

Практическое занятие 16

**ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ: ЭКСТРАКЦИЯ
ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ, ВЭЖХ**

Действующие в настоящее время нормативные документы на растительное лекарственное сырье включают нормирование содержания основных действующих веществ, определение которых проводится с использованием как химических и физических методов.

Для извлечения действующих веществ из растительного сырья чаще всего используют *экстракцию растворителями* или *гидродистилляцию*, в результате чего получают смесь компонентов. Полученную смесь очищают от примесей и делят на отдельные фракции или вещества с помощью ряда операций: последовательной обработки смеси различными растворителями, распределения веществ между двумя несмешивающимися растворителями, методов хроматографии.

Для анализа лекарственного растительного сырья наиболее часто используется *хроматографический метод*. По механизму разделения многокомпонентных смесей различают три основных вида хроматографии: адсорбционную, распределительную и ионообменную. В их основе лежат неодинаковая степень адсорбируемости молекул (ионов) на твердом веществе (адсорбционная или ионообменная хроматография) или различное распределение их между двумя несмешивающимися жидкими фазами, одна из которых связана с твердым носителем (распределительная хроматография). В зависимости от целей и задач анализа применяют различные сорбенты и виды хроматографии: колоночную, бумажную и тонкослойную. Бумажная и тонкослойная хроматография позволяет работать с микроколичествами органических веществ и не требует дорогостоящей аппаратуры (рис. 20). На хроматограммах (рис. 21) действующие вещества проявляются при просматривании в ультрафиолетовом свете (флавоноиды, кумарины) или после обработки специфическими реактивами (алкалоиды, сапонины).

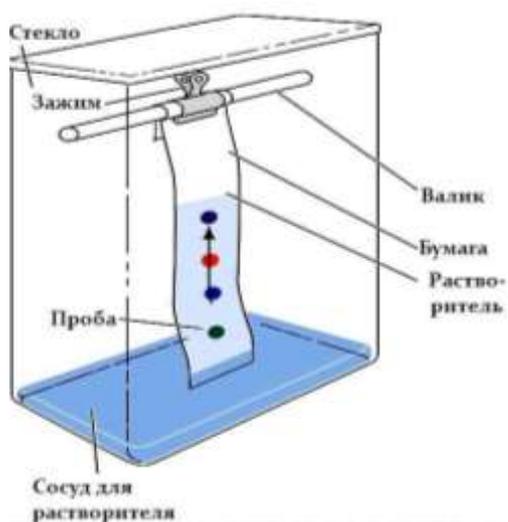


Рис. 20. Камера для бумажной хроматографии



Рис. 21. Хроматограммы

Однако более надежными и эффективными методами являются газожидкостная (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В основе газожидкостной хроматографии лежат законы распределения вещества между двумя фазами, одна из которых подвижна. В качестве подвижной фазы используют инертный газ (гелий, аргон, азот), а неподвижной фазой является жидкость, нанесенная на инертное твердое тело (сорбент). Сорбент помещают в хроматографическую колонку (рис. 22). Автоматическое устройство фиксирует разделяемые вещества на выходе из колонки по их физическим и химическим свойствам, а самописец регистрирует качественный и количественный состав смеси (рис. 23). С помощью газожидкостной хроматографии анализируют смеси летучих веществ или их производных (рис. 23).



Рис. 22. Колонки для газожидкостной хроматографии

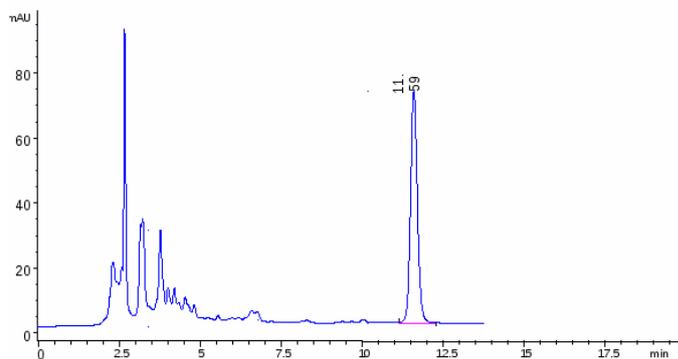


Рис. 23. ГЖХ-хроматограмма экстракта корней шлемника байкальского

Высокоэффективная жидкостная хроматография является вариантом колоночной хроматографии, но подвижная фаза - *элюэнт* - проходит через колонку с большой скоростью за счет высокого давления. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии проводят качественный и количественный анализ нелетучих термолabileльных соединений (рис. 24).

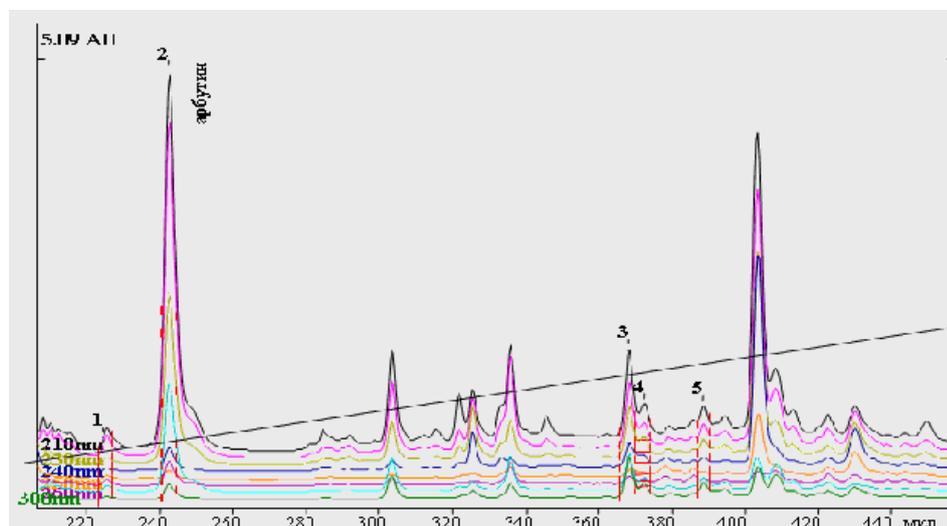


Рис. 24. ВЭЖ-хроматограмма водного экстракта зимолоубки зонтичной

Для определения количественного содержания действующих веществ в растительном лекарственном сырье используют и *оптические методы*: фотометрию, флуориметрию, а также поляризацию.

Фотометрический анализ основан на измерении количества света, поглощенного раствором вещества в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Для количественного определения некоторых природных соединений в сырье и лекарственных препаратах наиболее часто применяют фотоколориметрию и спектрофотометрию.

Спектрофотометрический анализ позволяет определять в растворе ароматические соединения (флавоноиды, фенолоксилоты, кумарины, лигнаны и др.). Метод основан на избирательном поглощении монохроматического света с определенной длиной волны раствором исследуемого вещества. Для этой цели используются спектрометры (рис. 25), позволяющие вычислить поглощение света как окрашенных, так и бесцветных растворов в видимой или ультрафиолетовой (от 190 до 400 нм) областях спектра.

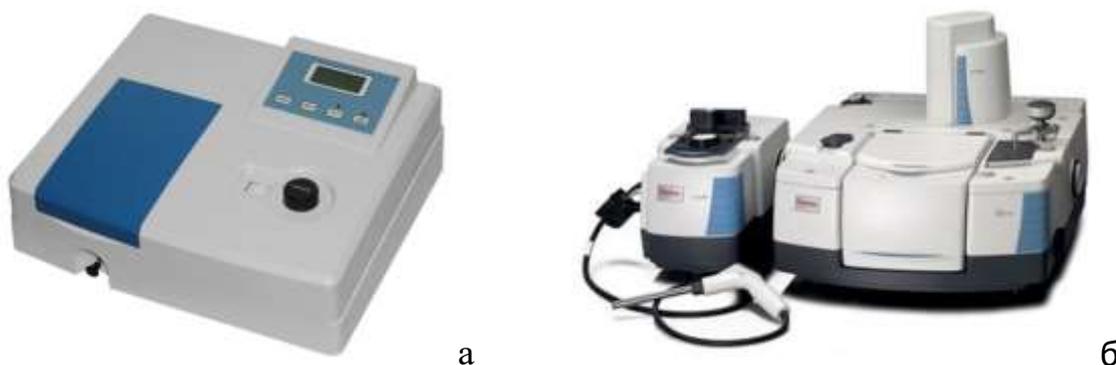


Рис. 25. Спектрофотометры:
а - LEKI SS1207UV, б - ИК-Фурье

Фотоколориметрия основана на измерении поглощения немонахроматического света на довольно широком участке спектра, выделяемом с помощью светофильтров на фотоэлектроколориметрах (рис. 26).

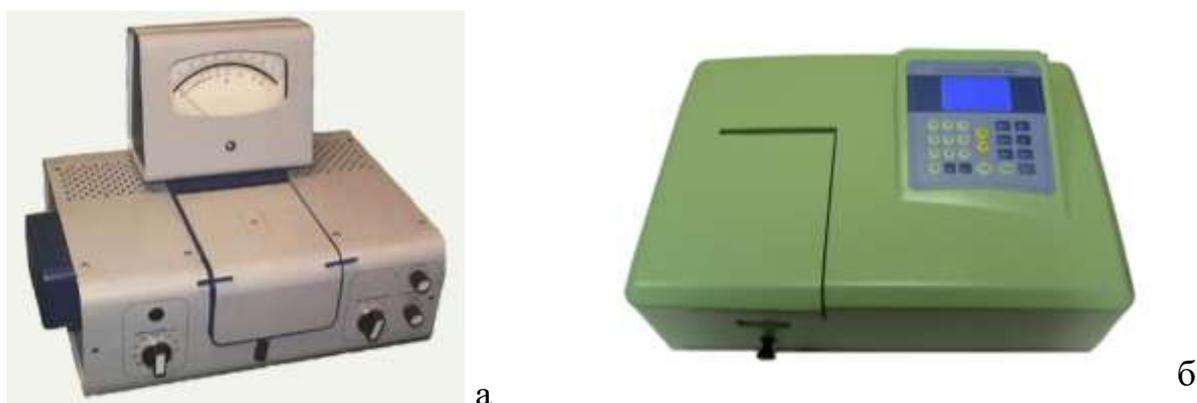


Рис. 26. Фотоколориметры:
а - КФК 2, б - КФК - 3КМ

Флюориметрический анализ основан на измерении интенсивности люминесценции испытуемых веществ. Это наиболее чувствительный метод при анализе кумаринов, флавоноидов и антрахинонов. Люминесценцию определяют с помощью флюориметров (рис. 27) или спектрофлюориметров (рис. 28) в растворах с концентрацией до 10^{-5} - 10^{-6} моль/л, когда между ее интенсивностью и концентрацией вещества наблюдается прямолинейная зависимость. Использование данного метода пока ограничено.



Рис. 27. Флюориметр «Флюорат 02-3М»



Рис. 28. Спектрофлюориметр EP-8500

Поляриметрия основана на определении содержания вещества в сырье по вращению плоскости поляризации оптически активных соединений (алкалоиды, терпеноиды, гликозиды). Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах (угол вращения), определяют на поляриметре (рис. 29) с точностью $\pm 0,02^\circ$. Значение угла вращения зависит от природы вещества, его концентрации, толщины слоя, длины волны света и температуры. При постоянстве толщины слоя, длины волны и температуры, угол вращения для анализируемого соединения зависит только от концентрации.



Рис. 29. Поляриметры: а - Atago POLAX-2L, б - ADP 600

Задание:

1. Записать принципы действия методов определения действующих веществ в растительном лекарственном сырье.
2. Зарисовать колонки для газожидкостной хроматографии.

Контрольные вопросы:

1. Какие методы используют для извлечения действующих веществ из растительного сырья?
2. По какому критерию классифицируются методы хроматографии?
3. На какие виды подразделяется хроматография? Что лежит в основе хроматографии?
4. Какие действующие вещества проявляются на хроматограммах в ультрафиолетовом свете, а какие после обработки реактивами?
5. Что используют в качестве подвижной фазы в газожидкостной хроматографии, а что в качестве неподвижной?
6. Какие действующие вещества анализируют с помощью газожидкостной хроматографии?

7. Какие действующие вещества анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии?
8. Какие оптические методы используют для определения количественного содержания действующих веществ в растительном лекарственном сырье?
9. На чем основан фотометрический анализ?
10. На чем основан спектрофотометрический анализ? Какие действующие вещества он позволяет определить?
11. На чем основана фотоколориметрия?
12. На чем основан флюориметрический анализ? Какие действующие вещества он позволяет определить?
13. На чем основана поляриметрия? Какие действующие вещества она позволяет определить?