

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**Кафедра загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії****МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ВИВЧЕННЯ ТЕМИ:**

«Флавоноїди. Методи якісного та кількісного визначення. ЛР і ЛРС що містить флавоноїди: Софора японська, види собачої кропиви, гірчак перцевий, сухоцвіт багновий, цмин пісковий, вовчуг польовий, види глоду, волошка синя, аронія чорнопліда, череда трироздільна, гінкго дволопатеве, бузина чорна.»

(для здобувачів 3 курсу медико-фармацевтичного факультету)

**Затверджено на методичній
наradі кафедри**

30.08.2024 р.

Протокол № 1

Зав. кафедри

проф. Рожковський Я.В.



Одеса-2024

1. Тема заняття: «Флавоноїди. Методи якісного та кількісного визначення. ЛР і ЛРС що містить флавоноїди: Софора японська, види собачої кропиви, гірчак перцевий, сухоцвіт багновий, цмин пісковий, вовчуг польовий, види глоду, волошка синя, аронія чорнопліва, череда трироздільна, гінкго дволопатева, бузина чорна.» (8 год.)

2. Актуальність теми.

Флавоноїди - численна група поліфенольних сполук, похідних дифенілпропана різного ступеня окислення і насиченості пропанового фрагмента. Застосування лікарської сировини і препаратів, що містять флавоноїди, різноманітно: багато хто з них мають Р-вітамінною активністю, зменшуючи крихкість кровоносних капілярів, посилюють дію аскорбінової кислоти (рутин), надають седативну дію (пустирник, шлемник, глід). Флавоноїдам притаманне протизапальний, противиразковий (флакарбін, ліквіритон), деяким - кровоспинну дію (горець перцевий, горець почечуйний, стальник польовий). В останні роки з'явилися повідомлення про протипухлинну і гіпоглікемічну дію флавоноїдів. Як правило, флавоноїди не використовуються в чистому вигляді, значно частіше про них говорять як про речовини, що входять до складу сумарних і комплексних препаратів, оскільки їх дія потенціюється супутніми речовинами (вітамінами, полісахаридами та ін.). Аптеками заготовлюються трава пустирника, горця перцевого, горця почім-чуйного і пташиного, череди, хвоща, квіти безсмертника, плоди і квітки бою-ришніка, тому в практичній діяльності провізора необхідні вміння по заготівлі, аналізу та зберіганню цих видів лікарських рослин.

3. Мета заняття:

3.1. Загальні цілі: освоїти методи якісного і кількісного хімічного аналізу ЛРС, що містить флавоноїди (бутони і плоди софори японської, трава і квітки гречки, трава горця перцевого і почечуйного, трава череди, квіти безсмертника піщаного, квітки глоду і пижма).

3.2. Виховні цілі:

Формування професійнозначимої підструктури особистості з актуальними аспектами деонтологічної, екологічної, правової, психологічної, патріотичної, професійної відповідальності.

3.3 Конкретні цілі:

1. - Знати:

1. Визначення поняття «флавоноїди».
2. Класифікацію і особливості структури флавоноїдних сполук.
3. Фізико-хімічні властивості флавоноїдів.
4. Методи очистки та розділення флавоноїдів.
5. Якісні реакції на флавоноїди.
6. Методи хроматографічного аналізу флавоноїдів.
7. Методи кількісного визначення флавоноїдів.
8. Фармакопійний метод аналізу рутина і його екстраполяція для кількісного визначення в лікарській рослинній сировині.
9. Хімічний склад АРС, що містить флавоноїди.

3.4. На основі теоретичних знань і проведеної лабораторної роботи опанувати методиками (вміти):

- Виявляти флавоноїди в рослинній сировині якісними реакціями і хроматографічних методами;
- Проводити кількісне визначення флавоноїдів в рослинній сировині.

4. Матеріали аудиторної самостійної підготовки (міждисциплінарна інтеграція)

№ п.п.	Дисципліни	Знати	Уміти
1	2	3	4
1.	<p>Попередні дисципліни:</p> <p>1.ботаніка</p> <p>2.органічна хімія</p> <p>3.аналітична хімія</p>	<p>Характерні ознаки родин досліджуваних рослин. Морфологію стебла, кори, листя, квітки, плоду, кореня і кореневища. Анатомічна будова листа, кори, плоду, кореня, кореневища. Фізичні та хімічні свойства полісахаридів, глікозидів, терпеноїдів, похідних ароматичного ряду, гетероциклов. Методи кислотно - основного титрування (нейтралізації) і перманганатометрії</p>	<p>Користуватися мікроскопом, готувати поверхневі препарати і поперечні зрізи.</p> <p>Проводити качественні реакції; очищення органічних сполук.</p> <p>Працювати з аналітичними терезами, з мірним посудом, фотоелектрокалориметром, використовувати методи хроматографії на папері і в тонкому шарі сорбіт-ту.</p>
2.	<p>Наступні дисципліни:</p> <p>фізична і колоїдна хімія</p>	<p>Розчинність твердих речовин і рідин в рідинах. Перегонка. Закон Рауля. Закон Коновалова. Тиск і склад пари над взаємонерастворюючими рідинами. Буферні розчини. Полярографія. Потенціометричні титрування.</p>	

	<p>аптечна технологія лікарських препаратів.</p> <p>заводська технологія лікарських препаратів</p> <p>клінічна фармакологія</p> <p>фармацевтична хімія</p> <p>організація і економіка фармації</p>	<p>Адсорбція. Іоннооб-менная адсорбція. Хроматографія: паперова, колонкова, в тонкому кулі адсорбенту, гелхроматографія.</p> <p>Способи відмірювання маси і об'єму. Додавайте порошок або рідкий лікарські препарати для внутрішнього і зовнішнього застосування. Приготування рідких лікарських препаратів за допомогою бюреточ-ної системи</p> <p>Умови промислового заготовлення лікарських препаратів.</p> <p>Принципи організації фармацевтичного виробництва різних лікарських форм: рідкі, тверді, м'які, ін'єкційні розчини та ін. Машина, апарати, обладнання для виробництва лікарських засобів.</p> <p>Фармакодинаміка і фармакокінетика лікарських засобів. Закономірність дії ліків на організм людини і його відповідні реакції. Основні принципи лікування з точки зору вибору лікарських препаратів, оцінці її ефективності і безпеки.</p> <p>Методи якісного та кількісного вивчення лікарських препаратів.</p> <p>Управління фармацевтичної службою. Госпрозрахункова аптека і організація її роботи. Збереження і вигляд лікарських препаратів. Контрольно - аналітична служба, організація її роботи. Зовнішність товарно - матеріальних цінностей і грошових коштів. Економічний</p>	
--	--	---	--

маркетинг і менеджмент у фармації	аналіз діяльності аптеки. Організація як об'єкт управління. Об'єднання процеси в управлінні. Менеджмент і підприємство. Управління трудовими ресурсами. Управління фармацевтичним маркетингом. Вивчення фармацевтичного ринку. Міжнародний маркетинг.
-----------------------------------	---

5. Зміст теми (текст і тези), графологічна структура заняття.

(Див. Текст лекції)

6. Матеріали методичного забезпечення заняття.

6.1. Завдання для самоперевірки рівня знань - умінь; тести різних типів з еталонами відповідей.

Тести.

1. Для виявлення флавоноїдів в траві череди використовують метод паперової хроматографії. Завдяки якому фізичному властивості флавоноїдів відбувається їх ідентифікація на хроматограмі:

- А. флюоресценція
- Б. люмінесценція
- В. оптична активність
- Г. питома вага
- Д. показник заломлення

2. При хімічному аналізі бутонів софори японської був отриманий позитивний результат ціанідінової реакції, що свідчить про присутність:

- А. флавоноїдів
- Б. алколоїдів
- В. антраценпроізводние
- Г. сапонінів
- Д. кумаринів

3. Для ідентифікації сировини до настоянці квіток глоду додали порошок металевого магнію і концентровану хлористоводородную кислоту. Утворилося рожеве забарвлення, яке свідчить про наявності в сировині:

- А. флавоноїдів
- Б. ефірного масла
- В. сапонінів
- Г. антраценпроізводние
- Д. кумаринів

4. Для встановлення справжності сировини витяг з коренів стальника нанесли на смужку фільтрувального паперу і переглянули в УФ-світлі. Блакитна флуоресценція свідчить про присутність в сировині:

- А. изофлавоноидов
- Б. неофлавоноидов
- В. бифлавоноидов
- Г. флаволигнанів
- Д. Еуфлавоноидов

5. Хроматографический анализ є специфічним методом визначення автентичності рослинної сировини і фітопрепаратів. Для ідентифікації індивідуальних речовин в хроматографическом анализі визначають наступну величину:

- А. величина R_f
- Б. температура плавлення
- В. температура кипіння
- Г. кут заломлення
- Д. кут обертання $[\alpha]_{20}$

6. З квіток і плодів глоду отримують настоянку і рідкий екстракт, ис-пользуемые як кардіотонічну засіб. Спектрофотометричним методом визначають зміст в сировину глоду наступних діючих речовин:

- А. флавоноїди
- Б. кардіоглікозиди
- В. атропін
- Г. папаверин
- Д. цитізін

7. Наявність флавоноїдів в корені вовчугу польового визначають за допомогою методу паперової хроматографії. Яке фізичне властивість флавоноїдів дозволяє їх ідентифікувати на хроматограмі:

- А. флюоресценція
- Б. люминисценция
- В. оптична активність
- Г. питома вага
- Д. показник заломлення

8. Проводячи хімічний анализ трави фіалки триколірної, отримали поклади-вальний результат ціанідінової реакції, що свідчить про присутність:

- А. флавоноїдів
- Б. алколоидов
- В. антраценпроизводные
- Г. сапонінів
- Д. кумаринів

9. При додаванні порошку металевого магнію і концентрованої хлористоводневої кислоти до витяжки з квітів цмину піскового, утворилося рожеве забарвлення, яке свідчить про наявність в сировині:

- А. флавоноїдів

- Б. ефірного масла
- В. сапонінів
- Г. антраценпроізводние
- Д. кумаринів

10. З коренів шоломниці байкальської отримують настоянку, рідкий і сухий екстракти, використовувані як седативні і гіпотензивні засоби. Спектрофотометричним методом визначають зміст в сировину шоломниці байкальської наступних діючих речовин:

- А. флавоноїдів
- Б. кардіоглікозидов
- В. атропіну
- Г. папаверину
- Д. цитизину

6.2. Інформація, необхідна для формування знань - умінь можна знайти в підручниках:

- основна:

1. Фармакогнозія: підручник (I—III р. а.) / І.А. Бобкова, Л.В. Варлахова. – 3-є видання Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина» 2018, 504с.
2. Фармакогнозія: базовий підручн. 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.
3. Навчальний посібник з дисципліни «Фармакогнозія» / Я. В. Рожковський, Б. В. Приступа, І. А. Бойко, Н. В. Герасимюк, В. В. Черногорюк -: Методична розробка кафедри фармакогнозії ОНМедУ. – Одеса: ОНМедУ, 2019 – 51 с.
4. Державна Фармакопея України: в 3 т. / 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. – 1500 с.

Додаткова література:

- 1 Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 3. – 732 с.
2. Сербін А.Г., Сіра Л.М., Слободянюк Т.О. Фармацевтична ботаніка. Підручник. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2007. – 488 с.
3. 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. – 250 с.

5. Матеріали для самоконтролю якості підготовки.

А. Питання для самоконтролю:

1. Визначення поняття «флавоноїди».
2. Класифікація і особливості структури флавоноїдних сполук.

3. Фізичні властивості флавоноїдів.
4. Якісні реакції на флавоноїди.
5. Методи хроматографічного аналізу флавоноїдів.
6. Формули кульгає, флаванона, флаванонола, флавон, флавонол, халкони, Аурон, изофлавона, нарингенина, апигенина, лютеоліна, кверцетину, рутину.
7. Латинські і російські назви сировини, які виробляють рослин і родин всіх об'єктів досліджуваної теми.

8. Матеріали для аудиторної самостійної підготовки:

8.1 Перелік навчальних практичних завдань, які необхідно виконати під час практичного лабораторного заняття:

Робота проводиться на зразках сировини: бутони і плоди софори японської, трава і квітки гречки, трава горян пташиного і почечуйного, трава череди, квіти безсмертника, пижма і глоду.

Завдання 1. Провести якісні реакції і хроматографическое визначення флавоноїдів на зразках сировини.

ХІД РОБОТИ

1. Екстракція

1. Подрібнити 3,0 г сировини до 2 мм.
2. Помістити наважку в колбу з шліфом на 50 мл або 100 мл.
3. Залити сировину 35 мл 70% етилового спирту
4. Закрити колбу повітряним холодильником і кип'ятити на водяній бані протягом 20 хвилин, періодично перемішуючи.
5. Витяг охолодити і профільтрувати.

2. Очищення

1. Отриманий фільтрат нанести на колонку діаметром 1 см, заповнену 1,0 г полиамидного сорбенту.
2. Флавоноїди з колонки елююють 70% етанолом.
3. Отриманий розчин упарити до $\frac{1}{2}$ об'єму і використовувати для проведення якісних реакцій і хроматографічного виявлення флавоноїдів.
4. Роботу проводити в порівнянні з 0,1% розчином рутина.

Ціанідіновa реакція

1. До 1 мл очищеного екстракту (і 0,1% р-ру рутина) додати по 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти і дрібку порошку металевого магнію.
2. До забарвленого розчину додати октанол або бутанол, розбавити водою до поділу шарів, струсити. Відзначити перехід пігментів в водну або

органічну фази. (Пігменти глікозидів залишаються у воді, а агліконов - переходять в органічну фазу.)

3. Результати спостережень записати в лабораторний журнал і зробити висновок про наявності агліконов або глікозидів.

Реакція з лугом

До 1 мл екстракту (і 0,1% розчину рутина) додати по 1-2 краплі 10% спирто-водного розчину гідроксиду калію або натрію.

Реакція з хлорним залізо.

До 1 мл екстракту (і 0,1% розчину рутина) додати по 1-2 краплі 10% розчину хлориду заліза. Спостереження оформити у вигляді табл.1

Таблиця 1

Досліджуваний об'єкт	Окрашування			
	ціанідіновая	КОН	FeCl ₃	ацетат свинцю
0,1% р-р рутина				
Екстракт сировини				

Зробити попередній висновок про клас флавоноїдів, що містяться в досліджуваному зразку сировини.

Хроматографія в тонкому шарі сорбенту

- 5 мл очищеного екстракту (п.2.3.) Упарити насухо на водяній бані в випарювальній чашці.
- Залишок розчинити в 0,3-0,5 мл етилового спирту, нанести його на дві пластинки "Силуфол" і в якості "свідків" - розчини рутина і кверцетину.
- Після висушування помістити їх в камери з системами розчинників (А) етилацетат-мурашина кислота-вода 70:15:17 (для агліконов). (В) метанол-оцтова кислота-вода 18: 1: 1 (для глікозидів).
- Висушити хроматограми під витяжкою.
- Відзначити плями флавоноїдів у видимому і УФ-світлі до і після обприскування 10% спиртовим розчином луку і розрахувати величини їх R_f.
- Намалювати схему хроматограмм, пронумерувати плями флавоноїдів.
- Результати спостережень оформити у вигляді

табл.2

Номер пята	Величина R _f в системі	Окрашування пята

	А	В	У видимому світлі	в УФ-світлі	с NaOH
рутин досліджуваний екстракт					

Завдання 2. Визначити кількісний вміст флавоноїдів в сировині по ФС 42-341-74.

ХІД РОБОТИ

. 1. Екстракція

1. Подрібнити 2-5 г сировини до 0,5 мм.
 2. Взяти точну наважку 2-5 г (відповідно до вимог НТД на сировину) в колбу на 250-500 мл з притертою пробкою.
 3. Додати 150 мл метилового спирту.
 4. Суміш струшувати 6 годин вібраційному апараті.
 5. Додатково настоювати 8 годин.
 6. метанольна витяг профільтрувати через складчастий фільтр.
- Всі перераховані вище операції проводять лаборанти до лабораторного заняття.

2. Очищення

1. Нанести на лінію старту хроматографічної паперу розміром 14 x 55 см або пластинки «Силуфол» мікропіпеткою 0,07 мл метанольного вилучення в трьох повторностях.
2. Паралельно нанести 0,1 мл стандартного розчину рутина.
3. Провести хроматографію низхідним способом в системі 15% оцтова кислота протягом 3,5 годин.
4. Хроматограми висушити на повітрі до зникнення запаху оцтової кислоти.
5. Висушені хроматограми переглянути в УФ-світлі.
6. Відзначити жовто-коричнева пляма рутина з R_f близько 0,70.
7. Вирізати ділянки паперу з плямами рутина і один контрольний ділянку порожній смужки паперу.
8. Скласти папір «гармошкою» і помістити у флакони на 10 мл.
9. Залити 10,0 мл 60% розчину метанолу, флакони щільно закрити пробками. Струшувати 2 години на вібраційному апараті.

3. Власне кількісне визначення

1. Визначити оптичну щільність елюата на спектрофотометрі при довжині хвилі 358 нм в кюветі з товщиною шару 1 см на тлі елюата контрольного досвіду.
2. Виміряти оптичну щільність розчину стандартного зразка рутину

4. Розрахунок

1. Розрахувати процентний вміст рутину в сировину за формулою

$$X = \frac{D_1 \cdot 3 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a \cdot V_2 \cdot (100 - v)}, \text{ де}$$

D_1 - оптична щільність досліджуваного розчину;

D_0 - оптична щільність стандартного розчину рутину;

S_0 - навішування стандартного зразка рутину в г;

a - навішування сировини в г;

V_1 - загальний об'єм вилучення в мл; V_2 - об'єм вилучення, нанесеного на хроматограму, в мл; V_3 - об'єм елюата в мл; v - вміст вологи в сировині в %

1. Примітка:

Приготування розчину стандартного зразка рутину.

0,05 г (точна наважка) стандартного зразка рутину (МРТУ 42-3976-71)

розчинити в метанолі (ГОСТ 6995-67) в мірній колбі ємністю 25 мл і

довести обсяг розчину до мітки. 1 мл розчину перенести в мірну колбу ємністю 100 мл і довести об'єм розчину 60% метиловим спиртом до мітки. 1 мл стандартного розчину містить 0,00002 г рутину.

2. Провести статистичну обробку результатів трьох паралельних дослідів. 4. Оцінка якості сировини На підставі проведеного аналізу зробити висновок про кількісний содер-жанні рутину в досліджуваному зразку сировини.

9. Інструктивні матеріали для оволодіння професійними вміннями, навичками:

9.1 Методика виконання роботи, етапи виконання:

а) отримати необхідну АРС

б) провести підготовку ЛРС- екстракцію, очищення.

в) провести якісні реакції визначення флавоноїдів

г) провести хроматографію в тонкому шарі сорбенту

д) спостереження записати в лабораторний журнал

е) провести підготовку АРС для кількісного визначення флавоноїдів - екстракцію, очищення

ж) провести власне кількісне визначення флавоноїдів

з) спостереження записати в лабораторний журнал

10. Матеріали для самоконтролю оволодіння знаннями, вміннями, навичками, передбачені цією роботою:

Тести

1. ЛРС, що містить халкони і аурони, що відносяться до класу флавоноїдів, не дають ціанідінової реакції. Їх можна виявити по червоному фарбування при додаванні:

- А. соляної кислоти
- Б. залізо-амонійних квасцов
- В. метиленового-синього
- Г. гліцерину
- Д. Судану 3

2. Витяг з трави череди трироздільної, що містить флавоноїди, не дає позитивної ціанідінової реакції, але при додаванні соляної кислоти ми спостерігаємо червоне забарвлення. Це свідчить про те, що низка містить:

- А. халкони і аурони
- Б. ксантони
- В. фурокумаріни
- Г. дубильні речовини
- Д. алкалоїди

3. Препарати з софори японської використовується як капіляроукреплюючим кошти. Кількісну оцінку на вміст БАР в цьому лікарській рослинній сировині проводять в перерахунку на:

- А. рутин
- Б. діосцін
- В. ціонін
- Г. ононін
- Д. галлову кислоту

4. При визначенні флавоноїдів очищений і упарений екстракт АРС розчиняють в спирті і наносять на пластинки «Силуфол». При цьому використовують зразки свідки:

- А. розчини рутина і кверцетину
- Б. розчин ваніліну
- В. розчин оцтової кислоти
- Г. розчин флороглюцину
- Д. розчин бензидину

5. При обробці екстракту ЛРС, що містить флавоноїди, 10% спиртоводного розчином калію, отримали жовто-оранжеве забарвлення.

Це свідчить про наявність в даному сировину:

- А. халкони
- Б. монотерпеноїд
- В. хромонов
- Г. алкалоїдів
- Д. іррідоїдов

6. Для екстракції флавоноїдів з квіток пижма звичайного необхідно використовувати:
- А. нижчі спирти або водно-спиртові суміші
 - Б. оцтову кислоту
 - В. розчин хлоралгідрату
 - Г. соляну кислоту
 - Д. розчин калію перманганату
7. Одним з хроматографічних методів визначення вмісту флавоноїдів в АРС є метод визначення:
- А. рутина
 - Б. ланатозід
 - В. глюкози
 - Г. арабінази
 - Д. галактози
8. Квітки волошки синьої використовують як сечогінний засіб. Кількісну характеристику цього рослинної сировини проводять в перерахунку на:
- А. ціанін
 - Б. ланатозид
 - В. галлову кислоту
 - Г. діосцін
 - Д. ононін
9. При хімічному аналізі квіток цмину піскового був отриманий позитивний результат ціанідінової проби. Про наявність якого класу сполук в даному АРС дозволяє судити проведена реакція:
- А. флавоноїдів
 - Б. антоціанів
 - В. кумаринів
 - Г. хромонов
 - Д. алкалоїдів
10. При нанесенні розчину луку на зріз кореня шоломниці байкальської з'являється оранжеве або червоне забарвлення. Це свідчить про наявність в АРС:
- А. флавоноїдів
 - Б. алкалоїдів
 - В. іррідоїдов
 - Г. сапонінів
 - Д. слизу
11. **Тема наступного заняття:**
«Хінони. Методи якісного та кількісного визначення. ЛР і ЛРС, що містить антрахінони: крушина вільховидна, жостір проносний, ревінь тангутський, щавель

кінський, види алое, касія гостролиста і вузьколиста, марена красильна, види звіробою.» - 4 години.

Методичні рекомендації склав



доцент Бойко І.А.

