свет при длине волны 540 нм.

Аутергофф предложил гидролиз и экстракцию агликонов объединить в одну стадию кипячением навески сырья с кислотой ледяной уксусной и последующей экстракцией диэтиловым эфиром.

Стадии определения:

- Гидролиз антраценпроизводных и экстракция агликонов из сырья.
- Получение окрашенных солей.

Эфирное извлечение обрабатывают в делительной воронке отдельными порциями щелочно-аммиачного раствора (5 % раствор натрия гидроксида, содержащий 2 % раствор аммиака). Антраценпроизводные в виде окрашенных антрахинолятов переходят в водную фазу; обрабатывают до тех пор, пока последняя порция щелочно-аммиачного раствора не будет оставаться бесцветной.

- Окисление восстановленных форм антраценпроизводных.

Для перевода всех форм антраценпроизводных в окисленные, часть щелочно-аммиачного раствора антрахинолятов нагревают на водяной бане в течение 15 мин. Восстановленные формы окисляются кислородом воздуха и

вступают в реакцию со щелочно-аммиачным раствором, окраска становится интенсивнее.

- Измерение оптической плотности окрашенных антрахинолятов с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) при длине волны 540 нм (зеленый светофильтр).

Содержание антраценпроизводных в сырье (%) рассчитывают по калибровочному графику, построенному по кобальта хлориду ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), в пересчете на истизин.

Фотоэлектроколориметрический метод рекомендован ГФ XI для определения содержания антраценпроизводных в сырье крушины, ревеня, марены красильной.

Содержание флавоноидов в экстракте чабреца жидкого определяли дифференциальным спектрофотометрическим ДЕ-методом по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Основным преимуществом которого является возможность избирательного определения флавоноидов в сложных смесях полифенольных соединений, в частности, в извлечениях из растительного сырья, без предварительного разделения. В качестве стандартного вещества предложено использовать лютеолин [7. с. 2].

Спектрофотометрический метод основан на способности флавоноидов или их окрашенных комплексов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны.

1. Получают спиртовое извлечение и измеряют собственное поглощение:

- в цветках бессмертника песчаного (Flores Helichrysi arenarii; Бессмертник песчаный - Helichrysum arenarium; Сем.Астровые – Asteraceae) при длине волны 315 нм, рассчитывают содержание флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид с использованием оптической плотности ГСО изосалипурпозида;

- в корнях стальника (*Radices Ononisdis*; Стальник полевой – *Ononis arvensis*; Сем. Бобовые – *Fabaceae*) при длине волны 260 нм, рассчитывают в пересчете на ононин с учетом оптической плотности ГСО ононина;

- в цветках пижмы (*Flores Tanacetii*; Пижма обыкновенная – *Tanacetii vulgare*; Сем. Астровые – *Asteraceae*) измеряют оптическую плотность флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в буферном растворе и пересчитывают на лютеолин с учетом оптической плотности ГСО лютеолина.

2. Получают спиртовое извлечение, затем проводят реакцию образования комплекса с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и измеряют оптическую плотность:

- в траве горца перечного в пересчете на кверцетин с учетом удельного показателя поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом;

- в траве спорыша (горца) птичьего в пересчете на авикулярин с учетом удельного показателя поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом.

3. Получают извлечение антоцианов 1 % раствором кислоты хлористоводородной из цветков василька синего, при этом образуются окрашенные оксониевые соли, у которых измеряют оптическую плотность и пересчитывают на 3,5-дигликозид цианидина (цианин) с учетом удельного показателя поглощения цианина в 1 % растворе кислоты хлористоводородной.

При анализе растительного сырья наиболее распространено количественное определение суммы действующих веществ в пересчёте на конкретное соединение, которое должно отвечать определённым требованиям: это соединение должно входить в состав суммы действующих веществ и для него должен существовать государственный стандартный образец (ГСО). Например, в траве зверобоя (*Herba Hyperici*; Зверобой продырявленный – *Hypericum perforatum*; Сем. Зверобойные – *Hypericaceae*) спектрофотометрически оценивается содержание суммы флавоноидов в

пересчёте на рутин. В случаях отсутствия ГСО, в качестве стандарта используют иное соединение, имеющее сходный с определяемым коэффициент поглощения на аналитической длине волны. Подобным приёмом пользуются при фотоколориметрическом определении суммы антраценпроизводных, где в качестве стандарта используют кобальта хлорид (кора крушины, корни ревеня и др.) [3. с.14].

Количественное определение суммы алкалоидов в настойке красавки в пересчёте на атропин возможно проводить экстракционно-спектрофотометрическим методом. Вычисляют содержание суммы алкалоидов (в процентах) в препарате в пересчёте на атропин основание [13. с. 3].

Определение концентрации веществ в растворе проводят тремя основными способами:

Первый способ основывается на измерении оптической плотности с последующим применением закона Бугера-Ламберта-Бэра для расчёта концентрации. Этот способ применим, когда известен коэффициент поглощения исследуемого вещества на данной длине волны. Таким образом определяют количественное содержание суммы антоцианов в пересчёте на цианидин-3,5-дигликозид в цветках василька синего (Цветки василька синего – *Flores Centaureae cyani*; Василек синий - *Centaurea cyanus* ; Сем.Астровые – *Asteraceae*).

Второй способ — определение концентрации исследуемого соединения путём сравнения величин оптических плотностей его раствора и раствора стандартного образца в известной концентрации. Так определяют содержание суммы флавоноидов в пересчёте на изосалипурпозид в цветках бессмертника песчаного.

Третий способ — построение калибровочного графика с использованием серии растворов стандартного образца известной концентрации, например количественное определение суммы флавоноидов в пересчёте на ононин в корнях стальника .

Спектрофотометрическим методом определяют содержание антраценпроизводных в листьях сенны. Имеются особенности из-за структуры действующих веществ:

- экстракцию сеннозидов проводят водой при нагревании;
- водное извлечение очищают от смолистых веществ;
- окисление восстановленных форм проводят с помощью железа окисного хлорида (FeCl_3);
- гидролиз гликозидов антрахинонов проводят 50 % раствором кислоты серной;
- оптическую плотность окрашенных антрахинолятов измеряют с помощью спектрофотометра при длине волны 523 нм;
- содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на хризофанол вычисляют по калибровочному графику, построенному по кобальта хлориду.

Для количественного определения каротиноидов в лекарственном сырье используют фотоколориметрический или спектрофотометрический методы. В качестве стандарта применяют раствор калия бихромата. Из сырья каротиноиды извлекают абсолютным спиртом, петролейным эфиром. Извлечения высушивают над безводным натрия сульфатом перед определением оптической плотности.

Количественное содержание полисахаридов в сырье спектрофотометрическим методом основано на измерении оптической плотности продуктов взаимодействия моносахаридов, образовавшихся после гидролиза полисахаридов с пикриновой кислотой в щелочной среде. Этот метод не является фармакопейным, однако разработаны и предложены методики спектрофотометрического определения полисахаридов для некоторых видов сырья (листья мать — и — мачехи, цветки липы сердцевидной, цветки василька синего и др.), а также в сухой слизи алтея.

Для оценки количественного содержания инулина в сырье девясила высокого разработана методика спектрофотометрического определения,

основанная на измерении оптической плотности продуктов взаимодействия фруктозы, образовавшейся после расщепления инулина с резорцином в кислой среде.

Для стандартизации корня одуванчика разработана методика прямого спектрофотометрического определения фруктозанов после их кислотной трансформации, основанной на способности сахаров (фруктозы, сахарозы) при нагревании с концентрированными кислотами образовывать продукты, имеющие поглощение в области 200- 380нм. [2. с.30].

3 Хроматоспектрофотометрический метод

Данным методом определяют содержание например лигнанов.

Определение основано на способности лигнанов поглощать монохроматический свет при определенной длине волны. Измеряют оптическую плотность растворов лигнанов с помощью спектрофотометра после предварительного хроматографического разделения. Данным методом определяют элеутерозид (диклозид сирингоренизола) в сырье элеутерококка колючего (Корневища и корни элеутерококка - *Rhizomata et radices Eleutherococci senticosi*; Элеутерококк колючий – *Eleutherococcus senticosus*; Сем. Аралиевые – *Araliaceae*).

Нормативная документация на некоторые виды сырья (листья наперстянки шерстистой - *Folia Digitalis lanatae*) и препараты кардиотонических гликозидов требует определять их количественное содержание физико-химическими (хроматофотоэлектроколориметрическим или хроматоспектрофотометрическим) методами. Они основаны на предварительном хроматографическом разделении кардиотонических гликозидов с последующим фотоэлектроколориметрическим или спектрофотометрическим определением.

Хроматоспектрофотометрический метод применяют для определения содержания фурукумаринов в плодах амми большой, псоралеи костянковой и листьях инжира.

Стадии определения:

1. Получение хлороформного извлечения из сырья.
2. Разделение суммы кумаринов методом хроматографии на бумаге в системе растворителей, указанной в нормативной документации.
3. Идентификация кумаринов в УФ-свете по характерному свечению.
4. Элюирование веществ с бумаги. Каждое вещество отдельно элюируют 95 % этанолом.

5. Измерение оптической плотности растворов с помощью спектрофотометра при длине волны, указанной в нормативной документации.

6. Расчет содержания каждого соединения с учетом удельного показателя поглощения.

Плоды амми большой: бергаптена и изопимпинеллина не менее 0,6 %.

Плоды псоралеи костянковой: псоралена и изопсоралена не менее 0,9 %.

Листья инжира: псоралена и бергаптена не менее 0,7 %, отдельно псоралена не менее 0,42 %.

Хроматоспектрофотометрический метод используется для определения келлина в плодах виснаги морковевидной. Метод основан на получении спиртового извлечения, разделении суммы хромонов методом тонкослойной хроматографии и определении оптической плотности элюата келлина с помощью спектрофотометра.

Хроматоспектрофотометрический метод используется для определения флавоноидов:

1. Предварительное разделение флавоноидов в тонком слое сорбента (Цветки боярышника – *Flores Grataegi*; Боярышник кроваво-красный, колючий – *Grataegus sanguinea, oxyacantha*; Сем. Розоцветные – *Rosaceae*)

Стадии определения:

- получение спиртового извлечения;
- очистка извлечения;
- хроматографическое разделение флавоноидов на пластинке «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол 8:2 вместе со свидетелем ГСО гиперозида;
- идентификация гиперозида и свидетеля на пластинках в УФ-свете;
- элюирование гиперозида и ГСО смесью диоксана и воды 1:1;
- измерение оптической плотности испытуемого раствора и ГСО при длине волны 365 нм;

- расчет содержания гиперозида.

2. Предварительное разделение на колонке с полиамидом (плоды боярышника).

Стадии определения:

- получают спиртовое извлечение;
- отгоняют спирт и обрабатывают остаток 10 % раствором натрия хлорида;
- полученный раствор наносят на колонку с полиамидом;
- элюируют флавоноиды с колонки 95 % этанолом, собирают окрашенный в желтый цвет элюат в мерную колбу на 25 мл;
- измеряют оптическую плотность элюата при длине волны 365 нм;
- параллельно измеряют оптическую плотность элюата ГСО гиперозида, полученного аналогично элюату флавоноидов;
- пересчитывают на гиперозид с учетом оптической плотности элюата ГСО гиперозида [4. с.19].

3. В траве сушеницы топяной выделяют следующие стадии количественного определения флавоноидов:

- получают спиртовое извлечение;
- отгоняют спирт и остаток обрабатывают 10 % раствором натрия хлорида;
- полученный раствор переносят на колонку с полиамидом;

Современный фармакогностический анализ также предусматривает использование многих других физико-химических методов. При выделении из растений органических веществ, требующих идентификации и определения их количественного содержания, успешно используются такие методы, как полярографический, люминесцентный анализ, ИК-спектроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, хромато-масс-спектрометрия, электрохимические методы и др.

По существующей нормативной документации для количественного определения кумаринов в лекарственном растительном сырье используют

Поляррографический метод. Основан на восстановлении кумаринов на ртутно-капельном электроде в альфа-пироновом кольце по месту двойной связи в положении 3,4. Присоединяют галоген - йод, в качестве реактива используют тетраэтиламмония йодид.

Используют для определения содержания фурокумаринов в плодах пастернака посевного. Содержание кумаринов в пересчете на ксантотоксин не менее 1 %.

Заключение

Таким образом, в нашей работе мы познакомились с основными физико – химическими методами качественного и количественного анализа биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье на примерах некоторых растений.

Широкое распространение физико-химических методов анализа в первую очередь связано с их значительно большей чувствительностью по сравнению с химическими. Если при помощи обычных химических методов можно установить концентрацию вещества порядка 10^{-5} моль/л, то для некоторых физико-химических методов определяемый минимум меньше примерно на пять порядков, т. е. 10^{-9} - 10^{-10} моль/л. Это преимущество особенно важно в связи с тем, что в анализе значительное место занимает определение следов веществ.

Рассмотрели и дали краткую характеристику основным физико – химическим методам. Физико-химические методы анализа — это экспресс – методы. Хроматографический, спектрофотометрический, фотоколориметрический и другие методы позволяют одновременно качественно и количественно определять десятки компонентов. В производственных условиях для анализа малых навесок и установления следов примесей эти методы незаменимы.

Преимущество физико-химических методов — их селективность.

Выявили какие методы используются для обнаружения витаминов, кумаринов, флавоноидов, полисахаридов, антраценпроизводных, алкалоидов, в лекарственном растительном сырье. На примере некоторых растений провели качественный и количественный анализ.

Из-за особенностей состава и многокомпонентности биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье, необходимо приспособлять стандартные методы к особенностям состава и физико-

химической структуры – т.е. в каждом конкретном случае требуется проведение в той или иной мере аналитической исследовательской работы.

Не смотря на то, что при этом используют дорогостоящую аппаратуру, достигается большая экономия средств и сил благодаря быстрой определению. Вместе с тем большая часть методов обладает и высокой чувствительностью, что значительно расширяет возможности исследования и одновременно позволяет снизить расходы реактивов.

Возможность автоматизировать аналитический процесс, а в ряде случаев выполнять его, не разрушая исследуемый объект, даже в живом растении, — еще одно несомненное преимущество физико-химических методов анализа перед обычными химическими.

Список литературы

1. Васильев В.П. Аналитическая химия. В 2кн.: Кн.2: Физико-химические методы анализа: Учебн. Для студ.вузов. – 4 –е изд., - М.:Дрофа, 2004. -384с.: ил.

2. Коренская И. М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащее витамины, полисахариды, жирные масла: учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов фармацевтического факультета / И. М. Коренская, И. П. Ивановская, О. А. Колосова. – Воронеж: издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – 85 с.

3. Коренская И. М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащее: антраценпроизводные, простые фенолы, лигнаны, дубильные вещества/ учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов фармацевтического факультета / И. М. Коренская, И. П. Ивановская, О. А. Колосова. – Воронеж: издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – 87 с.

4. Коренская И. М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащее: флавоноиды, кумарины и хромоны/ учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов фармацевтического факультета / И. М. Коренская, И. П. Ивановская, О. А. Колосова. – Воронеж: издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. – 82 с.

5. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия : учеб. пособие /под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб. : СпецЛит, 2004. – 765 с.

6. Маркова О.М. Использование оптических и хроматографических методов для стандартизации растительного сырья и лекарственных препаратов

чабреца и тимьяна. Автореф. дис. . канд. фармац. наук.-
Пятигорск,1997.- 23 с.

7. Маркова О.М., В.А. Карпенко, А.С. Саушкина, Т.Т. Лихота Вестник ВГУ. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного /Серия химия, биология, фармация 2003. № 1. с. 99 – 100

8.Муравьева Д.А. Фармакогнозия : учеб. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М. : Медицина, 2002. – 656 с.

9. Петров К. П. Методы биохимии растительных продуктов / К. П. Петров. – Киев: Вища школа, 1978. – 224 с.

10. Плешков Б. П. Биохимия сельскохозяйственных растений / Б. П. Плешков. – М. : Агропромиздат, 1987. – 494 с.

11. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений / Х. Н. Починок. – Киев: Наукова Думка, 1976. – 335 с.

12. Русин Г. Г. Физико-химические методы анализа в агрохимии. — М.: Агропромиздат, 1990. — 303 с: ил.— (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).

13. Химический анализ лекарственных растений под ред.Н.И.Гринкевича.-Москва «Высшая школа», 1983, с.175.

14.Государственная Фармакопея СССР : Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд. – М. : Медицина, 1987. – 336 с.

15. Государственная Фармакопея СССР : Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд. – М. : Медицина, 1989. – 398 с.

16.Государственная Фармакопея СССР : Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 10-е изд. – М. : Медицина, 1968. – 1080 с.