

Katedra Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**ANALIZA FITOCHEMICZNA
roślinnych substancji leczniczych**

dla studentów farmacji
Wydanie III zmienione i uzupełnione
pod redakcją prof. dr hab. Barbary Klimek



ŁÓDŹ 2011

ISBN 978-83-62807-62-8

© Copyright by Barbara Klimek

Współautorzy wydania II: prof. dr hab. M. Królikowska (red.), dr J. Gudej, dr B. Klimek, dr K. Szepczyńska, dr M. Szymańska, dr M. Wolbiś, dr E. Wójcik

Skład komputerowy: mgr Ł. Szczęsna

Redakcja techniczna: dr inż. A. Kicel (wzory), mgr A. Owczarek, mgr P. Michel

Spis treści

PODSTAWOWE BADANIA SUROWCA ROŚLINNEGO	1
Oznaczenie zawartości wody	1
Oznaczenie zawartości substancji mineralnych (popiołu)	2
OLEJKI ETERYCZNE	5
Oznaczenie zawartości olejków wg FP VI	10
Oznaczenie zawartości olejków eterycznych w substancjach roślinnych wg FP VIII	12
Badanie tożsamości olejków eterycznych	15
POLISACHARYDY ŚLUZOWE	20
Surowce polisacharydowe	20
Oznaczenie wskaźnika pęcznienia	22
GLIKOZYDY	23
GLIKOZYDY FENOLOWE	26
Metodyka badań surowców zawierających glikozydy fenolowe	27
Surowce arbutynowe	28
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Uvae ursi folium</i> i <i>Vitis idaeae folium</i>	28
Oznaczenie zawartości arbutyny w <i>Uvae ursi folium</i> (wg FP VIII)	29
Surowce zawierające pochodne salicyny	30
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Salicis cortex</i>	31
KUMARYNY	33
Metodyka badań surowców kumarynowych	35
Surowce kumarynowe	36
Chromatografia cienkowarstwowa surowców kumarynowych	37
FLAWONOIDY	38
Metodyka analizy surowców flawonoidowych	42
Surowce flawonoidowe	44
Wykrywanie flawonoidów za pomocą reakcji barwnych	48
Chromatografia cienkowarstwowa surowców flawonoidowych	49
Oznaczenie zawartości flawonoidów w <i>Crataegi folium cum flore</i> wg FP VIII	50
Oznaczenie zawartości flawonoidów w <i>Betulae folium</i> , <i>Sambuci flos</i> , <i>Polygoni avicularis herba</i> , <i>Equiseti herba</i> , <i>Solidaginis herba</i> , <i>Solidaginis virgaureae herba</i> wg FP VIII	51
ANTOCYJANY	53
Metodyka badań surowców antocyjanowych	55
Surowce antocyjanowe	55
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Myrtilli fructus siccus</i> i <i>Sambuci fructus</i>	56
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Myrtilli fructus recens</i> wg FP VIII	56
Oznaczenie zawartości antocyjanów w <i>Myrtilli fructus recens</i> wg FP VIII	57
ANTRANOIDY	58
Metodyka badań surowców antranoidowych	60
<i>Aloe</i> – alona	61
Badanie tożsamości alony	62
Oznaczenie zawartości antranoidów w alonie	63
<i>Frangulae cortex</i> – kora kruszyny	64

Badanie tożsamości <i>Frangulae cortex</i>	65
Oznaczenie zawartości glukofrangulin w <i>Frangulae cortex</i>	65
<i>Rhamni purshianae cortex</i> – kora szakłaku amerykańskiego	66
<i>Rhei radix</i> – korzeń rzewienia	67
Badanie tożsamości <i>Rhei radix</i>	67
Badanie <i>Rhei radix</i> na zawartość <i>Rheum rhaponticum</i> i innych obcych gatunków rzewienia	68
Oznaczenie zawartości antrazwiązków w <i>Rhei radix</i>	68
Surowce z rodzaju <i>Cassia</i>	69
Badanie tożsamości <i>Sennae folium</i>	70
Oznaczenie zawartości sennozydów w <i>Sennae folium</i>	70
Farmakopealne preparaty antranoidowe	71
IRYDOLIDY	72
Metodyka badań surowców irydoidowych	75
Surowce irydoidowe.....	76
Badanie tożsamości <i>Valerianae radix</i>	78
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Gentianae radix</i>	79
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Centaurii herba</i>	79
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Menyanthidis trifoliatae folium</i>	79
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Agni casti fructus</i>	80
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Harpagophyti radix</i>	80
Oznaczenie zawartości harpagozydu w <i>Harpagophyti radix</i>	80
Oznaczenie wskaźnika goryczy	81
KARDENOLIDY.....	83
Metodyka badania surowców kardenolidowych	87
Surowce kardenolidowe.....	89
Badanie tożsamości <i>Digitalis purpureae folium</i> wg FPVIII	90
Oznaczenie zawartości kardenolidów w <i>Digitalis purpureae folium</i> wg FPVIII	91
Oznaczenie zawartości kardenolidów w <i>Digitalis lanatae folium</i> z użyciem odczynnika ksanthydroloowego	92
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Adonidis vernalis herba</i> i <i>Convallariae herba</i>	93
SAPONINY	95
Metodyka analizy surowców saponinowych	97
Surowce saponinowe	100
Próba pienienia	102
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Liquiritiae radix</i> , <i>Primulae radix</i> , <i>Saponariae radix</i> , <i>Herniariae herba</i>	102
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Primulae radix</i> , <i>Polygalae radix</i> , <i>Ginseng radix</i> , <i>Centellae asiaticae herba</i> wg FPVIII	103
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Liquiritiae radix</i> wg FP VIII	103
Oznaczenie zawartości kwasu glicyryzynowego	104
GARBNIKI	106
Metodyka badania surowców garbnikowych	109
Surowce garbnikowe	111
Reakcje barwne i osadowe.....	112
Chromatografia cienkowarstwowa surowców garbnikowych.....	114
Badanie produktów hydrolizy galotanin	114

Oznaczenie zawartości garbników wg FP VIII	115
POCHODNE KWASU KAWOWEGO	117
Metodyka badań surowców zawierających pochodne kwasu kawowego	118
Surowce zawierające pochodne kwasu kawowego	118
Oznaczenie sumy pochodnych hydroksycynamonowych w <i>Melissae folium</i>	119
Oznaczenie zawartości pochodnych kwasu kawowego w <i>Plantaginis lanceolatae folium</i> i <i>Ballotae nigrae herba</i>	119
ALKALOIDY	121
Alkaloidy grupy piperydyny	122
Alkaloidy grupy tropanu	122
Alkaloidy grupy indolu	123
Alkaloidy grupy chinoliny	126
Alkaloidy grupy izochinoliny	127
Alkaloidy grupy puryny	129
Metodyka badań surowców alkaloidowych	130
<i>Capsici fructus</i> – owoc pieprzowca	132
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Capsici fructus</i>	132
Oznaczenie zawartości kapsaicyny w <i>Capsici fructus</i> metodą FP IV	132
<i>Lobeliae herba</i> – ziele lobelii	133
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Lobeliae herba</i>	133
Surowce zawierające alkaloidy tropanowe	134
Chromatografia cienkowarstwowa surowców tropanowych	135
Oznaczenie zawartości sumy alkaloidów tropanowych	135
<i>Cinchonae cortex</i> – Kora chinowa	136
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Cinchonae cortex</i>	137
Oznaczenie zawartości alkaloidów w <i>Cinchonae cortex</i>	137
<i>Colae semen</i> – Zarodek kola	138
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Colae semen</i>	138
Oznaczenie zawartości alkaloidów w <i>Colae semen</i>	139
<i>Ipecacuanhae radix</i> – korzeń ipekakuany	140
Chromatografia cienkowarstwowa <i>Ipecacuanhae radix</i>	140
Oznaczenie zawartości alkaloidów w <i>Ipecacuanhae radix</i>	142

PRZEDMOWA

Ćwiczenia specjalistyczne z farmakognozji dla studentów farmacji obejmują analizę fitochemiczną ukierunkowaną na ocenę wartości leku naturalnego. Dwa poprzednie wydania skryptu stanowiły cenną pomoc w realizacji ćwiczeń zarówno z uwagi na szczegółowo opisane procedury analityczne, jak też wiadomości na temat budowy chemicznej, różnych metod oznaczania związków czynnych oraz wykorzystania substancji roślinnych w lecznictwie. W aktualnym wydaniu zachowano układ treści przyjęty w poprzednich wydaniach skryptu. Dość szczegółowe ujęcie części teoretycznej wynika z braku możliwości zsynchronizowania zajęć praktycznych z treścią aktualnie prowadzonych wykładów z farmakognozji (bloki ćwiczeniowe).

Treści te wymagały znacznego poszerzenia z chwilą ukazania się kolejnego wydania farmakopei polskiej (FP VIII), która zawiera wiele roślinnych substancji leczniczych nie objętych wykazami poprzednio obowiązujących farmakopei (FP IV - FP VI). Zostały one uwzględnione w obecnym wydaniu skryptu wraz z przyjętymi przez FP VIII procedurami analitycznymi dotyczącymi badania tożsamości i oznaczania zawartości substancji czynnych. Ze względu na brak możliwości wprowadzenia do ćwiczeń wszystkich metod badawczych zalecanych przez aktualnie obowiązującą farmakopeę, zachowano niektóre metody stosowane dotychczas w trakcie ćwiczeń, które zostały uprzednio sprawdzone zarówno przez pracowników katedry jak i studentów pod względem czasu wykonywania i jakości uzyskiwanych wyników. Wybór materiału ćwiczeniowego (substancji roślinnej) oraz metodyki badań ustalają prowadzący ćwiczenia tak aby student miał możliwość zapoznania się z budową chemiczną i metodyką analizy wszystkich ważniejszych grup związków czynnych występujących w roślinach.

prof. dr hab. Barbara Klimek

PODSTAWOWE BADANIA SUROWCA ROŚLINNEGO

Ocenę wartości surowca roślinnego na drodze chemicznej (jakościowa i ilościowa analiza składników biologicznie czynnych) poprzedzają zazwyczaj podstawowe badania obejmujące oznaczenie w surowcu zawartości wody (wilgoci), popiołu, domieszek i zanieczyszczeń organicznych i mineralnych, które składają się na określenie czystości surowca. Wynik analizy decyduje o przydatności surowca jako leku naturalnego i w pewnym stopniu o jego wartości przemysłowej. W Farmakopei Polskiej zamieszczone są metody oznaczania czystości surowca i podane są dla każdego surowca roślinnego normy zawartości wilgoci i popiołu.

Warunkiem prawidłowo przeprowadzonej analizy surowca roślinnego jest właściwe pobranie próbki do badań analitycznych. Próbka powinna reprezentować średnią jakość analizowanego surowca. Z partii surowca pobiera się próbki zwane próbkami pierwotnymi, z których przez zmieszanie i oddzielenie określonej ilości surowca otrzymuje się próbkę laboratoryjną. Szczegółowy opis pobierania i przygotowywania próbek do badań podaje FP VIII, t. I, str. 233. Wyniki określa się na podstawie co najmniej trzech oznaczeń. W wątpliwych przypadkach oznaczenia należy powtórzyć.

Oznaczanie zawartości wody

Surowce roślinne do użytku leczniczego są stosowane z reguły w postaci wysuszonej. Zawierają jednak pewną ilość wody, która może wynosić od 5% do 12% (w zależności od surowca). Nadmiar zawartości wody może spowodować pewne niekorzystne zmiany w surowcu i obniżyć jego wartość terapeutyczną. Zawilgocenie surowca sprzyja rozwojowi pleśni i bakterii co prowadzi do zmiany barwy, zapachu i smaku surowca oraz uaktywnienia enzymów, które mogą katalizować szereg niekorzystnych procesów, takich jak: hydroliza estrów i glikozydów, utlenianie związków polifenolowych, polimeryzacja itp. Przesuszenie surowca jest również niekorzystne, prowadzi do łatwego kruszenia przy przepakowywaniu i transporcie.

Zawartość wody w surowcach nie-olejkowych oznacza się metodą wagową przez określenie straty na ciężarze surowca wysuszonego w określonych warunkach.

Próbki surowców do oznaczania wilgoci powinny być odpowiednio rozdrobnione. Bezpośrednio przed oznaczeniem należy surowiec sproszkować i przesiać przez odpowiednie sito.

Strata masy po suszeniu

Odważyć 1g sproszkowanego surowca (sito ϕ 0,28 mm) w szerokim i niskim naczynku wagowym przykrytym pokrywką, z dokładnością do 0,001g. Otwarte naczynko wraz z pokrywką wysuszyć uprzednio do stałego ciężaru w temp. 105°C i ostudzić w eksykatorze z chlorkiem wapniowym. Surowiec suszyć w naczynku otwartym w temp. 105°C w ciągu 2 godzin. W czasie suszenia potrząsać naczynkiem używając szczypiec (surowiec powinien równą warstwą pokrywać dno naczynka). Następnie otwarte naczynko ostudzić w eksykatorze w ciągu 30–40 minut, zamknąć i zważyć. Dalsze suszenie należy powtarzać dotąd, aż różnica między kolejnymi ważeniami będzie mniejsza niż 0,001 g.

$$\% \text{ wody} = \frac{\text{strata na ciężarze po wysuszeniu} \times 100}{\text{ciężar badanej próbki}}$$

Oznaczanie zawartości wody przez destylację

W surowcach zawierających substancje łatwo lotne np. olejki eteryczne oznacza się zawartość wody metodą objętościową przez destylację azeotropową z nie mieszającymi się z wodą rozpuszczalnikami organicznymi o gęstości różnej od wody, najczęściej z toluenem lub ksylenem. Oznaczenie przeprowadza się w specjalnych aparatach destylacyjnych, zaopatrzonych w kalibrowany odbieralnik, służący do odczytania objętości wody wydestylowanej z odważki surowca np. w aparacie Derynga.

Oznaczanie zawartości substancji mineralnych (popiołu)

Popiół jest to pozostałość uzyskiwana po wyprażeniu surowca roślinnego w określonych warunkach. Ilość i skład popiołu zależy od obecności zawartych w tkankach roślinnych soli mineralnych oraz domieszki piasku i pyłu, znajdujących się na powierzchni surowca i stanowiących jego zanieczyszczenie. Popiół uzyskiwany przez wyprażenie soli mineralnych będących stałymi składnikami surowca nazywany jest **popiołem fizjologicznym**. Składa się on głównie z węglanów pierwiastków alkalicznych i ziem alkalicznych, a w małej części z fosforanów, siarczanów i chlorków. Jest rozpuszczalny w kwasie solnym. Jego zawartość waha się najczęściej w granicach 5-10%. Wyjątek stanowią surowce zawierające krzemionkę: w ziele skrzypu *Equiseti herba* ilość ta waha się w granicach od 12% do 27%.

Substancje mineralne otrzymywane po wyprażeniu całej próbki nazywane są **popiołem całkowitym**. Jest to suma popiołu fizjologicznego oraz zanieczyszczeń mineralnych występujących w surowcu. W celu określenia jaką część popiołu stanowią zanieczyszczenia oznacza się tzw. **popiół nierozpuszczalny w kwasie solnym**, który wskazuje na zawartość

krzemionki jako naturalnego składnika (ziele skrzypu) lub też piasku i ziemi w przypadku korzeni i liści gęsto owłosionych (surowiec *Digitalis purpureae folium* powinien zawierać nie więcej niż 3% popiołu rozpuszczalnego w kwasie solnym).

Niektóre farmakopee zalecają zamiast popiołu całkowitego oznaczenie popiołu siarczanowego, czyli pozostałości otrzymanej przez wyprażenie surowca po dodaniu kwasu siarkowego 96%. Powstają wówczas siarczany obecnych w surowcu pierwiastków metalicznych, które są trwalsze w wysokiej temperaturze od węglanów.

Oznaczenie zawartości popiołu całkowitego

Krzemionkowy lub platynowy tygiel ogrzewać 30 min do czerwoności, ochłodzić w ekcykatorze i zważyć. Wsypać i rozproszyc równomiernie w tyglu 1,00 g substancji roślinnej sproszkowanej lub innego produktu roślinnego, suszyć 1h w temp. 100-105°C i wyprażyć do stałej masy w piecu muflowym w temp. 600 ± 25°C pozostawiając tygiel w ekcykatorze do ochłodzenia po każdym zważeniu. W czasie prażenia nie powinny pojawiać się płomienie. Jeśli popiół zawiera nadal czarne cząstki, należy przemyć go gorącą wodą sącząc przez bibułowy sączek bezpopiołowy i wyprażyć pozostałość wraz z sączkiem. Przesącz połączyć z popiołem, ostrożnie odparować do sucha i wyprażyć do stałej masy.

Zawartość popiołu oblicza się w stosunku do suchej masy surowca (po odliczeniu wilgoci) wg wzoru:

$$\% \text{ popiołu} = \frac{A \times 100}{b}$$

A – ciężar popiołu w g

b – ciężar bezwodnego surowca w g

Oznaczenie zawartości popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym

Do tygla z otrzymanym uprzednio popiołem całkowitym lub popiołem siarczanowym dodać 15 ml wody i 10 ml kwasu solnego stęż., przykryć szkiełkiem zegarkowym i gotować przez 10 min. Po ochłodzeniu przesączyć przez sączek bezpopiołowy. Osad przemyć gorącą wodą do uzyskania obojętnego przesączu, wysuszyć i prażyć do zaniku żarzących się cząstek, pozostawić do ochłodzenia w ekcykatorze i zważyć. Prażyć dopóki różnica między ważeniami będzie nie większa niż 1 mg.

Oznaczenie zawartości popiołu siarczanowego

Prażyć odpowiedni tygiel (np. krzemionkowy, platynowy, kwarcowy) przez 30 min w temp. 600 ± 50°C. Po ochłodzeniu w ekcykatorze nad żelem krzemionkowym zważyć.

Podaną ilość sproszkowanego surowca umieścić równą warstwą w uprzednio wyprażonym tyglu i zważyć. Zwilżyć niewielką ilością (zwykle 1 ml) kwasu siarkowego 96% i ogrzewać ostrożnie do całkowitego zwęglenia substancji roślinnej. Po ochłodzeniu zwilżyć pozostałość kwasem siarkowym (1 ml) i ogrzewać aż przestaną się wydzielać białe dymy. Pozostałość prażyć w temp. $600 \pm 50^{\circ}$ C do spopielenia się substancji. Popiół zważyć po ochłodzeniu w eksykatorze nad żelem krzemionkowym i obliczyć zawartość pozostałości w procentach. Popiół siarczanowy oblicza się w stosunku do suchego surowca.

OLEJKI ETERYCZNE

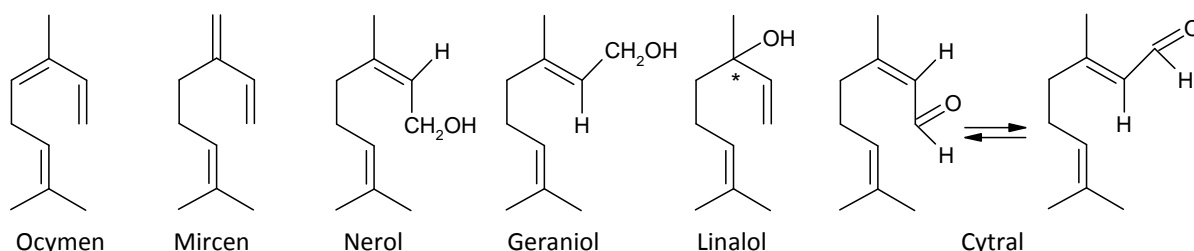
Olejki eteryczne (*Olea aetherea*) są fizjologicznymi wydaliniami roślin, składającymi się z produktów wtórnej przemiany materii. Zlokalizowane są w elementach zewnątrztkankowych, jakimi są włoski gruczołowe lub w elementach wewnątrztkankowych, takich jak: komórki olejkowe, zbiorniki i przewody olejkowe. W nielicznych roślinach (kwiaty lewkonii, jaśminu, róży, tuberozy) olejki występują w postaci emulsji w protoplazmie komórek skórki.

Olejki są zazwyczaj wieloskładnikowymi mieszaninami związków o dość zróżnicowanym składzie chemicznym, ale zbliżonych właściwościach fizycznych. Są lotne z parą wodną, posiadają charakter lipofilowy, odznaczają się swoistym zapachem.

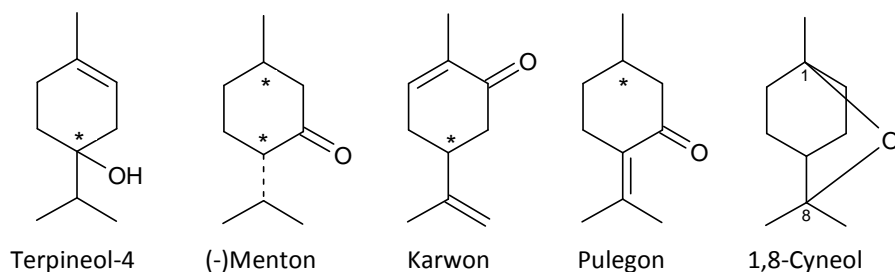
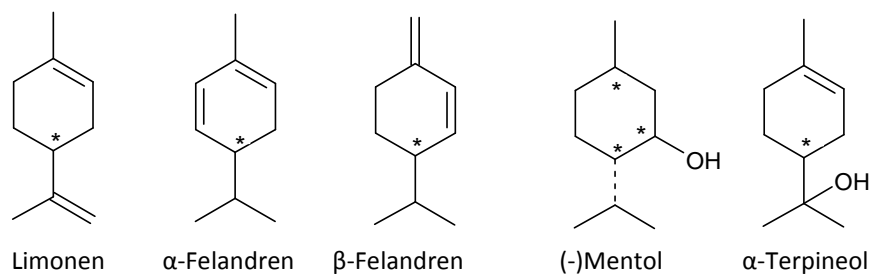
W skład olejków wchodzi związek należące do różnych grup chemicznych, głównie monoterpenów ($C_{10}H_{16}$), seskwiterpenów ($C_{15}H_{24}$) oraz pochodnych fenylopropanu (C_6-C_3). Składnikami olejków eterycznych mogą być również inne węglowodory alifatyczne i aromatyczne, laktony aromatyczne (kumaryny, ftalidy), związki zawierające w swym składzie azot (estry kwasu antranilowego) i siarkę (estry alkilowe lub arylove kwasu izosiarkocyjanowego) oraz szereg innych. W skład olejku wchodzi od kilku do kilkudziesięciu związków, przy czym jeden (rzadziej dwa) są często składnikami dominującymi, np. w *Anisi aetheroleum* – anetol, *Menthae piperitae aetheroleum* – mentol i menton, *Carvi aetheroleum* – karwon.

Najważniejsze składniki olejków eterycznych:

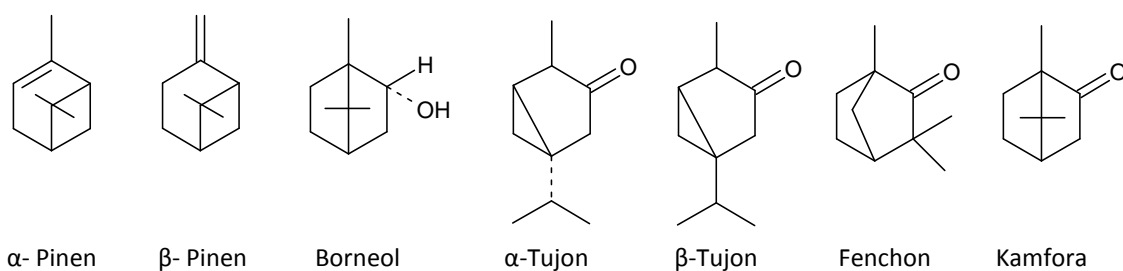
- **Monoterpeny acykliczne (łańcuchowe) i ich tlenowe pochodne:** ocymen, mircen, nerol, geraniol, linalol, cytral



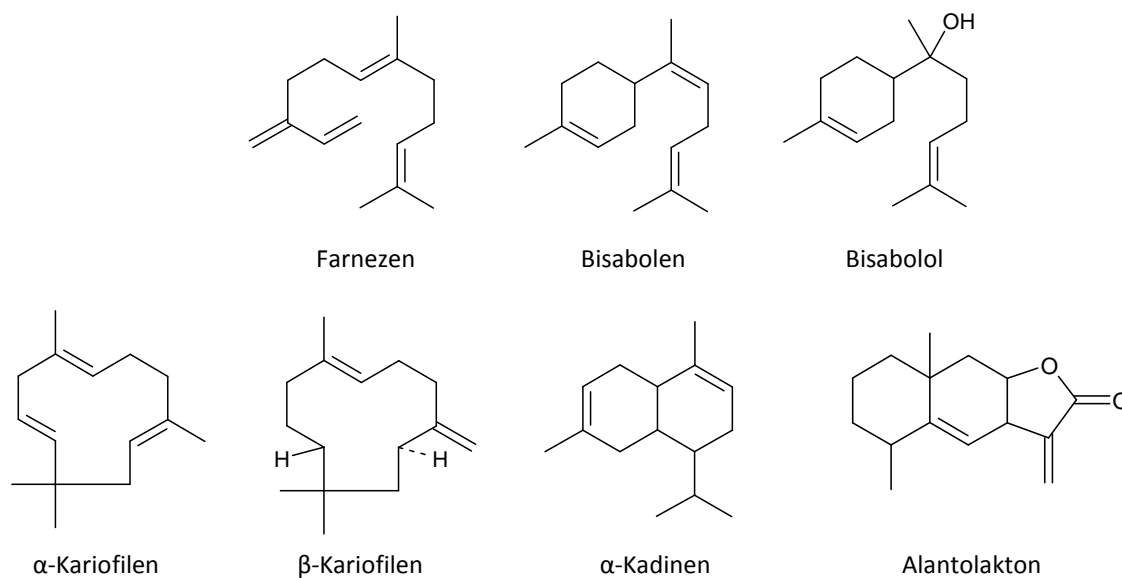
- **Monoterpeny monocykliczne (jednopierścienowe) i ich tlenowe pochodne:** limonen, α - i β -felandreny, (-)-mentol, α -terpineol, terpineol-4, menton, karwon, pulegon, 1,8-cyneol



- **Monoterpeny bicykliczne (dwupierścienowe) i pochodne:** α - i β -pineny, borneol, α - i β -tujony, fenchon, kamfora

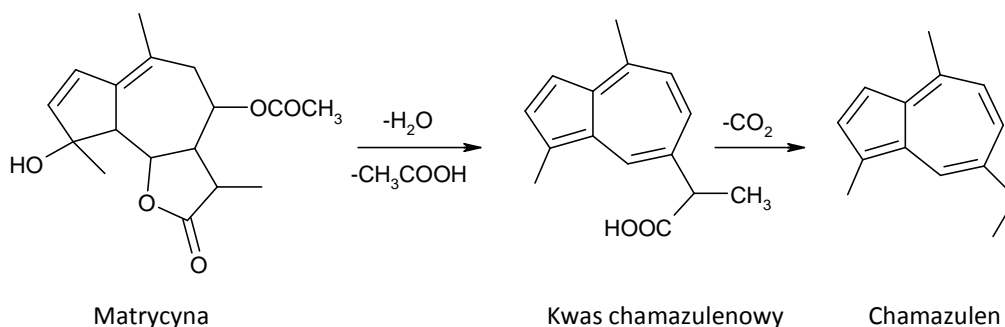


- **Seskwiterpeny i ich tlenowe pochodne:** farnezen, bisabolen, bisabolol, α - i β -kariofileny, α -kadinen, alantolakton



- **Azuleny i proazuleny:**

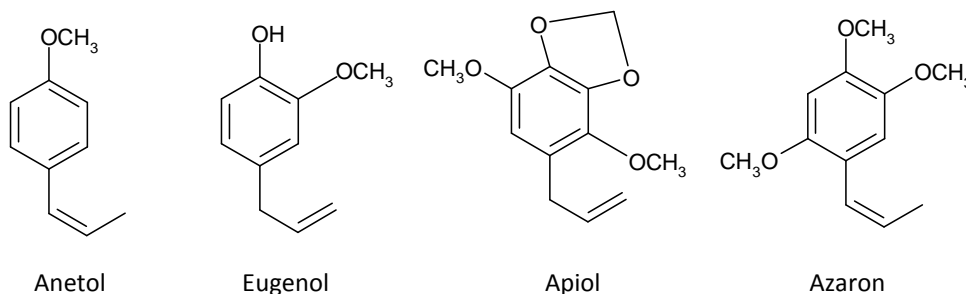
Azuleny są alkilowymi lub rzadziej tlenowymi pochodnymi azulanu $C_{10}H_8$. W roślinach występują w postaci tzw. proazulenów, którymi są laktony seskwiterpenowe (gwajanolidy): matrycyna, artabsyna, achillina. Związki te są bezbarwnymi składnikami substancji zawartych we włoskach gruczołowych rumianku pospolitego, piołunu, krwawnika. W czasie destylacji z parą wodną w wyniku procesów zmydlenia, dehydratacji i dekarboksylacji powstaje z nich chamazulen o charakterystycznej niebieskiej barwie.



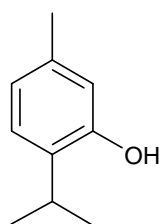
Laktony seskwiterpenowe są częstymi składnikami roślin z rodziny *Asteraceae*. Występują także w roślinach: *Cnicus benedictus*, *Artemisia absinthium*, *Taraxacum officinale*, które dostarczają surowców zaliczanych do grupy aromatyczno-gorzkich (*amara aromatica*).

Innymi, ważnymi laktonami seskwiterpenowymi o zróżnicowanej aktywności farmakologicznej są: helenalina – pseudogwajanolid występujący w *Arnicae flos*; partenolid z grupy germakranolidów – składnik *Tanacetii partenii herba*; artemizynina – związek typu sekokadinanu izolowany z *Artemisiae annuae herba*.

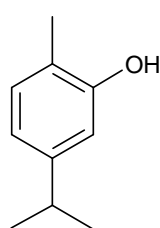
- **Pochodne fenylopropanu – arylowe pochodne allilu i propenylu** ($Ar-CH_2-CH=CH_2$ i $Ar-CH=CH-CH_3$): anetol, eugenol, apiol, azaron



- **Fenole pochodne p- cymenu:** tymol i karwakrol

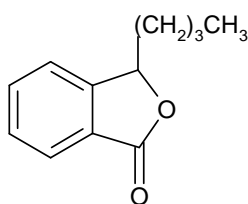


Tymol

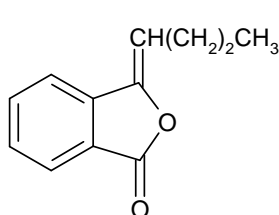


Karwakrol

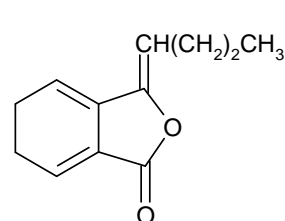
- **Ftalidy:** n-butyloftalid, n-butylenoftalid, ligustylid



n-Butyloftalid



n-Butylenoftalid



Ligustylid

Przyjemny zapach olejków jest spowodowany obecnością związków tlenowych, głównie estrów, ketonów, aldehydów lub alkoholi.

Klasyfikacja olejków w podręcznikach oparta jest najczęściej na charakterze chemicznym głównego składnika(-ów) olejku.

Występowanie. W świecie roślinnym są bardzo rozpowszechnione (około 30% roślin zawiera olejki eteryczne). Występują często w roślinach należących do rodzin: *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Apiaceae*, *Zingiberaceae*, *Asteraceae* i innych. Olejki roślin należących do tych samych rodzin botanicznych rzadko wykazują podobny skład chemiczny. Wyjątek stanowią rośliny z rodz. *Pinaceae*, których olejki zawierają zawsze jako główne składniki monoterpenu bicyklicznego. W obrębie każdego rodzaju, a nawet gatunku mogą występować różnice w składzie olejków, np. olejek *Mentha piperita* zawiera jako główny składnik mentol, *M. crispata* – karwon, *M. pulegium* – pulegon. Procentowy udział poszczególnych składników w olejku jest zmienny i zależy od wielu czynników, głównie genetycznych, ekologicznych i klimatycznych, np. rośliny śródziemnomorskie (kolendra, lawenda, szalwia, tymianek i inne) są znacznie bogatsze w olejek od roślin uprawianych w klimacie umiarkowanym. Zawartość olejków w surowcach roślinnych jest różna, waha się od 0,01% (płatki róży) do 20% (pączki kwiatowe goździkowca *Syzygium aromaticum* (*Myrtaceae*)).

Otrzymywanie. W skali przemysłowej otrzymuje się olejki z surowców roślinnych przez destylację z parą wodną, ekstrakcję łatwo lotnymi rozpuszczalnikami organicznymi

bądź przez wyciskanie lub wytłaczanie (świeża owocia roślin cytrusowych). Najszerzej stosowaną metodą otrzymywania olejków jest destylacja z parą wodną. Podczas destylacji z parą wodną skład olejku ulega pewnym zmianom. Są one na ogół tak małe, że nie mają istotnego wpływu na obniżenie wartości zapachowej czy terapeutycznej olejku. W handlu znajdują się zazwyczaj olejki rektyfikowane.

Do specjalnych metod (stosowanych w przemyśle perfumeryjnym) należy metoda wytrawiania olejków z płatków kwiatowych tłuszczami na zimno lub w podwyższonej temperaturze.

Właściwości fizykochemiczne. Olejki eteryczne wykazują wiele wspólnych cech:

- Są lotne z parą wodną, mają charakter lipofilowy, odznaczają się charakterystycznym zapachem.
- W temperaturze otoczenia (około 18°C) posiadają konsystencję płynną, oleistą.
- Niektóre z olejków przy dłuższym staniu zestalają się. Stałe składniki olejku nazywamy **stearooptenami**, płynne **oleoptenami** (np. stearoptenem *Menthae piperitae oleum* jest mentol, *Anisi oleum* – anetol).
- Kropla olejku naniesiona na bibułę daje tłustą plamę, która zanika po kilku godzinach (odróżnienie olejków eterycznych – *Olea aetherea* od olejów tłustych – *Olea pingua*).
- Są zazwyczaj bezbarwne lub jasnożółte, rzadko brunatne (*Thymi oleum*).
- Występowanie zabarwienia ciemnoniebieskiego, fioletowego lub zielonego wskazuje na obecność azulenów (*Millefolii oleum*, *Chamomillae oleum*).
- Gęstość olejku jest zazwyczaj mniejsza niż 1, bywają olejki o gęstości wyższej niż 1 (*Caryophylli oleum*, *Cinnamomi oleum*, *Sinapis oleum* i inne) lub niemal równej 1.
- Posiadają szerokie temperatury wrzenia, ponieważ są mieszaninami.
- Są optycznie czynne. Skręcalność optyczna olejku jest wypadkową skręcalności występujących w olejku związków czynnych optycznie.

Działanie farmakologiczne. Olejki eteryczne w zależności od składu chemicznego wykazują różne typy działania farmakologicznego. Do użytku zewnętrznego są stosowane jako środki drażniące skórę (*remedia rubefacientia*), przeciwzapalne (*remedia antiphlogistica*) oraz dezynfekujące (*r. antiseptica*). Do użytku wewnętrznego, jako środki wykrztuśne (*r. expectorantia*), spazmolityczne (*r. spasmolytica*), żółciopędne (*r. cholagoga*), żółciotwórcze (*r. choleretica*), wiatropędne (*r. carminativa*) i moczopędne (*r. diuretica*).

Olejki eteryczne są także stosowane w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym, i spożywczym.

Surowce olejkowe w FP VIII: *Absinthi herba, Angelicae radix, Anisi fructus, Anisi stellati fructus, Aurantii amari pericarpium et mesocarpium, Aurantii amari flos, Carvi fructus, Caryophylli flos, Chamomillae romanae flos, Cinnamomi cortex, Coriandri fructus, Eucalypti folium, Foeniculi amari fructus, Foeniculi dulcis fructus, Juniperi pseudofructus, Levistici radix, Matricariae flos, Menthae piperitae folium, Millefoli herba, Origani herba, Rosmarini folium, Salviae officinalis folium, Salviae trilobae folium, Thymi herba.*

Nie zamieszczone w FP VIII: *Inulae radix, Calami rhizoma.*

Szyszkę chmielu (*Lupuli flos*), lupulinę (*Lupulinum*) i korzeń waleriany (*Valerianae radix*) można zaliczyć do surowców olejkowych. Należy jednak pamiętać, że ich działanie farmakologiczne jest uwarunkowane obecnością także innych grup związków (floroglucydy, walepotriany).

Farmakopee podają w monografiach surowców olejkowych normę zawartości olejku. Surowiec o zawartości olejku poniżej normy nie powinien być stosowany w leczeniu.

Spośród około 30 olejków eterycznych, których monografie są zamieszczone w FP VIII do najczęściej stosowanych należą: *Anisi aetherol., Anisi stellati aetherol., Auranti dulcis aetherol., Carvi aetherol., Caryophyll floris aeterol., Cinnamomi cassiae aethertoL., Eucalypti aetherol., Foeniculi amari fructus aetherol., Juniperi aetherol., Lavandulae aetherol., Limonis aetherol., Matricariae aetherol., Melaleucaae aetherol., Menthae piperitae aetherol., Pini sylvestris aetherol., Rosmarini aetherol., Salviae lavadulifoliae aetherol., Thymi aetherol.*

Oznaczanie zawartości olejków wg FP VI

Bezpośrednie oznaczanie (metoda I)

Dokładnie odważaną próbkę surowca, w przepisanej ilości i formie (wg tabeli 1) należy natychmiast umieścić w kolbie aparatu Derynga i zalać przepisaną ilością wody. Najpierw wlać połowę ilości wody, a po wymieszaniu zawartości kolby spłukać surowiec ze ścianek pozostałą jej ilością. Kolbę należy połączyć z aparatem, napęnić odbieralnik wodą, włączyć chłodzenie i ogrzewać 3 godziny, licząc od chwili rozpoczęcia wrzenia zawartości kolby i przedestylowania pierwszej kropli. Po zakończeniu destylacji chłodzenie wyłączyć. Olejek sprowadzić na mikroskalę i odczytać otrzymany wynik po upływie 30 minut od zakończenia ogrzewania. Odczytaną objętość olejku przeliczyć na 100 gramów surowca, wyrażając zawartość olejku w procentach objętościowych.

Pośrednie oznaczanie (metoda II)

Dokładnie odważoną próbkę surowca, w przepisanej ilości i formie (wg tabeli 1), natychmiast umieścić w kolbie i zalać przepisaną ilością wody. Najpierw wlać połowę wody, a po wymieszaniu zawartości kolby spłukać surowiec ze ścianek pozostałą jej ilością. Następnie odmierzyć pipetą do kolby 0,3 ml m-ksylenu z dokładnością do 0,01 ml, po czym kolbę połączyć z aparatem, napełnić odbieralnik wodą, włączyć chłodzenie i ogrzewać w ciągu 3 godzin, licząc od chwili rozpoczęcia wrzenia zawartości kolby. Po ukończeniu destylacji chłodzenie wyłączyć. Warstwę ksylenowo-olejkową sprowadzić na mikroskalę, odczytać otrzymany wynik po upływie 30 minut od wyłączenia ogrzewania. Od otrzymanego wyniku odjąć poprawkę ksylenową, lecz nie w wysokości 30 podziałek a 27, gdyż trzy podziałki należy uwzględnić na doświadczalnie stwierdzoną średnią stratę m-ksylenu w czasie trzygodzinnej destylacji. Tak ustalony wynik przeliczyć na 100 gramów surowca, wyrażając zawartość olejku w procentach objętościowych.

Pośrednie oznaczanie (metoda III)

Dokładnie odważoną próbkę surowca, w przepisanej ilości i formie (wg tabeli 1), natychmiast umieścić w kolbie i zalać przepisaną ilością wody, w sposób podany w metodzie I i II. Następnie dodać cylinderkiem 5 ml kwasu siarkowego 20% oraz odmierzyć pipetą do kolby 0,3 ml m-ksylenu z dokładnością 0,01 ml, po czym postępować w myśl poprzedniego opisu (metoda II).

Zawartość olejku w surowcach, których olejek ma gęstość niższą od gęstości wody oznacza się metodą I. W przypadku surowców, których olejek ma gęstość równą lub wyższą od wody, by zapobiec powstawaniu trudnej do rozdzielania emulsji olejku w wodzie, lub przepływowi olejku wraz z cyrkulującą w aparacie wodą z powrotem do kolby destylacyjnej, należy zastosować metodę II. Dodatek m-ksylenu powoduje, że warstwa ksylenowo-olejkowa, która ma gęstość mniejszą od gęstości wody zbiera się w odbieralniku na powierzchni słupa wody. Zawartość olejku w *Inulae radix* należy oznaczać metodą III w celu obniżenia gęstości cieczy oznaczanej (warstwy ksylenowo-olejkowej) oraz przeciwdziałaniu zmianom w strukturze głównych składników olejku (dodatek kwasu siarkowego utrwala formę laktonową seskwiterpenów występujących w olejku).

Tabela 1. Warunki oznaczania olejku eterycznego w surowcach roślinnych wg FP VI

Surowiec	Ilość surowca [g]	Ilość wody [ml]	Stan rozdrobnienia surowca	Czas destylacji [h]	Metoda oznaczania
<i>Anth. Chamomillae</i>	20	400	<i>totum</i>	3	II
<i>FoL. Menthae pip.</i>	20	400	<i>totum</i>	3	I
<i>FoL. Salviae</i>	20	400	<i>totum</i>	3	I
<i>Fruct. Anisi</i>	20	400	sito 0,5 mm	3	II
<i>Fruct. Carvi</i>	10	300	sito 0,5 mm	3	I
<i>Fruct. Coriandri</i>	50	500	sito 0,5 mm	3	I
<i>Fruct. Foeniculi</i>	10	300	sito 0,5 mm	3	II
<i>Herb. Absinthii</i>	40	400	<i>concisum</i>	3	II
<i>Herb. Millefolii</i>	40	400	<i>concisum</i>	3	II
<i>Herb. Thymi</i>	20	400	<i>concisum</i>	3	I
<i>Peric. Aurantii amari</i>	10	200	sito 0,5 mm	3	I
<i>Rad. Inulae</i>	10	200	sito 0,28 mm	3	III
<i>Rad. Levistici</i>	20	400	sito 0,28 mm	3	II
<i>Rhiz. Calami</i>	10	300	sito 0,28 mm	3	II

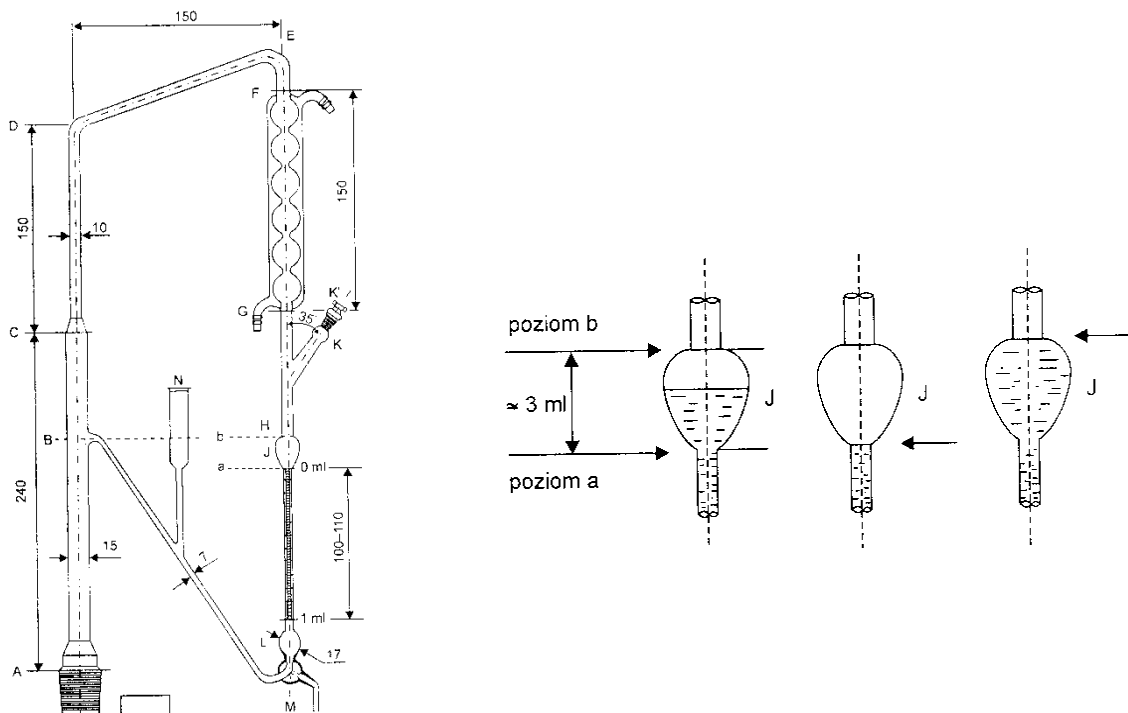
Oznaczanie zawartości olejków eterycznych w substancjach roślinnych wg FP VIII

Do oznaczania olejków eterycznych w substancjach roślinnych wykorzystuje się destylację z parą wodną w specjalnej aparaturze, w warunkach opisanych poniżej. Destylat zbierany jest w rurce kalibrowanej, gdzie olejek eteryczny pozostaje w warstwie górnej nad wodą lub miesza się z ksylenem stanowiąc lżejszą od wody warstwę ksylenowo-olejkową, a warstwa wodna zawracana jest automatycznie do kolby destylacyjnej.

Aparatura. Aparat składa się z następujących części:

1. kolby okrągłodennej o odpowiedniej pojemności (patrz tabela 2) z krótką szyjką zakończoną standardowym szlifem szklanym (o średnicy wewnętrznej 29 mm)
2. zestawu destylacyjnego (ryc. 1) wykonanego ze szkła o niskim współczynniku rozszerzalności, dopasowanego do kolby, składającego się z następujących połączonych elementów:

- a. układu odpowietrzającego składającego się z korka K' z nacięciem i otworu (o średnicy ok. 1 mm) w rurce K, która zakończona jest szlifem szklanym o średnicy wewnętrznej 10 mm;
 - b. zbiorniczka gruszkowego J poj. 3 ml;
 - c. rurki kalibrowanej JL co 0,01 ml;
 - d. zbiorniczka okrągłego L poj. ok. 2 ml;
 - e. zaworu trójdrożnego M;
 - f. rurki przepływowej, która łączy się z kolumną destylacyjną na wysokości B (20 mm powyżej najwyższej wartości skali);
3. odpowiedniego urządzenia ogrzewającego z płynną regulacją temperatury;
 4. pionowego statywu z poziomym pierścieniem pokrytym materiałem izolacyjnym.



Metoda. Należy używać aparat dokładnie umyty. Wykonać badanie odpowiednio do właściwości badanej substancji. Podaną objętość destylowanej cieczy umieścić w kolbie, dodać kilka kawałków porowatej porcelany i zmontować zestaw destylacyjny. Przez lejek napełniający N dodać wody do poziomu B. Wyjąć korek K' i za pomocą pipety wprowadzonej do końca rurki K dodać podaną ilość ksyłenu. Włożyć korek K' upewniając się, że szczelinka pokrywa się z otworem wentylacyjnym. Ogrzewać do wrzenia ciecz w kolbie, a następnie uregulować szybkość destylacji tak, aby otrzymywać 2-3 ml destylatu na minutę, jeżeli nie podano inaczej. Aby ustalić szybkość destylacji, podczas jej trwania otworzyć trójdrożny

Tabela 2. Warunki oznaczania zawartości olejków eterycznych w substancjach roślinnych wg FP VIII

Substancja roślinna	Odważka [g]	Pojemność kolby [ml]	Ilość cieczy [ml]	Ksylene [ml]	Czas dest. [h]	Szybkość dest. [ml/min]	Min. zaw. [ml/kg]
<i>Absinthii herba</i>	50****	1000	500 w.	0,5	3 h	2 - 3	2
<i>Anisi fructus</i>	10**	250	100 w.	0,5	2 h	2,5 - 3,5	20
<i>Carvi fructus</i>	10**	500	200 w.	0,5	1,5 h	2 - 3	30
<i>Caryophylli flos</i>	4***	250	100 w.	0,5	2 h	2,5 - 3,5	150
<i>Chamomillae romanae flos</i>	20*	500	250 w.	0,5	3 h	3 - 3,5	7
<i>Cinnamomi cortex</i>	20**	500	200 kw.	0,5	3 h	2,5 - 3,5	12
<i>Coriandri fructus</i>	30**	500	200 w.	0,5	2 h	2 - 3	3
<i>Eucalypti folium</i>	10****	500	300 w. + gl.	0,5	2 h	2 - 3	20
<i>Filipendulae herba</i>	50****	1000	300 kw.	0,5	2 h	2 - 3	1
<i>Foeniculi amari fructus</i>	5**	500	200 w.	0,5	2 h	2 - 3	40
<i>Foeniculi dulcis fructus</i>	10**	500	200 w.	0,5	2 h	2 - 3	20
<i>Juniperi pseudofructus</i>	20**	500	200 w.	0,5	1,5 h	3 - 4	10
<i>Lavandulae flos</i>	20*	1000	500 w.	0,5	2 h	2 - 3	13
<i>Levistici radix</i>	40**	2000	500 w. + p.	0,5	4 h	2 - 3	4(3)
<i>Matricariae flos</i>	30*	1000	300 w.	0,5	4 h	3 - 4	4
<i>Menthae pip. folium</i>	20*	500	200 w.	0,5	2 h	3 - 4	12(9)
<i>Millefolii herba</i>	20****	1000	500 w. + g.	0,2	2 h	2 - 3	2
<i>Origani herba</i>	30*	1000	400 w.	-	2 h	2 - 3	25
<i>Rosmarini folium</i>	25****	1000	300 w.	-	3 h	2 - 3	12
<i>Salviae folium</i>	20****	500	250 w.	0,5	2 h	2 - 3	15(10)
<i>Salviae trilobae folium</i>	20****	500	250 w.	0,5	2 h	2 - 3	18(12)
<i>Serpylli herba</i>	50****	1000	500 w.	-	2 h	2 - 3	3
<i>Thymi herba</i>	30*	1000	400 w.	-	2 h	2 - 3	12
<i>Zingiberis rhizoma</i>	20*	1000	500 w. + p.	0,5	4 h	2 - 3	15

Objaśnienia do tabeli 2:

- * – użyć surowiec cały (nie rozdrabniać)
- ** – użyć surowiec grubo sproszkowany bezpośrednio przed oznaczeniem
- *** – użyć surowiec zmielony z ziemią okrzemkową (5g + 5g) bezpośrednio przed oznaczeniem
- **** – użyć surowiec pocięty bezpośrednio przed oznaczeniem
- w. – woda destylowana
- w. + gl. – woda + glicerol (200ml + 100ml)
- w. + g. – woda + glikol etylenowy (50ml + 450ml)
- w. + p. – woda z dodatkiem parafiny płynnej (10 kropli) w celu zmniejszenia ilości piany
- dest. – destylacja
- min. zaw. – wymagana przez FP VIII minimalna zawartość olejku w surowcu (w nawiasach podano wymaganą minimalną zawartość olejku w surowcu rozdrobnionym).

zawór i obniżyć poziom wody dopóki menisk nie znajdzie się na poziomie (a) (ryc. 2). Zamknąć zawór i zmierzyć czas, po którym ciecz osiągnie poziom (b). Ponownie otworzyć zawór i kontynuować destylację dopasowując intensywność ogrzewania do pożądanej szybkości destylacji. Po 30 min zakończyć destylację odłączając ogrzewanie i po co najmniej 10 min odczytać objętość ksylenu w rurce kalibrowanej.

Umieścić w kolbie podaną ilość substancji roślinnej i kontynuować destylację jak podano powyżej z ustaloną szybkością i w ustalonym czasie. Wyłączyć ogrzewanie, odczekać 10 min i odczytać objętość cieczy zebranej w rurce kalibrowanej odejmując objętość dodanego wcześniej ksylenu. Różnica wskaże ilość olejku eterycznego przypadającą na masę użytej substancji roślinnej. Uzyskaną objętość olejku eterycznego przeliczyć na kilogram substancji roślinnej.

Badanie tożsamości olejków eterycznych

Badanie tożsamości i czystości olejków prowadzi się za pomocą określenia gęstości względnej d_{20}^0 , współczynnika załamania światła n_D^{20} , skręcalności właściwej α_D^{20} , temperatury krzepnięcia, absorpcji w świetle UV i innych parametrów np. barwy, liczby kwasowej, pozostałości po odparowaniu. Jednak podstawowe znaczenie w identyfikacji i wykrywaniu zafałszowań olejków mają obecnie metody chromatograficzne – cienkowarstwowa (TLC) i gazowa (GC), które pozwalają na identyfikację składników olejku (TLC, GC) oraz określenie ich procentowego udziału w całości (GC).

Za pomocą chromatografii gazowej określa się tzw. profil chromatograficzny, który obejmuje identyfikację składników olejku na podstawie czasów retencji zgodnych z czasami retencji roztworów porównawczych oraz oznaczenie procentowego udziału składników w całości olejku na podstawie pomiaru pól powierzchni poszczególnych pików. Porównanie pól powierzchni pików na chromatogramie olejku badanego z powierzchniami pików korespondujących pod względem czasów retencji na chromatogramie referencyjnym pozwala na wykrycie niezgodności co do prawidłowego składu chemicznego olejku. Ponieważ skład substancji olejkowych wyodrębnionych z tego samego gatunku rośliny podlegać może dość znacznym wahaniom, w profilu chromatograficznym uwzględniono wartości graniczne.

Dane fizykochemiczne i chromatograficzne ważniejszych olejków eterycznych stosowanych w lecznictwie zestawiono w tabeli 3. Przykład: olejek goździkowy – *Caryophylli floris aetheroleum* winien zawierać 75-85% eugenolu, 4-15% acetyloeugenolu i 5-14% kariofilenu.

Tabela 3. Cechy ważniejszych olejków eterycznych (w/g FP VIII)

Olejek eteryczny	Parametry fizyko - chemiczne	Tożsamość pierwsza:B(GC)*, Tożsamość druga:A(TLC)		Profil chromatograficzny GC	Składniki niepożądane
		A ₁	A ₂		
<i>Anisi aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,98 - 0,99$ $n_D^{20} = 1,552 - 1,561$ $T_K = 15 - 19^{\circ}\text{C}$	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 1 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> anetol, aldehyd anyżowy	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 1 Detekcja: odcz.1 <u>Wynik:</u> anetol, aldehyd anyżowy, linalol	<i>trans</i> -anetol 87-94% <i>cis</i> -anetol 0,1-0,4% estragol 0,5-5,0% linalol < 1% α -terpineol < 1,2% 2-metylomaślan pseudo-eugenolu 0,3-2% aldehyd anyżowy 0,1-1,4%	fenchon < 0,01%, fenikulina < 0,01%, oleje tłuste i olejki zżywczałe
<i>Anisi stelati aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,979-0,985$ $n_D^{20} = 1,553 - 1,556$ $T_K = 15 - 19^{\circ}\text{C}$	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 1 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> anetol, aldehyd anyżowy	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 1 Detekcja: odcz.1 <u>Wynik:</u> anetol, aldehyd anyżowy, linalol	<i>trans</i> -anetol 86-93% <i>cis</i> -anetol 0,1-0,5% linalol 0,2-2,5% estragol 0,5- 6% aldehyd anyżowy 0,1-0,5% fenikulina 0,1-3,0%	fenchon < 0,01% 2-metylomaślan pseudoizo-eugenolu < 0,01%
<i>Carvi aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,904 - 0,920$ $n_D^{20} = 1,484 - 1,490$ α_D^{20} od +65° do +81° Liczba kwasowa < 1,0	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 2 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> karwon	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> karwon, karweol	karwon 50-65% limonen 30-45% trans-dihydrokarwon < 2,5%, β -mircen 0,1-1,0% trans-karweol < 2,5%	(-)karwon < 1%
<i>Caryophylli floris aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 1,030 - 1,063$ $n_D^{20} = 1,528 - 1,537$ α_D^{20} od 0° do -2° rozpuszcza się w etanolu w stosunku 1:2	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 3 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> eugenol, acetyloeugenol	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 3 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> eugenol, acetyloeugenol, β -kariofilen	eugenol 75-88% acetyloeugenol 4-15% β -kariofilen 5-14%	
<i>Cinnamomi cassiae aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 1,052 - 1,070$ $n_D^{20} = 1,600 - 1,614$ α_D^{20} od -1° do +1°	Żel krzem. Faza ruchoma: 4 Detekcja: UV ₃₆₅ <u>Wynik:</u> kumaryna (pasmo o fluorescencji niebieskiej)	Żel krzem. Faza ruchoma: 4 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> aldehyd trans-cynamonowy, eugenol	aldehyd trans-cynamonowy 70-90% octan cynamoilu 1-6% aldehyd trans-2-metoksy-cynamonowy 3-15% kumaryna 1,5-4,0%	
<i>Eucalypti aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,906 - 0,927$ $n_D^{20} = 1,458 - 1,470$ α_D^{20} od -13° do -0,5° Liczba nadtlenkowa < 20	Żel krzem. Faza ruchoma: 4 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> cyneol		1,8- cyneol > 70% limonen \leq 12% α pinen \leq 9% β -pinen < 1,5% α -felandren < 1,5% sabinen < 0,3% kamfora < 0,1%	aldehydy (oznaczanie metodą miareczkową)

Olejek eteryczny	Parametry fizyko - chemiczne	Tożsamość pierwsza:B(GC)*, Tożsamość druga:A(TLC)		Profil chromatograficzny GC	Składniki niepożądane
		A ₁	A ₂		
<i>Foeniculi amari fructus aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,961 - 0,975$ $n_D^{20} = 1,528 - 1,539$ α_D^{20} od $+10,0^{\circ}$ do $+24,0^{\circ}$	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 3 <u>Wynik:</u> anetol, fenchon		<i>trans</i> - anetol 55-75% fenchon 12-25% α -pinen limonen 1-10% α -pinen/ limonen 0,9-5% <i>cis</i> -anetol > 1,0 aldehyd $\leq 0,1\%$ anyżowy estragol $\leq 2,0\%$ $\leq 6\%$	
<i>Juniperi aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,857 - 0,876$ $n_D^{20} = 1,471 - 1,483$ α_D^{20} od -15° do $-0,5^{\circ}$ Liczba nadtlenkowa < 20	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> brunatno-fioletowe pasma terpinenu 1-ol i α -terpineolu		α -pinen 20-50% β -pinen 1,0-12% β -mircen 1,0-35% limonen 2-12% terpinen 4-ol β -kariofilen < 7,0% α -felandren < 1,0% octan bornylu < 2%	oleje tłuste i olejki żywiczne
<i>Lavandulae aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,878 - 0,892$ $n_D^{20} = 1,455 - 1,466$ α_D^{20} od $-12,5^{\circ}$ do $-7,0^{\circ}$ Liczba kwasowa $\leq 1,0$	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> octan linalilu, linalol, cyneol		octan linalilu 25-46% linalol terpinen-4-ol 20-45% 0,1-6,0% 3-oktanon 0,1-2,5% limonen < 1,0% cyneol < 2,5% kamfora < 1,2% α -terpineol < 2%	(S)-linalol < 12,0%, octan (S) linalilu < 1%, oleje tłuste
<i>Limonis aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,850 - 0,858$ $n_D^{20} = 1,473 - 1,476$ α_D^{20} od $+57^{\circ}$ do $+70^{\circ}$ Absorbancja: $\lambda_{max} = 315$ nm, Pozostałość po odparowaniu: 1,8-3,6%	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 5 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> bergamotyna, cytral, cytropten, kumaryny (3 pasma)	Żel krzem. Faza ruchoma: 6 Detekcja: odcz. 4 <u>Wynik:</u> limonen	56-78% limonen 7-17% β -pinen 6-12% γ -terpinen neral 0,3-1,5% geranial sabinen 0,5-2,3% octan geranylu 1-3% octan nerylu 0,2-0,9% 0,2-0,9%	oleje tłuste i olejki żywiczne
<i>Matricariae aetheroleum</i>	Intensywnie niebieska lepka ciecz o charakterystycznym zapachu	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: światło dzienne <u>Wynik:</u> chamazulen (niebieskie pasmo)	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> (-) α -bisabolol, enindicykloeter, chamazulen	<u>I-olejek bogaty w tlenki bisabololu:</u> tlenek bisabololu 29-81%, chamazulen $\geq 1,0\%$ <u>II-olejek bogaty w (-)α-bisabolol:</u> (-) α -bisabolol 10-65%, chamazulen $\geq 1,0\%$, suma tlenków bisabololu i (-) α -bisabololu $\geq 2,0\%$	gwajazulen

Olejek eteryczny	Parametry fizyko – chemiczne	Tożsamość pierwsza: B (GC)* Tożsamość druga: A (TLC)		Profil chromatograficzny – GC		Składniki niepożądane
		A ₁	A ₂			
<i>Melaleuca aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,885 - 0,906$ $n_D^{20} = 1,475 - 1,482$ α_D^{20} od $+5^{\circ}$ do $+15^{\circ}$	Żel krzem. Faza ruchoma: 7 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> cyneol, terpinen-4-ol, α -terpineol		γ -terpinen 10-28% terpinen-4-ol $\geq 30\%$ cyneol $\leq 15\%$ α -terpineol 1,5-8,0% p-cymen 0,5-12% terpinolen 1,5-5,0% limonen 0,5-4,0% aromadendren $\leq 7\%$ α -pinen 1,0-6,0%		
<i>Menthae piperitae aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,900 - 0,916$ $n_D^{20} = 1,457 - 1,467$ α_D^{20} od -10° do -30° Liczba kwasowa $< 1,4$	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 2 Detekcja: UV ₂₅₄ <u>Wynik:</u> karwon, pulegon	Żel krzem. F ₂₅₄ Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> mentol, menton, izomenton, mentofuran, cyneol	mentol 30-55% menton 14-32% cyneol 3,5-14% mentofuran 10-90% octan mentylu 2,8-10% limonen 1,0-5,0% pulegon $\leq 4,0\%$ karwon $\leq 1,0\%$	oleje tłuste i olejki zżywczałe	
<i>Pini sylvestris aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,855 - 0,879$ $n_D^{20} = 1,465 - 1,480$ λ_D^{20} od -9° do -30° Liczba kwasowa $< 1,0$ Liczba nadtlenkowa < 20	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> octan bornylu - brunatne pasmo oraz pasma różowe u góry i fioletowe u dołu		α -pinen 32-60% β -pinen 5-22% kar-3-en 6-18% limonen 7-12% β -mircen 1,5-10% β -kariofilen 1-6% octan bornylu 1-4%	nadtlenki, oleje tłuste, olejki zżywczałe	
<i>Rosmarini aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,895 - 0,920$ $n_D^{20} = 1,464 - 1,473$ α_D^{20} od -5° do $+8^{\circ}$	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 4 <u>Wynik:</u> octan bornylu, cyneol, borneol		α -pinen 18-26% 1,8-cyneol 16-25% kamfora 13-21% kamfen 8-12% borneol octan 2-4,5% bornylu 0,5-2,5%	tłuszcze: liczba kwasowa $< 1,0$	
<i>Salviae lavandulifoliae aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,907 - 0,932$ $n_D^{20} = 1,465 - 1,473$ α_D^{20} od $+7^{\circ}$ do $+17^{\circ}$ Liczba kwasowa $< 2,0$	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 3 Wynik: cyneol oraz 3 pasma niebieskie		kamfora 11-36% 1,8 cyneol 10-30% α -pinen 4-11% borneol 1-7%, octan α -terpinylu 0,5-9%, linalol 0,3-4%	tujon $\leq 0,5\%$	
<i>Thymi aetheroleum</i>	$d_{20}^{\circ} = 0,915 - 0,935$ $n_D^{20} = 1,490 - 1,801$	Żel krzem. Faza ruchoma: 2 Detekcja: odcz. 2 <u>Wynik:</u> tymol, karwakrol, linalol, α -terpineol		tymol 36-55% p-cymen 15-28% α -terpinen 5-10% linalol 4-6,5% karwakrol 1-4% tymol + karwakrol $\geq 40\%$		

Objaśnienia do tabeli 3:

- * Badanie tożsamości określone w FPVIII jako tożsamość pierwsza (B) polega na porównaniu położenia pików na chromatogramie (GC) roztworu badanego i roztworu porównawczego otrzymanego w badaniu profilu chromatograficznego. Zgodność czasów retencji pików roztworu badanego z porównawczym świadczy o tożsamości olejku.

Fazy ruchome:

1. octan etylu : toluen (7 : 93 v/v)
2. octan etylu : toluen (5 : 95 v/v)
3. toluen
4. metanol : toluen (10 : 90 v/v)
5. octan etylu : toluen (15 : 85 v/v)
6. n-heksan
7. octan etylu : heptan (20 : 80v/v)

Odczynniki do detekcji:

1. 4-acetylobenzoesan metylu: rozpuścić 0,25 g 4-acetylobenzoesu metylu w mieszaninie 5 ml kwasu siarkowego 96% i 85ml ochłodzonego metanolu
2. roztwór aldehydu anyżowego: zmieszać w następującej kolejności: 0,5 ml aldehydu anyżowego, 10 ml lodowatego kwasu octowego, 85 ml metanolu i 5 ml kwasu siarkowego.
3. kwas fosfomolibdenowy w etanolu: świeżo przygotowany roztwór 200 g/l kwasu fosfomolibdenowego w etanolu 96%.
4. odczynnik wanilinowy: dodać ostrożnie kroplami 2 ml kwasu siarkowego 96% do 100 ml roztworu 10 g/l waniliny w etanolu 96%. Odczynnik zużyć w czasie 48 h.

Uwaga. Po spryskaniu odpowiednim odczynnikiem płytki ogrzewa się 5-10 min w temp. 100-105°C i oglądać w świetle dziennym

POLISACHARYDY ŚLUZOWE

Polisacharydy to związki o dużej cząsteczce, złożone z co najmniej 10 cukrów prostych, połączonych liniowo, lub o łańcuchu rozgałęzionym. W ich skład mogą wchodzić cząsteczki tego samego cukru i wówczas określane są jako homopolisacharydy. Należą tu glukany, fruktany, galaktany i inne. Polisacharydy zawierające cząsteczki różnych cukrów prostych i kwasów uronowych nazywane są heteropolisacharydami.

Śluzy są mieszaninami związków heteropolisacharydowych o właściwościach hydrokoloidów. W roślinach wyższych w skład śluzów wchodzi przeważnie heteropolisacharydy o łańcuchu rozkrzewionym zbudowane z heksoz, pentoz, alkoholi cukrowych i ich eterów (śluzy obojętne) lub też w ich skład oprócz w/w wchodzi także kwasy glukuronowy i galakturonowy, niekiedy reszty siarczanowe lub fosforanowe (śluzy kwaśne). W lecznictwie śluzy są stosowane jako środki powlekające, łagodzące podrażnienia błon śluzowych i zmiękczające (*emollientia*) w stanach zapalnych przewodu pokarmowego i górnych dróg oddechowych oraz zewnętrznie.

Śluzy stanowią dla roślin substancje zapasowe, są magazynowane w specjalnych komórkach idioblastycznych lub zbiornikach, często występują w epidermie nasion. Dużą zawartością śluzów wśród roślin kwiatowych odznacza się rodzina *Malvaceae*. Nagromadzone są także u niektórych przedstawicieli rodzin: *Linaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Tiliaceae*, *Rosaceae* i innych.

Charakterystyczne cechy śluzów to: zdolność pęcznienia, tworzenia żelów, ciągliwość roztworów wodnych. Właściwości te wykorzystywane są w ocenie wartości surowców śluzowych, która może polegać na pomiarze ciągliwości śluzu w wiskozymetrze lub oznaczeniu tzw. indeksu (wskaźnika) pęcznienia.

Wskaźnik pęcznienia jest to objętość, w mililitrach, jaką zajmuje 1 gram substancji roślinnej po spęcznieniu w roztworze wodnym w czasie 4h, łącznie z przylegającym śluzem.

Surowce polisacharydowe

***Plantaginis ovatae semen* – nasienie babki jajowatej**

Surowcem są wysuszone, dojrzałe nasiona *Plantago ovata* Forssk. (*P. ispagula* Roxb.) (*Plantaginaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 9.

***Plantaginis ovatae seminis tegumentum* – łupina nasienna babki jajowatej**

Na surowiec składają się łupiny nasienne z przylegającymi warstwami oddzielone z nasion *Plantago ovata* Forssk. (*Plantaginaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 40.

***Psyllii semen* – nasienie płesznika**

Dojrzałe całe, suche nasiona *Plantago afra* L. (*P. psyllium* L.) lub *Plantago indica* L. (*P. arenaria* Waldstein et Kitaibel) (*Plantaginaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 10.

***Althaeae folium* – liść prawoślazu**

Cały lub pocięty wysuszony liść *Althaea officinalis* L. (*Malvaceae*) zebrany w czasie kwitnienia rośliny. Wskaźnik pęcznienia nie mniejszy niż 12.

***Althaeae radix* – korzeń prawoślazu**

Okorowany lub nie okorowany, cały lub pocięty, wysuszony korzeń *Althaea officinalis* L. (*Malvaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 10.

***Verbasci flos* – kwiat dziewanny**

Wysuszony kwiat, złożony tylko z korony i pręcikowia *Verbascum thapsus* L., *V. densiflorum* Bertol. (*V. thapsiforme* Schrad) i *V. phlomoides* L. (*Scrophulariaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 9.

Oprócz śluzu składnikami czynnymi surowca są: saponiny triterpenowe, irydoidy, flawonoidy i werbaskozyd.

***Malvae sylvestris flos* – kwiat ślazu dzikiego**

Całe lub rozdrobnione, wysuszone kwiaty *Malva sylvestris* L. (*Malvaceae*) lub jej uprawowych odmian o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 15.

***Malvae folium* – liść ślazu**

Cały lub rozdrobniony, wysuszony liść *Malva sylvestris* L., *M. neglecta* Wallr. (*Malvaceae*) lub mieszanina obu gatunków o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 7.

***Lini semen* – nasienie lnu**

Wysuszone, dojrzałe nasiona *Linum usitatissimum* L. (*Linaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 4.

***Trigonellae foenugraeci semen* – nasienie kozieradki**

Wysuszone, dojrzałe nasiona *Trigonella foenum graecum* L. (*Fabaceae*) o wskaźniku pęcznienia nie mniejszym niż 6.

Surowiec zawiera do 30% śluzu (galaktomannany) zlokalizowanego w bielmie, 2-3% saponin steroidowych, głównie furostanolowych bidesmozydów pochodnych diosgeniny

i jamogeniny, 0,37% trygoneliny (pochodna kwasu nikotynowego) oraz flawonoidy i ślady olejku eterycznego.

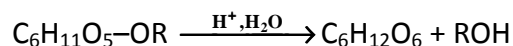
Oznaczanie wskaźnika pęcznienia

W kalibrowanym cylindrze poj. 25 ml, wysokości 125 ± 5 mm, z podziałką co 0,5 ml, ze szklanym korkiem, umieścić 1,0 g substancji roślinnej nie rozdrobnionej lub rozdrobnionej w stopniu podanym w monografii. Jeśli nie podano inaczej, zwilżyć substancję 1,0 ml etanolu 96%, dodać 25 ml wody i zamknąć cylinder. Wstrząsać energicznie co 10 min w czasie 1h i pozostawić na 3h. Po 90 min od rozpoczęcia badania uwolnić większe objętości cieczy z warstwy substancji roślinnej jak również cząstki pływające na powierzchni przez obracanie cylindra wokół pionowej osi. Zmierzyć objętość zajmowaną przez substancję roślinną wraz z przylegającym śluzem. Wykonać trzy badania w tym samym czasie. Za wskaźnik pęcznienia należy uznać wartość średnią z trzech badań.

Uwaga. Przy oznaczaniu *Malvae flos* należy użyć 0,2 g surowca sproszkowanego zwilżonego 0,5 ml bezwodnego etanolu, *Althaeae folium* - 0,2 g surowca sproszkowanego, *Plantaginis ovatae seminis tegumentum* - 0,1 g surowca sproszkowanego; w przypadku *Verbasci flos* surowiec sproszkowany (1,0 g) zwilżyć 2 ml etanolu.

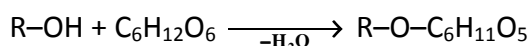
GLIKOZYDY

Glikozydy (heterozydy) w warunkach hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej ulegają rozpadowi na odpowiedni cukier (glikon) oraz składnik niecukrowy – aglikon, zwany również geniną (R).



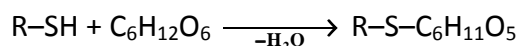
W zależności od budowy chemicznej rozróżnia się następujące typy glikozydów:

1. **O-glikozydy**, w których aglikon połączony jest z resztą cukrową przez atom tlenu.



Ten typ glikozydów jest najbardziej rozpowszechniony w świecie roślinnym.

2. Związki zawierające grupę tiolową (–SH) mogą tworzyć **S-glikozydy** (tioglikozydy).



Ten typ glikozydów reprezentują glukozynolaty.

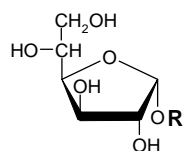
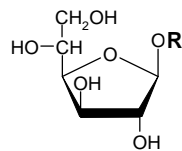
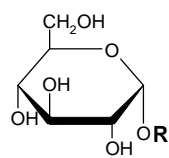
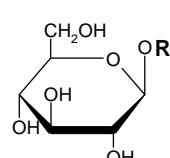
3. Związki o charakterze amin tworzą **N-glikozydy** (N-glikozylowe pochodne). Ten typ glikozydów występuje w nukleozydach, będących składnikami kwasów nukleinowych oraz pewnych enzymów.
4. Jeżeli reakcja zachodzi między „aktywnym cukrem” i ugrupowaniem C–H powstają wówczas **C-glikozydy** (C-glikozylowe pochodne). C-glikozydami są niektóre flawonoidy (witeksyna) oraz antrazwiązki (aloina).

Charakter chemiczny aglikonów jest różny. Mogą to być małowcząsteczkowe związki, np. proste fenole lub alkohole czy też wielkowcząsteczkowe z grupy steroidów lub triterpenów pentacyklicznych (saponiny).

Składnikami cukrowymi glikozydów są cukry proste (pentozy, heksozy) lub cukry złożone (oligosacharydy). Z cukrów prostych najczęściej występują: D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksyloza oraz kwasy uronowe; z cukrów złożonych: rutynoza [6-/α-L-ramnozydo/-D-glukoza], soforoza [2-/β-D-glukozydo/-D-glukoza] i gencjiozoza [6-/β-D-glukozydo/-D-glukoza].

Ilość składników cukrowych w glikozydach jest różna, przeważają monozydy i biozydy, rzadziej występują triozydy i tetrozydy, jedynie w saponinach ilość składników cukrowych bywa znacznie większa. Glikozydy zawierające więcej niż jedną cząsteczkę cukru mogą być **monodesmozydami** (występuje pojedynczy łańcuch cukrowy), **bidesmozydami** (występują dwa niezależne łańcuchy cukrowe), rzadziej **tridesmozydami**.

Glikozydy jako pochodne cyklicznej formy cukrów mogą występować w zależności od budowy przestrzennej cukru w czterech odmianach: jako furanozydy lub piranozydy a w zależności od konfiguracji wiązania glikozydowego jako α - lub β -glikozydy.

 α -D-glukofuranozyd β -D-glukofuranozyd α -D-glukopiranozyd β -D-glukopiranozyd

W świecie roślinnym przeważają β -D-piranozydy. Nomenklatura glikozydów nie jest ujednolicona. Podawane są nazwy zwyczajowe i chemiczne. Nazwa chemiczna określa budowę glikozydu, charakter chemiczny aglikonu, budowę przestrzenną cukru oraz jego lokalizację, np. astragalina = 3- β -D-glukozyd kemferolu, = 3- β -D-glukopiranozyd 4',5,7-trihydroksyflawonolu.

Właściwości fizykochemiczne. Glikozydy są w większości związkami krystalicznymi, rozpuszczalnymi w wodzie i innych polarnych rozpuszczalnikach, są optycznie czynne, przeważnie lewoskrętne. Podobnie jak inne acetale nie dają charakterystycznej reakcji grupy aldehydowej (nie wykazują właściwości redukujących, nie reagują z fenylohydrazyną). Łatwo ulegają hydrolizie pod działaniem kwasów (wyjątek stanowią C-glikozydy) i specyficznych enzymów (glikozydaz), przy czym α -glikozydy są rozszczepiane przez α -glikozydazy (maltaza, amylaza), β -glikozydy przez β -glikozydazy (emulsyna). Hydroliza enzymatyczna pozwala na określenie konfiguracji wiązania glikozydowego.

Występowanie. Glikozydy stanowią dużą i bardzo zróżnicowaną pod względem chemicznym grupę związków naturalnych. Często występują w zespołach o zbliżonej budowie chemicznej, np. pąki kwiatowe perełkowca japońskiego – *Sophora japonica* (*Fabaceae*) zawierają około 30% glikozydów flawonoidowych. Natomiast w liściach naparstnicy purpurowej – *Digitalis purpurea* (*Scrophulariaceae*) obok glikozydów kardenolidowych występują glikozydy o innej budowie: saponinowe i flawonoidowe. Wobec tak dużej różnorodności glikozydów, występujących często w jednym surowcu, muszą być stosowane różne metody ich wyodrębniania, identyfikacji oraz ilościowego oznaczania.

Działanie farmakologiczne. Glikozydy są w większości związkami biologicznie czynnymi. Ich zasadnicze działanie jest związane z aglikonem, natomiast występujące w glikozydach cukry potęgują to działanie tworząc związki dobrze rozpuszczalne w płynach ustrojowych. Przykładem mogą być kardenolidy, których glikozydy wykazują dziesięciokrotnie silniejsze działanie od aglikonów.

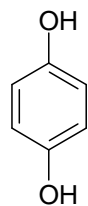
GLIKOZYDY FENOLOWE

Glikozydami fenolowymi nazwano grupę małych cząsteczkowych heterozydów, których aglikonami są jednopierścieniowe fenole, zawierające od 1 do 3 grup hydroksylowych a część cukrową stanowi najczęściej glukoza.

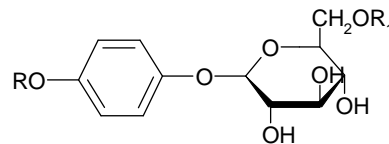
W świecie roślinnym występują również glikozydy polifenolowe o bardziej złożonej strukturze dwu- i trójpierścieniowej, zawierające kilka grup OH: lignany, kumaryny, flawonoidy, antocyjany, antrazwiązki. Z uwagi na swoiste właściwości związki te są omawiane oddzielnie.

Przedstawicielami glikozydów prostych fenoli są: arbutyna (arbutozyd), metyloarbutyna (eter metylowy arbutyny), salicyna (salikozyd) oraz ich acylowe pochodne (pirozyd, populina, fragilina).

Wymienione glikozydy występują w niektórych gatunkach roślin z rodziny *Ericaceae*, *Pirolaceae*, *Salicaceae* i *Rosaceae*.



Hydrochinon



Arbutyna R= -H R₁= -H

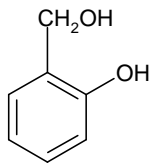
Metyloarbutyna R= -CH₃ R₁= -H

Pirozyd R= -H R₁= -C(O)-CH₃

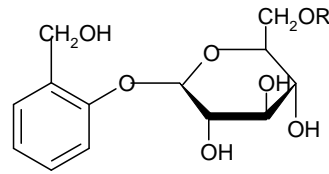
Arbutyna – (β -D-glukopiranozyd hydrochinonu) jest krystaliczną substancją rozpuszczalną w wodzie. Daje szereg reakcji barwnych, charakterystycznych dla fenoli (z roztworem FeCl₃ powstaje niebieskogrnatowe zabarwienie). Jest łatwo przyswajany, biologicznie czynnym glikozydem. Jej aglikon posiada antyseptyczne właściwości. W organizmie ludzkim ulega hydrolizie enzymatycznej do glukozy i hydrochinonu, który z kolei łączy się z kwasem glukuronowym. Utworzony glukuronian hydrochinonu ulega hydrolizie w zasadowym środowisku (pH~8) patologicznego moczu do hydrochinonu, który wydany z moczem odkaża drogi moczowe zaatakowane przez chorobotwórcze drobnoustroje. Podobne działanie wykazuje metylohydrochinon, powstający jako produkt hydrolizy metyloarbutyny.

Arbutyna jest głównym składnikiem surowców leczniczych *Uvae ursi folium* – liść mącznicy i *Vitis idaeae folium* – liść borówki brusznicy. Przetwory uzyskiwane z wymienionych surowców są stosowane pomocniczo (łącznie z antybiotykami) jako *remedia urodesinficientia* (leki odkażające drogi moczowe) w niezżytach i stanach zapalnych dróg

moczowych, wywołanych przez drobnoustroje patogenne (*Staphylococcus albus*, *Proteus sp.*, *Streptococcus faecalis* i inne).



Saligenina



Salicyna R= -H
 Populina R= -C(O)-C₆H₅
 Fragilina R= -C(O)-CH₃

Salicyna – (2-β-D-glukopiranozyd saligeniny). Jeden z najwcześniej poznanych glikozydów fenolowych, wyodrębniony w 1830 r. z kory wierzby wikliny – *Salix purpurea* L. Bezbarwna, krystaliczna substancja, rozpuszczalna w wodzie, łatwo przyswajalna. W organizmie ludzkim ulega hydrolizie do glukozy i saligeniny (alkohol salicylowy), która z kolei utlenia się do kwasu salicylowego. Analogicznie przebiega hydroliza wszystkich glikozydów salicylowych. Kwas salicylowy działa przeciwgorączkowo, przeciwzapalnie, wykazuje swoiste działanie w chorobie reumatycznej. Salicyna i jej pochodne występują w różnych gatunkach rodzajów *Salix* i *Populus* (*Salicaceae*). Jest jednym z głównych składników *Salicis cortex* – kory wierzby stosowanej w chorobie reumatycznej i przewlekłym goścucu (*remedium antipyreticum, antirheumaticum, antiphlogisticum*).

Metodyka badań surowców zawierających glikozydy fenolowe

Ekstrakcja: Glikozydy fenolowe wyodrębnia się z surowca roślinnego stosując ekstrakcję alkoholem, uwodnionym alkoholem lub wodą. Otrzymane wyciągi można oczyścić przez wytrącanie substancji balastowych zasadowym octanem ołowiu lub przez zaadsorbowanie balastów na kolumnie wypełnionej odpowiednim nośnikiem.

Analiza jakościowa: Badanie składu chemicznego frakcji fenologlikozydów oraz ich identyfikację przeprowadza się najczęściej metodami chromatografii cienkowarstwowej. Chromatografię cienkowarstwową prowadzi się na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym, używając faz ruchomych zawierających octan etylu i wodę z dodatkiem kwasu mrówkowego lub octowego.

Chromatogramy wywołuje się takimi odczynnikami jak: 4-aminofenazon z cyjanożelazianem potasowym, zdwuazowany kwas sulfanilowy (reakcję barwną dają związki zawierające wolne grupy fenolowe), kwas fosforomolibdenowy, odczynnik Millona, Gibbisa i inne.

Identyfikację poszczególnych związków przeprowadza się przez porównanie wartości R_f oraz zabarwienia plam z równolegle naniesionymi na chromatogram substancjami wzorcowymi.

Analiza ilościowa: Zawartość glikozydów fenolowych w surowcach oznaczyć można metodami kolorymetrycznymi, m.in. metodą Horaka ze zdwuazowanym kwasem sulfanilowym (glikozydy fenolowe ulegają reakcji sprzęgania, tworząc barwniki azowe), względnie wykorzystuje się reakcję Emmersona z 4-aminofenazonem. FP VIII zamieszcza metodę chromatografii cieczowej zarówno do oznaczania zawartości salicyny w *Salicis cortex* jak też arbutyny w *Uvae ursi folium*.

Surowce arbutynowe

***Uvae ursi folium* – liść mącznicy**

Surowiec stanowią całe lub pocięte wysuszone liście mącznicy lekarskiej. *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Spreng. (*Ericaceae*), które wg FP VIII winny zawierać nie mniej niż 7% arbutyny oznaczonej metodą chromatografii cieczowej.

W surowcu występują: arbutyna (do 12%) oraz niewielkie ilości metyloarbutyny, galoiloarbutyny i wolnego hydrochinonu, który prawdopodobnie powstaje podczas suszenia surowca. Inną frakcją czynną jest zespół flawonoidów, głównie pochodne kwercetyny. Ponadto występują garbniki typu galotanoidów w ilości do 15%, fenolokwasy i triterpeny: kwas ursolowy i uwaol.

***Vitis idaeae folium* – liść brusznicy**

Surowiec stanowią liście borówki brusznicy, *Vaccinium vitis idaea* L. (*Ericaceae*), zawierające nie mniej niż 4% arbutyny.

W surowcu występuje arbutyna w ilości 5-7% oraz małe ilości wolnego hydrochinonu i pirozydu (6'-acetyloarbutyny). We frakcji flawonoidowej przeważają glikozydy kwercetyny. Zawartość garbników może dochodzić do 12%.

Chromatografia cienkowarstwowa *Uvae ursi folium* i *Vitis idaeae folium*

Roztwór badany. Do 0,5 g rozdrobnionego surowca dodać 5 ml mieszaniny wody i metanolu (1:1 v/v) i ogrzewać przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną na wrzącej łaźni wodnej. Wyciąg przesączyć na gorąco przez zwitek waty, przemyć kolbę i sącdek niewielką objętością tej samej mieszaniny rozpuszczalników uzupełniając do 5 ml.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 20 μ l badanego roztworu oraz po 10 μ l roztworów porównawczych (metanolowe

roztwory arbutyny, pirozydu oraz hydrochinonu 0,1%). Płytkę rozwijać fazą octan etylu : woda : bezwodny kwas mrówkowy (88:6:6 v/v/v) na wysokość 15 cm. Po rozwinięciu płytke wysuszyć w suszarce w temp. 105-110°C.

Detekcja A. Po rozwinięciu i wysuszeniu w temp. 105-110°C chromatogram spryskać kolejno roztworami: 4-aminofenazonu, cyjanożelazianu potasowego oraz wodorotlenku potasowego (odcz. 1). Zabarwienie plam oraz wartości współczynnika podziału R_f są następujące: hydrochinon – czerwono-brunatne (R_f ok. 0,90), pirozyd – czerwone (R_f ok. 0,70), arbutyna – czerwone (R_f ok. 0,50).

Detekcja B. Chromatogram można wywołać również zdwuazowanym kwasem sulfanilowym (odcz. 2). Arbutyna i pirozyd barwią się pomarańczowo-czerwono, hydrochinon szarobrunatno.

Detekcja C. Do wywołania chromatogramów używa się także odczynnika z siarczanem ceru w kwasie siarkowym (odcz. 3).

Przygotowanie odczynników:

Odcz. 1: Przygotować wodne roztwory:

- A. 4-aminofenazon 1%,
 - B. cyjanożelazian potasowy 0,5%,
 - C. wodorotlenek potasowy 0,1n.
- Spryskać kolejno odcz. A,B,C.

Odcz. 2: roztwór zdwuazowanego kwasu sulfanilowego 0,1% w Na_2CO_3 10%.

Odcz. 3: Roztwór siarczanu ceru 1% w kwasie siarkowym 10%.

Oznaczanie zawartości arbutyny w *Uvae ursi folium* (wg FP VIII)

Chromatografia cieczowa

Roztwór badany. W kolbie ze szlifem poj. 100 ml umieścić 0,800 g sproszkowanej substancji roślinnej. Dodać 20 ml wody i ogrzewać 30 min. pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej. Pozostawić do ochłodzenia i przesączyć płyn przez zwitek waty. Dodać ten zwitek waty do pozostałości w kolbie poj. 100 ml i ekstrahować 20 ml wody 30 min. pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej. Pozostawić do ochłodzenia i przesączyć przez sączonek bibułowy. Połączyć przesącze i uzupełnić wodą do 50 ml. Przesączyć płyn przez sączonek bibułowy. Odrzucić pierwsze 10 ml przesącza.

Roztwory porównawcze.

a. Rozpuścić 50,0 mg arbutyny CSP w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml.

- b.** Rozpuścić 2,5 mg hydrochinonu w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 10,0 ml. Do 5,0 ml tego roztworu dodać 2,5 ml roztworu porównawczego (a) i uzupełnić fazą ruchomą do 10,0 ml.

Chromatografia. Chromatografię przeprowadzamy na kolumnie o wymiarach 250x4 mm wypełnionej żelalem krzemionkowym z grupami oktadecylosililowymi deaktywowanym dla zasad (5 µm). Elucję prowadzić fazą metanol : woda (10:90 v/v). Szybkość przepływu 1,2 ml/min. Detekcja za pomocą spektrofotometru przy długości fali 280 nm. Objętość nastrzyku 20 µl.

Przydatność układu. Rozdzielczość pomiędzy pikami arbutyny i hydrochinonu nie mniejsza niż 4,0 na chromatogramie roztworu porównawczego (b).

Obliczyć procentową zawartość arbutyny wg poniższego wzoru:

$$\frac{F_1 \times x \times m_2 \times p}{F_2 \times x \times m_1}$$

F_1 – powierzchnia pików arbutyny na chromatogramie roztworu badanego;

F_2 – powierzchnia pików arbutyny na chromatogramie roztworu porównawczego;

m_1 – masa badanej substancji roślinnej użyta do przygotowania roztworu badanego, w gramach;

m_2 – masa arbutyny CSP użyta do przygotowania roztworu porównawczego, w gramach;

p – procentowa zawartość arbutyny w arbutynie CSP.

Surowce zawierające pochodne salicyny

***Salicis cortex* – kora wierzby**

Surowcem jest cała lub rozdrobniona wysuszona kora młodych gałęzi różnych gatunków wierzby – *Salix sp.*, głównie *Salix purpurea* L., *Salix daphnoides* Willd., *Salix fragilis* L. (*Salicaceae*). Korę zbiera się ze stanowisk naturalnych wczesną wiosną, suszy w temperaturze otoczenia. Kora wierzby winna zawierać nie mniej niż 1,5% pochodnych salicylowych w przeliczeniu na salicynę.

Surowiec zawiera zespół heterozydów fenolowych (około 10%), którego dominującymi składnikami są salicyna oraz jej acylowe pochodne: salikortyna, salirepozyd, populina, fragilina i inne. Poza tym występują flawonoidy oraz garbniki katechinowe i elagotaniny.

Filipendulae ulmariae herba – ziele wiązówki

Na surowiec składają się całe lub pocięte wysuszone kwitnące szczyty pędów *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (*Spirea ulmaria* L.), (*Rosaceae*). Winien on zawierać nie mniej niż 1 ml/kg substancji lotnych z parą wodną.

Surowiec zawiera lotne z parą wodną salicylany: salicylan metylu i aldehyd salicylowy (ok. 0,2%) oraz ich glikozydy z ksylozą i glukozą w części cukrowej: monotropitozyd i spireinę. Ponadto flawonoidy pochodne kwercetyny, głównie spireozyd oraz garbniki.

Chromatografia cienkowarstwowa *Salicis cortex***Procedura A**

Roztwór badany. Do 1,0 g sproszkowanego surowca dodać 10 ml metanolu i ogrzewać 10 minut na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Wyciąg przesączyć przez zwitek waty, ochłodzić. Do 5 ml wyciągu dodać 1,0 ml roztworu bezwodnego węgla sodowego 50 g/l i ogrzewać 10 minut na łaźni wodnej. Ochłodzić i przesączyć przez karbowany sącdek z bibuły. Przesącz zagęścić do połowy objętości.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 0,04-0,05 ml badanego roztworu oraz 0,04 ml roztworu wzorcowego salicyny (2mg salicyny w 5 ml metanolu). Płytkę rozwijać fazą octan etylu : kwas octowy lodowaty : woda (23:2:1) na wysokość 18 cm.

Detekcja. Po wysuszeniu spryskać chromatogram metanolem roztworem kwasu fosforomolibdenowego 5% i ogrzać w suszarce w temperaturze 105° w ciągu 5 minut. Salicyna pojawia się w postaci fioletowo-niebieskiej plamy (Rf ok. 0,50) na żółtym tle.

Procedura B

Roztwór badany. Do 1,0 g surowca sproszkowanego dodać 10 ml metanolu, ogrzewać 10 min. na łaźni wodnej w temp. 50°C, ochłodzić, przesączyć. Do 5 ml wyciągu dodać 1,0 ml roztworu bezwodnego węgla sodowego 50 g/l i ogrzewać 10 min. na łaźni wodnej w temp. ok. 60°C, ochłodzić i przesączyć (jeśli trzeba).

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 10 µl badanego roztworu oraz 2 µl ml roztworu porównawczego (2mg salicyny i 2 mg kwasu chlorogenowego w 1,0 ml metanolu). Płytkę rozwijać fazą woda : metanol : octan etylu (8:15:7) na wysokość 18 cm. Po rozwinięciu płytkę wysuszyć ciepłym powietrzem.

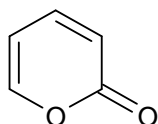
Detekcja. Do spryskania płytki użyć metanolu z kwasem siarkowym (95 : 5 v/v) a następnie ogrzewać 5 min. w temp. 100-105°C. Salicyna tworzy pasmo czerwono-fioletowe o Rf ok. 0,4.

KUMARYNY

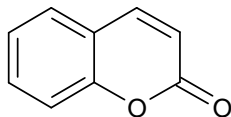
Kumaryny, licznie reprezentowane w świecie roślinnym, są laktonami aromatycznymi, pochodnymi benzo- α -pironu. Kumaryna, główny przedstawiciel tej grupy związków, jest laktonem kwasu *cis* o-hydroksycynamonowego (kwasu kumarynowego).

Kumaryna jest bezbarwną, krystaliczną substancją (t.t. 68-70°C) o charakterystycznym zapachu świeżego siana. W roślinach występuje w postaci bezwonnej β -D-glukozydu kwasu kumarynowego. Podczas suszenia surowców zachodzi enzymatyczna hydroliza glukozydu, a powstały kwas kumarynowy ulega samorzutnej wewnątrzcząsteczkowej kondensacji do benzo- α -pironu. Procesowi temu towarzyszy pojawienie się charakterystycznego zapachu. Kumaryna występuje w znaczniejszych ilościach w ziele nostrzyka – *Melilotus officinalis* i *M. altissimus* (*Fabaceae*), ziele marzanki wonnej – *Asperula odorata* (*Rubiaceae*), w ziele żubrówki – *Hierochloë odorata* (*Poaceae*).

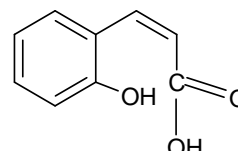
W roślinach występują również hydroksylowe, metoksyłowe, alkilowe i alkenylowe pochodne kumaryny lub ich glikozydy. Do często spotykanych należą: umbeliferon (7-hydroksykumaryna), herniaryna (7-metoksykumaryna), eskuletyna (6,7-dihydroksykumaryna), eskulina (6-glukozyd eskuletyny), skopoletyna (6-metoksy-7-hydroksykumaryna), skopolina (7-glukozyd skopoletyny).



α -piron



kumaryna
benzo- α -piron



kwas kumarynowy
cis-o-hydroksycynamonowy

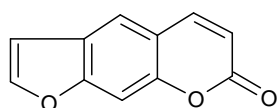
Występowanie. Proste pochodne kumaryny są bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym. Ich obecność stwierdzono w ponad 150 gatunkach roślin należących do 50 rodzin botanicznych, głównie: *Asteraceae*, *Poaceae*, *Hippocastanaceae*, *Fabaceae*, *Oleaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae*, *Apiaceae* i innych. Występują we wszystkich organach roślin, w niewielkich ilościach i często w zmiennym składzie.

Działanie farmakologiczne. Są związkami biologicznie czynnymi o słabym ale dość szerokim zakresie działania. Kumaryna działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, hamuje syntezę protrombiny w wątrobie, jest toksyczna, powoduje uszkodzenie mięszu wątroby i nerek. Hydroksylowe oraz metoksyłowe pochodne kumaryny posiadają działanie

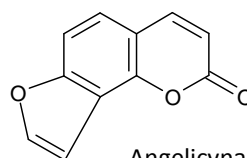
spazmolityczne, hipotensyjne, antykoagulacyjne. Niektóre z nich (eskulina, eskuletyna) są wykorzystywane do produkcji leków przeciwzylakowych.

W świecie roślinnym oprócz prostych kumaryn występują furanokumaryny i piranokumaryny.

Furanokumaryny są związkami trójpierścieniowymi, w których układ benzo- α -pironu jest skondensowany z pierścieniem furanu w pozycji 6,7 (typ psoralenu) lub 7,8 (typ angelicyny).



Psoralen



Angelicyna

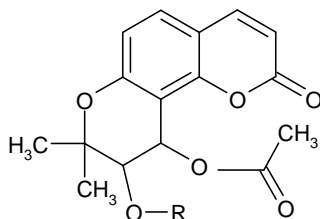
W roślinach spotyka się hydroksylowe, metoksyłowe oraz alkilowe pochodne psoralenu i angelicyny. Głównymi przedstawicielami pochodnych psoralenu są: bergaptol (5-hydroksypsoralen), bergapten (5-metoksypsoralen), ksantotoksyna (8-metoksypsoralen), występujące głównie w roślinach rodziny *Apiaceae* i *Rutaceae*. Szczególnie bogate w pochodne psoralenu są owoce aminka większego – *Ammi majus* i *Pastinaca sativa* (*Apiaceae*). Są to związki biologicznie czynne, posiadają właściwości fotosensybilizujące, pobudzają melanogenezę, wywołują repigmentację skóry. Niektóre z nich (ksantotoksyna, bergapten) stosuje się w leczeniu bielactwa (*vitiligo*) oraz w innych leukodermatozach.

Głównymi przedstawicielami pochodnych angelicyny są: izobergapten (5-metoksyangelicyna), sfondyna (6-metoksyangelicyna), pimpinelina (5,6-dimetoksyangelicyna).

Występują w roślinach rodziny *Apiaceae* i *Rutaceae*. Wykazują właściwości spazmolityczne.

Piranokumaryny posiadają szkielet trójpierścieniowy, w którym układ benzo- α -pironu jest skondensowany z pierścieniem piranu w pozycjach 5,6 (układ alloksantyletyny), 6,7 (układ ksantyletyny) lub 7,8 (układ seseliny).

Pochodne dihydrosešeliny (wisnadyna, samidyna, dihydroamidyna) występują w owocach aminka egipskiego – *Ammi visnaga* (*Apiaceae*). Wymienione związki są estrami wisnaganu, różnią się resztami acylowymi. Posiadają dość silne działanie spazmolityczne.



Wisnagan R= -H

Samidyna R= -C(O)-CH=C(CH₃)-CH₃

Dihydrosamidyna R= -C(O)-CH₂-CH(CH₃)-CH₃

Wisnadyna R= -C(O)-CH(CH₃)-CH₂-CH₃

Metodyka badań surowców kumarynowych

W świecie roślinnym kumaryny występują w postaci wolnej (aglikony), rzadziej związane glikozydowo. W czasie suszenia surowca niektóre glikozydy kumarynowe ulegają hydrolizie enzymatycznej.

Ekstrakcja. Wolne kumaryny wyodrębnia się z surowca stosując ekstrakcję eterem naftowym, eterem etylowym, chloroformem, cykloheksanem, rzadziej metanolem. Glikozydy ekstrahuje się alkoholem lub uwodnionym alkoholem. Liczne spośród wolnych kumaryn łatwo sublimują i są lotne z parą wodną. Zastosowanie frakcyjnej sublimacji lub destylacji z parą wodną umożliwia również ich wyodrębnienie z surowca.

Oczyszczanie wyciągów można prowadzić wykorzystując laktonowy charakter kumaryn, zmianę polarności w zależności od pH środowiska. W środowisku alkalicznym następuje otwarcie pierścienia laktonowego z równoczesnym utworzeniem soli odpowiednich pochodnych kwasu kumarynowego, dobrze rozpuszczalnych w wodzie. Można wówczas wyekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi znaczną część balastów. Po zakwaszeniu, pochodne kwasu kumarynowego ulegają wewnątrzcząsteczkowej kondensacji do układu benzo- α -pironu i mogą w tej postaci być wyekstrahowane rozpuszczalnikami organicznymi.

Do celów analitycznych ekstrakcję surowca prowadzi się najczęściej chloroformem lub eterem etylowym (furanokumaryny eterem naftowym) a rozdział i identyfikację kumaryn prowadzi się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

Analiza jakościowa. Detekcję większości związków kumarynowych ułatwia ich charakterystyczna fluorescencja w świetle UV: niebieska, zielona, żółta, przy czym kumaryna nie posiada właściwości fluoryzowania. Pod działaniem alkaliów, gazowego amoniaku lub wodorotlenku potasowego, na skutek otwarcia pierścienia laktonowego i utworzenia soli

kwasu kumarynowego pojawia się żółtozielona fluorescencja kumaryny oraz nasila się lub zmienia naturalna fluorescencja pochodnych kumaryny.

Analiza ilościowa. Oznaczanie ilościowe kumaryn w surowcu roślinnym można przeprowadzić różnymi metodami. Najczęściej stosowano metody fluorymetryczne spektrofotometryczne i densytometryczne. Identyfikację i oznaczenie ilościowe kumaryn umożliwiają obecnie chromatografia gazowa i chromatografia cieczowa (patrz FPVIII – monografia *Meliloti herba*)

Surowce kumarynowe

***Meliloti herba* – ziele nostrzyka**

Surowcem jest całe lub pocięte, wysuszone ziele nostrzyka żółtego *Melilotus officinalis* (L.) Desr. (*Fabaceae*) zawierające nie mniej niż 0,3% kumaryny.

Zawiera związki kumarynowe: kumarynę (ok. 0,9%), melilotynę (3,4-dihydrokumaryna), kwas kumarowy (trans orto-hydroksycynamonowy), kwas melilotowy (dihydrokumarynowy), dikumarol. W świeżej roślinie występuje glikozyd melilotozyd (glukozyd kwasu kumarowego czyli *trans* orto-hydroksycynamonowego), który izomeryzuje w wakuolach komórek do formy Z (glukozyd kwasu kumarynowego czyli *cis* orto-hydroksycynamonowego). Podczas suszenia surowca ulega on enzymatycznemu rozpadowi pod wpływem β -glukozydazy do kwasu kumarynowego a następnie spontanicznej laktonizacji do kumaryny. Oprócz kumaryn w surowcu występują: alantoina, flawonoidy, garbniki, związki azotowe.

***Asperulae herba* – ziele marzanki**

Surowcem jest ziele marzanki wonnej, *Asperula odorata* L. (*Rubiaceae*), zebrane w okresie kwitnienia i wysuszone.

Ziele marzanki zawiera kumarynę (0,4-0,8%), garbniki, irydoidy (asperulozyd) i flawonoidy.

Znaczne ilości kumaryn zawierają także surowce alkaloidowe z rodziny *Solanaceae*: ***Belladonnae folium*, *Belladonnae radix*, *Stramonii folium***. Występują w nich hydroksylowe i metoksyłowe pochodne kumaryn (np. korzeń pokrzyku zawiera skopoletynę i skopolinę, liść pokrzyku – dodatkowo umbeliferon).

Chromatografia cienkowarstwowa surowców kumarynowych

Roztwór badany A. 0,2 sproszkowanego surowca ogrzać ostrożnie do wrzenia z 2 ml chloroformu, następnie wytrząsać przez 5 minut. Wyciąg przesączyć przez mały sącdek z bibuły.

Roztwór badany B. Do 0,3 g surowca sproszkowanego dodać 3ml metanolu, ogrzewać 1 min na łaźni wodnej, przesączyć.

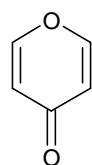
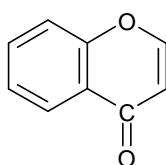
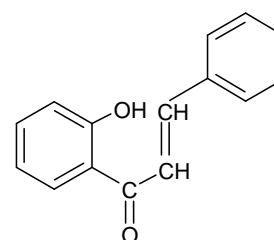
Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 pokrytą żelem krzemionkowym nanieść 30 i 50 μ l wyciągu z surowca oraz 20 μ l roztworu porównawczego (metanolewy roztwór kumaryny 0,1% lub metanolow roztwór skopoletyny 0,01%). Płytkę z wyciągiem z ziela nostrzyka rozwijać fazą rozcieńczony kwas octowy (12%) : eter etylowy : toluen (10:50:50 v/v/v) – warstwa górna lub chloroform : metanol (50:1 v/v). Płytkę z wyciągiem z liścia lub korzenia pokrzyku rozwijać fazą ruchomą chloroform : kwas octowy lodowaty : woda (4:1:1 v/v/v) – warstwa organiczna.

Detekcja. Po wysuszeniu chromatogramy obejrzyć w świetle UV, następnie chromatogram wyciągu z nostrzyka i marzanki spryskać wodnym roztworem wodorotlenku potasowego 5%. Chromatogram wyciągu z pokrzyku spryskać metanolewym roztworem wodorotlenku potasowego 1%. Wywołane chromatogramy powtórnie analizować w świetle UV. Zaznaczyć położenie fluoryzujących plam. Plama kumaryny (R_f ok 0,95) niewidoczna w świetle UV, po spryskaniu ługiem fluoryzuje intensywnie żółtozielono. Niebiesko fluoryzująca plama skopoletyny (R_f 0,60-0,65) po spryskaniu ługiem zmienia fluorescencję na seledynową.

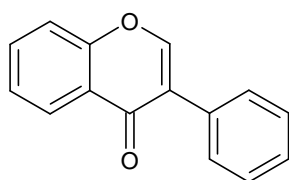
FLAWONOIDY

Flawonoidy, nazywane również bioflawonoidami, stanowią dużą grupę związków naturalnych o charakterze polifenoli, powiązanych ze sobą biogenetycznie i chemicznie.

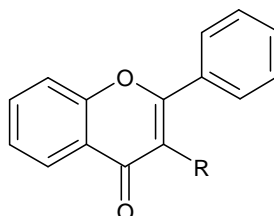
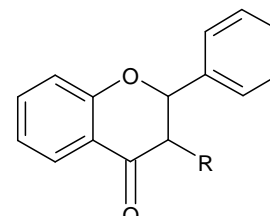
W grupie tej wyróżnia się flawony będące pochodnymi 2-fenylo-chromonu (benzo- γ -pironu) i izoflawony – pochodne 3-fenylo-chromonu. Do grupy tej często zaliczane są też katechiny i leukoantocyjanidyny będące pochodnymi flawanu oraz antocyjany o charakterze soli flawyliowych (antocyjany ze względu na odrębną specyfikę badań omówione są w osobnym rozdziale). Do flawonoidów należą również chalkony, które są biogenetycznymi prekursorami tej grupy związków.

 γ -PironChromon
Benzo- γ -piron

2'-Hydroksychalkon



Izoflawon

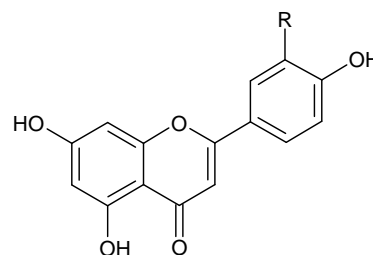
Flawon R= -H
Flawonol R= -OHFlawanon R= -H
Flawanonol R= -OH

Flawonoidy różnią się między sobą stopniem utlenienia pierścienia γ -pironu, położeniem reszty fenyłowej (pozycja 2 lub 3) w układzie chromonu (benzo- γ -pironu), charakterem, liczbą i miejscem położenia grup funkcyjnych (najczęściej hydroksylowych, rzadziej metoksyłowych) w obu pierścieniach aromatycznych. Liczba grup hydroksylowych waha się od 2 do 5. Grupy hydroksylowe występują najczęściej w pozycjach 3,5,7,3',4', metoksyłowe 6,7,8,3' podstawowych układów.

Głównymi przedstawicielami tej grupy są:

a) z **flawonów**:

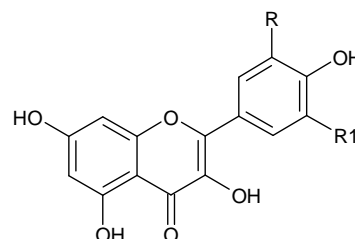
- apigenina (4',5,7-trihydroksyflawon)
- luteolina (3',4',5,7-tetrahydroksyflawon)



Apigenina R= -H
Luteolina R= -OH

b) z **flawonoli**:

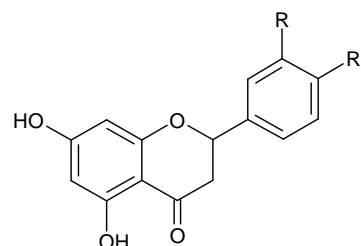
- kemferol (4',5,7-trihydroksyflawonol)
- kwercetyna (3',4',5,7-tetrahydroksyflawonol)
- izoramnetyna (4',5,7-trihydroksy-3'-metoksyflawonol)
- mirycetyna (3',4',5',5,7-pentahydroksyflawonol)



Kemferol R=R₁= -H
Kwercetyna R= -OH R₁= -H
Izoramnetyna R= -OCH₃ R₁= -H
Mirycetyna R=R₁= -OH

c) z **flawanonów**:

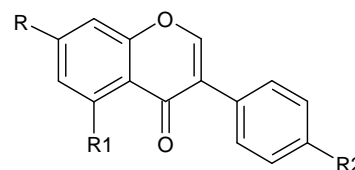
- naryngenina (4',5,7-trihydroksyflawanon)
- hesperetyna (3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon)



Naryngenina R= -H R₁= -OH
Hesperetyna R= -OH R₁= -OCH₃

d) z **izoflawonów**:

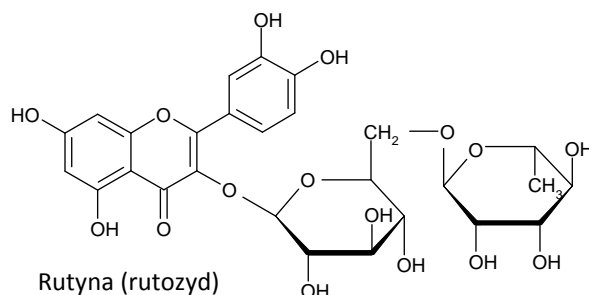
- genisteina (4',5,7-trihydroksyizoflawon)
- formononetyna (7-hydroksy -4'- metoksyizoflawon)



Genisteina R=R₁=R₂= -OH
Formononetyna R= -OH R₁= -H R₂= -OCH₃

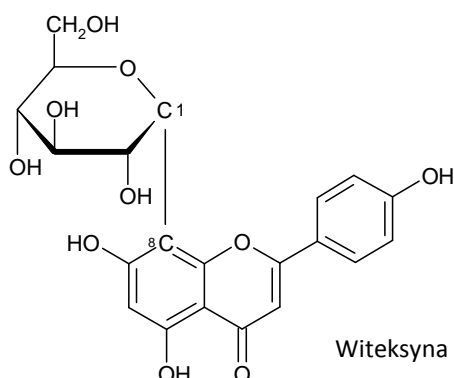
Bioflawony występują w roślinach głównie w postaci heterozydów, mono-, bi- lub triozydów. Aglikony są połączone z cukrami najczęściej wiązaniem O-glikozydowym, rzadziej C-glikozydowym. Składnikami cukrowymi są: D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, rzadziej L-arabinoza i kwas D-glukuronowy, z disacharydów występuje najczęściej rutynoza i soforoza.

Przedstawicielem O-glikozydów jest rutyna (3-rutynozyd kwercetyny), jeden z najbardziej rozpowszechnionych w świecie roślinnym heterozydów flawonolowych.

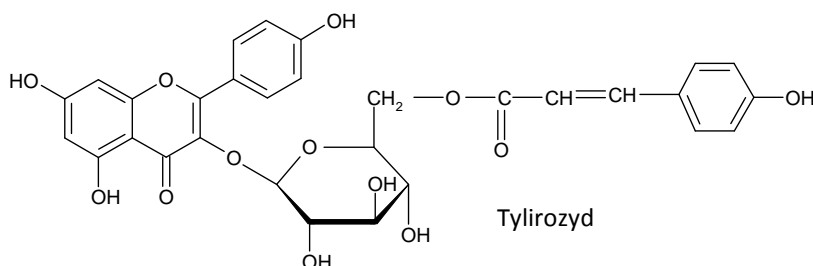


Otrzymywana jest w skali przemysłowej z pąków kwiatowych perełkowca japońskiego *Sophora japonica* (*Fabaceae*). Stosowana w lecznictwie głównie jako środek o właściwościach witaminy P (uszczelniający kapilary) i antyoksydacyjnych w postaci preparatów fabrycznych.

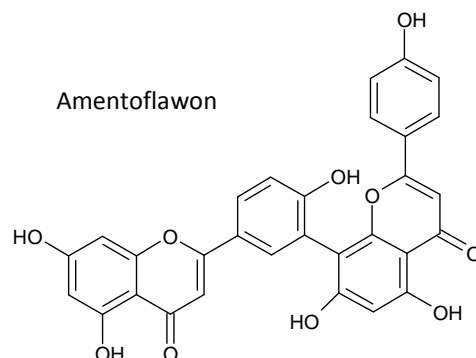
Przedstawicielem C-glikozydów jest witeksyna (8-C- β -D-glukopirnozyloapigenina).



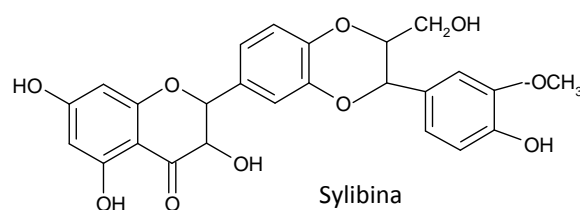
W C-glikozydach reszty cukrowe znajdują się w położeniu C-6 lub C-8 aglikonów. Wiązanie C-C (glukozytowe) jest bardzo trwałe, odporne na działanie kwasów i enzymów. Ciekawą grupę stanowią acylowe pochodne heterozydów flawonoidowych (glikozydoestry), w których grupa hydroksylowa aglikonu lub reszty cukrowej (glikonu) zestryfikowana jest kwasem alifatycznym (najczęściej octowym) lub fenolokwasami (galusowy, p-kumarowy, ferulowy i kawowy). Przedstawicielem tej grupy związków jest tylirozyd [3- β -D (6''-p-kumaroilo)-glukozyd kemferolu], występujący m. in. w roślinach rodzaju *Tilia*.



U Nagozalążkowych (*Gymnospermae*) spotykane są połączenia dimeryczne flawonów. Należą do nich amentoflawon, bilobetyna i ginkgetyna występujące w liściach miłorzębu japońskiego – *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*).



Do grupy flawonoidów zaliczane są też związki o bardziej złożonej strukturze, np. flawonolignany, których przedstawicielem jest sylibina, jeden z podstawowych składników ostropestu plamistego – *Silybum marianum* (*Asteraceae*) o działaniu antyhepatotoksycznym.



Bioflawony są zazwyczaj zaliczane do barwników naturalnych, mają żółtą lub pomarańczową barwę, chociaż niektóre z nich np. pochodne flawanonu są bezbarwne.

Występowanie. Są bardzo rozpowszechnione w świecie roślin, głównie w roślinach wyższych. Bogate w flawonoidy są rośliny należące do następujących rodzin botanicznych: *Betulaceae*, *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Ericaceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae*, *Polygonaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Scrophulariaceae*.

Działanie farmakologiczne. Flawonoidy stanowią grupę związków biologicznie czynnych o słabym ale wielokierunkowym działaniu farmakologicznym. Posiadają właściwości spazmolityczne, hipotensyjne, kardi toniczne, choleretyczne, moczopędne, estrogenne (to ostatnie działanie obserwowane jest w przypadku izoflawonów). Niektóre z tych aktywności mogą wynikać z antyoksydacyjnych właściwości flawonoidów, w wielu przypadkach udowodnionych eksperymentalnie.

W lecznictwie wykorzystywane są surowce roślinne bogate we flawonoidy, preparaty galenowe oraz różnego rodzaju specyfiki. Z izolowanych flawonoidów stosowane są w lecznictwie: rutyna, diosmina, hesperydyna, naryngenina.

Surowce lecznicze: *Sambuci flos*, *Crataegi folium cum flore*, *Tiliae flos.*, *Betulae folium*, *Equiseti herba*, *Hyperici herba*, *Polygoni avicularis herba*, *Matricariae flos*, *Ginkgonis folium*, *Orthosiphonis folium*, *Passiflorae herba*, *Solidaginis herba*, *Violae tricoloris herba*, *Fagopyri herba*, *Carthami flos*, *Calendulae flos*, *Leonuri cardiaca herba*, *Sylibi mariani fructus*.

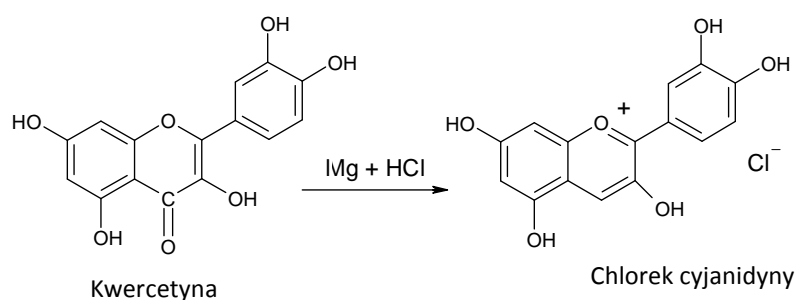
Metodyka analizy surowców flawonoidowych

Ekstrakcja. Heterozydy flawonoidowe na ogół rozpuszczają się dobrze w wodzie i niższych alkoholach, trudniej w słabo polarnych rozpuszczalnikach, nie rozpuszczają się w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych.

Aglikony z reguły nie rozpuszczają się w wodzie, słabo w niższych alkoholach, dobrze w eterze etylowym i octanie etylu.

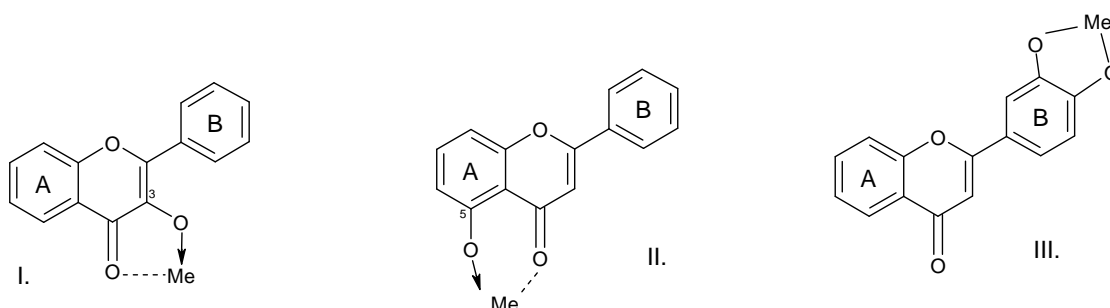
W celu usunięcia balastów surowiec można wstępnie ekstrahować eterem naftowym, następnie chloroformem (usuwanie lipidów, chlorofilu, wolnych kumaryn), w końcu właściwym rozpuszczalnikiem – przeważnie metanolem. Można też najpierw przeprowadzić ekstrakcję surowca metanolem, a po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozpuścić w wodzie i ekstrahować aglikony z roztworu wodnego eterem etylowym, a heterozydy flawonoidowe octaniem etylu (ewentualnie z dodatkiem metanolu).

Analiza jakościowa. Obecność flawonoidów w uzyskanych wyciągach można stwierdzić reakcjami barwnymi. Wśród stosowanych reakcji wyróżnia się typowe dla układu chromonu oraz charakterystyczne dla grup fenolowych. Na szczególną uwagę zasługuje reakcja redukcji wodorem w środowisku kwaśnym ($Mg + HCl$), zwana reakcją Shinody. W wyniku redukcji układu fenylochromonu do soli flawyliowych powstaje w zależności od stopnia utlenienia heterocyklicznego pierścienia – charakterystyczne zabarwienie od żółtopomarańczowego (flawony) poprzez malinowe (flawonole) do purpurowego (flawanony).



Intensywność zabarwienia jest uzależniona od stężenia substancji jak również od ilości i położenia grup hydroksylowych w układzie chromonu. Zamiast metalicznego magnezu można stosować sproszkowany cynk. W tych warunkach redukcji flawonole dają bardziej intensywne czerwone zabarwienie od flawanonów.

Duże znaczenie mają reakcje z solami metali trójwartościowych (Al^{3+} , Sr^{3+} , Sb^{3+} , Fe^{3+}) polegające na tworzeniu się barwnych, pięcio- lub sześciocząłonowych kompleksów chelatowych, jakie powstają między grupą karbonylową i grupami hydroksylowymi w pozycjach C-3 i C-5 układu chromonu, względnie ugrupowaniem ortodihydroksylowym w pierścieniu B. W zależności od rozmieszczenia grup hydroksylowych w podstawowym układzie powstają kompleksy I-III o różnej trwałości.



I tak związki flawonoidowe zawierające wolne grupy OH w pozycjach C-3 i C-5 dają żółto zabarwione kompleksy chelatowe z jonami glinu, solami ołowiu jak również z tlenochlorkiem cyrkonu, przy czym sześciocząłonowy chelat jest nietrwały i po dodaniu kwasu cytrynowego zanika żółte zabarwienie, natomiast pięciocząłonowy chelat jest trwały w roztworze. Tworzenie się barwnych chelatów z jonami glinu jest wykorzystywane do oznaczania zawartości flawonoidów w wielu surowcach roślinnych.

Dla flawonoli i flawonów zawierających grupę OH w pozycji C-5 układu chromonu charakterystyczna jest także reakcja z kwasem borowym w obecności kwasu szczawiowego, polegająca na tworzeniu się żółto zabarwionych sześciocząłonowych chelatów, wykazujących charakterystyczną zielonożółtą fluorescencję. Reakcja ta jest wykorzystywana do oznaczania zawartości sumy flawonoidów w surowcach: *Crataegi folium cum flore*, *Passiflorae herba*, *Violae herba cum flore*, które zawierają C-glikozydy flawonowe. Nie dają jej flawanonoliny (brak podwójnego wiązania w pierścieniu heterocyklicznym).

W analizie flawonoidów znalazły zastosowanie wszystkie rodzaje chromatografii. W chromatografii cienkowarstwowej, najczęściej stosowanej, do rozwijania chromatogramów używa się mieszanin rozpuszczalników, dobieranych w zależności od rodzaju badanych związków (aglikony, monozydy, diglikozydy).

Wykrywanie flawonoidów na rozwiniętych chromatogramach ułatwia ich charakterystyczna fluorescencja w świetle UV. Flawonole są widoczne w postaci plam/pasm o żółtej fluorescencji, 3-glikozydy flawonolowe, flawony, ich glikozydy oraz chalkony fluoryzują brunatno, flawanony niebiesko. Pod działaniem par amoniaku lub po spryskaniu chromatogramów rozcieńczonymi roztworami zasad, naturalna żółta fluorescencja plam pogłębia się, brunatna pozostaje bez zmian lub zmienia się na żółtą, pomarańczową lub jasnoniebieską, w zależności od struktury chemicznej związku.

Często do wywoływania chromatogramów stosuje się roztwory soli metali (najczęściej trójwartościowych), tworzące z flawonoidami barwne kompleksy chelatowe. Spośród stosowanych odczynników największe znaczenie diagnostyczne ma 1% metanolowy roztwór chlorku glinowego. Powstają połączenia o barwie żółtej w świetle dziennym, natomiast w świetle UV obserwuje się brunatną, żółtą, żółtozieloną lub żółtopomarańczową fluorescencję flawonów i flawonoli, niebiesko-żółtą flawanonów, pomarańczowo-brunatną chalkonów.

Analiza ilościowa. Najczęściej stosowaną metodą oznaczania zawartości flawonoidów w materiale roślinnym jest metoda Crista-Müllera, w której wykorzystuje się właściwość tworzenia przez flawonoidy trwałych chelatów z jonami glinu. Badany surowiec poddaje się najpierw ogrzewaniu z mieszaniną acetonu i kwasu solnego w obecności metenaminy lub formaldehydu w celu przeprowadzenia hydrolizy glikozydów. Metenamina zapobiega oksydacji występujących w niektórych surowcach leuko- lub procyjanidyn do antocjanidyn, których barwa wpływa na wynik reakcji. Aglikony ekstrahowane są z hydrolizatu octanem etylu a tworzenie chelatów następuje po dodaniu roztworu chlorku glinu w metanolu i kwasie octowym. Absorpcję roztworu o żółtym zabarwieniu mierzy się przy 425 nm. Metoda nadaje się przede wszystkim do oznaczania flawonoli, które tworzą pięcioczłonowe chelaty o intensywnej barwie, natomiast w przypadku flawonów tworzą się kompleksy o znacznie słabszym zabarwieniu.

Surowce flawonoidowe

***Sambuci flos* – kwiat bzu czarnego**

Surowcem są wysuszone kwiaty bzu czarnego, *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*), zebrane w początkowym okresie kwitnienia.

W surowcu występują głównie flawonoidy: 3-ramnoglukozyd kwercetyny (rutozyd), 3-glikozyd kwercetyny (izokwercytryna) i 3-glikozyd kemferolu (astragalina). Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na izokwercytryzyd winna wynosić co najmniej 0,80%. Ponadto

w mniejszej ilości występują: garbniki, fenolokwasy oraz produkty rozpadu glukozydu cyjanogenego – sambunigriny.

***Crataegi folium cum flore* – kwiatostan głogu**

Syn.: *Flos Crataegi*, *Flos cum Folio Crataegi*

Surowcem są kwiatostany wraz z towarzyszącymi 2-3 liśćmi głogu jednoszyjkowego – *Crataegus monogyna* Jacq. oraz dwuszyjkowego – *Crataegus oxyacantha* L., (*Rosaceae*), zebrane w początkowym okresie kwitnienia, szybko wysuszone.

Surowiec zawiera ok. 1% związków flawonoidowych. Głównymi składnikami są C-glikozydy: witeksyna, 4'-ramnozyd, 4'-acetyloramnozyd, 4'-rutynozyd witeksyny oraz zespół O-glikozydów, głównie rutozyd i 3-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd). Wymagana minimalna zawartość flawonoidów to 1,50% w przeliczeniu na hiperozyd.

Poza flawonoidami występują garbniki skondensowane, kwasy triterpenowe, fenolokwasy i związki purynowe.

***Helichrysi inflorescentia* – kwiatostan kocanek**

Syn.: *Flos Stoechados citrini*, kwiat nieśmiertelnika, kocanki

Surowcem są kwiatostany kocanek piaszkowych, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, (*Asteraceae*), zebrane na początku kwitnienia i wysuszone w temperaturze nie wyższej niż 35°C.

Surowiec zawiera liczny zespół flawonoidów, w ilości ok. 4%. Głównym związkiem (do 2%) jest 6'-glukozyd 2',4',6',4-tetrahydroksychalkonu (izosalipurozyd) zanikający w czasie przechowywania surowca. Występują także 3-glukozyd i 3-diglukozyd kemferolu, 5-glukozyd i 5-diglukozyd naryngeniny. Ponadto surowiec zawiera ftalidy, olejek eteryczny i karotenoidy.

***Tiliae flos* – kwiat lipy**

Surowcem są wysuszone kwiatostany wraz z podsadką lipy drobnolistnej – *Tilia cordata* Mill. (*Tilia parvifolia* Ehrh.) lub lipy wielkolistnej – *Tilia platyphyllos* Scop. (*Tilia grandifolia* Ehrh.) lub też *Tilia x vulgaris* Heyne (*Tiliaceae*), lub ich mieszanina.

Zawartość flawonoidów wynosi ok. 0,3%. W zespole (ok. 20 związków) występują: monozydy i biozydy kemferolu, kwercetyny, akacetyny (4'-metylowy eter apigeniny) oraz glikozydoester – tylirozyd. Ponadto surowiec zawiera olejek eteryczny, śluzu, sterole i garbniki.

***Betulae folium* – liść brzozy**

Surowcem są wysuszone liście brzozy brodawkowatej – *Betula pendula* Roth. (*B. verrucosa* Ehrh.) lub brzozy omszonej – *Betula pubescens* Ehrh. (*Betulaceae*), o zawartości flawonoidów nie mniejszej niż 1,5% w przeliczeniu na hiperozyd.

Surowiec zawiera od 1,5% do 3% związków flawonoidowych, głównie 3-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd), w mniejszej ilości 3-glukuronid kwercetyny oraz 3-galaktozyd mirycetyny. Ponadto w surowcu występują fenolokwasy, olejek eteryczny, kwas askorbinowy i triterpeny.

***Equiseti herba* – ziele skrzypu**

Surowcem są wysuszone, zielone, płone pędy skrzypu polnego, *Equisetum arvense* L., (*Equisetaceae*) o zawartości flawonoidów nie mniejszej niż 0,3%, w przeliczeniu na izokwercytozyd.

Surowiec zawiera od 0,2% do 0,9% flawonoidów, głównie glikozydów kemferolu, 3-glukozyd kwercetyny (izokwercytozyd) a w niektórych chemotypach także 5-glukozyd luteoliny. Ponadto występują związki krzemu (ok. 10%), w tym w postaci rozpuszczalnej do 2%, połączenia kwasu kawowego z kwasami alifatycznymi oraz śladowe ilości alkaloidów.

***Hyperici herba* – ziele dziurawca**

Surowcem są wysuszone kwitnące szczyty pędów dziurawca zwyczajnego, *Hypericum perforatum* L. (*Clusiaceae* syn. *Hypericaceae*, *Guttiferae*) o zawartości minimum 0,08% sumy hiperycyn.

Surowiec zawiera 2-4% związków flawonoidowych, głównie glikozydy kwercetyny: 3-galaktozyd (hiperozyd), 3-glukozyd (izokwercytryna) i 3-ramnoglukozyd (rutozyd). Ważnymi składnikami czynnymi są: pochodna izoprenoidowa o 36 atomach węgla – hiperforyna (2-4%) i pochodne naftodiantronu – hiperycyny (czerwonoczarne barwniki) w ilości do 0,1%, którym przypisuje się działanie antydepresyjne. Występują też garbniki katechinowe (9-12%) i niewielkie ilości olejku eterycznego.

***Polygoni avicularis herba* – ziele rdestu ptasiego**

Surowcem jest wysuszone ziele rdestu ptasiego, *Polygonum aviculare* L. (*Polygonaceae*), zebrane w okresie kwitnienia.

W surowcu występują flawonoidy w ilości 0,2%-1%: 3-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd), 3-arabinozyd kwercetyny (awikularyna), 3-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna). Ponadto obecne są garbniki w ilości ok. 4% oraz krzemionka (ponad 1%) częściowo w postaci rozpuszczalnej. Zawartość flawonoidów winna wynosić co najmniej 0,3% w przeliczeniu na hiperozyd.

***Fagopyri herba* – ziele gryki**

Całe lub pocięte nadziemne części *Fagopyrum esculentum* Moench (*Polygonaceae*), zebrane we wczesnym okresie kwitnienia, przed owocowaniem i natychmiast wysuszone, o zawartości rutyny nie mniejszej niż 4% (oznaczenie metodą HPLC).

***Ginkgonis folium* – liść miłorzębu japońskiego**

Wysuszony liść *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*) o zawartości nie mniejszej niż 0,5% glikozydów flawonowych oznaczonych metodą HPLC.

Głównymi składnikami surowca są biflawony (0,4-1,9%): amentoflawon, bilobetyna, ginkgetyna i inne oraz mono- i diglikozydy flawonoli: kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny. Ponadto występują oligomeryczne proantocyjanidyny (ok. 10%), laktony terpenowe: ginkgolidy (diterpeny) i bilobalidy (seskwiterpeny) w ilości ok. 0,04%.

***Orthosiphonis folium* – liść ortosyfonu**

Surowiec stanowią pocięte, wysuszone liście i szczyty łodyg azjatyckiej rośliny *Orthosiphon stamineus* Benth (*O. aristatus* Mig., *O. spicatus* Backer), (*Lamiaceae*). Popularną nazwą surowca jest Java-tea.

Zawiera on ok. 0,2% flawonów lipofilnych (metoksylowych pochodnych), których głównym przedstawicielem jest sinensetyna (3',4',5,6,7-pentametoksyflawon). Minimalna zawartość sinensetyny, oznaczona metodą HPLC winna wynosić 0,05%. Ponadto obecne są pochodne kwasu kawowego (ok. 1%), z których głównym jest kwas rozmarynowy, diterpeny (ortosyfole A-E), sole potasu oraz mioinozytol.

***Solidaginis virgaureae herba* – ziele nawłoci pospolitej**

Solidago virgaurea L.,

***Solidaginis herba* – ziele nawłoci**

S. canadensis L., *S. gigantea* Ait. (*Asteraceae*)

Składniki wymienionych trzech gatunków nawłoci są podobne, występują różnice ilościowe. W nawłoci pospolitej wymagana jest zawartość 1,4% flawonoidów; głównym z nich jest rutozyd. W nawłoci kanadyjskiej zawartość flawonoidów winna wynosić co najmniej 2,4% w przeliczeniu na hiperozyd, główny składnik frakcji flawonoidowej.

Nawłoc pospolita zawiera glikozydy fenolowe: lejokapozyd i wirgaureozyd. Inną frakcją czynną we wszystkich gatunkach są saponiny, pochodne kwasu poligalowego i bajogeniny.

Wykrywanie flawonoidów za pomocą reakcji barwnych

Podstawowy wyciąg metanolowy. 1,0 g surowca umieścić w kolbie okrągłodennej poj. 50 ml, zalać 25 ml metanolu i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej przez 30 minut. Wyciąg odsączyć przez karbowany sączeek, surowiec przenieść do kolby i ponownie ekstrahować metanolem (2x25 ml). Połączone wyciągi zagęścić na wyparce rotacyjnej do obj. 10 ml.

Oczyszczanie wyciągu. Wyciąg metanolowy można oczyścić jednym z poniżej podanych sposobów.

I. Przez odbalastowanie gorącą wodą.

Podstawowy wyciąg metanolowy odparować do sucha na wyparce rotacyjnej. Pozostałość zalać 25-50 ml gorącej wody i ogrzewać na łaźni wodnej przez 15 minut, po ochłodzeniu pozostawić w chłodziarce na 24 godziny. Przesączyć płyn przez karbowany sączeek, osad strąconych balastów przemyć małą porcją ciepłej wody. Przesącz wodny ekstrahować octanem etylu (3 x 25 ml). Połączone wyciągi octanowe zagęścić do objętości 5-10 ml.

II. Przez wstępne wytrawianie surowca chloroformem.

1,0 g surowca umieścić w gilzie z bibuły i wytrawiać chloroformem w aparacie Soxhleta aż do uzyskania bezbarwnego wyciągu (ok. 6-10 godzin). Surowiec wysuszyć pod wyciągiem; następnie przenieść do kolby okrągłodennej i wytrawiać metanolem w sposób podany powyżej.

Wyciąg do badania aglikonów. 2,5-5 ml podstawowego wyciągu metanolowego przenieść do kolby okrągłodennej poj. 50 ml i odparować metanol (wyparka rotacyjna). Pozostałość rozpuścić w 20 ml gorącej wody, po ochłodzeniu dodać 5ml kwasu siarkowego 10% i ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny. Po ochłodzeniu zawartość kolby przenieść do rozdzielacza i ekstrahować porcjami (5x20 ml) eteru etylowego aż do uzyskania bezbarwnego wyciągu. Połączone wyciągi przemyć niewielką ilością wody, osuszyć bezwodnym siarczanem sodowym. Oddestylować rozpuszczalnik, pozostałość rozpuścić w 5 ml metanolu.

Reakcje barwne.

I. Próba Shinody.

Do 1 ml wyciągu metanolowego (jeśli konieczne oczyszczonego) dodać niewielką ilość opitek magnezu, po czym kroplami stężony kwas solny i obserwować powstałe zabarwienie. W wyniku redukcji flawonoidów wodorem *in statu nascendi* powstaje zabarwienie pomarańczowe charakterystyczne dla flawonów, malinowoczerwone dla

flawonoli i fioletowoczerwone dla flawononów. Chalkony i aurony nie dają barwnych związków.

II. Reakcja z chlorkiem glinu.

Do 1 ml wyciągu metanolowego dodać 3-5 kropli metanolowego roztworu chlorku glinowego 2% i obserwować powstałe zabarwienie w świetle dziennym i UV. Flawonoidy dają z odczynnikiem żółte lub zielonkawożółte kompleksy barwne, które w świetle UV wykazują zielonożółtą fluorescencję. Reakcją tą można odróżnić chalkony, które z odczynnikiem tworzą pomarańczowoczerwone kompleksy.

III. Reakcja z chlorkiem żelaza.

Do 1 ml oczyszczonego wyciągu metanolowego z surowca dodać 2-3 krople metanolowego roztworu chlorku żelazowego 2% i obserwować powstałe zabarwienie. Flawonoidy tworzą z odczynnikiem kompleksy barwy zielonej, brązowej lub brunatnoczerwonej. Reakcja ta jest mało specyficzna, ponieważ barwną reakcję z odczynnikiem dają też inne związki o charakterze fenoli, np. garbniki, fenolokwasy i ich pochodne.

IV. Reakcja z kwasem borowym.

2 ml wyciągu umieścić w parownicy porcelanowej i odparować do sucha na łaźni wodnej. Do pozostałości dodać 3 ml wodnego roztworu kwasu borowego 3% i 1 ml wodnego roztworu kwasu szczawowego 10%, ponownie odparować do sucha na łaźni wodnej. Otrzymaną pozostałość wyekstrahować 10 ml eteru. W obecności flawonoidów roztwór eterowy wykazuje żółtozieloną fluorescencję.

Chromatografia cienkowarstwowa surowców flawonoidowych

Procedura A

Roztwór badany. Roztwór badany przygotować w sposób podany powyżej (podstawowy wyciąg metanolowy), oczyszczanie nie zawsze jest konieczne, zastosować w przypadku *Equiseti herba*, *Betulae folium*.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 30 µl badanego roztworu oraz 20 µl ml roztworów porównawczych (0,01% metanolowe roztwory hiperozydu, rutozydu i kwercetyny). Płytkę rozwijać fazą octan etylu : woda : kwas mrówkowy : kwas octowy lod. (100:27:11:1) na wysokość ok. 15 cm.

Detekcja. Wysuszoną płytkę obejrzyć w UV przy 365 nm a następnie spryskać metanolowym roztworem chlorku glinu 1% i obejrzyć ponownie w UV, porównać R_f i zabarwienie pasm/plam roztworu badanego i roztworów porównawczych. Flawonoidy

fluoryzują brunatno (flawony, flawonole bez wolnej grupy C-3 OH np. rutozyd, hiperozyd); z roztworem chlorku glinu pasma flawonoidów zabarwiają się przeważnie żółto (światło dzienne, UV). Kwercetyna fluoryzuje żółto, z chlorkiem glinu pomarańczowożółto.

Procedura B

Roztwór badany. Do 0,5 g sproszkowanego surowca dodać 10 ml metanolu, ogrzewać 5 min na łaźni wodnej w temp. 65°C często wstrząsając. Po ochłodzeniu przesączyć i uzupełnić metanolem do 10 ml.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 10 µl badanego roztworu oraz 10 µl ml roztworu porównawczego (po 2,5 mg hiperozydu i rutozydu w 10 ml metanolu). Płytkę rozwijać fazą bezwodny kwas mrówkowy : woda : metyloetyloketon : octan etylu (10:10:30:50 v/v/v/v) na wysokość 15 cm. Po rozwinięciu płytkę wysuszyć w suszarce w temp. 100-105°C

Detekcja. Gorącą płytkę spryskać roztworem (10g/l) estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego w metanolu, następnie spryskać roztworem (50g/l) makrogolu 400 w metanolu. Suszyć 30 min na powietrzu i obejrzyć w ultrafiolecie przy 365 nm. Pasma rutozydu jest pomarańczowe, powyżej pasmo hiperozydu pomarańczowożółte do pomarańczowo-brunatnego.

Oznaczenie zawartości flawonoidów w *Crataegi folium cum flore* wg FPVIII

Roztwór podstawowy. W kolbie poj. 200 ml umieścić 0,400 g sproszkowanego surowca i 40 ml etanolu 60% v/v. Ogrzewać w łaźni wodnej 10 min często wstrząsając w temp. 60°C. Pozostawić do ochłodzenia i przesączyć przez zwitek waty do kolby miarowej poj. 100 ml. Watę wrzucić do kolby poj. 200 ml zawierającej surowiec, dodać 40 ml etanolu 60% i ogrzewać ponownie 10 min w łaźni wodnej w temp. 60 ° C. Po ochłodzeniu przesączyć do tej samej kolby miarowej poj 100 ml. Przemyć kolbę poj. 200 ml etanolem 60% i przesączyć do kolby na 100ml, uzupełnić etanolem 60% do 100,0 ml i przesączyć.

Roztwór badany. Umieścić 5,0 ml roztworu podstawowego w kolbie okrągłodennej i odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Rozpuścić pozostałość w 8 ml mieszaniny 10 objętości metanolu i 100 objętości lodowatego kwasu octowego i przenieść do kolby miarowej poj. 25 ml. Przemyć kolbę okrągłodenną 3 ml mieszaniny złożonej z 10 objętości metanolu i 100 objętości lodowatego kwasu octowego i przenieść do kolby miarowej poj. 25 ml. Dodać 10,0 ml roztworu zawierającego 25,0 g/l kwasu borowego i 20,0 g/l kwasu szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym do 25,0 ml.

Odnośnik. Umieścić 5,0 ml roztworu podstawowego w kolbie okrągłodennej i odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Rozpuścić pozostałość w 8 ml mieszaniny 10 objętości metanolu i 100 objętości lodowatego kwasu octowego i przenieść do kolby miarowej poj. 25 ml. Przemyć kolbę okrągłodeną 3 ml mieszaniny 10 objętości metanolu i 100 objętości lodowatego kwasu octowego i płyn przenieść do kolby miarowej poj. 25 ml. Dodać 10,0 ml bezwodnego kwasu mrówkowego i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym do 25,0 ml.

Oznaczenie. Po 30 min. zmierzyć absorbancję roztworu badanego przy 410 nm wobec odnośnika.

Obliczyć procentową zawartość sumy flawonoidów, w przeliczeniu na hiperozyd, wg poniższego wzoru:

$$\frac{A \times 1,235}{m}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla hiperozydu równą 405.

A – absorbancja przy 410 nm,

m – masa badanego wyciągu, w gramach.

Oznaczanie zawartości flawonoidów w *Betulae folium*, *Sambuci flos*, *Polygoni avicularis herba*, *Equiseti herba*, *Solidaginis herba*, *Solidaginis virgaureae herba* wg FPVIII

Roztwór podstawowy. Umieścić 0,200-0,800 g* sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie okrągłodennej poj. 100 ml, dodać 1 ml roztworu heksametylenotetraminy (5g/l), 20 ml acetonu i 2 ml kwasu solnego (250g/l HCl). Mieszaninę utrzymywać 30 min. we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną. Przesączyć do kolby poj. 100ml przez zwitek waty. Dodać zwitek do pozostałości w kolbie okrągłodennej i ekstrahować 2-krotnie porcjami, po 20 ml acetonu, każdorazowo utrzymując we wrzeniu 10 min. pod chłodnicą zwrotną. Pozostawić do ochłodzenia do temperatury pokojowej i ciecz przesączyć do kolby przez zwitek waty, a następnie przez sącdek bibułowy do kolby miarowej, uzupełnić acetonem do 100,0 ml, przemywając kolbę i sącdek bibułowy. Przenieść 20,0 ml tego roztworu do rozdzielacza, dodać 20 ml wody i wytrząsnąć mieszaninę jedną porcją 15 ml, a następnie trzema porcjami po 10 ml, octanu etylu. Połączone wyciągi octanu etylu w rozdzielaczu przemyć dwiema porcjami po 50 ml wody, przesączyć wyciąg przez 10 g bezwodnego siarczanu sodu do kolby miarowej i uzupełnić octanem etylu do 50,0 ml.

Roztwór badany. Do 10,0 ml roztworu podstawowego dodać 1 ml odczynnika chlorku glinu i uzupełnić roztworem (5% v/v) lodowatego kwasu octowego w metanolu do 25,0 ml.

Oдно́шник. Uzupelnic 10,0 ml roztworu podstawowego roztworem (5% v/v) lodowatego kwasu octowego w metanolu do 25,0 ml.

Oznaczenie. Po 30 min. zmierzyc absorbancje roztworu badanego przy 425 nm wobec odnośnika.

Obliczyc procentowa zawartosc flawonoidow w przeliczeniu na hiperozyd, wg ponizszego wzoru:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

przyjmujac absorbancje wlasciwa dla hiperozydu rowna 500.

A – absorbancja przy 425 nm,

m – masa badanej substancji roslinnej, w gramach.

Przygotowanie odczynnikow.

Odczynnik chlorku glinu: 2g chlorku glinu rozpuszczic w 100 ml roztworu 5% v/v lodowatego kwasu octowego w metanolu

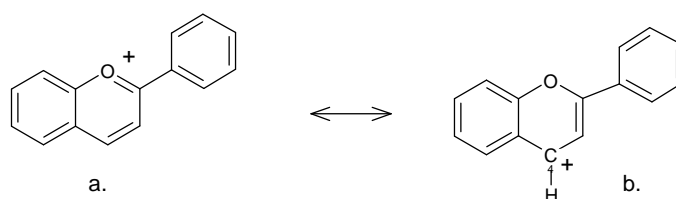
Kwas solny 250g/l HCl: 70 g kwasu solnego uzupelnic woda do 100 ml

* Zalecane odwazki dla poszczegolnych surowcow: *Sambuci flos* – 0,600 g, *Equiseti herba* – 0,800 g, *Polygoni avicularis herba* – 0,800 g, *Betulae folium* – 0,200 g, *Solidaginis herba* i *S. virgaureae herba* – 0,200 g

ANTOCYJANY

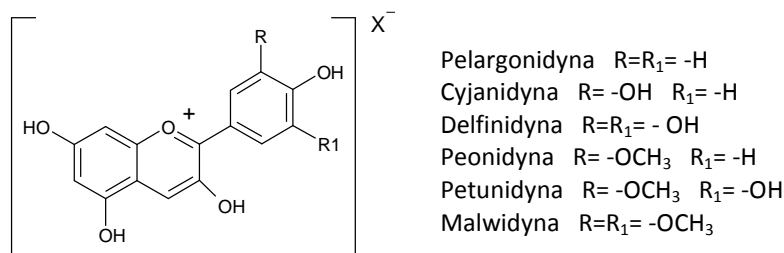
Antocyjany są barwnikami roślinnymi, spokrewnionymi biogenetycznie i chemicznie z flawonami, leukoantocyjanidynami i katechinami, stąd wielu autorów zalicza je do grupy flawonoidów. Występują zazwyczaj w postaci glikozydów, które są nazywane antocyjaninami (antocyjanozydami) a ich aglikony antocyjanidynami. Aglikony posiadają charakter zasadowy, związany z obecnością zjonizowanego pierścienia benzopiranowego.

W roślinach występują w postaci soli flawyliowych. Przyjmuje się, że kation tych soli jest hybrydą rezonansową struktur oksoniowych (a) i karboniowych (b) z tym, że struktura oksoniowa (a) jest bardziej trwała i z tego powodu antocyjanidyny są przedstawiane w postaci soli oksoniowych.



Naturalne antocyjanidyny posiadają grupy hydroksylowe w pozycjach C-3, C-5 i C-7 układu benzopiranu, różnią się liczbą i rodzajem grup funkcyjnych (najczęściej hydroksylowych i metoksyowych) w rodniku fenylowym.

Przedstawicielami antocyjanidyn są: pelargonidyna, cyjanidyna, delfinidyna oraz ich metylowe etery.



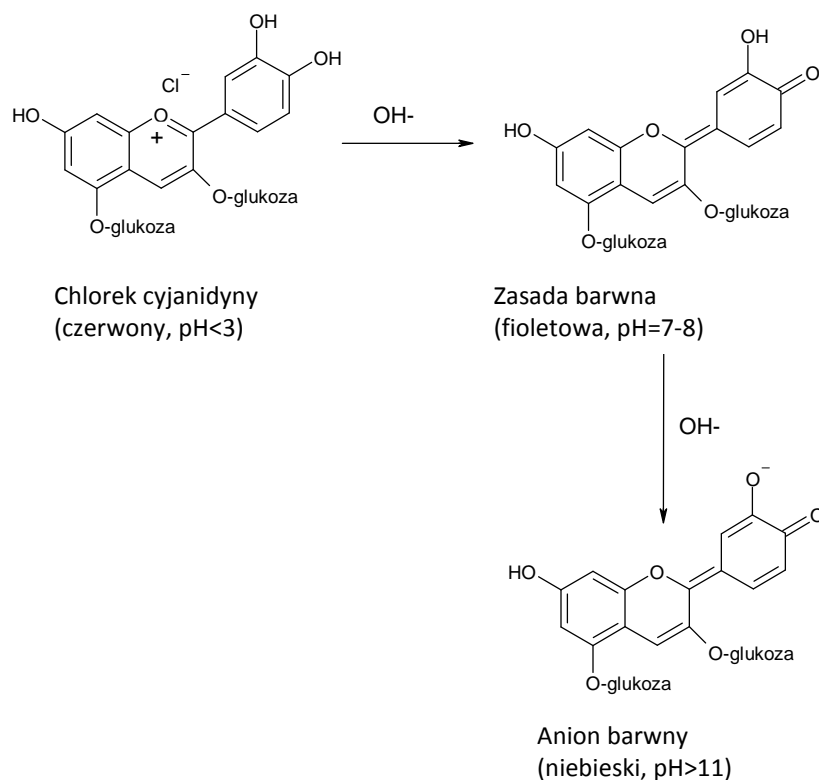
Występują zazwyczaj jako chlorki (X=Cl)

Naturalne antocyjaniny są najczęściej monoglikozydami, rzadziej di- i triglikozydami. Ich składnikami cukrowymi są: glukoza (najczęściej), galaktoza, ramnoza, ksyloza i arabinoza. W monoglikozydach reszta cukrowa występuje przeważnie w pozycji C-3, w pozostałych glikozydach w pozycjach C-3 oraz C-5 lub C-7.

W świecie roślinnym występują również acylowane antocyjaniny, w których składnik cukrowy (glikon) jest częściowo zestryfikowany prostymi kwasami organicznymi (najczęściej kwasem octowym) lub fenolokwasami, pochodnymi kwasu cynamonowego.

Barwniki antocyjanowe o strukturze soli flawyliowych rozpuszczają się w soku komórkowym, nadając kwiatom, owocom, liściom charakterystyczne zabarwienie. Ten sam barwnik, np. cyjanina, może przyjmować różne zabarwienie (czerwone, fioletowe, niebieskie) w zależności od pH środowiska.

W środowisku kwaśnym antocyjany występują w postaci czerwono zabarwionych soli piryliowych, w obojętnym w postaci chinoidowej a w alkalicznym jako sole sodowe, potasowe lub wapniowe formy chinoidowej.



W żywej komórce związki te występują prawdopodobnie w postaci bardziej złożonych zespołów (mogą tworzyć barwne kompleksy z metalami) i wówczas zabarwienie pigmentu odpowiednio się pogłębia.

Działanie farmakologiczne. Antocyjany są grupą związków biologicznie czynnych, posiadają działanie farmakologiczne zbliżone do flawonoidów. Są antyoksydantami, wzmagają elastyczność oraz zmniejszają przepuszczalność ścian naczyń włosowatych, polepszają ukrwienie w obrębie tęczówki oka, zwiększają ostrość widzenia, działają słabo przeciwzapalnie. Antocyjany borówki czernicy – *Vaccinium myrtillus* L. są stosowane w postaci specyfików w oftalmologii, w retynopatiach i osłabieniu wzroku wywołanych zaburzeniami mikrokrążenia.

Surowce lecznicze: *Myrtilli fructus siccus*, *Myrtilli fructus recens*, *Sambuci fructus*

Metodyka badań surowców antocyjanowych

Ekstrakcja. Antocyjany występują w świecie roślinnym w postaci barwnych soli, które można wyekstrahować wodą lub polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Trudno rozpuszczają się w eterze, benzenie. Wykazują tendencję do krystalizacji w roztworach kwaśnych. W niskiej temperaturze są dość trwałe, w podwyższonej temperaturze oraz w roztworach obojętnych i alkalicznych są mało stabilne.

Antocyjany wyodrębnia się z surowca roślinnego stosując ekstrakcję zakwaszonym metanolem, najczęściej metanolem kwasu solnego 0,1%. Wyekstrahowane antocyjaniny ulegają łatwo hydrolizie przez ogrzewanie wyciągu w środowisku kwaśnym do barwnych aglikonów (chlorki antocyjanidyn) i odpowiednich cukrów.

Analiza jakościowa. Badanie antocyjanów można prowadzić metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych celulozą lub żelem krzemionkowym. Układy rozwijające to najczęściej mieszaniny, w różnych stosunkach ilościowych, rozcieńczonych kwasów: solnego, octowego i mrówkowego. Wykorzystywane są również (podobnie jak w analizie flawonoidów) fazy ruchome zawierające n-butanol, rzadziej octan etylu, wysyczone rozcieńczonym kwasem octowym, solnym lub mrówkowym.

W świetle dziennym obserwuje się rozdzielone plamy/pasma różowe, czerwone lub czerwono-fioletowe, które pod działaniem par stężonego amoniaku lub spryskaniu roztworami ługów zmieniają zabarwienie na niebieskie.

Surowce antocyjanowe

***Myrtilli fructus recens* – owoc borówki czernicy świeży**

Wg FP VIII surowcem jest świeży lub mrożony dojrzały owoc borówki czernicy, *Vaccinium myrtillus* L. (*Ericaceae*), zawierający nie mniej niż 0,30% antocyjanów w przeliczeniu na chlorek 3-O-glukozydu cyjanidyny (chryzanteminy). Oznaczenia prowadzi się metodą fotokolorymetryczną. Farmakopealny preparat *Myrtilli fructus extractum siccum raffinatum et normatum* zawiera od 32,4% do 39,6% antocyjanów (oznaczenia metodą HPLC).

Głównymi składnikami surowca są antocyjany będące mieszaniną 3-arabinozydów oraz 3-galaktozydów cyjanidyny, delfinidyny, peonidyny i malwidyny oraz proantocyjanidyny (garbniki). Ponadto występują kwasy organiczne, cukry, pektyny, karotenoidy i witaminy.

***Myrtilli fructus siccus* – owoc borówki czernicy suchy**

Wysuszony dojrzały owoc *Vaccinium myrtillus* L. Winien zawierać nie mniej niż 1,0% garbników w przeliczeniu na pirogalol.

***Sambuci fructus* – owoc bzu czarnego**

Surowcem są dojrzałe owoce bzu czarnego *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*), wysuszone w temperaturze nie wyższej niż 60°C.

Głównymi składnikami surowca są glikozydy cyjanidyny: 3-glukozyd, 3-sambubiozyd i 3-sambubiozydo-5-glukozyd cyjanidyny. Sambubioza jest 2-(β-D-ksylozydo)-glukozą. Ponadto występują garbniki (ok. 3%), kwasy organiczne, witaminy, cukry, pektyny.

Chromatografia cienkowarstwowa *Myrtilli fructus siccus* i *Sambuci fructus*

Roztwór badany. 2 g sproszkowanego surowca umieścić w kolbce stożkowej poj. 50 ml, zalać 10 ml metanolewego roztworu kwasu solnego 0,1% i wytrząsać przez 5 minut. Wyciąg odsączyć przez karbowany sączek lub zwitek waty.

Hydroliza antocyjanin. 4 ml wyciągu przenieść do kolbki okrągłodennej poj. 25 ml, zalać 8 ml kwasu solnego 4% i ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 45 minut. Po ochłodzeniu hydrolizat przelać do rozdzielacza i wyekstrahować 4 ml alkoholu amyłowego I rz. (alkohol amyłowy można zastąpić alkoholem n-butyłowym I rz.). Warstwę alkoholową oddzielić i przeznaczyć do badań.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytej celulozą nanieść kolejno: 25 µl i 50 µl roztworu badanego, 50 µl i 100 µl wyciągu po hydrolizie oraz po 50 µl roztworów porównawczych (alkoholowe roztwory cyjanidyny i delfinidyny 0,1%). Nanoszenie należy prowadzić pasmowo w ten sposób, aby powierzchnie plam wynosiły ok. 0,5x1,5 cm. Płytkę rozwijać na wys. 18 cm fazą ruchomą kwas octowy lod. : woda (3:17 v/v).

Detekcja. Chromatogramy analizować w świetle dziennym przed i po zadziałaniu parami stęż. amoniaku. Porównać wartości R_f plam związków antocyjanowych surowca i wzorców. Główne składniki antocyjanowe owocu borówki czernicy barwią się różowofioletowo, owocu bzu czarnego fioletoworóżowo, po zadziałaniu parami amoniaku zmieniają zabarwienie na niebieskie.

Chromatografia cienkowarstwowa *Myrtilli fructus recens* wg FPIII

Roztwór badany. Do 5 g świeżo zmiażdżonej substancji roślinnej dodać 20 ml metanolu, mieszać 15 min i przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 10 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (5 mg chryzanteminy

w 10 ml metanolu). Płytkę rozwijać na wys. 10 cm fazą ruchomą bezwody kwas mrówkowy : woda : butanol (16:19:65 v/v/v). Po rozwinięciu płytke wysuszyć na powietrzu.

Detekcja. Płytkę oglądać w świetle dziennym. Poniżej podano kolejność pasm obecnych na chromatogramach roztworu porównawczego i badanego.

Górna część chromatogramu	
Chryzantemina: fioletowoczerwone pasmo	Fioletowoczerwone pasmo Główne fioletowoczerwone pasmo Zespół innych głównych pasm: - fioletowoczerwone pasmo - kilka fioletowoniebieskich pasm
Roztwór porównawczy	Roztwór badany

Oznaczanie zawartości antocyjanów w *Myrtilli fructus recens* wg FP VIII

Roztwór badany. Zmiażdżyć 50 g substancji roślinnej *ex tempore*. Do ok. 5,00 g zmiażdżonej, dokładnie odważonej substancji roślinnej, dodać 95 ml metanolu. Mieszać mechanicznie 30 min. Przesączyć do kolby miarowej poj. 100,0 ml. Przemyć sącdek i uzupełnić metanolem do 100,0 ml. Przygotować 50-krotne rozcieńczenie tego roztworu w roztworze 0,1% (v/v) kwasu solnego w metanolu.

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję roztworu przy 528 nm, używając roztworu 0,1% (v/v) kwasu solnego w metanolu jako odnośnika. Obliczyć procentową zawartość antocyjanów, w przeliczeniu na chlorek 3-O-glukozydu cyjanidyny, wg poniższego wzoru:

$$\frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

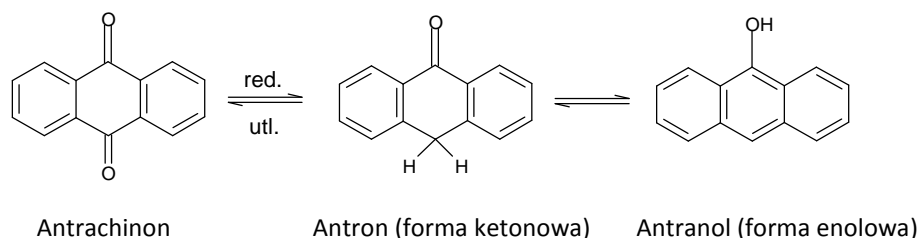
718 – absorbancja właściwa chlorku 3-O-glukozydu cyjanidyny przy 528 nm;

A – absorbancja przy 528 nm;

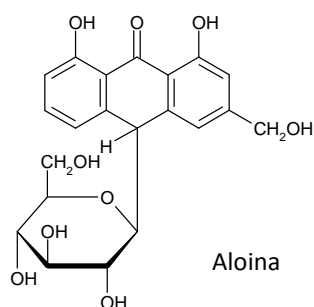
m – masa badanej substancji roślinnej, w gramach.

ANTRANOIDY

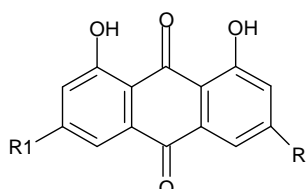
Antranoidy są pochodnymi antracenu. W zależności od stopnia utlenienia podstawowego układu rozróżniamy antrachinony, antrony oraz izomeryczne z antronami antranole.



W świecie roślin antrazwiązki występują przeważnie w postaci glikozydów. W większości są to O-glikozydy, występują również C-glikozyłowe pochodne, których przedstawicielem jest aloina (10-glukozyloaloeemodanoantron).



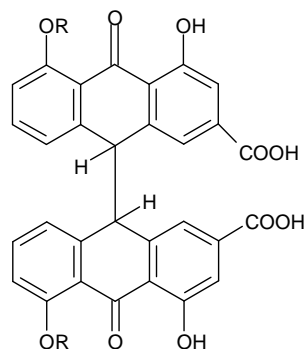
Składnikami cukrowymi glikozydów antranoidowych są najczęściej D-glukoza i L-ramnoza. Aglikony, zwane potocznie emodynami, są hydroksylowymi, hydroksymetylowymi, metylowymi lub karboksylowymi pochodnymi 1,8-dihydroksyantrachinonu lub jego zredukowanej formy. Do często spotykanych pochodnych antrachinonu należą: chryzofanol, aloeemodyna, reina, frangulaemodyna, fiscjon oraz odpowiadające im antrony i antranole (chryzofanoloantron, aloeemodanoantron itp.)



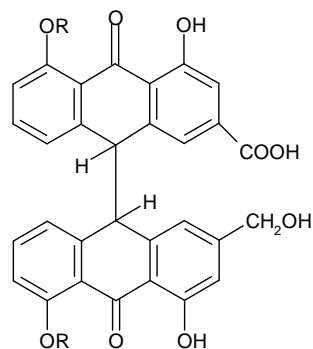
Chryzofanol R= -CH₃ R₁= -H
 Aloeemodyna R= -CH₂OH R₁= -H
 Reina R= -COOH R₁= -H
 Franguloemodyna R= -CH₃ R₁= -OH
 Fiscjon R= -CH₃ R₁= -OCH₃

Pochodne 1,8-dihydroksyantronu występują w niektórych roślinach w postaci dimerów (diantrony). Rozróżniamy izodiantrony o budowie symetrycznej, złożone z dwóch jednakowych antronów oraz heterodiantrony zbudowane z dwu różnych antronów.

Diantronowe pochodne występujące w liściu i owocu senesu (*Sennae folium*, *Sennae fructus*) to izomeryczne sennidyny A i B oraz izomeryczne sennidyny C i D (aglikony). Ich glikozydy zwane są sennozydami A, B, C i D (odpowiednio). W świeżo zebranym korzeniu rzewienia (*Rhei radix*) występują m.in. heterodiantrony: reidyny i palmidyny.



Sennidyny A i B R= -H
Sennozydy A i B R= -glukoza



Sennidyny C i D R= -H
Sennozydy C i D R= -glukoza

Występowanie. Antranojdy występują w kilku rodzinach botanicznych: *Polygonaceae* (rodzaje *Rheum*, *Rumex*, *Polygonum*), *Rhamnaceae* (rodzaj *Rhamnus*, syn. *Frangula*), *Caesalpiniaceae* (rodzaj *Cassia*), *Asphodelaceae* (rodzaj *Aloe*), *Rubiaceae* (rodzaj *Rubia*). Spotykane są również u grzybów i porostów. W żywych roślinach występują w postaci glikozydów, głównie pochodnych antrony i antranolu oraz dimerów. Podczas suszenia surowca ulegają utlenieniu do pochodnych antrachinonu a częściowo także hydrolizie enzymatycznej do aglikonów.

Właściwości fizykochemiczne. Antranojdy są substancjami krystalicznymi, ulegającymi procesowi sublimacji (aglikony). Antrachinony są zabarwione żółto, pomarańczowo lub czerwono w zależności od struktury; antrony i antranole są bezbarwne. Aglikony nie rozpuszczają się w wodzie, rozpuszczają się w słabo polarnych rozpuszczalnikach. Antraglikozydy to substancje łatwo krystalizujące, rozpuszczalne w wodzie i innych rozpuszczalnikach polarnych (alkohol metylowy, spirytus). O-glikozydy łatwo ulegają hydrolitycznemu rozpadowi pod wpływem kwasów, w przypadku C-glikozydów proces ten zachodzi znacznie trudniej.

Antrachinony rozpuszczają się w roztworach ługów tworząc czerwono zabarwione sole (reakcja Borntraegera). Antrony i antranole także się rozpuszczają, ale nie barwią się pod wpływem ługów. Dopiero po utlenieniu tlenem z powietrza, co zachodzi łatwo w czasie ogrzewania roztworu alkalicznego, następuje przejście tych form do antrachinonów i pojawia się czerwona barwa.

Działanie farmakologiczne. Antrapochodne posiadające grupy hydroksylowe przy C-1 i C-8 działają przeczyszczająco na skutek drażnienia jelit, wzmożenia perystaltyki oraz hamowania resorpcji wody. Mają także działanie żółciopędne i żółciotwórcze.

Niektóre surowce zawierające 1,8 dihydroksyantrony np. chryzarobina są stosowane w dermatologii jako środki działające dezynfekująco i przeciwgrzybiczo.

Pochodne 1,2-hydroksyantrachinonu np. alizaryna nie działają przeczyszczająco, mają natomiast zdolność tworzenia rozpuszczalnych kompleksów z jonami wapnia i dlatego są niekiedy stosowane w kamicy nerkowej.

Surowce lecznicze: *Aloe barbadensis*, *Aloe capensis*, *Frangulae cortex*, *Rhamni purshianae cortex*, *Rhamni catharticae fructus*, *Rhei radix*, *Sennae folium*, *Sennae fructus acutifoliae*, *Sennae fructus angustifoliae*, *Chryzarobinum*

Metodyka badań surowców antranoidowych

Analiza jakościowa. Obecność antranoidów w surowcu można wykryć za pomocą reakcji z alkaliami. Po ogrzaniu sproszkowanego surowca z rozcieńczonym kwasem solnym powstałe aglikony należy wyekstrahować eterem etylowym, do frakcji eterowej dodać rozcieńczony roztwór wodorotlenku amonowego lub sodowego i obserwować powstawanie czerwonego zabarwienia.

Uwaga. W przypadku niektórych surowców (*Sennae folium*) barwa czerwona powstaje dopiero po ogrzaniu roztworu (następuje utlenienie antronów do antrachinonów).

Dla celów identyfikacji surowca stosuje się najczęściej chromatografię cienkowsarstwową na żelu krzemionkowym. Wyciągi do analizy zespołu antranoidów (glikozydów i aglikonów) przygotowuje się przez ekstrakcję surowca alkoholem metylowym lub etylowym lub też mieszaniną alkoholu z wodą np. w stosunku 70:30. Jako fazy ruchome służą najczęściej mieszaniny rozpuszczalników o różnym stopniu polarności. Ich składnikami mogą być m.in.: octan etylu, chloroform, metanol, kwas octowy, woda w różnych stosunkach objętościowych.

Prostsze i wygodniejsze jest badanie aglikonów antrachinonowych powstających w wyniku hydrolizy glikozydów i utlenienia form zredukowanych. Hydrolizę glikozydów można przeprowadzić kwasem octowym lub roztworami kwasów mineralnych o różnym stężeniu (w zależności od budowy glikozydów). Utlenienie antronów, antranoli i diantronów zachodzi w obecności takich środków jak: woda utleniona, chlorek żelazowy lub tlen z powietrza w środowisku alkalicznym. Powstałe aglikony antrachinonowe wydzielają się

z mieszaniny reakcyjnej przez wytrawianie chloroformem, cykloheksanem, eterem etylowym lub octanem etylu.

Rozdział aglikonów prowadzi się na żelu krzemionkowym stosując jako fazy ruchome mieszaniny rozpuszczalników słabo polarnych jak: cykloheksan, eter naftowy lub etylowy, toluen, mrówczan lub octan etylu często z dodatkiem kwasu mrówkowego lub octowego. Rozwinięte chromatogramy wykazują w świetle UV obecność plamek lub pasm o fluorescencji żółtej, pomarańczowej lub różowej, które po spryskaniu płytki roztworem wodorotlenku potasowego, sodowego lub amonowego barwią się mniej lub bardziej intensywnie czerwono. Zamiast roztworu wodorotlenku do reakcji można użyć roztworów węglanu sodowego, octanu magnezowego lub glinowego.

Identyfikacji związków dokonuje się na podstawie porównania wartości R_f i zabarwienia plam lub pasm z analizowanymi w identycznych warunkach roztworami porównawczymi.

Analiza ilościowa. Oznaczanie zawartości antrachinonów w surowcach roślinnych prowadzi się najczęściej metodą fotokolorymetryczną z wykorzystaniem reakcji z alkaliami (reakcja Borntraegera). Pochodne 1,8- dihydroksyantrachinonu uwolnione z form glikozydowych przez ogrzewanie z kwasem (hydroliza) tworzą w roztworach wodorotlenków (sodowego, potasowego czy amonowego) czerwono zabarwione sole; tworzą także barwne chelaty z octanem magnezu. Antrony i antranole nie dają barwnych połączeń z tymi odczynnikami, chociaż przechodzą także do roztworów wodno – alkalicznych.

Dlatego, aby oznaczyć ogólną zawartość antranoidów, alkaliczny roztwór poddaje się dodatkowo ogrzewaniu, podczas którego następuje utlenienie form zredukowanych do antrachinonów za pomocą tlenu powietrza w środowisku alkalicznym (metoda FPIV). Nowsze procedury, zamieszczone w FPVIII zalecają, aby najpierw utlenić glikozydy antronowe chlorkiem żelazowym a następnie hydrolizować przez ogrzewanie z kwasem mineralnym. Przeprowadzenie utleniania przed hydrolizą ma zapobiegać tworzeniu się artefaktów, które mogą wpływać na wyniki oznaczeń.

Aloe – alona

Aloe barbadensis – Alona barbadoska

Surowcem jest zagęszczony i wysuszony sok z liści *Aloe barbadensis* Miller (*Asphodelaceae*). Ma postać ciemnobrunatnej masy lekko błyszczącej lub matowej o przełamie muszlowym lub też brunatnego proszku. Rozpuszcza się w gorącym alkoholu i częściowo we wrzącej wodzie. Zawartość pochodnych hydroksyantracenu winna wynosić

nie mniej niż 28% w przeliczeniu na barbaloinę ($C_{21}H_{22}O_9$; m. cz. 418,4) w odniesieniu do wysuszonej substancji roślinnej.

Alona barbadoska zawiera diastereoizomeryczne aloiny A i B (barbaloiny), które są 10-C-glukozydami aloemodynoantronu oraz analogiczne stereoizomery 10-C-glukozydu 7-hydroksy-aloemodynoantronu i 7-hydroksy-8-O-metylo-aloemodynoantronu. Aloina A ma konfigurację 10(S), 1'(S), aloina B konfigurację 10(R), 1'(S). Ogólna zawartość antrapochnych sięga 40%. Oprócz antranoidów występują pochodne chromonu (aloerezyny=aloezyny): 8-C-glukozyd 2-alkilochromonu (aloezyna B) oraz jego estry z kwasami: cynamonowym (aloezyna F) i p-kumarowym (aloezyna A). Aloezyiny charakteryzują się gorzkim smakiem, nie działają przeczyszczająco. W alonie barbadoskiej głównym komponentem tej frakcji jest aloezyna B.

***Aloe capensis* – Alona przyładkowa**

Zagęszczony i wysuszony sok z liści *Aloe ferox* i jego mieszańców o zawartości pochodnych hydroksyantracenu nie mniejszej niż 18% w przeliczeniu na barbaloinę.

Alona przyładkowa, podobnie jak alona barbadoska, zawiera stereoizomeryczne aloiny A i B (barbaloiny) oraz stereoizomeryczne aloinozydy A i B, które są O-ramnozydami aloiny (ramnoza przyłączona do grupy CH_2OH aloemodynoantronu). Oprócz tego obecna jest 5-hydroksyaloina. Surowiec nie zawiera natomiast 7- hydroksyaloiny i 8-O metylo-7-hydroksyaloiny. Frakcja pochodnych 1,8-dihydroksyantracenu stanowi 23-27% surowca. Głównymi składnikami surowca są pochodne chromonu: aloezyna A stanowi ok. 20%, aloezyna B ok. 15% tego gatunku alony. Obecne są ponad to pochodne α -pironu (aloeniny) o gorzkim smaku, których nie wykryto w alonie barbadoskiej.

Badanie tożsamości alony

Reakcje barwne

- I. 1 g sproszkowanej substancji wytrząsać kilka minut z 100 ml wrzącej wody, ochłodzić, dodać 1 g talku i przesączyć. Do 10 ml przesączu dodać 0,25 g tetraboranu disodowego i ogrzać do rozpuszczenia. Do 2 ml roztworu dodać 20 ml wody. Żółtozielona fluorescencja, dobrze widoczna w nadfiolecie (365 nm) powstaje zarówno z roztworem alony barbadoskiej jak i przyładkowej.
- II. Do 5 ml przesączu otrzymanego uprzednio (reakcja A) dodać 1 ml świeżo przygotowanej wody bromowej. Wytrąca się osad brunatnawożółty a roztwór nadsączu jest fioletowy (alona barbadoska) lub osad jest żółty a nadsącz nie zabarwia się (alona przyładkowa).

Chromatografia cienkowarstwowa

Roztwór badany. Do 0,25 g substancji badanej dodać 20 ml metanolu i ogrzać do wrzenia w łaźni wodnej, wstrząsać kilka minut, roztwór zdekantować. Przechowywać w temp. 4° C maksymalnie 24 h.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 10 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (25 mg barbaloiny w 10 ml metanolu). Rozwijać na wysokość 10 cm fazą ruchomą octan etylu : metanol : woda (100:17:13 v/v/v). Po rozwinięciu płytkę wysuszyć na powietrzu.

Detekcja. Wysuszony chromatogram spryskać roztworem wodorotlenku potasu (100 g/l) w metanolu i obejrzeć w nadfiolecie przy 365 nm. Pasma barbaloiny o żółtej fluorescencji widoczne jest w środkowej części chromatogramów alony barbadoskiej i alony przyładkowej.

Chromatogramy obydwu gatunków wykazują dodatkowo w dolnej części pasmo o jasnoniebieskiej fluorescencji (aloezyna). Po ogrzaniu chromatogramu alony barbadoskiej w temp. 110°C tuż poniżej pasma barbaloiny pojawia się pasmo o fioletowej fluorescencji (produkt utlenienia 7-hydroksyaloiny). Na chromatogramie alony przyładkowej oprócz barbaloiny widoczne są (poniżej) dwa pasma o żółtej fluorescencji (aloinozydy A i B). Po ogrzaniu chromatogramu nie pojawia się pasmo o fioletowej fluorescencji tuż pod pasmem barbaloiny.

Oznaczanie zawartości antranoidów w alonie

Roztwór badany. Umieścić 0,300 g sproszkowanego surowca w kolbie stożkowej poj. 250 ml i zwilżyć 2 ml metanolu, dodać 5 ml wody o temp. ok. 60° C, mieszać. Następnie dodać jeszcze 75 ml wody o tej samej temperaturze i wytrząsać 30 min. Po ochłodzeniu przesączyć do kolby miarowej poj. 1000,0 ml, kolbę stożkową i sączek przemyć 20 ml wody, dodając roztwór do kolby miarowej i uzupełnić wodą do kreski. 10 ml tego roztworu przenieść do kolby okrągłodennej poj. 100 ml, w której uprzednio umieszczono 1ml roztworu chlorku żelaza III o stęż. 600g/l i 6 ml kwasu solnego stęż.. Mieszaninę ogrzewać 4 h w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną tak, aby poziom płynu w kolbie znajdował się poniżej poziomu wody w łaźni. Ochłodzić, zawartość kolby przenieść do rozdzielacza, kolbę przemyć kolejno 4 ml wody, 4 ml roztworu wodorotlenku sodu o stęż. 1 mol/litr i 4 ml wody dodając płyny do rozdzielacza.

Zawartość rozdzielacza wytrząsać 3-krotnie porcjami po 20 ml eteru etylowego. Warstwy eterowe połączyć i przemyć 2-krotnie porcjami po 10 ml wody. Oddzieloną

warstwę eterową przenieść do kolby miarowej na 100,0 ml i uzupełnić eterem do kreski. 10,0 ml roztworu eterowego odparować ostrożnie do sucha na łaźni wodnej i pozostałość rozpuścić w 10,0 ml roztworu octanu magnezu w metanolu o stęż. 5g/l.

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję roztworu przy 512 nm, stosując metanol jako odnośnik.

Obliczyć procentowa zawartość pochodnych hydroksyantracenu w przeliczeniu na barbaloinę wg wzoru:

$$\frac{A \times 19,6}{M}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla barbaloiny równą 255.

A = absorbancja przy 512 nm

M = masa próbki wziętej do analizy w gramach

Uwaga. Oznaczanie wykonać chroniąc od intensywnego światła.

Frangulae cortex – kora kruszyny

Surowiec stanowią wysuszone całe lub połamane fragmenty kory pni i gałęzi kruszyny pospolitej – *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* Miller), (*Rhamnaceae*). Korę zbiera się wiosną przed rozwojem liści z młodych pni i gałęzi, po wysuszeniu ogrzewa się 2 h w temp. 100° C lub przechowuje co najmniej rok od czasu zbioru. Proces ten ma na celu utlenienie pochodnych antronu do formy chinonowej, która ma łagodniejsze działanie przeczyszczające. Surowiec leczniczy zawiera nie mniej niż 7,0% glukofrangulin w przeliczeniu na glukofrangulinę A.

W skład pochodnych hydroksyantracenu obecnych w korze kruszyny wchodzi głównie mono- i diglikozydy frangulaemodyny. Monoglikozydami frangulaemodyny są: 6-O-ramnozyd (frangulina A), 6-O-apiozyd (frangulina B), 6-O-ksylozyd (frangulina C) oraz 8-O-glukozyd frangulaemodyny. Głównym składnikiem jest glukofrangulina A (8-O-glukozyd franguliny A), następnie glukofrangulina B (8-O glukozyd franguliny B), w mniejszych ilościach obecne są franguliny A i B, które powstają z odpowiednich glukofrangulin przez enzymatyczne odszczepienie glukozy. Dalsze składniki to frangulaemodyna i jej diantron oraz chryzofanol i fiscjon w formie wolnej i glikozydowej, a także glikozydy antronów w/w związków. Całkowita zawartość antanoidów sięga 8%.

Farmakopealna metoda (FPVIII) oznaczania zawartości pochodnych hydroksyantracenu oparta na reakcji Bornrtaegera obejmuje przede wszystkim oznaczanie glukofrangulin. Franguliny i aglikony usuwa się przed oznaczaniem właściwym poprzez ekstrakcję eterem. Farmakopea zamieszcza także metodykę wykrywania antronów w celu

wyeliminowania surowca nie poddanego procesowi ogrzewania lub rocznego przechowywania (stosuje się metodę TLC a detekcji antronów dokonuje się poprzez reakcję z błękitem nitrozolowym). Metoda TLC służy także do badania zafałszowań innymi gatunkami *Rhamnus*: *R. purshiana*, *R. catharticus*, *R. alpina*, które różnią się składnikami od kory kruszyny.

Badanie tożsamości *Frangulae cortex*

Reakcja barwna

Do ok. 50 mg surowca dodać 25 ml rozcieńzonego kwasu solnego i ogrzewać 15 min na łaźni wodnej. Po ochłodzeniu mieszaninę wytrząsnąć z 20 ml eteru etylowego. Warstwę wodną odrzucić a warstwę eterową wytrząsnąć z 10 ml rozcieńzonego wodorotlenku amonowego 100g/l NH₃. Warstwa wodna zabarwia się czerwonofioletowo.

Chromatografia cienkowarstwowa

Roztwór badany. 100 mg sproszkowanego surowca umieścić w kolbie okrągłodennej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu, 2 ml kwasu solnego 6n i 1 ml roztworu chlorku żelazowego 25% i ogrzewać przez 30 min na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Dodać 5 ml wody, ochłodzić i przesączyć. Przesącz wytrząsnąć z 10 ml eteru etylowego lub cykloheksanu. Warstwę wodną odrzucić, warstwę organiczną przesączyć przez zwitek waty i odparować rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuścić w ok. 0,5 ml chloroformu.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść 50 µl roztworu badanego i 10 µl roztworu porównawczego (5 mg franguloemodyny w 5 ml chloroformu). Płytkę rozwijać na wysokość ok. 17 cm fazą ruchomą cykloheksan : mrówczan etylu (świeżo destylowany) : kwas mrówkowy (74:24:1 v/v/v) lub eter naftowy : octan etylu : kwas mrówkowy (75:25:1 v/v/v). Rozwinięty chromatogram suszyć na powietrzu.

Detekcja. Spryskać metanolem roztworem wodorotlenku potasu 2n i obejrzyć w UV (365 nm). Pasma odpowiadające frangulaemodynie o R_f 0,5-0,7 barwi się na czerwono, powyżej pasma barwy czerwonej odpowiadające fiscjonowi i chryzofanolowi, które mogą się nie rozdzielać.

Oznaczanie zawartości glukofrangulin w *Frangulae cortex*

Roztwór badany. W wytarowanej, okrągłodennej kolbie z doszlifowanym korkiem odważyć 0,250 g sproszkowanej substancji roślinnej, dodać 250 ml metanolu 70%, zmieszać i zważyć. Ogrzewać 15 min pod chłodnicą zwrotną w łaźni wodnej. Po ochłodzeniu uzupełnić

70%-owym metanolem do początkowej masy, przesączyć. Odmierzyć 5,0 ml przesącza, przenieść do rozdzielacza, dodać 50 ml wody i 0,1 ml kwasu solnego stęż. i wytrząsnąć 5 porcjami eteru naftowego po 20 ml każda. Po dokładnym rozdzieleniu warstwę wodną przenieść do kolby miarowej poj. 100 ml. Warstwy eteru naftowego także połączyć i przemyć 2 porcjami wody każda po 15 ml. Warstwę eteru naftowego odrzucić a warstwę wodną użyć do przemycia rozdzielacza i dodać ją do zawartości kolby miarowej. Do kolby miarowej dodać 5 ml roztworu węglańu sodu (50 g/ l) i uzupełnić wodą do 100,0 ml. Odmierzyć 40,0 ml roztworu wodnego, umieścić w kolbie okągłodennej poj. 200,0 ml z doszlifowanym korkiem, dodać 20 ml roztworu chlorku żelaza (III) (200g/l) i ogrzewać 20 min w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Dodać 2 ml kwasu solnego stęż. i ogrzewać 20 min. często wstrząsając dla rozpuszczenia osadu. Po ochłodzeniu przenieść mieszaninę do rozdzielacza, kolbę przemyć 3-krotnie eterem etylowym po 25 ml i wytrząsać zawartość rozdzielacza tymi samymi porcjami eteru. Warstwy eterowe połączyć, przemyć wodą 2 razy po 15 ml, przenieść do kolby miarowej i uzupełnić eterem do 100,0 ml. Odmierzyć 20,0 ml roztworu eterowego, odparować (ostrożnie!) do sucha, pozostałość rozpuścić w 10,0 ml octanu magnezu w metanolu (5 g/ l).

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję przy 515nm.

Obliczyć procentową zawartość glukofrangulin w przeliczeniu na glukofrangulinę A według wzoru:

$$\frac{A \times 3,06}{m}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla glukofranguliny A równą 204.

A – absorbancja roztworu badanego przy 515nm,

m – masa surowca w gramach.

Uwaga. Oznaczenie wykonać chroniąc od intensywnego światła.

***Rhamni purshianae cortex* – kora szakłaku amerykańskiego**

Wysuszona, cała lub rozdrobniona kora *Rhamnus purshiana* DC. Syn. *Frangula purshiana* (DC) A. Gray ex J. C. Cooper (*Rhamnaceae*).

Popularna nazwa surowca wiąże się z występowaniem rośliny macierzystej. Podobnie jak kora *Frangula alnus*, surowiec świeżo zebrany nie nadaje się do stosowania z uwagi na dużą zawartość antronów. Winien być przechowywany przez min. 1 rok lub poddany sztucznemu procesowi oksydacji.

Kora zawiera co najmniej 8% hydroksypochodnych antracenu wywodzących się od aloiny i 8-O-glukozylo-aloiny (kaskarozydy). Zawartość kaskarozydów stanowi ponad 60% sumy antranoidów (wyniki oznaczeń przelicza się na kaskarozyd A).

Postępowanie analityczne dla badania tożsamości i oznaczeń zawartości związków czynnych podaje FPVIII, str. 2815.

***Rhei radix* – korzeń rzewienia**

Surowiec składa się z całych lub pociętych, wysuszonych, podziemnych części *Rheum palmatum* L. lub *Rheum officinale* Baillon (*Polygonaceae*), mieszańców tych gatunków lub ich mieszaniny. Łodyga oraz większość kory z korzonkami są często usunięte. Zawartość pochodnych hydroksyantracenu wynosi nie mniej niż 2,2% w przeliczeniu na reinę.

Korzeń rzewienia zawiera skomplikowany zespół pochodnych 1,8-dihydroksyantracenu. Głównym składnikiem jest 8-O-gentiobiozyd fiscjonu, następnie występują mono i diglikozydy aloeemodyny, chryzofanolu, frangulaemodyny i reiny oraz ich formy antronowe i diantronowe: palmidyny, reidyny i sennidyny. Zawartość sumy antrapochodnych waha się w granicach od 4% do 10% w przeliczeniu na monoglukozyd dihydroksyantrachinonu. Niskie wartości podane w farmakopei wynikają z przeliczenia na nieglikozydową formę – reinę.

W surowcu ważną grupę związków stanowią także garbniki mieszane: katechiny, procyjanidyny i tanoidy. Inne gatunki rzewienia hodowane w celach spożywczych np. rzewień ogrodowy (*Rheum rhaponticum* L.) zawierają znacznie mniej antrapochodnych. Ich charakterystycznym składnikiem jest pochodna stilbenu – rapontycyna o słabych właściwościach estrogennych.

Oznaczanie zawartości antrapochodnych w surowcu *Rhei radix* przeprowadza się w sposób podobny jak w przypadku kory kruszyny. Różnice wynikają z kwaśnego charakteru reiny. Po dodaniu wodorowęglanu sodowego antrazwiązki wywodzące się od reiny tworzą sole łatwo rozpuszczalne w wodzie.

Badanie tożsamości *Rhei radix*

Reakcja barwna

Tok postępowania i wynik jak w analizie kory kruszyny.

Chromatografia cienkowarstwowa

Tok postępowania jak w analizie kory kruszyny.

Wynik. Pasma odpowiadające emodynie: Rf 0,65-0,75, powyżej – pasmo chryzofanolu i fiscjonu (mogą się nie rozdzielać): Rf 0,80-0,90. Poniżej pasma emodyny występują: pasmo aloeemodyny (Rf 0,55-0,65) i pasmo reiny (Rf 0,30-0,40).

Badanie *Rhei radix* na zawartość *Rheum rhaponticum* i innych obcych gatunków rzewienia

Procedura A

Roztwór badany. 0,5g sproszkowanego surowca umieścić w kolbie stożkowej pojemności 50 ml, dodać 5 ml metanolu i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej przez 15 min. Wyciąg przesączyć przez zwitek waty.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść 20 µl roztworu badanego i 10 µl roztworu porównawczego (0,1% roztwór rapontycyny). Płytkę rozwijać na wysokość 15 cm fazą ruchomą chloroform : metanol (4:1 v/v).

Detekcja. Wysuszony chromatogram oglądać w świetle UV (365 nm). Na chromatogramie roztworu badanego brak pasma o Rf 0,25-0,50 o niebieskiej fluorescencji zgodnego z pasmem rapontycyny.

Procedura B (wg FPVIII)

Roztwór badany. Do 0,2 g surowca dodać 2 ml metanolu i utrzymywać we wrzeniu 5 min pod chłodnicą zwrotną. Po ochłodzeniu przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić po 20 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (10 mg rapontycyny w 10 ml metanolu). Rozwijać na wysokość 12 cm fazą ruchomą metanol : chlorek metylenu (20:80 v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu spryskać płytkę roztworem kwasu fosforomolibdenowego. Roztwór badany nie wykazuje obecności niebieskiego pasma w pobliżu startu odpowiadającego rapontycynie.

Oznaczanie zawartości antrazwiązków w *Rhei radix*

0,100 g sproszkowanego surowca umieścić w kolbie poj. 100ml, dodać 30,0 ml wody, zmieszać i zważyć. Ogrzewać 15 min pod chłodnicą zwrotną w łaźni wodnej (kolba winna być zanurzona w wodzie). Po ochłodzeniu dodać 50 mg wodorowęglanu sodu, zważyć i uzupełnić wodą do masy początkowej. Odwirować i przenieść 10 ml cieczy do kolby okrągłodenne ze szlifem poj. 100 ml. Dodać 20 ml roztworu chlorku żelaza III 200 g/l i zmieszać. Ogrzewać 20

min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną, dodać 1 ml kwasu solnego stęż. i ponownie ogrzewać 20 min często wstrząsając. Ochłodzić, przenieść do rozdzielacza i wytrząsać 3 porcjami po 25 ml eteru etylowego użytego wcześniej do przemycia kolby. Połączyć warstwy eterowe i przemyć 2 porcjami po 15 ml wody. Przesączyć wyciąg eterowy przez zwitek waty do kolby miarowej i uzupełnić eterem do 100 ml. 10,0 ml wyciągu eterowego odparować ostrożnie do sucha na łaźni wodnej i rozpuścić pozostałość w 10 ml roztworu octanu magnezu 5 g/l w metanolu.

Oznaczenie. Zmierzyć absorbcję przy 515 nm, używając metanolu jako odnośnika.

Obliczyć procentową zawartość antrazwiązków wg wzoru:

$$\frac{A \times 0,64}{M}$$

przyjmując absorbcję właściwą dla reiny równą 468, którą obliczono na podstawie absorbcji właściwej barbaloiny.

A – absorbcja roztworu badanego przy 515 nm.

M – masa surowca w gramach.

Uwaga. Wykonać chroniąc od jaskrawego światła.

Surowce z rodzaju *Cassia*

***Sennae folium* – liść senesu**

Surowiec składa się z wysuszonych listków *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* Delile) znanej jako senes aleksandryjski (chartumski), lub *Cassia angustifolia* Vahl (*Caesalpinaceae*), znanej jako senes Tinnevely lub jest mieszaniną dwóch gatunków. Zawiera nie mniej niż 2,5% glikozydów hydroksyantracenowych w przeliczeniu na sennozyd B.

Głównymi składnikami są sennozydy A, B i C, D – glikozydy diantronów zwanych sennidynami, które z uwagi na obecność dwóch centrów chiralności (C-10 i C-10') tworzą różne konfiguracje. Przeważają sennozydy A i B, które są 8-,8'-diglukozydami diantronu reiny, przy czym sennozyd A ma konfigurację 10,10'-trans i tworzy formy prawoskrętną A i lewoskrętną A' a sennozyd B jest formą *mezo* optycznie nieczynną. Analogiczną parę diastereoizomerów tworzą diglukozydy diantronu złożonego z reiny i aloeemodyny – sennozydy C i D. Składnikami drugorzędnymi są inne diantrony, złożone m.in. z antronów chryzofanolu i fiscjonu.

Chemizm obydwu gatunków nie jest jednakowy; różnice dotyczą składników towarzyszących, głównie glikozydów pochodnych hydroksynaftaliny.

***Sennae fructus acutifoliae* – owoc senesu ostrolistnego**

Wysuszony owoc *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* Delile) o zawartości nie mniejszej niż 3,4% glikozydów hydroksyantracenowych w przeliczeniu na sennozyd B.

Analiza surowca: jak dla *Sennae folium*.

***Sennae fructus angustifoliae* - owoc senesu wąskolistnego**

Wysuszony owoc *C. angustifolia* Vahl, który zawiera nie mniej niż 2,2% glikozydów hydroksyantracenowych w przeliczeniu na sennozyd B.

Analiza jak wyżej.

Badanie tożsamości *Sennae folium***Reakcja barwna**

Do 25 mg surowca dodać w kolbie stożkowej 50ml wody i 2ml kwasu solnego stęż., ogrzewać 15 min na łaźni wodnej i po ochłodzeniu wytrząsać z 40 ml eteru etylowego. Warstwę eterową oddzielić, osuszyć bezwodnym siarczanem sodu i odparować 5 ml roztworu do sucha. Do ochłodzonej pozostałości dodać 5 ml rozcieńczonego roztworu wodorotlenku amonowego. Powstaje żółte lub pomarańczowe zabarwienie, które po ogrzaniu na łaźni wodnej zmienia się na czerwono-fioletowe.

Chromatografia cienkowarstwowa

Tok postępowania jak dla kory kruszyny.

Wynik. Widoczne są 3 pasma o R_f odpowiadającym (w kolejności rosnących wartości): reinie, aloemodynie oraz chryzofanolowi i fiscjonowi (dwa ostatnie związki tworzą jedno pasmo).

Oznaczanie zawartości sennozydów w *Sennae folium*

Oznaczanie zawartości sennozydów przeprowadza się wykorzystując reakcję Borntraegera, przy czym uprzednio należy uwolnić antrapochoodne o charakterze kwaśnym (pochodne reiny) z ich soli poprzez dodanie kwasu solnego a następnie usunąć wolne, nie związane glikozydowo antrapochoodne poprzez ekstrakcję chloroformem. Dalsze postępowanie jak przy oznaczaniu kory kruszyny.

Roztwór badany. Umieścić 0,150 g sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie poj. 100 ml. Dodać 30,0 ml wody, wymieszać, zważyć i umieścić w łaźni wodnej. Ogrzewać 15 min pod chłodnicą zwrotną. Pozostawić do ochłodzenia, zważyć i uzupełnić do wyjściowej masy wodą. Odwirować i przenieść 20,0 ml nadsącza do rozdzielacza poj. 159ml. Dodać 0,1 ml rozcieńczonego kwasu solnego i wytrząsać 3 porcjami po 15 ml chloroformu. Pozostawić warstwy do rozdzielania i odrzucić warstwę chloroformową. Dodać 0,10g wodorowęglonu

sodu i wytrząsać 3 min. Odwirować i przenieść 10,0 ml płynnego nadsącza do kolby okrągłodennej ze szlifem poj. 100 ml. Dodać 20 ml roztworu chlorku żelaza III 200g/l i zmieszać. Ogrzewać 20 min w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Dodać 1 ml kwasu solnego stęż. i ogrzewać 20 min. często wstrząsając dla rozpuszczenia osadu. Po ochłodzeniu przenieść mieszaninę do rozdzielacza, kolbę przemyć 3- krotnie eterem etylowym po 25 ml i wytrząsać zawartość rozdzielacza tymi samymi porcjami eteru. Warstwy eterowe połączyć, przemyć wodą 2 razy po 15 ml, przenieść do kolby miarowej i uzupełnić eterem do 100,0 ml. Odmierzyć 10,0 ml roztworu eterowego, odparować (ostrożnie!) do sucha, pozostałość rozpuścić w 10,0 ml octanu magnezu w metanolu (5 g/l)

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję przy 515 nm wobec metanolu jako odnośnika. Obliczyć procentową zawartość glikozydów hydroksyantracenowych w przeliczeniu na sennozyd B wg wzoru:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

Przyjmując absorbancję właściwą dla sennozydu B równą 240.

A = absorbancja przy 515 nm.,

m = masa badanej substancji w gramach

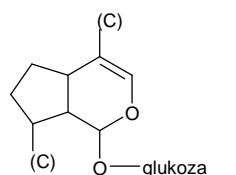
Farmakopealne preparaty antranoidowe

Preparat	Zawartość glikozydów hydroksyantracenowych
<i>Aloes extractum siccum normatum</i>	19,0-21,0% (aloina)
<i>Frangulae corticis extractum siccum normatum</i>	15,0-30,0% (glukofrangulina A)
<i>Sennae folii extractum siccum normatum</i>	5,5%-8,0% (sennozyd B)
<i>Rhamni purshianae extractum siccum normatum</i>	8,0%-25,0% (w tym 60% kaskarozydów w przeliczeniu na kaskarozyd A)

Metodyka oznaczania zawartości antrazwiązków w preparatach jest analogiczna jak przy oznaczaniu w surowcach.

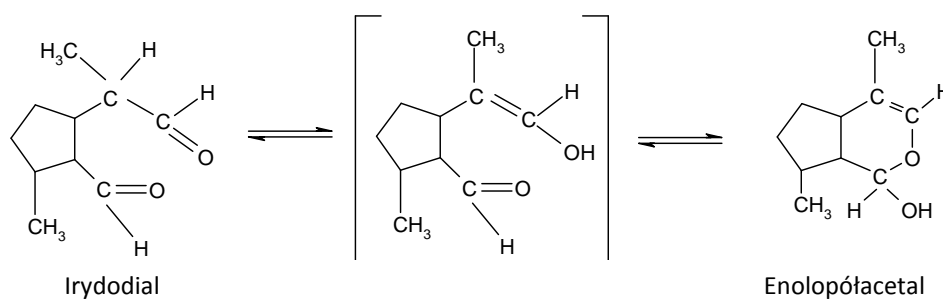
IRYDOIDY

Irydoidy (nazywane również pseudoindykanami) są grupą związków naturalnych zaliczanych do monoterpenu heterocyklicznego, zawierających w swej budowie układ cyklopentano-(c)-piranu.



cyklopentano-(c)-piran

Z uwagi na specyficzny charakter chemiczny określa się jej jako cykliczne enolopófacetale, których prekursorem jest irydodial.



Irydodial

Enolopófacetal

Występujące w świecie roślinnym irydoidy mają charakter alkoholi lub ich glukozydów, kwasów lub ich estrów, laktonów, rzadko ketonów. Są związkami ciekłymi lub krystalicznymi, wrażliwymi na działanie kwasów, alkaliów, tlenu z powietrza, podwyższoną temperaturę. W środowisku kwaśnym ulegają hydrolizie do barwnych związków o charakterze soli piryliowych.

Są grupą związków biologicznie czynnych o zróżnicowanym działaniu. Posiadają różne właściwości, w zależności od struktury: antybiotyczne (aukubigenina), przeciwzapalne (harpagozyd), hipotensyjne (oleuropeina), uspokajające (walepotriany).

Sekoirydoidy występujące w roślinach rodziny *Gentianaceae* i *Menyanthaceae* odznaczają się wybitnie gorzkim smakiem (*remedia amara*), pobudzają czynność wydzielniczą gruczołów trawiennych, wzmagają łaknienie.

Irydoidy występują głównie w roślinach dwuliściennych, szczególnie w rodzinach: *Gentianaceae*, *Menyanthaceae*, *Scrophulariaceae*, *Valerianaceae*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae*, *Oleaceae*.

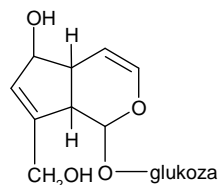
W zależności od budowy można je podzielić na dwie zasadnicze grupy:

1. **irydoidy właściwe** – zawierają szkielet cyklopentano-(c)-piranu,

2. **sekoirydoidy** – zawierają obok piranu sześcioczłonowy pierścień laktonowy.

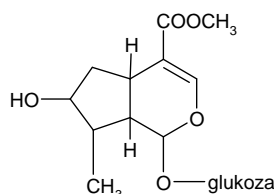
Przedstawicielami pierwszej grupy są:

Aukubina (aukubozyd) – jeden z głównych glikozydów irydoidowych, bardzo rozpowszechniony w świecie roślinnym (głównie w rodz. *Scrophulariaceae*). Jej aglikon (aukubigenina) posiada właściwości antybiotyczne.



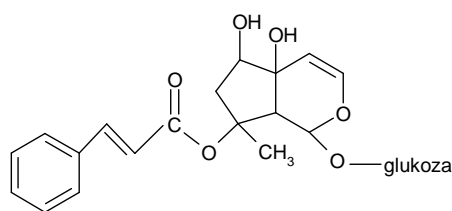
Aukubina (aukubozyd)

Loganina – glikozyd z funkcją estrową. Występuje w narządach podziemnych bobrka trójlistkowego – *Menyanthes trifoliata* (*Menyanthaceae*) oraz w nasionach kulczyby – *Strychnos nux vomica* (*Loganiaceae*).



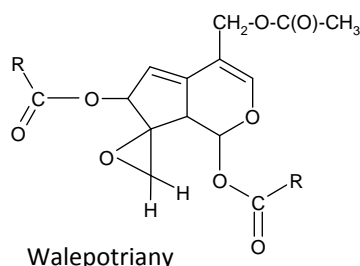
Loganina

Harpagozyd i harpagid – składniki korzenia hakorośli – *Harpagophytum procumbens*. Harpagozyd (=8-cynamoiloharpagid) jest związkiem o smaku silnie gorzkim, wykazuje działanie przeciwzapalne.

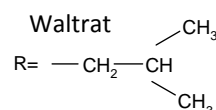


Harpagozyd

Walepotriany – mają charakter trójestrów, różnią się resztami acylowymi. Występują w narządach podziemnych kozłka lekarskiego – *Valeriana officinalis* (*Valerianaceae*). Posiadają właściwości uspokajające. Głównym przedstawicielem jest waltrat.

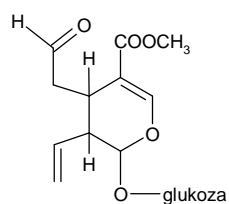


Walepotriany



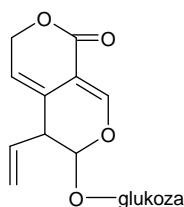
Przedstawicielami sekoirydoidów są:

Sekologanina – najprostszy przedstawiciel tej grupy związków. Powstaje z loganiny przez otwarcie pierścienia cyklopentanu



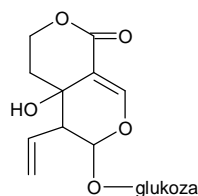
Sekologanina

Gencjopikryna (gencjopikrozyd) – substancja o wybitnie gorzkim smaku. Główny składnik korzenia goryczki – *Gentiana lutea* (*Gentianaceae*).



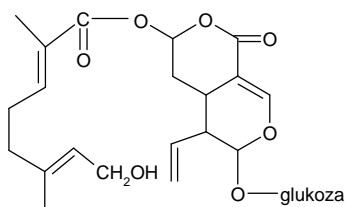
Gencjopikryna

Swercjamaryna – gorzki glikozyd, występujący w ziele centurii *Erythraea centaurium* (*Gentianaceae*).



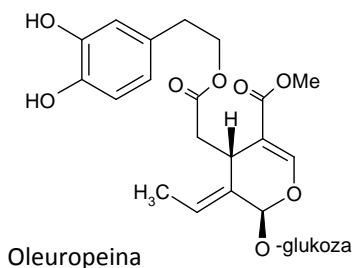
Swercjamaryna

Foliamentyna – gorzki acyloglikozyd występujący w liściu bobrka trójlistkowego – *Menyanthes trifoliata* (*Menyanthaceae*).



Foliamentyna

Oleuropeina – gorzki acyloglukozyd, składnik liści oliwki – *Olea europea* (*Oleaceae*).



Surowce lecznicze: *Menyanthidis trifoliatae folium*, *Centaurii herba*, *Gentianae radix*, *Valerianae radix*, *Plantaginis lanceolatae folium*, *Agni casti fructus*, *Harpagophyti radix*, *Oleae folium*.

Metodyka badań surowców irydoidowych

Występujące w surowcach leczniczych irydoidy stanowią grupę związków o dość zróżnicowanej budowie chemicznej, właściwościach fizykochemicznych i różnym stopniu trwałości. Walepotriany są trudno rozpuszczalne w wodzie, wrażliwe na podwyższoną temperaturę i pH środowiska. W surowcu niewłaściwie zebrany, suszony lub przechowywany ulegają rozkładowi do nieczynnych biologicznie związków. Inne irydoidy właściwe oraz sekoirydoidy charakteryzują się większą trwałością. Rozpuszczają się dobrze w wodzie i metanolu. Sekoirydoidy w środowisku kwaśnym lub w podwyższonej temperaturze ulegają hydrolizie do łatwo polimeryzujących aglikonów. Swoiste właściwości fizykochemiczne walepotrianów i sekoirydoidów wymagają stosowania odmiennych metod analitycznych w identyfikacji i oznaczaniu zawartości.

Ekstrakcja. Walepotriany wyodrębnia się z surowca stosując ekstrakcję eterem etylowym, benzenem, octanem etylu, chlorkiem metylenu, rzadziej cykloheksanem lub dioksanem.

Analiza jakościowa. Do standardowej analizy surowców irydoidowych stosuje się metodę chromatografii cienkowarstwowej i wywoływanie przez ogrzanie do temp. 105° C, spryskanie roztworem kwasu siarkowego i waniliny, kwasem mrówkowym lub też poprzez wygaszanie fluorescencji na płytkach z żelem fluorescencyjnym przy 254 nm.

Badanie składu chemicznego frakcji walepotrianów prowadzi się metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym lub żelem fluorescencyjnym GF₂₅₄. Chromatogramy rozwija się rozpuszczalnikami słabo polarnymi, mieszaniną heksanu lub chlorku metylenu z metyloetyloketonem w różnych proporcjach

ilościowych. Niektóre walepotriany posiadają zdolność wygaszania fluorescencji światła UV (254 nm), co ułatwia ich lokalizację na chromatogramach. Rozdzielone chromatograficznie związki wywołuje się kwasem solnym 6n, roztworem benzydyny w kwasie solnym i octowym, roztworem 2,4-dinitrofenylohydrazyny w kwasie solnym i octowym.

Analiza ilościowa. Podstawą oceny surowców zawierających sekoirydoidy jest wskaźnik goryczy (WG). Zawartość gencjopikrozydu można oznaczyć metodą kolorymetryczną po utworzeniu barwnego związku z roztworem chlorowodoru trifenylotetrazoliny. Odczynnik ten jak również roztwór chlorku antymonu wykorzystywane są do wywoływania gencjopikrozydu na chromatogramach.

Równoczesną identyfikację i oznaczenie ilościowe harpagozydu w *Harpagophyti radix* umożliwia metoda wysokociśnieniowej chromatografii gazowo-cieczowej opisana w FPVIII.

Surowce irydoidowe

***Valerianae radix* – korzeń kozłka**

Syn.: Korzeń waleriany

Surowcem są wysuszone podziemne części kozłka lekarskiego, *Valeriana officinalis* L. (*Valerianaceae*) o zawartości olejku eterycznego nie mniejszej niż 4 ml/kg i kwasów seskwiterpenowych nie mniejszej niż 0,17%.

Olejek eteryczny jest mieszaniną kilkudziesięciu związków, m.in. monoterpenu, w tym estrów borneolu i myrtenolu z kwasem izowalerianowym. Z seskwiterpenów głównymi związkami są kwasy: walerenowy i acetoksywalerenowy. Związkami czynnymi surowca są także irydoidy (walepotriany). Zawartość walepotrianów wynosi 0,5-0,9%. W zespole tym dominują: waltrat, acetoksywaltrat, dihydrowaltrat. Ponadto w surowcu występują alkaloidy monoterpene, lignany, flawonoidy i związki poliacetylowe.

***Menyanthis trifoliatae folium* – liść bobrka**

Syn.: *Folium Trifolii fibrini*

Surowcem jest wysuszony liść bobrka trójlistkowego, *Menyanthes trifoliata* L. (*Menyanthaceae*), zebrany w okresie tworzenia kwiatostanów lub na początku kwitnienia rośliny, o wskaźniku goryczy nie mniejszym niż 3000.

Liść bobrka zawiera glukozyd irydoidowy – loganinę (ok. 1%) i sekoirydoidy: foliamentynę, mentafolinę, dihydrofoliamentynę, swerozyd. Poza goryczami w surowcu występują garbniki (ok. 7%), fenolokwasy, flawonoidy, alkaloidy monoterpene (m.in. gencjanina).

***Centaurii herba* – ziele centurii**

Syn.: Ziele tyśiącznika

Surowcem są wysuszone kwitnące części nadziemne centurii pospolitej, *Centaurium erythrea* Rafn. s.l. (*Centaurium umbellatum* Gilib., *Erythraea centaurium* Persoon) (*Gentianaceae*), o wskaźniku goryczy nie mniejszym niź 2000.

Głównymi skłdnikami ziela centurii są sekoirydoidy (ok. 0,3%): swercjamaryna, gencjopikrozyd, erytauryna. Ponadto występują alkaloidy monoterpenowe (m.in. gencjanina), flawonoidy i triterpeny.

***Gentianae radix* – korzeń goryczki**

Surowcem są wysuszone podziemne narządy goryczki żółtej, *Gentiana lutea* L. (*Gentianaceae*) o wskaźniku goryczy nie mniejszym niź 10 000.

Korzeń goryczki zawiera sekoirydoidy, głównie gencjopikrozyd (2,5%) i związki pokrewne, m.in. amarogentyn i amaropani. Amarogentyna jest 5000 razy bardziej gorzka niź gencjopikrozyd. Dalszymi skłdnikami są alkaloidy monoterpenowe (gencjanina), pochodne ksantonu (gentyzyna i izogentyzyna) oraz cukry o gorzkim smaku – gencjanoza i gencjbioza.

***Plantaginis lanceolatae folium* – liść babki lancetowatej**

Liście *Plantago lanceolata* L. (*Plantaginaceae*) zebrane w okresie kwitnienia i szybko wysuszone w temp. 40-50°C, o zawartości pochodnych kwasu kawowego nie mniejszej niź 1,5%.

Surowiec zawiera śluz (wskaźnik pęcznienia ponad 6); irydoidy: aukubina (2%), katalpol; pochodne kwasu kawowego, głównie akteozyd (werbaskozyd) i kwas chlorogenowy oraz flawonoidy. Znajduje zastosowanie jako środek o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbakteryjnym (zewnętrznie) oraz w preparatach przeciwkaszlowych.

***Harpagophyti radix* – korzeń hakorośli (korzeń czarciego pazura)**

Bulwiaste korzenie południowoafrykańskiej rośliny *Harpagophytum procumbens* DC i/lub *H. zeyheri* Decne (*Pedaliaceae*) o zawartości co najmniej 1,2% harpagozydu (oznaczanie metod HPLC).

Surowiec zawiera silnie gorzkie irydoidy: harpagozyd i jego desacylow pochodną harpagid oraz prokumbid, występują teź pochodne kwasu kawowego (akteozyd). Stosowany jest jako środek przeciwartretyczny i usprawniający procesy metaboliczne.

***Agni casti fructus* – owoc niepokalanka zwyczajnego**

Wysuszone dojrzałe owoce niepokalanka – *Vitex agnus castus* L. (*Verbenaceae*) o zawartości kastycyny (5,3'-dihydroksy-3,6,7,4'-tetrametoksy flawon) nie mniejszej niż 0,08% oznaczonej metodą HPLC.

Surowiec zawiera irydoidy: aukubinę i agnuzyd, który jest estrem aukubiny z kwasem p-hydroksybenzoesowym oraz diterpeny o szkielecie labdanu. W nieznacznych ilościach występują lipofilne flawonoidy, m.in. charakterystyczna dla surowca kastycyna oraz olejek eteryczny. Wyciągi z surowca hamują sekrecje prolaktyny, normalizują cykl miesięczny.

***Oleae folium* - liść oliwki**

Wysuszone liście *Olea europea* L. (*Oleaceae*) o zawartości oleuropeiny nie mniejszej niż 5,0% (oznaczanie metodą HPLC). Zawiera 6-9% pochodnej sekoirydoidowej o bardzo gorzkim smaku – oleuropeiny. Oleuropeina jest β -D-glukozydem estru kwasu elenolowego z alkoholem 3,4-dihydroksyfenyloetylowym. Występują także: wolny kwas elenolowy (sekoirydoid), flawonoidy, mannitol.

Badanie tożsamości *Valerianae radix*

Roztwór badany. 0,2 g sproszkowanego surowca umieścić w kolbce stożkowej poj. 25ml. Surowiec ekstrahować 5 ml chlorku metylenu lekko wstrząsając zawartością kolbki przez 5 minut. Wyciąg odsączyć przez watę, pozostały surowiec przepłukać 2 ml chlorku metylenu. Połączone przesącze odparować do sucha na łaźni wodnej, pozostałość rozpuścić w 0,2 ml metanolu.

Reakcja barwna na obecność waltratu i jego pochodnych o układzie dienowym.

Do probówki zawierającej 3 ml mieszaniny kwas octowy lod. + kwas solny 25% (1:1) dodać 0,1 ml roztworu badanego i wymieszać zawartość probówki. Po 15 minutach roztwór powinien się zabarwić na kolor szmaragdowoniebieski.

Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym, nakropić na dwa punkty startowe 20 i 40 μ l roztworu badanego. Płytkę rozwijać dwukrotnie na wys. 15 cm fazą ruchomą n-heksan : metyloetyloketon (80:20 v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu płytkę spryskać roztworem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (0,1 g 2,4-dinitrofenylohydrazyny rozpuścić w mieszaninie: kwas octowy lod. 20 ml, kwas solny 25% 20 ml, metanol 10ml). Chromatogram obejrzyć bezpośrednio po wywołaniu, po czym ogrzewać przez 5-10 minut w temp. 105°C. Waltrat oraz jego pochodne o układzie dienowym

(Rf: 0,50-0,60 i 0,30-0,40) barwią się na kolor zielononiebieski, po podgrzaniu zmieniają zabarwienie na szarozielone.

Chromatografia cienkowarstwowa *Gentianae radix*

Roztwór badany. Do 1,0 g sproszkowanego surowca dodać 25 ml metanolu, wytrząsać 15 min i przesączyć. Przesącz odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie wyższej niż 50° C. Pozostałość rozpuścić w 5 ml metanolu.

Procedura A

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym F₂₅₄ nanieść roztwór po 20 i 40 µl roztworu badanego w postaci pasm i rozwijać na wysokość 8-12 cm fazą ruchomą mrówczan etylu : bezwodny kwas mrówkowy : woda (88:8:4 v/v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu na powietrzu obejrzyć w nadfiolecie. Pasma o wyraźnie wygaszonej fluorescencji w dolnej części chromatogramu odpowiada gencjopikrozydowi.

Procedura B

Chromatografia. Użyć płytkę z żelem krzemionkowym G oraz fazą ruchomą aceton : chloroform : woda (80:20:5 v/v/v), rozwijać na odległość 15 cm.

Detekcja. Po wysuszeniu płytkę spryskać 5% roztworem etanolowym kwasu siarkowego a następnie 1% roztworem waniliny, ogrzewać 10 min w temp 80°C. Sekoirydoidy tworzą pasmo brunatnofioletowe w środkowej części chromatogramu.

Chromatografia cienkowarstwowa *Centaurii herba*

Roztwór badany przygotować j.w. (korzeń goryczki). Dalsze postępowanie wg opisanego wyżej sposobu A. Pasma o wyraźnie wygaszonej fluorescencji w środkowej części chromatogramu odpowiada swercjamarynie.

Chromatografia cienkowarstwowa *Menyanthis trifoliatae folium*

Roztwór badany. Do 1g sproszkowanego surowca dodać 10 ml metanolu, ogrzewać mieszając 10 min w łaźni wodnej o temp. 60° C. Po ochłodzeniu przesączyć, przesącz odparować pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuścić w 2,0 ml metanolu.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść 30 i 50 µl roztworu badanego i rozwijać na odległość 15cm fazą ruchomą octan etylu : metanol : woda (77:15:8 v/v/v). Po rozwinięciu płytkę wysuszyć na powietrzu

Detekcja. Po wysuszeniu spryskać odczynnikiem wanilinowym i ogrzewać 10 min w temp.100-105°C. Pasma o barwie fioletowej do szarofioletowej w środkowej części

chromatogramu odpowiada loganinie. Widoczne są także inne pasma o podobnym zabarwieniu.

Chromatografia cienkowarstwowa *Agni casti fructus*

Roztwór badany. Przygotować jak dla liścia bobrka, nie zagęszczać.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 pokrytą żelem krzemionkowym F₂₅₄ nanieść 10 i 20 µl roztworu badanego, rozwijać na odległość 8 cm fazą octan etylu : metanol : woda (77:15:8 v/v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu spryskać kwasem mrówkowym i ogrzewać 10 min w temp. 120° C. Obejrzeć w świetle dziennym. Niebieskie pasma odpowiadają irydoidom: pasmo w dolnej części chromatogramu – aukubinie, w środkowej – agnuzydowi.

Chromatografia cienkowarstwowa *Harpagophyti radix*

Analizę wykonać jak dla liścia bobrka z tym, że odparować roztwór badany w temp. do 40°C a do detekcji użyć etanolowy roztwór floroglucynolu (10g/l), a następnie kwas solny. Po ogrzaniu przez 5-10 min w temp. 80°C uwidacznia się w górnej części chromatogramu pasmo harpagozydu barwy zielonej.

Oznaczanie zawartości harpagozydu w *Harpagophyti radix*

Chromatografia cieczowa

Roztwór badany. Do 0,500 g sproszkowanej substancji roślinnej dodać 100,0 ml metanolu OD. Wytrząsać 4 h i przesączyć przez sączeek membranowy (nominalna wielkość porów: 0,45 µm).

Roztwór porównawczy. Rozpuścić zawartość fiołki harpagozydu CSP w metanolu OD i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml.

Chromatografia. Rozdział prowadzić na kolumnie o wymiarach 100x4 mm wypełnionej żelem krzemionkowym do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi (5 µm). Elucję prowadzić mieszaniną metanol : woda (50:50 v/v). Szybkość przepływu 1,5 ml/min. Objętość nastrzyku 10 µl. Detekcja za pomocą spektrofotometru przy długości fali 278 nm. Czas analizy: 3-krotność czasu retencji harpagozydu (który wynosi ok. 7 min).

Obliczyć procentową zawartość harpagozydu wg poniższego wzoru:

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 1000}{A_2 \times m_1}$$

A₁ – powierzchnia pików harpagozydu na chromatogramie roztworu badanego;

A₂ – powierzchnia pików harpagozydu na chromatogramie roztworu porównawczego;

m₁ – masa badanej substancji roślinnej użyta do przygotowania roztworu badanego,

w gramach;

m_2 – masa harpagozydu CSP w roztworze porównawczym, w gramach.

Oznaczanie wskaźnika goryczy

Wskaźnik goryczy jest odwrotnością takiego rozcieńczenia związku, roztworu lub wyciągu, które wykazuje jeszcze smak gorzki. Oznaczany jest przez porównanie z chlorowodorkiem chininy, którego wskaźnik goryczy określony jest na 200 000.

Wyznaczanie wskaźnika korekcyjnego

Zaleca się aby zespół badający składał się co najmniej z co najmniej z 6 osób. Uczestnicy badań muszą wypłukać usta wodą przed badaniem. Aby skorygować indywidualne różnice w odczuwaniu gorzkiego smaku pomiędzy członkami zespołu, konieczne jest wyznaczenie współczynnika korekcyjnego dla każdego członka zespołu.

Roztwór podstawowy. Rozpuścić 0,100 g chlorowodoru chininy w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 ml. Uzupełnić 1,0 ml tego roztworu wodą do 100,0 ml.

Roztwory porównawcze. Przygotować serię rozcieńczeń umieszczając w pierwszej probówce 3,6 ml roztworu porównawczego, zwiększając o 0,2 ml objętość w każdej następnej probówce, aż do uzyskania objętości 5,8 ml; uzupełnić zawartość każdej próbki wodą do 10,0 ml.

Oznaczyć rozcieńczenie o najniższym stężeniu, które jeszcze wykazuje smak gorzki: 10,0 ml roztworu o najniższym stężeniu wziąć do ust i przemieszczać go przez 30 s w obie strony, a także do tyłu, w kierunku języka. Jeżeli okaże się, że roztwór nie jest gorzki, wypłuć go i odczekać 1 min. Wypłukać usta wodą. Po 10 min użyć następnego rozcieńczenia w kolejności wzrastających stężeń.

Obliczyć wg wzoru współczynnik korekcyjny k dla każdego członka zespołu:

$$\frac{n}{5,00}$$

n – liczba mililitrów roztworu podstawowego w rozcieńczeniu o najniższym stężeniu, które zostało ocenione jako gorzkie

Osoby, które nie są w stanie wyczuć gorzkiego smaku, nawet przy użyciu roztworu porównawczego przygotowanego z 5,8 ml roztworu podstawowego, muszą być wykluczone z zespołu.

Właściwe oznaczenie

Przygotowanie próbki. Jeżeli jest to konieczne, sproszkować próbkę. Do 1,0 g próbki dodać 100 ml wrzącej wody. Ogrzewać 30 min na łaźni wodnej, stale mieszając. Pozostawić do ochłodzenia i rozcieńczyć wodą do 100 ml. Energicznie wstrząsnąć i przesączyć,

odrzucając pierwsze 2 ml przesącza. Przesącz oznaczyć symbolem C-1, ma on współczynnik rozcieńczenia (DF) 100.

Jeżeli mają być badane preparaty płynne 1 ml preparatu uzupełnić odpowiednim rozpuszczalnikiem do 100 ml i oznaczyć symbolem C-1.

Roztwory badane:

10,0 ml roztworu C-1 rozcieńczone wodą do 100 ml: C-2	(DF = 1000)
10,0 ml roztworu C-2 rozcieńczone wodą do 100 ml: C-3	(DF = 10 000)
20,0 ml roztworu C-3 rozcieńczone wodą do 100 ml: C-3A	(DF = 50 000)
10,0 ml roztworu C-3 rozcieńczone wodą do 100 ml: C-4	(DF = 100 000)

Rozpoczynając badanie od rozcieńczenia C-4 każdy członek zespołu określa rozcieńczenie, które ma jeszcze gorzki smak. Ten roztwór oznacza się literą D. Zanotować, że DF roztworu D wynosi Y.

Rozcieńczenia roztworu D.

Stosując roztwór D przygotować następującą kolejność rozcieńczeń:

Roztwór D (ml)	1,2	1,5	2,0	3,0	6,0	8,0
Woda (ml)	8,8	8,5	8,0	7,0	4,0	2,0

Określić liczbę mililitrów roztworu D, który po rozcieńczeniu wodą do 10,0 ml, ma jeszcze smak gorzki (X).

Obliczyć z wzoru wskaźnik goryczy określony przez każdego członka zespołu:

$$\frac{Y \times k}{X \times 0,1}$$

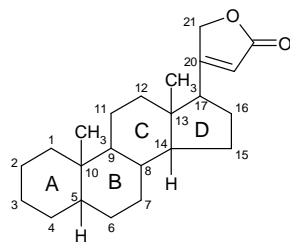
Obliczyć wskaźnik goryczy badanej próbki jako średnią ze wskaźników uzyskanych przez poszczególnych członków zespołu.

KARDENOLIDY

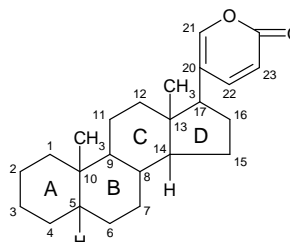
Glikozydy kardenolidowe, ze względu na swoiste działanie na mięsień sercowy nazywane również glikozydami nasercowymi, występują w niektórych gatunkach roślin z rodzin botanicznych: *Apocynaceae*, *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Convallariaceae*, *Hyacinthaceae*, *Ranunculaceae*, *Plantaginaceae*.

Pod względem chemicznym należą do steroidów. Aglikony glikozydów nasercowych posiadają układ steranu (cyklopentanoperhydrofenantrenu), w którym w pozycji C-17 występuje nienasycony pierścień laktonowy pięcio- lub sześcioczłonowy. W zależności od budowy pierścienia laktonowego rozróżniamy dwie grupy glikozydów nasercowych:

1. **kardenolidy** zawierające pięcioczłonowy, nienasycony pierścień laktonowy (steroidy C₂₃). Występują m.in. w gatunkach: *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata*, *Convallaria majalis*, *Adonis vernalis*, *Strophanthus gratus*.
2. **bufadienolidy** zawierające sześcioczłonowy, podwójnie nienasycony pierścień laktonowy (steroidy C₂₄). Taką budowę mają glikozydy nasercowe izolowane z bulw cebuli morskiej – *Urginea maritima* *Hyacinthaceae*).



Kardenolid

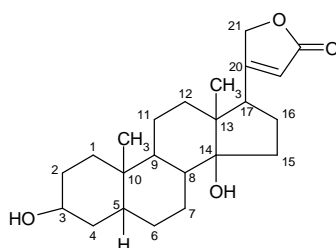


Bufadienolid

Wszystkie geniny kardenolidów i bufadienolidów posiadają w pozycji C-3 grupę hydroksylową, poprzez którą wiążą się glikozydowo z cukrami, druga grupa hydroksylowa występuje w pozycji C-14. Zwornikowe grupy metylowe, pierścień laktonowy oraz grupy hydroksylowe posiadają orientację β . Pierścienie A/B układu steranowego są połączone *cis*, B/C *trans*, C/D *cis*.

Taka budowa przestrzenna podstawowego układu warunkuje aktywność biologiczną glikozydów nasercowych.

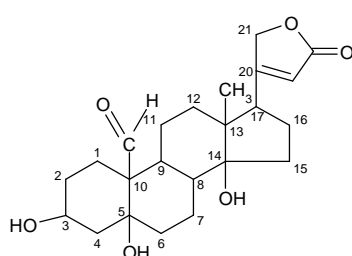
Podstawowym układem kardenolidów jest układ 3 β ,14 β -dihydroksykardenolidu. Taką strukturę posiada digitoksygenina, najprostsza z genin kardenolidowych, składnik struktury glikozydów serii A występujących w naparstnicy wełnistej - lanatozydu A i acetylodigoksyny oraz w naparstnicy purpurowej – purpureaglikozydu A i digitoksyny.



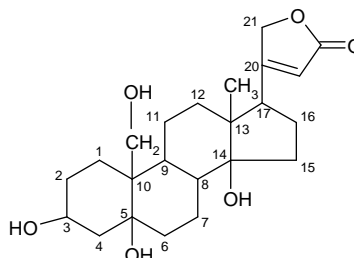
Digitoksygenina

Geniny innych kardenolidów są pochodnymi digitoksygeniny; różnią się liczbą, rodzajem i położeniem grup funkcyjnych, najczęściej -OH, rzadziej -CH₂OH, C=O i innych. Ważną geniną glikozydów kardenolidowych jest digoksygenina (12-hydroksy-digitoksygenina), która jest częścią składową stosowanych w leczeniu glikozydów nasercowych izolowanych z naparstnicy wełnistej: lanatozydu C, acetyldigoksyny oraz digoksyny. Półsyntetyczną pochodną digoksyny stosowaną w leczeniu jest β-metyldigoksyna. Glikozydy digoksygeniny nie występują w naparstnicy purpurowej.

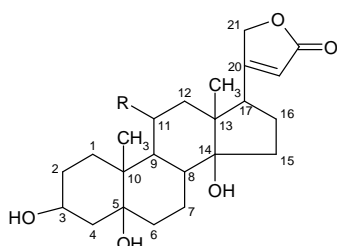
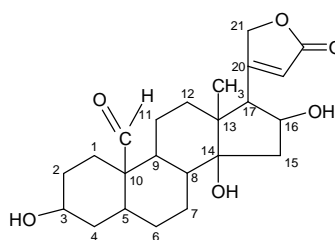
W ziele konwalii majowej – *Convallaria majalis* L. (*Convallariaceae*) i miłka wiosennego *Adonis vernalis* L. (*Ranunculaceae*) występują kardenolidy, których geniny wywodzą się przeważnie od 5- lub 16-hydroksy i 19-oksodigitoksygeniny.



Strofantydyna



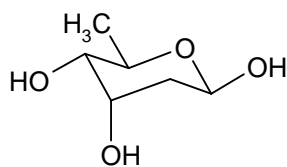
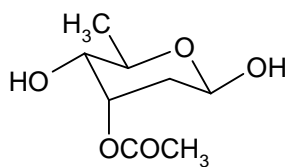
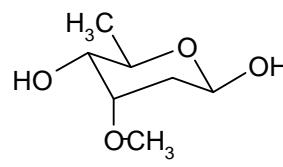
Strofantydol

Peryplogenina R= -H
Bipindogenina R= -OH

Adonitoksygenina

Glikozydy nasercowe zawierają od 1 do 5 cząsteczek cukrów związanych glikozydowo z geniną w pozycji C-3. Cukry te odznaczają się dużą różnorodnością i specyficznością. Obok D-glukozy, która jest częstym składnikiem omawianych glikozydów, występują 6-deoksycukry

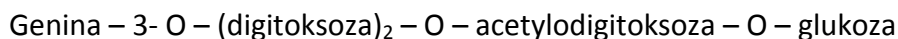
(metylopentozy), 2-deoksy- i 2,6-dideoksycukry oraz ich 3-metylowe i 3-acetylowe pochodne.

 β -D-digitoksoza β -D-acetyloditoksoza β -D-cymarozza

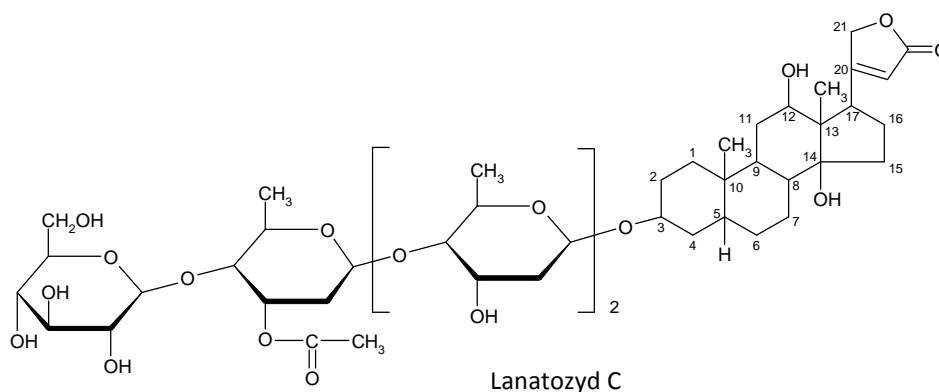
Cukry wchodzące w skład glikonu mają budowę piranozową, wiążą się między sobą wiązaniem β -glikozydowym w pozycjach 1,4 (purpureaglikozydy, lanatozydy, strofantozyd K i inne). Jeżeli w cząsteczce glikonu obok deoksycukrów występuje D-glukoza, znajduje się ona zawsze na końcu łańcucha.

W surowcach roślinnych występują glikozydy pierwotne oraz produkty ich odbudowy enzymatycznej – glikozydy wtórne.

Glikozydami pierwotnymi **naparstnicy wełnistej** są lanatozydy A,B,C,D,E o ogólnym wzorze:



Różnią się one aglikonami (geninami), natomiast łańcuch cukrowy jest taki sam w każdym z lanatozydów. Aglikonem lanatozydu A jest digitoksygenina, lanatozydu B – gitoksygenina, lanatozydu C – digoksygenina.



Lanatozyd C

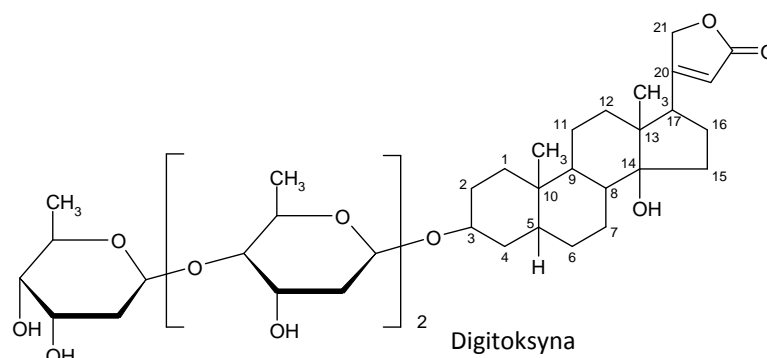
Glikozydy pierwotne **naparstnicy purpurowej** są również tetrozydami. Można je przedstawić ogólnym wzorem:



Są to: purpureaglikozyd A, którego geniną jest digitoksygenina, purpureaglikozyd B (gitoksygenina), glukogitaloksyna (gitaloksygenina).

Jak widać na przedstawionych schematach glikozydy naparstnicy purpurowej różnią się od występujących w naparstnicy wełnistej brakiem grupy acetylowej przy trzeciej reszcie digitoksozy. Oprócz tego w naparstnicy purpurowej nie ma odpowiednika lanatozydu C.

Glikozydami wtórnymi określane są produkty odbudowy enzymatycznej glikozydów pierwotnych. Są one pozbawione cząsteczki końcowego cukru (np. glukozy w przypadku glikozydów naparstnic). Ważnymi glikozydami wtórnymi naparstnic są digitoksyna, którą można otrzymać zarówno z purpureaglikozydu A jak i lanatozydu A oraz digoksyna, która może powstać tylko z lanatozydu C.



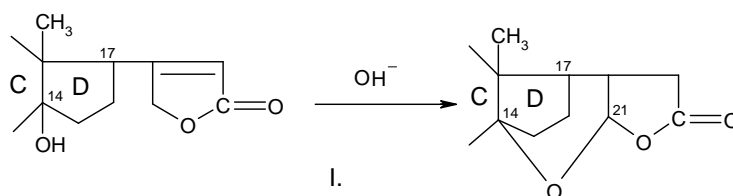
W ziele **konwalii majowej** – *Convallariae herba* występują głównie monozydy: 3-β-L-ramnozydy strofantydyny, strofantydołu, bipindogeniny i peryplogeny. Głównym składnikiem zespołu jest konwalatoksyna – ramnozyd strofantydyny.

W ziele **miłki wiosennego** – *Adonidis vernalis herba* występują monozydy i biozydy wywodzące się od strofantydyny i adonidotoksygeniny, m.in.: cymaryna (3-β-D-cymarozyd strofantydyny), K-strofantyna (3-β-D-glukozydo-D-cymarozyd strofantydyny) oraz adonitoksyna (3-β-L-ramnozyd adonitoksygeniny), która jest głównym składnikiem zespołu.

Właściwości fizykochemiczne. Glikozydy kardenolidowe są krystalicznymi substancjami, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie, w polarnych i słabo polarnych rozpuszczalnikach organicznych (metanol, chloroform, octan etylu).

Ich aglikony trudno rozpuszczają się w wodzie, dobrze w słabo polarnych rozpuszczalnikach. Glikozydy ulegają hydrolizie kwaśnej i enzymatycznej. W warunkach hydrolizy kwaśnej ulega rozerwaniu wiązanie glikozydowe między geniną a deoksycukrem. Hydroliza enzymatyczna zachodzi przy udziale swoistych enzymów. Jej przebieg jest inny niż przy hydrolizie kwaśnej; zawsze jest atakowany końcowy fragment łańcucha cukrowego.

Glikozydy nasercowe są bardzo wrażliwe na działanie alkaliów, przy pH>7 następuje otwarcie pierścienia laktonowego lub jego izomeryzacja do biologicznie nieczynnego 14,21-epoksykardenolidu /I/.



Działanie farmakologiczne. Glikozydy nasercowe działają w swoisty sposób na chory mięsień sercowy. W dawkach terapeutycznych wzmagają siłę skurczu mięśnia sercowego oraz powodują wydłużenie okresu między skurczem a rozkurczem. Serce pracuje wolniej, ale bardziej wydajnie. Ze względu na dużą toksyczność obecnie są bardzo rzadko stosowane.

Surowce lecznicze: *Digitalis purpureae folium* (FPVIII), *Adonidis vernalis herba* (FPVI), *Convallariae herba* (FPVI), *Scillae bulbosus*, *Strophanthi semen*.

Glikozydy stosowane w lecznictwie (FPVIII): β -Acetyldigoxin, Digoxin, Deslanoside (deacetylo lanatozyd C), Digitoxin, Ouabain.

Metodyka badania surowców kardenolidowych

Ekstrakcja. Swoista wrażliwość kardenolidów na działanie czynników chemicznych i enzymów wymaga specjalnych metod postępowania przy przygotowywaniu i oczyszczaniu wyciągów z surowców. Do sporządzania wyciągów stosuje się przeważnie wodę i uwodniony metanol, najczęściej 50%. Zastosowanie bardziej stężonego metanolu powoduje przechodzenie do wyciągu znacznej ilości chlorofilu. Ekstrakcję prowadzi się z reguły na zimno przez godzinne mechaniczne wytrząsanie surowca z rozpuszczalnikiem. Jeżeli celem ekstrakcji jest otrzymanie glikozydów wtórnych, surowiec maceruje się wodą przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, następuje wówczas hydroliza enzymatyczna glikozydów pierwotnych.

Oczyszczanie wyciągów można prowadzić różnymi metodami. Najczęściej stosowana polega na wytrącaniu substancji balastowych octanem ołowiatym. W metodzie tej obserwuje się duże straty związków kardenolidowych, ponieważ są one częściowo adsorbowane przez wytrącające się balasty. Znacznie lepsze wyniki uzyskuje się przesączając wyciąg przez kolumnę z poliamidu. Na poliamidzie adsorbuje się chlorofil i związki polifenolowe, do przesączu przechodzą kardenolidy.

Z oczyszczonych wyciągów ekstrahuje się związki kardenolidowe rozpuszczalnikami organicznymi. Glikozydy naparstnic najlepiej chloroformem, glikozydy miłka i konwalii mieszaniną chloroformu z metanolem. Dodatek metanolu skraca czas ekstrakcji i umożliwia ilościowe wyczerpanie glikozydów.

Analiza jakościowa. Rozdział chromatograficzny kardenolidów można prowadzić za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Do powlekania płytek stosuje się różnorodne

adsorbenty: tlenek glinu, tlenek magnezu, celulozę, talk, najczęściej żel krzemionkowy. Bardzo często adsorbenty impregnuje się wodą lub formamidem. Ze względu na dość zróżnicowany skład frakcji kardenolidów występujących w surowcach, stosuje się dla ich rozdzielania fazy ruchome umożliwiające oddzielenie frakcji genin od glikozydów oraz silnie polarnych glikozydów pierwotnych od mniej polarnych glikozydów wtórnych.

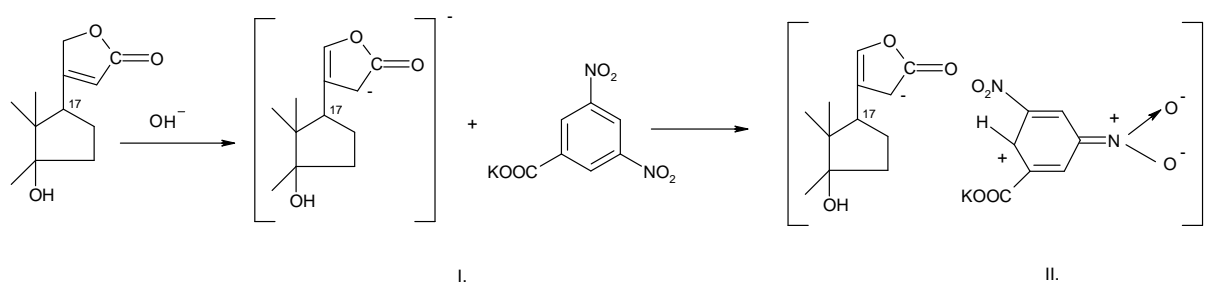
Identyfikację rozdzielonych chromatograficznie związków prowadzi się przez porównanie wartości R_f i zabarwienia po wywołaniu odczynnikami z analizowanymi w identycznych warunkach wzorcami. Najczęściej stosuje się odczynniki specyficzne dla tej grupy związków. Na ugrupowanie laktonowe - m-dinitrobenzen (odczyn. Raymonda) i kwas 3,5-dinitrobenzoesowy (odczynnik Keddego).

Obecność 2-dezoksycukrów można wykryć stosując odczynnik ksanthydrolowy (Peseza), różne modyfikacje odczynnika Keller-Kilianiego oraz p-nitrofenylohydrazynę z kwasem trichlorooctowym. Stosowane są również odczynniki ogólne, dające reakcje barwne ze sterolami: bezwodnik kwasu octowego i kwas siarkowy (odcz. Liebermana-Burcharda), kwas trichlorooctowy (odcz. Rosenheima), roztwór waniliny w kwasie siarkowym i etanolu.

Analiza ilościowa. Zawartość kardenolidów w badanym materiale oznacza się najczęściej metodami kolorymetrycznymi. Glikozydy zawierające w swym składzie 2-deoksycukry oznacza się wykorzystując reakcję z ksanthydrolem. 2-deoksycukry pod wpływem stężonych kwasów przekształcają się w pochodne furfuralu, które ulegając kondensacji z ksanthydrolem tworzą barwne połączenia.

Oznaczanie zawartości glikozydów jak i aglikonów kardenolidowych umożliwia zastosowanie odczynnika Keddego. W reakcji tej następuje w środowisku alkalicznym przesunięcie w pierścieniu laktonowym α , β nienasyconego wiązania w pozycję β , γ z równoczesnym odszczepieniem protonu, co prowadzi do utworzenia anionu kardenolidowego (I), który z kwasem 3,5-dinitrobenzoesowym daje barwny, addycyjny związek (II).

Przebieg reakcji Keddego:



Surowce kardenolidowe

***Digitalis lanatae folium* – liść naporstnicy wełnistej**

Surowcem są wysuszone liście *Digitalis lanata* Ehrh. (*Scrophulariaceae*)

Surowiec zawiera ok. 60 kardenolidów wywodzących się od 5-ciu aglikonów i 8-miu monosacharydów. Zawartość sumy kardenolidów (mono- do tetrazydów) sięga 0,5-1,5%. Surowiec przemysłowy, służy do izolacji lanatozydu C, deslanozydu, β -acetylodigoksyny, digoksyny i digitoksyny.

***Digitalis purpureae folium* (FPVIII) – liść naporstnicy purpurowej**

Surowcem jest wysuszony liść *D. purpurea* L. (*Scrophulariaceae*) o zawartości glikozydów kardenolidowych nie mniejszej niż 0,3%. Zespół kardenolidów składa się z ok. 30 związków wywodzących się głównie od digitoksygeniny (purpureaglikozyd A, digitoksyna), gitoksygeniny (purpureaglikozyd B, gitoksyna) i gitaloksygeniny (glukogitaloksyna, gitaloksyna). Zawartość kardenolidów sięga 0,6%, głównym z nich jest digitoksyna.

Obecnie surowiec ani jego przetwory galenowe nie są stosowane. Liście naporstnic purpurowej i wełnistej służą do izolacji związków jednorodnych, które obecnie dość rzadko są stosowane w lecznictwie.

***Convallariae herba* – ziele konwalii**

Surowcem jest kwiatostan wraz z dwoma otaczającymi go liśćmi konwalii majowej, *Convallaria majalis* L. (*Convallariaceae*), bądź same liście zebrane przed kwitnieniem rośliny i wysuszone.

W surowcu występują glikozydy kardenolidowe w ilości 0,2-0,5%: konwalatoksyna, konwalozyd, konwalatoksol, lokundiozyd, peryploramnozyd. Głównym składnikiem zespołu jest konwalatoksyna (ok. 40% zespołu). Związkom kardenolidowym towarzyszą saponiny sterydowe oraz flawonoidy.

***Adonidis vernalis herba* – ziele miłka wiosennego**

Surowcem jest ziele miłka wiosennego, *Adonis vernalis* L. (*Ranunculaceae*), zebrane w okresie kwitnienia i wysuszone.

Głównymi składnikami surowca są glikozydy kardenolidowe (0,1-0,4%): cymaryna, adonitoksyna, K-strofantyna, wernadygina. Drugą grupą czynnych składników są heterozydy flawonowe, pochodne luteoliny

Badanie tożsamości *Digitalis purpureae folium* wg FPVIII

Chromatografia cienkowarstwowa

Roztwór badany. Do 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej dodać mieszaninę 20ml etanolu 50% (v/v) i 10ml wodnego roztworu octanu ołowiu (II) 150 g/l. Utrzymywać 2 min we wrzeniu, pozostawić do ochłodzenia i odwirować. Wytrząsnąć roztwór nadsączu 2 porcjami, każda po 15 ml chloroformu; rozdzielić 2 warstwy przez odwirowanie, jeżeli to konieczne. Osuszyć warstwy chloroformowe bezwodnym siarczanem sodu i przesączyć. Odparować 10 ml roztworu do sucha na łaźni wodnej a pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny równych objętości chloroformu i metanolu.

Roztwór porównawczy. Rozpuścić 5 mg purpureaglikozydu A, 2 mg purpureaglikozydu B, 5 mg digitoksyny i 2 mg gitoksyny w mieszaninie równych objętości chloroformu i metanolu, następnie uzupełnić mieszaniną takich samych rozpuszczalników do 10 ml.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 20 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego i rozwijać na wysokość 10 cm fazą ruchomą woda : metanol : octan etylu (7,5:10:75 v/v/v). Wsuszyć do odparowania rozpuszczalników.

Detekcja. Spryskać mieszaniną 2 objętości roztworu chloraminy (10 g/l) i 8 objętości roztworu (250 g/l) kwasu trichlorooctowego w etanolu 96%, następnie ogrzewać 10 min. w temp. 100-105°C. Obejrzeć w nadfiolecie przy 365 nm. Chromatogram roztworu porównawczego wykazuje pasmo o jasnoniebieskiej fluorescencji w dolnej części chromatogramu, odpowiadające purpureaglikozidowi B i tuż powyżej, pasmo o brunatnawożółtej fluorescencji odpowiadające purpureaglikozidowi A. Pasma o jasnoniebieskiej fluorescencji odpowiadające gitoksynie pojawia się w środku chromatogramu, a powyżej pasmo o brunatnawożółtej fluorescencji odpowiadające digitoksynie. Pasma na chromatogramie roztworu badanego wykazują położenie, zabarwienie i wielkość zgodną z pasmami na chromatogramie roztworu porównawczego. Na chromatogramie roztworu badanego mogą się również pojawić inne fluoryzujące pasma.

Reakcje barwne

- I. Odparować 5 ml roztworu chloroformowego otrzymanego przy wykonywaniu roztworu podstawowego w poprzednim oznaczeniu do sucha na łaźni wodnej. Do pozostałości dodać 2 ml roztworu kwasu dinitrobenzoesowego (20 g/l) w etanolu 96% i 1 ml roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l). Powstaje w czasie 5 min czerwono-fioletowe zabarwienie.

- II. Odparować 5 ml roztworu chloroformowego otrzymanego podczas przygotowywania roztworu badanego w poprzednim oznaczeniu do sucha na łaźni wodnej. Do pozostałości dodać 3 ml odczynnika z ksanthydrolem i ogrzewać 3 min na łaźni wodnej. Powstaje czerwone zabarwienie.

Przygotowanie odczynnika z ksanthydrolem.

Do 0,1 ml roztworu (100g/l) ksanthidrolu w metanolu dodać 100 ml bezwodnego kwasu octowego i 1 ml kwasu solnego stęż. Pozostawić na 24 h przed użyciem.

Oznaczanie zawartości kardenolidów w *Digitalis purpureae folium* wg FPVIII

Roztwór badany. Wytrząsać 1 h 0,250 g sproszkowanego surowca z 50,0 ml wody. Dodać 5 ml roztworu octanu ołowiu (II) (150 g/l), wytrząsnąć, a po kilku minutach dodać 7,5 ml wodorofosforanu sodu (40 g/l). Przesączyć przez karbowany sączonek bibułowy. Ogrzewać 50,0 ml przesącza z 5 ml kwasu solnego (150 g/l) 1h pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej. Przenieść do rozdzielacza, przemyć kolbę 2 porcjami, każda po 5 ml, wody i wytrząsnąć 3 porcjami każda po 25 ml chloroformu. Osuszyć połączone fazy chloroformowe bezwodnym siarczanem sodu i uzupełnić chloroformem do 100,0 ml. Odparować 40,0 ml roztworu chloroformowego do sucha, pozostałość rozpuścić w 7 ml etanolu 50% (v/v), dodać 2 ml roztworu kwasu dinitrobenzoesowego 20g/l w etanolu 96% i 1 ml mianowanego roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l). W tym samym czasie przygotować roztwór porównawczy jak podano poniżej:

Roztwór porównawczy. Rozpuścić 50,0 mg digitoksyny w etanolu 96% i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 50,0 ml. Uzupełnić 5,0 ml tego roztworu etanolem 96% do 50,0 ml. Do 5,0 ml otrzymanego roztworu dodać 25 ml wody i 3 ml kwasu solnego (150 g/l). Ogrzewać roztwór 1 h pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej i postępować jak podano powyżej.

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję 2 roztworów przy 540 nm kilka razy w czasie pierwszych 12 min aż do osiągnięcia maksimum, używając jako odnośnika mieszaniny 7 ml etanolu 50% (v/v), 2 ml roztworu kwasu dinitrobenzoesowego 20g/l w etanolu 96% i 1 ml mianowanego roztworu wodorotlenku sodu (1 mol/l).

Z pomiaru absorbancji i stężeń roztworów, obliczyć zawartość glikozydów kardenolidowych, w przeliczeniu na digitoksynę.

Podpowiedź. Przy zastosowaniu odważki surowca równej 0,25 g i odważki digitoksyny równej 0,05 g na mierzone objętości analizów przypada 0,10 g surowca i 0,0005 g digitoksyny. Posługując się regułą trzech można obliczyć zawartość kardenolidów (%).

Oznaczanie zawartości kardenolidów w *Digitalis lanatae folium* z użyciem odczynnika ksanthydrolowego

Roztwór badany. Odważyć dokładnie 1,0 g sproszkowanego surowca, przenieść do kolby stożkowej o poj. 250 ml, dodać 100 ml metanolu 50% i wytrząsać mechanicznie przez 1 godzinę. Następnie dodać 2,5 ml roztworu octanu ołowiawego 30%, zmieszać i nie przesączając wytrącić nadmiar jonów ołowiu roztworem wodorofosforanu sodowego 15%. Koniec wytrącania jonów ołowiu poznaje się po tym, że nie powstaje żółty osad w miejscu dodania kropli roztworu jodku potasowego 2%. Dokładnie wymieszać zawartość kolby i po opadnięciu osadu na dno, przesączyć. Pozostały w kolbie osad oraz sączek przemyć trzykrotnie metanolem 50% po 10 ml każdorazowo. Połączone przesącze umieścić w rozdzielaczu o poj. 250 ml i wytrząsać pięciokrotnie z chloroformem po 25 ml. Zebrane wyciągi chloroformowe wysuszyć bezwodnym siarczanem sodowym, przesączyć do kolby okrągłodennej i odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 35-40°C. Pozostałość rozpuścić w dokładnie odmierzonej 1 ml mieszaniny chloroformu i metanolu (1:1).

Krzywa wzorcowa. Odważyć dokładnie 0,010 g wzorcowego lanatozydu C, uprzednio suszonego nad kwasem siarkowym w ciągu 24 godzin, przenieść do kolby miarowej poj. 100 ml, dodać mieszaninę równych części metanolu i chloroformu, zmieszać do rozpuszczenia i uzupełnić do kreski. Na kwadraty bibuły chromatograficznej Whatman nr 3 (2x2 cm) zaimpregnowanej mieszaniną formamidu z acetonem (1:3), nanieść następujące ilości wzorcowego roztworu 0,25; 0,50; 1,0; 1,50; 2,0 cm³, co odpowiada 25, 50, 100, 150 i 200 µg lanatozydu C. Po wysuszeniu w 120° C (20 minut) każdy kwadrat bibuły pociąć na kwadraty o bokach 2 mm, umieścić w probówce, dodać 5 ml odczynnika ksanthydrolowego i wytrząsać w ciągu 3 minut. Probówki ogrzać na łaźni wodnej w ciągu 5 minut i chłodzić w zimnej wodzie przez 15 minut. Zmierzyć wartość absorbancji promieniowania w 1 cm naczynkach przy długości fali 530 nm lub przy zielonym filtrze. Jako próbę porównawczą stosować odczynnik ksanthydrolowy, w którym wytrząsano pocięty kwadrat bibuły bez naniesionego roztworu lanatozydu C.

Na podstawie uzyskanych wyników wykreślić krzywą wzorcową.

Oznaczenie. Na kwadraty bibuły do chromatografii Whatman nr 3 o wymiarach 2x2 cm nanieść dokładnie odmierzone mikropipetą 0,02 ml wyciągu. Po wysuszeniu kwadraty bibuły pociąć na kwadraty o bokach 2 mm, umieścić w probówkach, dodać 5 ml odczynnika ksanthydrolowego, wytrząsać w ciągu 3 minut, wstawić do łaźni wodnej na 5 minut, a następnie chłodzić w zimnej wodzie w ciągu 15 minut. Zmierzyć wartość

absorbancji promieniowania w 1 cm naczynkach przy długości fali 530 nm lub przy zielonym filtrze, stosując jako próbę porównawczą roztwór przygotowany identycznie z kwadratu bibuły, na który nie naniesiono wyciągu.

Ogólną zawartość glikozydów obliczyć wg wzoru:

$$f \times \frac{100}{a}$$

a – ilość surowca wzięta do oznaczania (odpowiadająca objętości wyciągu naniesionego na kwadrat bibuły) w mg;

f – zawartość lanatozydu C w przeliczeniu na mg, odczytana z krzywej wzorcowej.

Przygotowanie odczynników.

- I. odczynnik Keddego: etanolowy roztwór kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego 2% mieszać z wodnym roztworem wodorotlenku potasowego 1,5 n w stosunku obj. (1:1); odczynnik przechowywać w niskiej temp.; zabarwienie plam występuje po upływie 1-3 minut od spryskania; barwy plam są nietrwałe
- II. odczynnik ksanthydroloy: 0,020 g ksanthydrołu rozpuścić w 50 ml kwasu octowego lod.; dodać 2 ml stęż. kwasu solnego i uzupełnić kwasem octowym do obj. 100 cm³; odczynnik przygotować bezpośrednio przed oznaczeniem

Chromatografia cienkowarstwowa *Adonidis vernalis herba* i *Convallariae herba*

Wyciąg badany. 1,5 g sproszkowanego surowca umieścić w kolbie stożkowej poj. 250 ml, dodać 75 ml metanolu 50% i wytrząsać mechanicznie przez godzinę. Surowiec odsączyć, przemyć dwukrotnie 5 ml metanolu 50%. Do wyciągu dodać 2,5 ml roztworu octanu ołowiawego 30%, dobrze wymieszać. Nadmiar ołowiu wytrącić przez dodanie ok. 2 ml wodorofosforanu dwusodowego 15%, sprawdzić koniec wytrącania roztworem jodku potasowego 2% (w obecności jonów Pb²⁺ w miejscu dodania jodku potasowego powstaje żółty osad). Osad odsączyć na karbowanym sączku, przemyć dwukrotnie 10 ml metanolu 50%. Połączone przesącze przenieść do rozdzielacza, przeprowadzić ekstrakcję najpierw 3-krotnie chloroformem biorąc każdorazowo po 35 ml tego rozpuszczalnika, następnie 3-krotnie po 15 ml mieszaniny chloroform : metanol (3:2 v/v). Połączone ekstrakty osuszyć bezwodnym siarczanem sodowym, oddestylować całkowicie rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny chloroform – metanol (1:1 v/v).

Chromatografia. Na płytki o wymiarach 10x20 cm pokryte żelom krzemionkowym nanieść pasmowo 10-30 µl wyciągu z ziela konwalii lub 5-10 µl wyciągu z ziela miłki wiosennej. Płytki rozwijać na wys. 18 cm fazą ruchomą metyloetyloketon : toluen : woda :

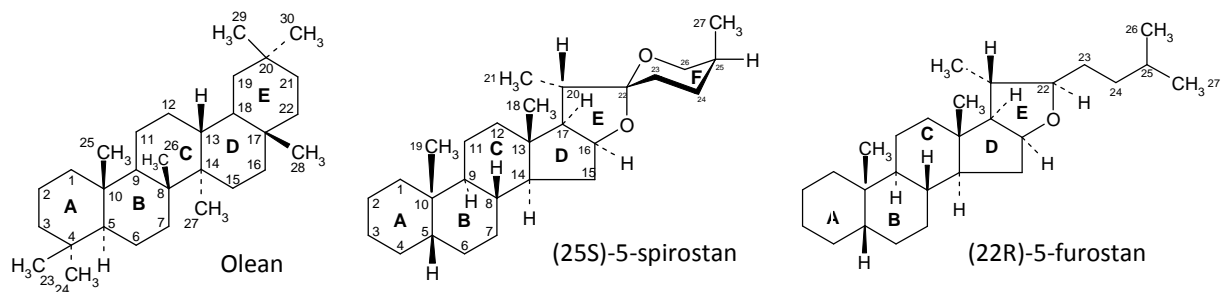
metanol : kwas octowy lod. (40:5:3:2,5:1 v/v/v/v/v). Rozwinięte chromatogramy suszyć 30 minut w temp. pokojowej.

Detekcja. Spryskać najpierw kwasem siarkowym (roztwór etanolowy 2%) a po 5 min etanolowym roztworem waniliny 2%, ogrzewać kilka minut w temp. 100°C i oglądać w świetle dziennym. Na chromatogramach z ziela miłka wiosennego widocznych jest około 10 plam o zabarwieniu szarym bądź fioletowoszarym; na chromatogramach z ziela konwalii 8 plam o zabarwieniu brunatnozielonym (konwalatoksyna), niebieskim i fioletowoszarym.

SAPONINY

Saponiny (saponozydy) są glikozydami roślinnymi, które odznaczają się specyficznymi właściwościami fizycznymi: obniżają napięcie powierzchniowe wody, wywołują efekt pienienia. Ta właściwość wynika z obecności w cząsteczce lipofilowego aglikonu i hydrofilowej reszty cukrowej. Większość saponin ma zdolność emulgowania tłuszczu, tworzenia ze sterolami trudno rozpuszczalnych kompleksów, hemolizowania erytrocytów. W większości saponiny są substancjami bezpostaciowymi, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie i alkoholu.

Saponiny zawierają triterpenowy lub steroidowy aglikon oraz jedną do kilkunastu reszt cukrowych.

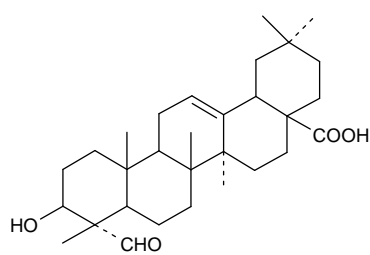


Saponozydy triterpenowe mogą zawierać jeden łańcuch cukrowy przyłączony w pozycji C-3 aglikonu (monodesmozydy) lub dwa łańcuchy (bidesmozydy), przy czym jeden z łańcuchów jest zawsze połączony z grupą OH w pozycji C-3 aglikonu.

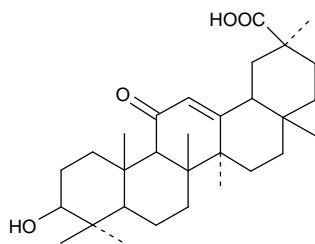
W saponozydach steroidowych z układem furostanu reszty cukrowe są zwykle przyłączone do grup OH w pozycjach C-3 i C-26, w pochodnych spirostanu zwykle w pozycji C-3.

Składnikami łańcuchów cukrowych saponin są: D-glukoza, D-galaktoza, D-ksyloza, D-arabinoza, L-ramnoza, L-fukoza, kwas glukuronowy. Niektóre saponiny triterpenowe zawierają dodatkowo reszty kwasów organicznych przyłączonych do grupy OH aglikonu lub cukru (saponiny estrowe). Charakter estrowy mają także saponiny, w których reszta cukrowa jest przyłączona do grupy COOH aglikonu np. kwasu oleanolowego. Saponozydy mające wolną grupę COOH w aglikonie lub kwas uronowy w części cukrowej mają charakter kwaśny.

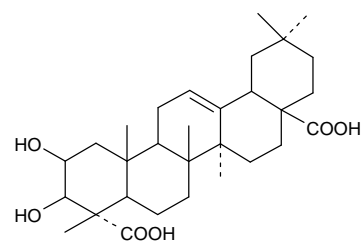
Saponozydy triterpenowe mają w większości aglikony pentacykliczne z 30 atomami węgla. Ich podstawą strukturą jest olean-12-en (pochodne β -amyryny). Do tej grupy należą m.in. saponiny pierwiosnka, lukrecji, mydlnicy, kasztanowca, senegi, bluszczu, eleuterokoka, połonicznika, nawłoci.



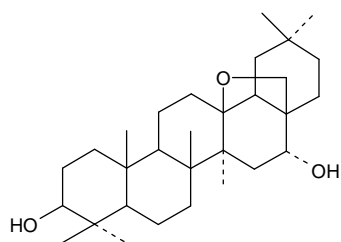
Gipsogenina



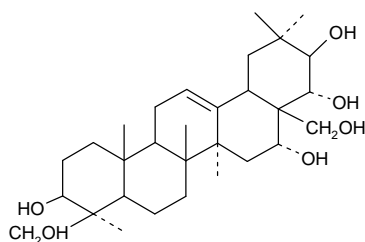
Kwas glicyretynowy



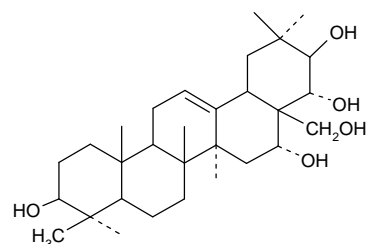
Kwas medykenowy



Protoprymulagenina

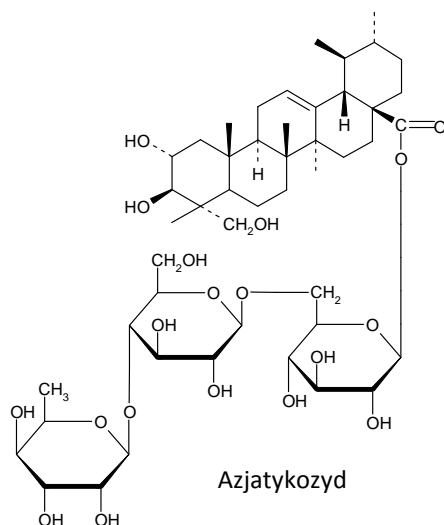


Protoescygenina



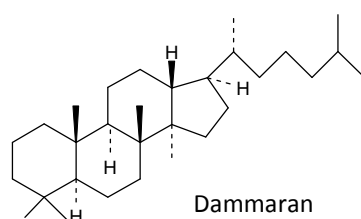
Baryngtogenol C

Niewielka liczba saponin ma aglikon o izomerycznej strukturze ursanu (pochodne α -amyryny). Należą tu związki czynne wąkroty azjatyckiej (azjatykozyd).



Azjatykozyd

Odmienny typ budowy reprezentują saponozydy żeńszenia, których aglikonami są tetracykliczne triterpeny zawierające układ dammaranu.



Dammaran

Saponiny steroidowe występują głównie w roślinach klimatu tropikalnego, m.in. w rodzajach *Smilax*, *Dioscorea*, *Agava* i *Yucca*. Izolowane z nich saponiny służą jako półprodukty do syntezy kortykosteroidów i hormonów płciowych. Rzadziej spotykane są

w roślinach klimatu umiarkowanego: w rodzaju *Digitalis*, nasionach kozieradki, kłączu ruszczyka.

Surowcem o znaczeniu leczniczym ze względu na obecność saponin sterydowych jest kłącz ruszczyka.

Działanie farmakologiczne. Saponiny są grupą związków biologicznie czynnych. Podawane parenteralnie są silnymi truciznami, wywołują hemolizę czerwonych krwinek (wyjątek stanowią glicyryzyna i escyna). Podawane doustnie nie wykazują działania toksycznego, ponieważ nie są resorbowane z przewodu pokarmowego. Działają drażniąco na błony śluzowe błony ustnej, nosa, gardła powodując odruch kaszlu, kichanie i silne wydzielanie śluzu. Wyciągi z surowców *Liquiritiae radix*, *Primulae radix*, *Saponariae radix*, *Hederae herba* są stosowane jako leki wykrztuśne. Niektóre saponiny działają przeciwzapalnie (glicyryzyna). Przeciwwysiękową i przeciwobrzękową aktywność wykazują escyna i ruscyna; są one stosowane w leczeniu żylaków. Większość saponin działa fungistatycznie, niektóre także cytostatycznie. Bakteriostatycznie na prątki gruźlicy i trądu działają saponiny wąkroty azjatyckiej.

Surowce lecznicze: *Liquiritiae radix*, *Primulae radix*, *Saponariae radix*, *Hippocastani semen*, *Hederae herba*, *Rusci rhizoma*, *Ginseng radix*, *Centellae asiaticae herba*.

Metodyka analizy surowców saponinowych

Klasyczne metody wykrywania saponin i oceny surowców saponinowych oparte są na fizycznych i biologicznych właściwościach tych związków, tj. zmniejszaniu napięcia powierzchniowego roztworów wodnych (próba pienienia), hemolizowaniu erytrocytów oraz toksyczności dla ryb.

Negatywny wynik próby pienienia prawie zawsze wskazuje na brak saponin w badanym surowcu, natomiast wynik pozytywny musi być potwierdzony badaniem aktywności hemolitycznej lub reakcjami chemicznymi, ponieważ oprócz saponin niektóre inne składniki surowców, jak: białka, śluzy, garbniki mogą powodować przy wstrząsaniu wodnych roztworów tworzenie się dość trwałej piany.

Zjawisko hemolizy polega na przechodzeniu hemoglobiny z erytrocytów do otaczającego je płynu na skutek uszkodzenia otoczki. Uszkodzenie to następuje w wyniku wiązania się saponin z lipofilną, sterydową częścią otoczki, która wypełnia wolne przestrzenie struktury białkowej. Hemolizę rozpoznaje się po tym, że początkowo mętna, matowo-czerwonej barwy zawiesina krwi zmieszana z roztworem saponiny staje się po pewnym czasie klarowna i przybiera czystą czerwoną barwę. Jeśli nie następuje hemoliza,

erytrocyty po pewnym czasie opadają na dno probówki, a ciecz nad nimi staje się bezbarwna. Przy wykonywaniu próby hemolizy należy ściśle przestrzegać określonych warunków, ponieważ na wynik próby w znacznym stopniu mogą wpływać takie czynniki jak: hipertonia lub hypotonia roztworów, zmiany pH, obecność rozpuszczalników organicznych i inne. Niektóre saponiny, np. glicyryzyna (saponina korzenia lukrecji) nie wykazują wyraźnej aktywności hemolitycznej.

Analiza jakościowa. Rozdział chromatograficzny saponin, szczególnie triterpenowych kwaśnych, nie zachodzi łatwo. Analizę wyciągu lub wydzielonej frakcji saponin przeprowadza się najczęściej metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, co umożliwi użycie odczynników o odczynie silnie kwaśnym do wywołania chromatogramów.

Chromatografii poddaje się wyciągi wodno-metanolowe, które należy przynajmniej częściowo pozbawić substancji balastowych, utrudniających rozdział i identyfikację saponin. Oczyszczanie wyciągu można przeprowadzić przez ogrzewanie z węglem aktywnym, wytrącanie saponin z roztworu wodno-metanolowego rozpuszczalnikami o mniejszej polarności lub przez adsorpcję balastów na odpowiednim nośniku. Jako fazy ruchome stosuje się mieszaniny rozpuszczalników o różnej polarności, często z dodatkiem kwasu octowego, kwasu mrówkowego lub amoniaku.

Do wywołania chromatogramów stosuje się odczynniki dające barwne połączenia z saponinami: odczynnik Liebermanna-Burcharda, chloroformowe roztwory trój- i pięciochlorku antymonu, aldehyd anyżowy, wanilinę z kwasem siarkowym, kwas fosforowolframowy. Zabarwienie z odczynnikami zależy głównie od budowy aglikonu. Żaden z wymienionych odczynników nie jest specyficzny wyłącznie dla saponin. W celu odróżnienia saponin od innych związków mogących dawać reakcje barwne ze stosowanymi odczynnikami, można rozwinięty chromatogram przed spryskaniem odczynnikiem wystawić na działanie pary wodnej lub delikatnie opryskać wodą. W wyniku zmniejszenia napięcia powierzchniowego plamy saponin uwidaczniają się wyraźnie na ciemniejszym tle.

Chromatogramy wyciągów z surowców zawierających saponiny hemolizujące, np. *Saponariae radix*, *Primulae radix*, *Herniariae herba* można wywołać wykonując próbę hemolizy. Na rozwinięty, dobrze wysuszony chromatogram wylewa się specjalnie przygotowany roztwór żelatyny z krwią. Po pewnym czasie w miejscach zaadsorbowanych saponin obserwuje się hemolizę krwinek, powodującą odbarwienie się żelatyny.

Analiza ilościowa. Opracowane dotychczas metody oznaczania zawartości saponin w surowcach roślinnych można podzielić na biologiczne i fizykochemiczne z wyróżnieniem metod spektrofotometrycznych.

Metody biologiczne polegają na określeniu względnej aktywności biologicznej surowca w porównaniu z saponiną wzorcową, którą najczęściej jest saponina otrzymana z korzeni *Gypsophila paniculata* (*Caryophyllaceae*) zwana saponiną (np. *Saponinum album* firmy Merck).

Z metod biologicznych najczęściej stosowana jest metoda hemolityczna. Polega ona na ustaleniu najmniejszego stężenia saponiny lub wyciągu z surowca, powodującego jeszcze całkowitą hemolizę erytrocytów. Jednocześnie z badanym wyciągiem należy każdorazowo określić najmniejsze stężenie saponiny wzorcowej, powodujące w warunkach doświadczenia całkowitą hemolizę.

Wskaźnik hemolityczny W_h (indeks hemolityczny IH) wyraża ilość ml 2%-owej zawiesiny krwinek, która jest całkowicie hemolizowana przez wyciąg z 1 g surowca, względnie roztworem 1 g saponiny wzorcowej, przy zachowaniu ściśle określonych warunków.

Wykorzystując zdolność saponin do tworzenia barwnych połączeń z niektórymi odczynnikami, jak: stężony kwas siarkowy, wanilina z kwasem siarkowym, chlorek kobaltowy lub żelazowy w kwasie octowym z dodatkiem kwasu siarkowego, odczynnik Liebermanna-Burcharda, opracowano szereg metod spektrofotometrycznych oznaczenia zawartości saponin. Reakcje te nie są specyficzne i dlatego oznaczenia ilościowe wymagają zazwyczaj uprzedniego dokładnego oczyszczenia wyciągu od substancji towarzyszących.

Wartości absorbancji barwnych połączeń w różnych zakresach widma są uzależnione od budowy aglikonów, zatem każdy z surowców wymaga zastosowania indywidualnej metodyki oznaczenia z uwzględnieniem odpowiedniej wzorcowej saponiny lub sapogeniny.

Metody spektrofotometryczne posiadają obecnie ograniczone zastosowanie. Dla ważniejszych surowców, których składniki zespołu saponozydów są dobrze określone, opracowana została metodyka oznaczania zawartości saponin z wykorzystaniem chromatografii ciekłej. Należą do nich: korzeń lukrecji i przetwory z surowca, ziele wąkroty azjatyckiej, korzeń żeńszenia, kłącze ruszczyka, liść bluszczu.

Surowce saponinowe

***Liquiritiae radix* – korzeń lukrecji**

Syn.: *Glycyrrhizae radix*

Surowcem są okorowane lub nieokorowane korzenie i rozłogi lukrecji gładkiej, *Glycyrrhiza glabra* L. i/lub *G.inflata* Bat. i/lub *G. uralensis* Fisch. (*Fabaceae*), zebrane z roślin kilkuletnich późną jesienią lub wczesną wiosną i wysuszone. Surowiec leczniczy otrzymuje się głównie z *Glycyrrhiza glabra var. glabra* i *G. glabra var. glandulifera*.

Surowiec zawiera saponiny triterpenowe, których głównym składnikiem jest glicyryzyna (2-9%), będąca solą potasową lub wapniową kwasu glicyryzynowego, tj. 3-diglukuronidu kwasu glicyretynowego. Zawartość kwasu glicyryzynowego oznaczona metodą chromatografii cieczowej winna wynosić nie mniej niż 4,0%. Glicyryzyna jest saponiną niehemolizującą, silnie pieniącą się, o słodkim smaku i właściwościach przeciwzapalnych. Drugą grupą związków czynnych surowca są flawonoidy – pochodne flawanonu (likwirytyna, likwirytygenina), chalkonu (izolikwirytyna, izolikwirytygenina), izoflawonu (formononetyna). Ponadto w surowcu występują hydroksykumaryny, kwasy organiczne, cukry i żywice.

***Primulae radix* – korzeń pierwiosnki**

Surowcem są wysuszone korzenie i kłącza pierwiosnki lekarskiej, *Primula officinalis* Jacq. lub pierwiosnki wyniosłej, *Primula elatior* Hill. (*Primulaceae*).

Korzeń pierwiosnki zawiera 5-10% triterpenowych saponin hemolizujących (Wh ok. 2300). Dominującym składnikiem jest prymulasaponina A (kwas prymulowy), której aglikonem jest protoprymulagenina A, pochodna oleananu z mostkiem eterowym pomiędzy C-13 i C-28 a składnikami glikonu: glukoza, galaktoza, ramnoza i kwas glukuronowy. Ponadto w surowcu występują fenologlikozydy (prymwerozyd), których aglikony będące estrami metylowymi kwasu p- i m-metoksylsalicylowego warunkują charakterystyczny zapach surowca.

***Saponariae radix* – korzeń mydlnicy**

Syn.: Mydlik

Surowcem są podziemne części mydlnicy lekarskiej, *Saponaria officinalis* L., (*Caryophyllaceae*), zebrane późną jesienią lub wczesną wiosną i szybko wysuszone.

Korzeń mydlnicy zawiera 2-5% saponozydów triterpenowych, hemolizujących (Wh powyżej 1000), zwanych saporubiną. Jest to mieszanina kwaśnych saponozydów triterpenowych mono- i bisdesmozydowych, których głównym aglikonem jest kwas kwilajowy.

***Herniariae herba* – ziele połonicznika**

Surowiec pochodzi z gatunków *Herniaria glabra* L. lub *H. hirsuta* L. (*Caryophyllaceae*). Zawiera ok. 10% saponin triterpenowych hemolizujących (glabrozydy), których aglikonem jest kwas medykagenowy. Ponadto występują flawonoidy (glikozydy kwercetyny i izoramnetyny), kumaryny i fenolokwasy.

***Hederae helicis folium* – liść bluszczu**

Surowcem są wysuszone liście bluszczu pospolitego *Hedera helix* L. (*Araliaceae*), zebrane wiosną, o zawartości hederakozydu C nie mniejszej niż 3,0%.

Hederakozyd C jest głównym składnikiem zespołu saponin bluszczu, występujących w ilości ok. 5%. Są to bisdesmozydy, których agikonami są: hederagenina, kwas oleanolowy i bajogenina. Surowiec (wyłącznie w postaci wyciągów) jest stosowany w kaszlu.

***Centellae asiaticae herba* – ziele wąkroty azjatyckiej**

Surowcem są wysuszone, rozdrobnione nadziemne części *Centella asiatica* (L.) Urban (*Hydrocotyle asiatica* L.), (*Apiaceae*) zawierające nie mniej niż 6,0% pochodnych triterpenowych w przeliczeniu na azjatykozyd. Azjatykozyd i madekasozyd są saponozydami, których aglikony są pochodnymi kwasu ursolowego a reszty cukrowe są przyłączone estrowo do grupy karboksylowej przy C-17. Azjatykozyd wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwgruźlicze i przeciwtrądzowe (niszczy otoczkę *Mycobacterium lepre* i *M. tuberculosis*).

***Polygalae radix* – korzeń senegi**

Surowcem są korzenie *Polygala senega* L. (*Polygalaceae*) i innych gatunków rodzaju *Polygala*. Surowiec zawiera 6-10% saponin triterpenowych, przeważnie bisdesmozydowych, pochodnych preseneginy, w których cukry są acylowane resztami kwasów przeważnie pochodnych kwasu cynamonowego.

***Rusci rhizoma* – kłącze ruszczyka**

Surowiec stanowią kłącza z korzeniami śródziemnomorskiej rośliny *Ruscus aculeatus* L. (*Ruscaceae*) o zawartości sapogenin sterydowych ruskogeniny i neoruskogeniny nie mniejszej niż 1,0% (oznaczanie metodą HPLC). W obiegu są przetwory z surowca, surowiec jako taki nie jest spotykany w aptekach.

***Ginseng radix* – korzeń żeń-szenia**

Surowiec występuje w dwóch postaciach: żeń-szeń biały uzyskany przez działanie dwutlenku siarki i wysuszeniu na powietrzu korzeni 4-6 letnich roślin *Panax ginseng* C.A. Meyer (*Araliaceae*) oraz żeń-szeń czerwony uzyskany przez poddanie korzeni tej samej rośliny działaniu gorącej pary wodnej przez 2-3 h (karmelizacja cukrów). W obydwu sortach wymagana jest zawartość sumy ginsenozydów Rg1 i Rb1 nie mniejsza niż 0,4%.

Korzeń żeń-szenia zawiera mieszaninę glikozydów triterpenowych, których aglikonami są protopanaxadiol i protopanaxatriol wywodzące się od układu dammaranu. Oprócz tego występują: poliacetyleny, seskwiterpeny, sterole, olejek eteryczny, sacharydy.

Przetwory z surowca są składnikami wielu preparatów gotowych występujących na rynku europejskim, przeważnie wieloskładnikowych.

Próba pienienia

Do 0,5 g sproszkowanego surowca dodać w probówce 10 ml wrzącej wody, pozostawić do ostygnięcia i wytrząsać silnie ok. 10 sek. Jeśli surowiec zawiera saponiny tworzy się warstwa piany wys. 1-10 cm, która jest trwała przez co najmniej 10 minut i nie znika po dodaniu kilku kropli 2n kwasu solnego (odróżnienie od mydeł).

Chromatografia cienkowarstwowa *Liquiritiae radix*, *Primulae radix*, *Saponariae radix*, *Herniariae herba*

Roztwór badany. 0,2 g sproszkowanego surowca ogrzewać 20 minut w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną z 10 ml metanolu 50%. Dodać 0,1 g węgla aktywnego, ogrzewać jeszcze 3 minuty, po czym przesączyć na gorąco przez bibułę.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść pasmowo roztwór badany w ilościach 30, 50 i 100 µl. Chromatogram rozwinąć na wysokość 18 cm fazą ruchomą chloroform : metanol : woda (64:36:8 v/v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu chromatogram spryskać delikatnie wodą. Zaznaczyć białe plamy na ciemniejszym, szarzielonkawym tle. Płytkę wysuszyć dokładnie w temp. 110°C i jeszcze gorącą spryskać odczynnikiem Liebermanna-Burcharda. Jeśli nie wystąpiło zabarwienie płytkę ogrzać ponownie przez 5 minut w temp. 110°C. Chromatogram oglądać w świetle dziennym i UV (365 nm). Plamy saponozydów ziela połonicznika (Rf 0,12-0,30) barwią się żółtobrunatno lub zielonkawo, korzenia lukrecji (Rf 0,18) fioletowobrunatno, korzenia pierwiosnki (Rf 0,20-0,30) czerwono-fioletowo, korzenia mydlnicy (Rf 0,15-0,25) brunatno.

Przygotowanie odczynnika Liebermanna-Burcharda:

Do 50ml bezwodnego alkoholu etylowego przy stałym chłodzeniu i mieszaniu dodać 5ml bezwodnika octowego i 5 ml kwasu siarkowego stęż.

Chromatografia cienkowarstwowa *Primulae radix*, *Polygalae radix*, *Ginseng radix*, *Centellae asiaticae herba* wg FPVIII

Roztwór badany. Do 1,0 g sproszkowanego surowca dodać 10 ml etanolu 70% i ogrzewać 15 min pod chłodnicą zwrotną. Ostudzić i przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym F₂₅₄ nanieść po 20 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (10 mg escyny w 1,0 ml etanolu 70%). Płytkę rozwijać na wysokość 12 cm fazą ruchomą n-butanol : woda : kwas octowy lodowaty (50:40:10 v/v/v) (*Polygala i Primula*); octan etylu : woda : butanol (10:20:40 v/v/v) – warstwa górna (*Ginseng*), kwas octowy : kwas mrówkowy : woda : octan etylu (11:11:27:100 v/v/v/v) (*Centella*). Rozwinięte chromatogramy suszyć w suszarce w temp. 100-105°C.

Detekcja. Obejrzyć w nadfiolecie przy 254 nm a następnie spryskać odcz. z aldehydem anyżowym, ogrzać w temp. 100-105°C i obejrzyć w świetle dziennym. Saponiny obecne w surowcach widoczne są jako pasma o wygaszonej fluorescencji a po spryskaniu odczynnikiem barwią się na niebieskofioletowo (escyna), fioletowo (glicyryzyna, ginsengozydy), ciemnofioletowo (prymulasaponina), zielononiebiesko (azjatykozyd) lub czerwono (seneginy). Pasma escyny, prymulasaponiny, polygalasaponin, glicyryzyny, ginszenozydów Rb1, Rb2 i Rc znajdują się w dolnej 1/3 części chromatogramu, pozostałe saponozydy migrują wyżej.

Przygotowanie odczynnika z aldehydem anyżowym:

Zmieszać w następującej kolejności: 5g aldehydu anyżowego, 10 ml lodowatego kwasu octowego, 85 ml metanolu i 5ml kwasu siarkowego stęż.

Chromatografia cienkowarstwowa *Liquiritiae radix* wg FP VIII

Roztwór badany. Do 0,50 g sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie okrągłodennej poj. 50 ml dodać 16,0 ml wody i 4,0 ml kwasu solnego i ogrzewać 30 min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Ochłodzić i przesączyć. Suszyć sączek i kolbę okrągłodeną 60 min w temp. 105°C. Umieścić sączek w kolbie okrągłodennej, dodać 20,0 ml eteru etylowego i ogrzewać 5 min w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temp. 40°C. Ochłodzić i przesączyć. Odparować przesącz do sucha. Pozostałość rozpuścić w 5,0 ml eteru etylowego.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym F₂₅₄ nanieść po 10 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (5,0 mg kwasu glicyretynowego i 5,0 mg tymolu w 5,0 ml eteru etylowego). Płytkę rozwijać na wysokość

15 cm fazą ruchomą stężony wodorotlenek amonowy : woda : etanol 96% : octan etylu (1:9:25:65 v/v/v/v). Wyszuszyć na powietrzu.

Detekcja. Obejrzyć w nadfiolecie przy 254 nm. Chromatogramy roztworu badanego i roztworu porównawczego wykazują w dolnej połowie pasmo o wygaszonej fluorescencji odpowiadające kwasowi glicyretynowemu. Spryskać roztworem aldehydu anyżowego, ogrzewać 5-10 min w temp. 100-105°C i obejrzyć w świetle dziennym. Chromatogram roztworu porównawczego wykazuje w dolnej połowie fioletowe pasmo odpowiadające kwasowi glicyretynowemu, a w górnej 1/3 części chromatogramu czerwone pasmo odpowiadające tymolowi. Chromatogram roztworu badanego wykazuje w dolnej połowie fioletowe pasmo odpowiadające pasmu kwasu glicyretynowego na chromatogramie roztworu porównawczego i żółte pasmo (izolikwiritigenina) w górnej 1/3 części pod pasmem tymolu na chromatogramie roztworu porównawczego. Mogą wystąpić dodatkowe pasma.

Oznaczanie zawartości kwasu glicyryzynowego

Chromatografia cieczowa

Roztwór badany. Umieścić 1,000 g sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie stożkowej z doszlifowanym korkiem poj. 150 ml. Dodać 100,0 ml wodorotlenku amonowego (8 g/l) i umieścić na 30 min w łaźni ultradźwiękowej. Odwirować część roztworu i 1,0 ml nadsącza uzupełnić wodorotlenkiem amonowym (8 g/l) do 5,0 ml. Przesączyć roztwór przez sącze (0,45 µm) i użyć przesącza jako roztwór badany.

Roztwory porównawcze.

Roztwór A. Rozpuścić 0,130 g glicyryzianu monoamonowego w wodorotlenku amonowym (8 g/l) i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml.

Roztwór porównawczy (a). Uzupełnić 5,0 ml roztworu A wodorotlenkiem amonowym (8 g/l) do 100,0 ml.

Roztwór porównawczy (b). Uzupełnić 10,0 ml roztworu A wodorotlenkiem amonowym (8 g/l) do 100,0 ml.

Roztwór porównawczy (c). Uzupełnić 15,0 ml roztworu A wodorotlenkiem amonowym (8 g/l) do 100,0 ml.

Chromatografia. Chromatografię prowadzić na kolumnie o wymiarach 100x4 mm wypełnionej żelalem krzemionkowym do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi (5 µm). Elucję prowadzić fazą lodowaty kwas octowy : acetonitryl : woda (6:30:64 v/v/v). Objętość nastrzyku 10 µl. Szybkość przepływu: 1,5 ml/min. Detekcja przy pomocy spektrofotometru przy długości fali 254 nm.

Wyznaczyć krzywą wzorcową ze stężeń roztworów porównawczych (g/100 ml) na osi odciętych i odpowiadające powierzchnie (pików) na osi rzędnych.

Stosując czas retencji i powierzchnię pików wyznaczonego z chromatogramów roztworów porównawczych, umiejscowić i integrować pik kwasu glicyryzynowego na chromatogramie roztworu badanego.

Obliczyć procentową zawartość kwasu glicyryzynowego wg poniższego wzoru:

$$A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{822}{840}$$

A – stężenie glicyryzynianu monoamonowego w roztworze badanym wyznaczone z krzywej wzorcowej, w g/100 ml;

B – deklarowana procentowa zawartość glicyryzynianu monoamonowego;

m – masa substancji roślinnej, w gramach;

822 – masa cząsteczkowa kwasu glicyryzynowego;

840 – masa cząsteczkowa glicyryzynianu monoamonowego (bez wody krystalizacyjnej).

GARBNIKI

Garbniki roślinne są wielkocząsteczkowymi polifenolami o masie cząsteczkowej od 500 do 3000. Posiadają zróżnicowaną budowę chemiczną. Odznaczają się specyficznymi właściwościami fizykochemicznymi, m.in. zdolnością tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami. Właściwość ta jest wykorzystywana w procesie garbowania skóry, który prowadzi do zmiany surowej skóry zwierzęcej w skórę wyprawną.

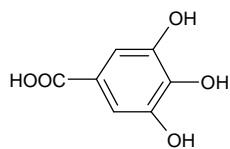
Uwzględniając budowę chemiczną można podzielić garbniki na dwie zasadnicze grupy:

1. garbniki ulegające hydrolizie (tanoidy)
2. garbniki nie ulegające hydrolizie (garbniki skondensowane, garbniki katechinowe, proantocyjanidyny).

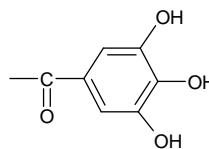
Garbniki hydrolizujące mają charakter estrów, bardzo rzadko glikozydów. Pod działaniem kwasów lub enzymów (tannaza) ulegają hydrolizie do cukrów lub alkoholi cukrowych oraz fenolokwasów.

W zależności od składnika kwasowego dzieli się je na galotaniny i elagotaniny.

Galotaniny są zazwyczaj estrami glukozy i kwasu galusowego (3,4,5-trihydroksybenzoesowego), względnie jego depsydów, tj. kwasów meta: di-, tri-, tetra- lub pentagalusowego.



Kwas galusowy



Reszta galoilowa

Galotaniny różnią się między sobą liczbą i położeniem reszt galoilowych względnie oligogaloilowych w cząsteczce cukru. Najprostszymi przedstawicielami mono- i di-galusanów glukozy są: 1-galoilo- β -D-glukoza (glukogalina) występująca w korzeniu rzewienia – *Rheum palmatum* L., 6-galoilo- β -D-glukoza oraz 3,6-digaloilo- β -D-glukoza występujące w kłęczu rdestu wężownika – *Polygonum bistorta* L. (*Polygonaceae*).

Oligogalusanany glukozy występują w zespole garbników otrzymywanych z różnych gatunków galasów, patologicznych narośli, występujących na dębach i sumakach.

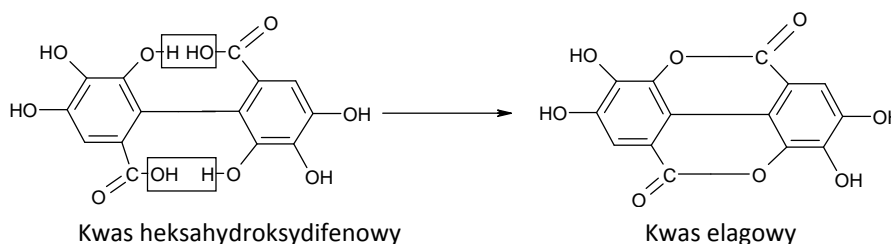
Tanina otrzymywana z galasu tureckiego (*Galla turtica*) jest mieszaniną oligogalusanów glukozy, zawierających 6 lub 7 cząsteczek kwasu galusowego na 1 cząsteczkę glukozy.

Galotanina otrzymywana z galasu chińskiego (*Galla chinense*) jest mieszaniną oligogalusanów glukozy, zawierających od 7 do 9 cząsteczek kwasu galusowego na cząsteczkę glukozy.

Garbniki typu galotanin dają w warunkach hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej kwas galusowy i glukozę (rzadko inny cukier).

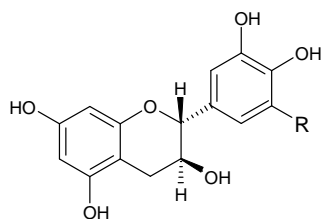
W **elagotaninach** występuje kwas elagowy związany glikozydowo z cukrem względnie jego prekursor, tj. kwas heksahydroksydifenowy związany estrowo z cukrem.

Hydroliza elagotanin prowadzi do powstawania kwasu elagowego (dilaktonu kwasu heksahydroksydifenowego) i odpowiedniego cukru, najczęściej glukozy.

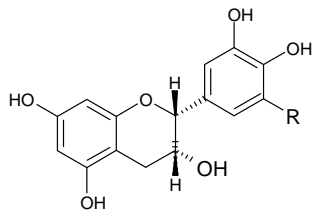


Garbniki skondensowane odgrywają w lecznictwie większą rolę niż garbniki hydrolizujące. Macierzystymi substancjami tej grupy garbników są najczęściej pochodne flawan-3-olu: (+)katechina (tetrahydroksy- pochodna) oraz (+)galokatechina (pentahydroksy- pochodna) z jednej strony, a z drugiej (-)epikatechina i (-)epigalokatechina. Wymienione pary związków różnią się konfiguracją przy C-3: katechina i galokatechina mają konfigurację (S) a epikatechina i epigalokatechina konfigurację (R). W budowie garbników skondensowanych biorą także udział leukoantocyjanidyny (hydroksylowe pochodne 3,4-dihydroksyflawanu).

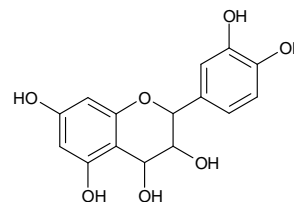
Katechiny i leukoantocyjanidyny są bezbarwnymi, krystalicznymi substancjami, nie posiadają właściwości garbujących. Łatwo ulegają polimeryzacji lub polikondensacji tworząc bezpostaciowe, rozpuszczalne w wodzie oligomery, których cząsteczki są połączone ze sobą heteropolarnym wiązaniem C-C. W żywych roślinach proces ten jest katalizowany przez specyficzne enzymy typu oksydaz; w wyniku odwodornienia i kondensacji powstają polimery o dużej masie cząsteczkowej (niekiedy powyżej 2000), które mają cechy garbników.



(+)katechiny R= -H
(+)galokatechiny R= -OH



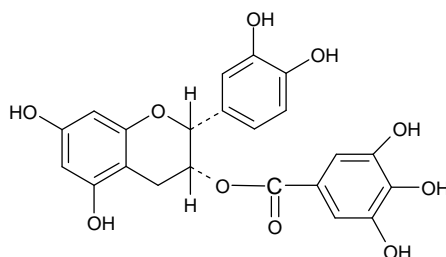
(-)epikatechiny R= -H
(-)epigallocatechiny R= -OH



Leukoantocyjanidyna

Dalsza polimeryzacja garbników katechinowych prowadzi do powstawania wielkocząsteczkowych, brunatno zabarwionych, nierozpuszczalnych w wodzie flobafenów, które pozbawione są właściwości typowych dla garbników.

Oprócz garbników hydrolizujących i skondensowanych wyróżnia się tzw. **garbniki mieszane**, które są estrami katechiny lub epikatechiny z kwasem galusowym. 3-O-galoilokatechiny występują m.in. w herbacie.



3-galoiloepikatechiny

W roślinach oprócz garbników właściwych występują tzw. **pseudogarbniki**. Są to związki o budowie zbliżonej do garbników o stosunkowo małych cząsteczkach. Występują głównie w rodzinie *Lamiaceae* (tymianek, melisa), w której nie znaleziono dotychczas ani garbników katechinowych ani galotanin.

Właściwości fizykochemiczne. Garbniki posiadają szereg charakterystycznych, wspólnych cech. Dobrze rozpuszczają się w gorącej wodzie, w niższych alkoholach i acetonie, praktycznie są nierozpuszczalne w lipofilowych rozpuszczalnikach. Posiadają cierpki, ściągający smak.

Z białkami w środowisku wodnym tworzą trudno rozpuszczalne połączenia. Mają zdolność garbowania skóry zwierzęcej, powodują aglutynację czerwonych krwinek. Tworzą strąty z solami metali ciężkich, z białkami, śluzami, pektynami, alkaloidami. Dają reakcje charakterystyczne dla fenoli, m.in. z solami Fe^{3+} tworzą kompleksy barwy niebieskiej lub zielonej.

Występowanie. Garbniki są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Ich występowanie obserwuje się w roślinach należących do następujących rodzin

systematycznych: *Anacardiaceae*, *Fagaceae*, *Ericaceae*, *Myrtaceae*, *Polygonaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae*.

Za roślinne surowce garbnikowe uznajemy te, w których garbniki są głównymi składnikami działającymi, odpowiedzialnymi za stosowanie danego surowca w lecznictwie.

Działanie farmakologiczne. Wydzielone frakcje garbników (tanina) oraz wyciągi z surowców garbnikowych są stosowane zewnętrznie i wewnętrznie jako środki ściągające (*remedia adstringentia*), przeciwzapalne (*r. antiphlogistica*), hamujące drobne krwawienia (*r. haemostatica*), jako środki zapierające (*r. obstipantia*) oraz jako antidotum przy zatruciach alkaloidami i metalami ciężkimi. Działają bakteriostatycznie. szczególnie na bakterie Gramm dodatnie, łącząc się z białkami podłoża hamują rozwój flory bakteryjnej.

Surowce lecznicze: *Galla*, *Quercus cortex*, *Bistortae rhizoma*, *Tormentillae rhizoma*, *Agrimoniae herba*, *Alchemillae herba*, *Ratanhiae radix*, *Lythri herba*.

Metodyka badania surowców garbnikowych

Analiza jakościowa. W celu stwierdzenia obecności garbników w surowcu przygotowuje się wyciąg wodny lub alkoholowy i wykonuje reakcje z odczynnikami grupowymi, do których zaliczane są między innymi: roztwór żelatyny. roztwory alkaloidów, np. siarczanu atropiny lub chlorowodoru chininy, roztwory soli metali ciężkich, np. octanu ołowiawego, siarczanu żelazowego z winianem sodowo-potasowym (odczynnik Mitchella), octanu miedziowego. Wymienione odczynniki powodują wytrącanie garbników w postaci trudno rozpuszczalnych osadów.

Często stosowanymi odczynnikami są sole żelaza: chlorek żelazowy i ałun żelazowo-amonowy, z którymi galotaniny dają zabarwienie niebieskie, garbniki katechinowe – zabarwienie zielone. Próba nie jest specyficzna, podobnie reaguje z solami żelaza szereg innych związków o charakterze fenoli. Czułą reakcją na garbniki jest próba aglutynacji (zlepiania) erytrocytów.

Dla odróżnienia garbników hydrolizujących od skondensowanych stosuje się następujące odczynniki:

- a) formaldehyd z kwasem solnym – wytrącają się garbniki skondensowane, garbniki hydrolizujące można wykryć w roztworze;
- b) octan ołowiu z kwasem octowym – wytrącają się przede wszystkim tanoidy, kwas octowy zapobiega wytrącaniu się garbników skondensowanych;
- c) woda bromowa – wytrącają się garbniki skondensowane;

d) wanillina z kwasem solnym – z garbnikami katechinowymi daje zabarwienie malinowe, garbniki hydrolizujące nie wywołują zabarwienia.

Jednoznaczne wyniki poszczególnych reakcji uzyskuje się jedynie w przypadku badania roztworu określonego garbnika, np. taniny (*Tanninum*). Badanie wyciągów zawierających często zarówno garbniki hydrolizujące jak i skondensowane, jest znacznie trudniejsze. Wnioski co do występowania garbników w badanym wyciągu można wyciągnąć dopiero po wykonaniu kilku różnych prób.

Wyniki reakcji z odczynnikami można potwierdzić badaniem chromatograficznym, które daje przede wszystkim możliwość rozdzielenia i odróżnienia garbników właściwych od niegarbnikowych związków fenolowych reagujących podobnie z odczynnikami na fenole. Garbniki właściwe mają zwykle niższe wartości R_f z uwagi na wielkość cząsteczki. Chromatogramy można wywołać roztworem chlorku żelazowego, roztworem waniliny z kwasem solnym lub innymi odczynnikami na fenole.

Analiza ilościowa. Metody ilościowe stosowane dotychczas do oznaczania garbników w surowcach roślinnych można podzielić na następujące grupy:

- a) metody strąceniowe, polegające na wytrącaniu garbników z wyciągu przeważnie solami metali ciężkich i wagowym określaniu ich zawartości;
- b) metody adsorpcyjne polegające na adsorpcji garbników przez proszek skórzany, powszechnie stosowane w przemyśle garbarskim;
- c) metody kolorymetryczne, z których szersze zastosowanie znalazła metoda z odczynnikiem molibdenofosforowolframowym.
- d) metody biologiczne polegające na określeniu aktywności aglutynacyjnej (metoda aglutynacyjna Koberta z użyciem krwi wołu) lub adstrykcyjnej (na skąposzczetach) w porównaniu z aktywnością garbnika wzorcowego.

Farmakopealna (FPVIII) metoda oznaczania garbników polega na tworzeniu się barwnych połączeń kompleksowych polifenoli z odczynnikiem molibdenowolframowym w środowisku alkalicznym. W pierwszym etapie wyznacza się absorbancję sumy polifenoli zawartych w wyciągu, które z odczynnikiem dają zabarwienie niebieskie. Następnie oddziela się garbniki właściwe przez związanie ich z proszkiem skórzanym i wyznacza absorbancję polifenoli nie wiążących się z proszkiem skórzanym. Na podstawie różnicy absorbancji oblicza się zawartość garbników w surowcu. Jako wzorzec stosuje się pirogalol.

Surowce garbnikowe

Galla – dębianka

Syn.: Galas dębowy

Surowcem są patologiczne narośla, powstałe na młodych pędach dębu małozajatyckiego, *Quercus lusitanica* Lamarck (*Q. infectoria* Oliv.), (*Fagaceae*), wskutek bujnego wzrostu tkanki merystematycznej pąka po złożeniu w nim jaja przez samicę galasownika *Andricus* sp. (*Cynipidae*).

Galasy dębowe zawierają od 40% do 75% galotanin, wśród których przeważają galusany glukozy zawierające od 6 do 7 cząsteczek kwasu galusowego na 1 cząsteczkę glukozy. Ponadto występują: kwas galusowy (ok. 3%), kwas elagowy (ok. 2%), glukoza i skrobia. Galasy służą do przygotowywania nalewki *Gallae tinctura*.

Garbnik otrzymywany z dębianek nosi nazwę taniny – *Tanninum* (kwas taninowy, *Acidum tannicum*). Jest to mieszanina galusanów glukozy, których głównym składnikiem jest 1,3,4-O-trigaloilo-6-O-m-galoilo-D-glukoza.

***Quercus cortex* – kora dębu**

Surowcem jest kora młodych pni i gałęzi dębu szypułkowego, *Quercus robur* L. lub dębu bezszypułkowego, *Quercus petraea* (Mabto.) Liebl. (*Q. sessilis* Ehrh.) lub *Q. pubescens* Willr., (*Fagaceae*), zebrana na wiosnę przed rozwojem liści i wysuszona w cieniu, w temp. nie wyższej niż 35°C.

Kora dębu zawiera od 8 do 20% garbników, z których ok. 85% to oligomery proantocjanidyn (garbniki katechinowe), niewielki procent stanowią elagotanoidy. Najwięcej garbników (do ok. 20%) zawiera kora młoda. W korze starszej lub dłużej przechowywanej tworzą się nierozpuszczalne w wodzie flobafeny a zawartość garbników spada. Oprócz garbników właściwych kora dębowa zawiera kwas elagowy, kwas galusowy, katechinę, galokatechinę oraz niewielkie ilości związków triterpenowych. Minimalna zawartość garbników w surowcu winna wynosić 3%.

***Bistortae rhizoma* – kłącze wężownika**

Surowcem jest wysuszone kłącze rdestu wężownika, *Persicaria bistorta* (L.) Samp. (*Polygonum bistorta* L.), (*Polygonaceae*), zebrane jesienią lub wiosną.

Surowiec zawiera garbniki hydrolizujące i skondensowane (ok. 25%). W zespole tym występują 6-galoilo-β-D-glukoza i 3,6-digalolilo-β-D-glukoza. Garbniki skondensowane są pochodnymi (+)katechiny i (-)epikatechiny. W nieznacznym ilościach występują: kwas galusowy i elagowy, katechina i epikatechina i ok. 20% skrobi.

***Tormentillae rhizoma* – kłącze pięciornika**

Syn.: Kłącze kurzego ziela

Surowcem jest wysuszone kłącze pięciornika, kurzego ziela, *Potentilla erecta* (L.) Hampe (*Potentilla tormentilla* Necker), (*Rosaceae*), zebrane jesienią lub wczesną wiosną, oczyszczone z korzeni i zawierające nie mniej niż 7% garbników.

Kłącze pięciornika zawiera głównie garbniki katechinowe (ok. 80% frakcji), które z czasem przechodzą w brunatnoczerwone flobafeny. W niewielkich ilościach występują elagotaniny, wolny kwas galusowy, kwas elagowy. Oprócz tego obecne są związki triterpenowe (kwas chinowowy, tormentozyd).

***Ratanhiae radix* – korzeń ratanii**

Surowcem jest wysuszony korzeń ratanii peruwiańskiej, *Krameria triandra* Ruiz et Pavon, (*Krameriaceae*).

Garbniki zawarte w korzeniu ratanii są to prawie wyłącznie oligomeryczne i polimeryczne proantocyjanidyny złożone z 2-14 jednostek flawanoli, które są połączone wiązaniami C-4-C-8. Zawartość garbników sięga 15%, wymagana minimalna zawartość to 5%.

***Agrimoniae herba* – ziele rzepiku pospolitego**

Surowcem jest wysuszone ziele *Agrimonia eupatoria* L. i/lub *Agrimonia procera* Wallr., (*Rosaceae*) zawierające co najmniej 2% garbników adsorbujących się na proszku skórzanym, w przeliczeniu na pirogalol.

Garbniki występujące w surowcu w ilości 4-10% są przeważnie typu katechin (garbniki skondensowane). Oprócz tego surowiec zawiera elagotoniny oraz około 1,2% flawonoidów – glikozydów apigeniny, kempferolu i luteoliny.

***Alchemillae herba* – ziele przywrotnika**

Wysuszone, kwitnące ziele *Alchemilla xanthochlora* Rothm. (*Alchemilla vulgaris* auct. non L.), (*Rosaceae*). Zawiera 5-8% garbników, przeważnie elagotannin. Wymagana zawartość to co najmniej 6,0%. Flawonoidy występują w ilości ok. 2%.

***Lythri herba* – ziele krwawnicy**

Wysuszone, kwitnące szczyty pędów krwawnicy pospolitej – *Lythrum salicaria* L. (*Lythraceae*). Wymagana zawartość garbników: minimum 5%.

Reakcje barwne i osadowe

Wyciąg z surowca sporządzić w stosunku 2 g surowca na 25 ml wody. Sproszkowany surowiec ogrzewać z wodą w ciągu 3 minut we wrzącej łaźni wodnej, po ochłodzeniu przesączyć przez bibułę.

- I. Do 5 ml wyciągu dodać 2 ml odczynnika Mitchella (0,1 g siarczanu żelazowego i 0,5 g winianu sodowo potasowego w 100 ml wody) oraz 0,5 g octanu sodowego i zagotować.
- II. 1 ml wyciągu rozcieńczyć 1 ml wody i dodać 3 krople roztworu chlorku żelazowego 2%. Natychmiast zaobserwować pojawiające się zabarwienie. Późniejsze zmiany barw nie są charakterystyczne. W przypadku występowania garbników katechinowych obok galotanin pojawia się zabarwienie zielone, które przechodzi w niebiesko-granatowe, związane z obecnością galotanin.
- III. 2 ml wyciągu rozcieńczyć 2 ml wody, dodać 3-6 kropeł roztworu formaldehydu 40% i 6-10 kropeł kwasu solnego 10%. Gotować przez 10 minut. Wytrącający się po oziębieniu obfity serowaty osad świadczy o obecności garbników skondensowanych.
- IV. Do 2 ml wyciągu dodać 1ml kwasu octowego 33% i 2 ml roztworu octanu ołowiawego 10%. Wynik odczytać po 30 minutach. Wytrącają się garbniki hydrolizujące. Po odsączeniu osadu do przesączu dodać 2 krople 2% roztworu chlorku żelazowego. W obecności garbników katechinowych powstaje zabarwienie zielone.
- V. Do 1 g surowca dodać 10 ml etanolu 96% i ogrzewać mieszaninę na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30 min. Po ochłodzeniu przesączyć. Do 1 ml roztworu dodać 2 ml roztworu (10 g/l) waniliny w kwasie solnym. W obecności garbników katechinowych powstaje czerwone zabarwienie (reakcja charakterystyczna dla *Quercus cortex* i *Tormentillae rhizoma*).

Surowiec	Wynik reakcji			
	I	II	III	IV
<i>Quercus cortex</i>	osad fioletowo-brunatny	zabarwienie zielone → granatowe → ciemny osad	osad żółto-brunatny	osad żółto-pomarańczowy, przesącz + FeCl ₃ → słabe zabarwienie
<i>Bistortae rhizoma</i>	osad ciemnofioletowy obfity	zabarwienie granatowe → osad	osad beżowy	osad jasnobeżowy, przesącz + FeCl ₃ → słabo niebieskie zabarwienie
<i>Tormentillae rhizoma</i>	osad fioletowo-brunatny, obfity	zabarwienie ciemnozielone → granatowe → ciemny osad	obfity żółtawy osad	osad pomarańczowy, przesącz + FeCl ₃ → ciemnozielone zabarwienie
1% roztwór taniny	obfity szary osad	zabarwienie granatowe → osad	brak osadu	osad biały, przesącz + FeCl ₃ → słabo niebieskie zabarwienie

Chromatografia cienkowarstwowa surowców garbnikowych

Roztwór badany. 0,2 g sproszkowanego surowca ogrzewać w probówce z 5 ml metanolu 50% w czasie 2 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu wyciąg przesączyć przez watę.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 30 i 60 µl wyciągu i po 10 µl roztworów porównawczych (0,1% roztwór taniny, 0,1% roztwór kwasu galusowego i 0,1% roztwór katechiny). Płytkę rozwijać na wysokość 18 cm fazą ruchomą chloroform : octan etylu : metanol : kwas mrówkowy 98% (5:4:2:1 v/v/v/v). Chromatogram wysuszyć na powietrzu.

Detekcja. Po wysuszeniu na powietrzu chromatogram wywołać 1% metanolem roztworem chlorku żelazowego. Porównać położenie pasm/plam z roztworami porównawczymi.

Badanie produktów hydrolizy galotanin

Tanina

Roztwór badany. 0,1 g taniny umieścić w kolbce okrągłodennej ze szlifem poj. 50 cm, dodać 10 cm³ 1n kwasu solnego i ogrzewać przez 3 godziny na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Po ochłodzeniu zawartość kolbki przenieść do rozdzielacza i wytrząsać z 10 cm³ octanu etylu. Oddzieloną warstwę octanu etylu przemyć niewielką ilością wody, warstwę wodną odrzucić a wyciąg octanowy pozostawić do badań

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą poliamidem 30 µl roztworu badanego i po 20 µl roztworów porównawczych (roztwór kwasu galusowego i taniny). Chromatogram rozwijać na wys. 18 cm fazą ruchomą metanol : woda : dioksan : kwas octowy lod. (20:12:1:1 v/v/v/v).

Detekcja. Wywołać metanolem roztworem chlorku żelazowego 0,1%.

Bistortae rhizoma

Roztwór badany. 0,2 g surowca ogrzewać pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej z 5 ml 1n kwasu solnego przez 2 godziny. Przesączyć na gorąco do rozdzielacza i przesączyć po ochłodzeniu wytrząsać z 5 ml octanu etylu. Oddzieloną warstwę octanu etylu przemyć niewielką ilością wody.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą poliamidem nanieść 100 µl roztworu badanego, 50 µl wyciągu wodnego surowca (0,2 g surowca na 5 ml wody) oraz 10 µl roztworu porównawczego (0,1% roztwór kwasu galusowego). Chromatogram rozwinąć i wywołać jak podano w punkcie przy analizie taniny.

Wynik. Na chromatogramach hydrolizatów taniny i garbnika kłącza wężownika widoczne są wyraźne plamy kwasu galusowego, produktu hydrolizy galotanin. W roztworze taniny oraz w wyciągu niehydrolizowanym z kłącza wężownika kwas galusowy występuje w ilościach śladowych.

Oznaczenie zawartości garbników wg FP VIII

Wszystkie procesy wytrawiania i rozcieńczania należy wykonać chroniąc od światła.

Roztwór badany. W przypadku substancji roślinnej lub wyciągu suchego, do podanej ilości* sproszkowanej substancji lub wyciągu umieszczonego w kolbie okrągłodennej poj. 250 ml, dodać 150 ml wody. Ogrzewać 30 min na łaźni wodnej. Ochłodzić strumieniem bieżącej wody i przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 250 ml. Kolbę wyplukać zbierając popłuczyny do kolby miarowej, a następnie uzupełnić wodą do 250,0 ml. Pozostawić do opadnięcia osadu i przesączyć płyn przez sączek z bibuły o średnicy 125 mm. Pierwsze 50 ml przesącza odrzucić.

W przypadku wyciągu płynnego lub nalewki, uzupełnić podaną ilość wyciągu lub nalewki wodą do 250,0 ml. Przesączyć mieszaninę przez sączek z bibuły o średnicy 125 mm. Odrzucić pierwsze 50 ml przesącza.

Ogólna zawartość polifenoli. Uzupełnić 5,0 ml przesącza wodą do 25,0 ml. Wymieszać 2,0 ml tego roztworu z 1,0 ml odczynnika fosfomolibdenowolframowego i 10,0 ml wody, uzupełnić roztworem węgla sodu (290 g/l) do 25,0 ml. Po 30 min. zmierzyć absorbancję przy 760 nm (A_1) stosując wodę jako odnośnik.

Polifenole niewiążące się z proszkiem skórzanym. Do 10,0 ml przesącza dodać 0,10 g proszku skórzanego i wytrząsać energicznie 60 min. Przesączyć i uzupełnić 5,0 ml przesącza wodą do 25,0 ml. Wymieszać 2,0 ml tego roztworu z 1,0 ml odczynnika fosfomolibdenowolframowego i 10,0 ml wody, uzupełnić roztworem węgla sodu (290 g/l) do 25,0 ml. Po 30 min. zmierzyć absorbancję przy 760 nm (A_2) stosując wodę jako odnośnik.

Roztwór porównawczy. Rozpuścić bezpośrednio przed użyciem 50,0 mg pirogalolu w wodzie i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100,0 ml. Uzupełnić 5,0 ml roztworu wodą do 100,0 ml. Wymieszać 2,0 ml tego roztworu z 1,0 odczynnika fosfomolibdenowolframowego i 10,0 ml wody, uzupełnić roztworem węgla sodu (290 g/l) do 25,0 ml. Po 30 min zmierzyć absorbancję przy 760 nm (A_3), stosując wodę jako odnośnik.

Obliczyć procentową zawartość garbników w przeliczeniu na pirogalol wg wzoru:

$$\frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

m_1 – masa badanej próbki w gramach

m_2 – masa pirogalolu w gramach

Przygotowanie odczynnika fosforomolibdenowolframowego:

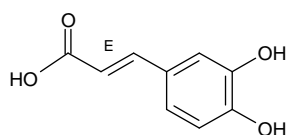
100 g wolframianu sodu i 25 g molibdenianu sodu rozpuścić w 700 ml wody, dodać 150 g siarczanu litu, 50 ml wody i kroplami brom. Usunąć nadmiar bromu przez wrzenie (15 min), ochłodzić, uzupełnić wodą do 1000 ml i przesączyć. Odczynnik ma barwę żółtą, zielonkawy nie nadaje się do użycia.

* Zalecane masy próbek wziętych do analizy ilościowej:

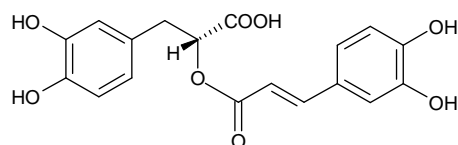
<i>Agrimoniae herba</i>	1,000 g
<i>Alchemillae herba</i>	0,500 g
<i>Quercus cortex</i>	0,700 g
<i>Tormentillae rhizoma</i>	0,500 g
<i>Bistortae rhizoma</i>	0,500 g
<i>Ratanhiae radix</i>	0,750 g
<i>Lythri herba</i>	0,750 g

POCHODNE KWASU KAWOWEGO

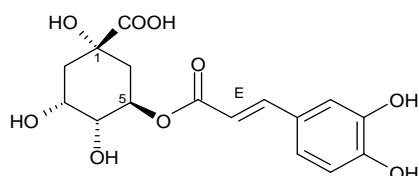
Kwas kawowy (kwas orto-dihydroksycynamonowy) występuje powszechnie w świecie roślin zarówno w postaci wolnej jak też połączony z innymi związkami za pomocą wiązań estrowych lub glikozydowych. Połączenia estrowe pomiędzy hydroksykwasami aromatycznymi określane są mianem depsydów. Do związków o tym typie budowy zaliczyć można m.in. kwas rozmarynowy występujący w rodzinie *Lamiaceae* i kwas litospermowy wyodrębniony z pewnego gatunku karbieńca - *Litospermum (Boraginaceae)*. Oprócz tego znane są połączenia estrowe kwasu kawowego z alkoholowymi grupami kwasów alifatycznych np. kwas cykoriowy (dikawoilowinowy) lub alicyklicznym kwasem chinowym (kwas chlorogenowy, cynaryna). Kwas kawowy występuje także w połączeniach z węglowodanami: glukozą, ramnozą, rutynozą, gencjibiozą.



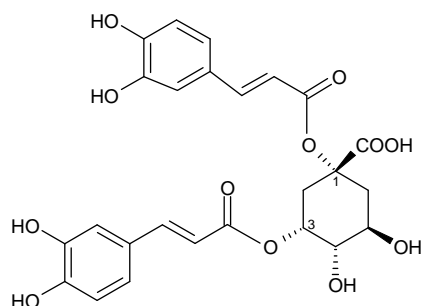
Kwas kawowy (trans)



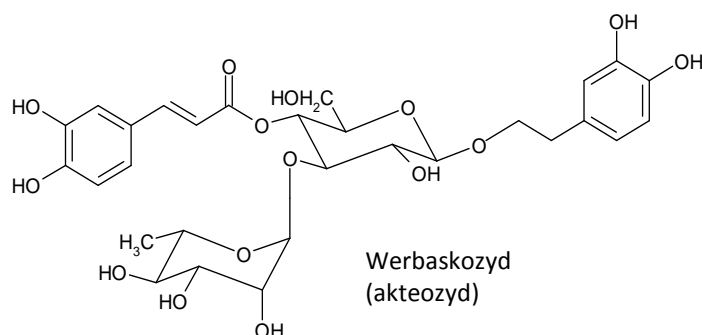
Kwas rozmarynowy



Kwas chlorogenowy



Cynaryna

Werbaskozyd
(akteozyd)

Związkami o bardziej skomplikowanej strukturze są glikozydoestry, w których kwas kawowy stanowi resztę acylową rutynozydu alkoholu 3,4-dihydroksyfenyloetylowego. Do takich związków należą akteozyd, izoakteozyd i ich pochodne rozpowszechnione w rodzinach zaliczanych do rzędu *Scrophulariales*: *Plantaginaceae*, *Oleaceae*, *Scrophulariaceae*,

Lamiaceae. Niektóre z połączeń kwasu kawowego zawierające w cząsteczce dwie reszty fenolokwasu takie jak kwas rozmarynowy wykazują właściwości zbliżone do garbników.

Działanie farmakologiczne. Kwas rozmarynowy, zwany garbnikiem *Lamiaceae* posiada zdolność łączenia się z białkiem skóry, działa łagodnie ściągająco na błony śluzowe, przeciwwirusowo i antyoksydacyjnie. Podobną aktywność wykazuje werbaskozyd (akteozyd). Aktywność antyoksydacyjna kwasu kawowego i jego pochodnych, które występują w wielu surowcach leczniczych została w ostatnich latach dobrze udokumentowana.

Surowce lecznicze: *Melissae folium*, *Plantaginis lanceolatae folium*, *Ballotae nigrae herba*.

Metodyka badań surowców zawierających pochodne kwasu kawowego

Analiza ilościowa. W oznaczeniach zawartości pochodnych kwasu kawowego w surowcach roślinnych wykorzystuje się reakcje barwne jakie dają związki polifenolowe z solami metali ciężkich np. molibdenu, wolframu, żelaza.

W metodzie farmakopealnej (FPVIII) stosuje się odczynnik z molibdenianem sodu i azotynem sodu, który daje z pochodnymi kwasu kawowego zabarwienie pomarańczowo-czerwone.

Surowce zawierające pochodne kwasu kawowego

***Melissae folium* – Liść melisy**

Surowcem jest wysuszony liść melisy lekarskiej *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*). Składnikami czynnymi są: olejek eteryczny (0,02-0,08%) z cytralem, cytronellalem i seskwiterpenami (tlenek kariofilenu, germakren), kwas rozmarynowy (ok. 5%), flawony pochodne luteoliny i apigeniny, kwas ursolowy, glukozyd β -sitosterolu. Standaryzacja surowca wg FPVIII (suplement) wymaga oznaczenia zawartości kwasu rozmarynowego metodą HPLC. Winna ona wynosić nie mniej niż 1,0%.

***Plantaginis lanceolatae folium* – liść babki lancetowatej**

Surowiec stanowią wysuszone liście *Plantago lanceolata* L. (*Plantaginaceae*) o zawartości akteozydu nie mniejszej niż 1,5%.

Składnikami czynnymi są: śluzy (wskaźnik pęcznienia ok. 5), irydoidy (aukubina), fenylloetanoidy (akteozyd), flawonoidy.

***Ballotae nigrae herba* – ziele mierznicy pospolitej**

Surowcem są wysuszone szczyty pędów *Ballota nigra* L. (*Lamiaceae*) o zawartości nie mniejszej niż 1,5% pochodnych kwasu o-dihydroksycynamonowego (kawowego) w przeliczeniu na akteozyd.

Oprócz pochodnych kwasu kawowego ważnymi składnikami są związki diterpenowe pochodne labdanu o gorzkim smaku. Stosowany jako środek uspokajający, głównie we Francji.

Oznaczanie sumy pochodnych hydroksycynamonowych w *Melissae folium*

Roztwór podstawowy. Do 0,200 g sproszkowanej substancji roślinnej dodać 190 ml etanolu 50%. Utrzymywać 30 min we wrzeniu w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Pozostawić do ochłodzenia i przesączyć. Przemycić sączek 10 ml etanolu 50%. Połączyć przesącz i popłuczyny w kolbie miarowej i uzupełnić etanolem 50% do 200,0 ml.

Roztwór badany. Do 1,0 ml roztworu podstawowego w probówce dodać 2 ml kwasu solnego (0,5 mol/l), 2 ml roztworu przygotowanego przez rozpuszczenie 10 g azotynu sodu i 10 g molibdenianu sodu w 100 ml wody, następnie dodać 2 ml rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu (8,5 g NaOH w 100ml wody) i uzupełnić wodą do 10,0 ml, zmieszać.

Odnośnik. W innej probówce umieścić 1,0 ml roztworu podstawowego, 2 ml kwasu solnego (0,5 mol/l), 2 ml rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu i uzupełnić wodą do 10,0 ml.

Natychmiast zmierzyć absorbancję roztworu badanego przy 505 nm wobec odnośnika. Obliczyć procentową zawartość sumy pochodnych kwasu hydroksycynamonowego, w przeliczeniu na kwas rozmarynowy, wg poniższego wzoru:

$$\frac{A \times 5}{m}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla kwasu rozmarynowego równą 400.

A – absorbancja przy 505 nm,

m – masa substancji badanej, w gramach.

Oznaczanie zawartości kwasu rozmarynowego metodą chromatografii cieczowej zamieszczono w FPVIII, Supl. 2009, str 4090.

Oznaczanie zawartości pochodnych kwasu kawowego w *Plantaginis lanceolatae folium* i *Ballotae nigrae herba*

Roztwór podstawowy. Umieścić 1,000 g sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie, dodać 90 ml etanolu 50% i ogrzewać 30 min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Pozostawić do ochłodzenia i przesączyć, zbierać przesącz do kolby miarowej poj. 100 ml.

Przemyć kolbę i sącdek 10 ml etanolu 50%. Dodać popłuczyny do przesączu i uzupełnić etanolem 50% do 100,0 ml.

Roztwór badany. Do kolby miarowej poj. 10 ml wprowadzać stopniowo, wstrząsając po każdym dodaniu, 1,0 ml roztworu podstawowego, 2 ml kwasu solnego (0,5 mol/l) i 2 ml roztworu zawierającego 100 g/l azotynu sodu i 100 g/l molibdenianu sodu, 2 ml rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu i uzupełnić wodą do 10,0 ml.

Odnośnik. Do kolby miarowej poj. 10 ml wprowadzić 1,0 ml roztworu podstawowego, 2 ml kwasu solnego (0,5 mol/l) i 2 ml rozcieńczonego roztworu wodorotlenku sodu i uzupełnić wodą do 10,0 ml.

Oznaczenie. Zmierzyć natychmiast absorbancję roztworu badanego przy 525 nm wobec odnośnika. Obliczyć procentową zawartość sumy pochodnych kwasu ortodihydroksycynamonowego, w przeliczeniu na akteozyd, wg poniższego wzoru:

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla akteozydu równą 185.

A – absorbancja przy 525 nm,

m – masa substancji badanej, w gramach.

ALKALOIDY

Alkaloidy są organicznymi zasadami roślinnymi, zawierającymi azot w heterocyklicznym układzie, farmakologicznie czynnymi, o wyraźnym działaniu na układ nerwowy. Definicja ta nie obejmuje wszystkich istotnych cech alkaloidów, gdyż istnieje wiele substancji zaliczanych do alkaloidów (meskalina, efedryna, kapsaicyna, kolchicina, paklitaksel i inne), w których azot nie występuje w pierścieniu heterocyklicznym, jak również nie posiada zasadowego charakteru (m.in. kapsaicyna, kolchicina).

Uwzględniając proces biogenezy można alkaloidy zaliczyć do trzech grup:

1. **Alkaloidy właściwe**, posiadające azot w pierścieniu heterocyklicznym, których prekursorami są aminy biogenne, powstałe z odpowiednich aminokwasów.
2. **Protoalkaloidy**, powstające z aminokwasów lub amin biogennych z tym, że azot znajduje się w łańcuchu bocznym.
3. **Pseudoalkaloidy**, zasady roślinne, których azot nie pochodzi od aminokwasów ani związków pokrewnych, a zostaje wbudowany w warunkach zachodzącej biosyntezy do już utworzonego, podstawowego szkieletu. Prekursorami pseudoalkaloidów są najczęściej związki z grupy izoprenoidów (irydoidy, sterydy, terpeny, seskwiterpeny i inne).

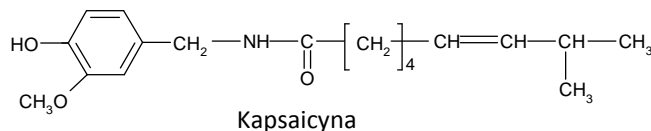
W świecie roślinnym w przeważającej ilości występują alkaloidy właściwe. W klasyfikacji alkaloidów uwzględnia się podstawowy układ zawierający heteroatom azotu. Rozróżniamy alkaloidy grupy pirolidyny, imidazolu, piperydyny, indolu, tropanu, pirolizydyny, chinolizydyny, chinoliny, izochinoliny, puryny i inne.

W roślinach alkaloidy występują w postaci soli kwasów organicznych (rzadziej nieorganicznych) rozpuszczalnych w soku komórkowym. W nielicznych roślinach spotykane są w połączeniu z cukrami (glikoalkaloidy) lub garbnikami (garbnikany alkaloidów).

Większość alkaloidów jest substancjami krystalicznymi, tylko nieliczne (małocząsteczkowe) mają konsystencję płynną (arekolina, pilokarpina, nikotyna, sparteina). Są związkami optycznie czynnymi, najczęściej lewoskrętnymi, wyjątek stanowi atropina, która jest racematem. Większość alkaloidów ma charakter zasad trzeciorzędowych, nieliczne są zasadami drugo- lub pierwszorzędowymi. Spotykane są również alkaloidy o charakterze zasad czwartorzędowych (berberyna). Niektóre z alkaloidów mają charakter amidów podstawionych kwasami organicznymi (kapsaicyna).

Alkaloidami występującymi w leczniczych surowcach roślinnych oraz stosowanymi w lecznictwie są:

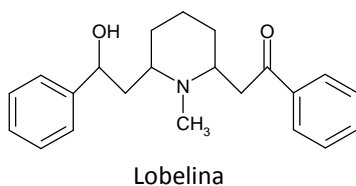
Kapsaicyna (4-hydroksy-3-metoksybenzyloamid kwasu 7-metylo-5-okteno-karboksylowego-1).



Krystaliczna substancja nierozpuszczalna w wodzie, o ostrym piekącym smaku. Jest głównym składnikiem zespołu alkaloidów występujących w owocu pieprzowca – *Capsicum annuum* L. (*Solanaceae*). Należy do grupy protoalkaloidów. Silnie drażni skórę, pobudza receptory termiczne, wywołuje uczucie ciepła.

Alkaloidy grupy piperydyny

Lobelina [1-metylo-2-(benzoilometylo)-6-(β-fenyl-β-hydroksyetylo)-piperydyna]

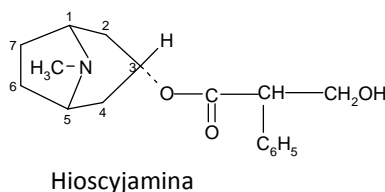


Główny składnik zespołu alkaloidów ziela stroiczki rozdętej – *Lobelia inflata* L. (*Lobeliaceae*). Działa na centralny układ nerwowy, pobudza wybiórczo ośrodek oddechowy. Stosowana w postaci rozpuszczalnego chlorowodoru – *Lobelinum hydrochloricum* jako analeptyk.

Alkaloidy grupy tropanu

Występują w roślinach rodziny *Solanaceae*, są estrami aminoalkoholu tropiny (tropan-3α-ol) i odpowiednich kwasów, głównie kwasu tropowego (α-fenyl-β-hydroksypropionowego). Głównymi przedstawicielami są:

L(-)-Hioscyjamina (ester tropiny i kwasu L(-) tropowego)



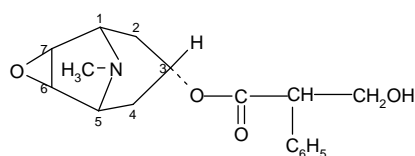
Występuje w pokrzyku wilczej jagodzie – *Atropa belladonna* L., bieluniu dziędzierzawie – *Datura stramonium* L., lulku czarnym – *Hyoscyamus niger* L. Należy do

grupy leków o działaniu parasympatykolitycznym/antycholinergicznym poprzez hamowanie receptorów acetylocholinowych. Wywiera działanie na układ wegetatywny i mięśnie gładkie oraz na centralny układ nerwowy. Łatwo ulega racemizacji do optycznie nieczynnej atropiny.

Atropina (DL-hioscyjamina), występuje w niewielkich ilościach w żywych roślinach. W w/w gatunkach z rodz. *Solanaceae* jej zawartość zwiększa się podczas suszenia surowca. Działa podobnie do hioscyjminy ale słabiej. Stosowana w leczeniu w postaci siarczanu – *Atropinum sulfuricum*. Technicznie otrzymuje się hioscyjaminę i atropinę z korzeni pokrzyku lub (częściej) z liści niewysokich drzew z rodzaju *Duboisia* (*Solanaceae*) rosnących w Australii, które dostarczają również skopolaminy. Jako źródła hioscyjminy wykorzystywane są także nasiona *Hyoscyamus niger* L. lub ziele egipskiego gatunku lulka - *Hyoscyamus muticus* L., które zawiera do 1,7% alkaloidów, przy czym hioscyjamina stanowi około 75% zespołu.

L(-) Skopolamina (6,7-epoksyhioscyjamina)

Ester skopiny i kwasu L(-)-tropowego. Występuje w roślinach rodz. *Solanaceae*



Skopolamina

w niewielkich ilościach obok hioscyjminy. Jedynie w pewnych gatunkach rodzaju *Datura* (*D. innoxia* Mill., *D. metel* L.) i *Scopolia* jest dominującym alkaloidem. Działa podobnie jak atropina (poraża zakończenia nerwów parasympatycznych). W odróżnieniu od atropiny działa również depresyjnie na czynności psychomotoryczne i autonomiczne mózgu.

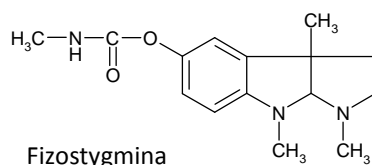
Stosowna w postaci bromowodorku – *Scopolaminum hydrobromicum*.

Alkaloidy grupy indolu

Alkaloidy zawierające układ indolu występują w postaci monomerów i (rzadziej) dimerów. Związkami dimerycznymi są winkrystyna, winblastyna i pokrewne wykazujące działanie cytostatyczne oraz toksyferyna C o działaniu kuraryzującym.

Z monomerycznych pochodnych indolu w leczeniu stosowane są alkaloidy: fizostygmina, ergometryna, ergotamina, johimbina, rezerpina, ajmalina, strychnina. Niektóre z nich są obecnie otrzymywane na drodze syntezy lub metodami biotechnologicznymi.

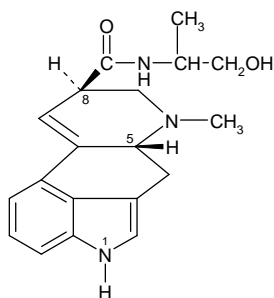
Fizostygmina (eseryna)



Fizostygmina

Fizostygmina (metylo-karbaminian eseroliny) jest głównym alkaloidem nasion bobu kalabarskiego – *Physostigma venenosum* Balfour, (*Fabaceae*). Pobudza układ przywspółczulny. Stosowana m.in. w leczeniu jaskry w postaci kropli z zawartością 0,2% salicylanu fizostygminy. Jest antidotum w zatruciach atropiną, amfetaminą i benzodiazepiną.

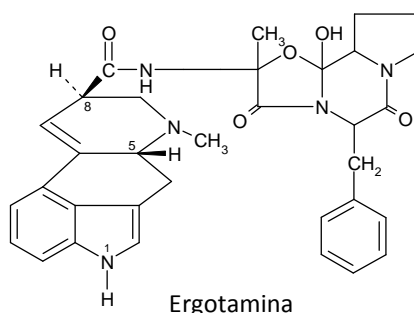
Ergometryna (ergobazyna, ergonowina)



Ergometryna

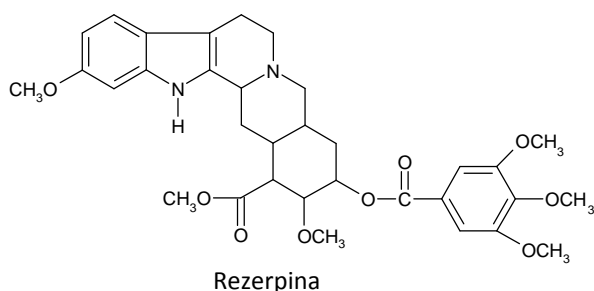
Ergometryna (α -hydroksy- β -metyloetyloamid kwasu D(-)lizergowego) jest jednym z alkaloidów sporyszu (*Secale cornutum*). Stosowana w postaci wodoromaleinianu – *Ergometrinum hydromaleinicum* w ginekologii jako środek hamujący krwawienia maciczne (*remedium uterotonicum*).

Ergotamina – główny alkaloid sporyszu o budowie cyklicznego trójpeptydu, amidowo związanego z kwasem D(-) lizergowym.



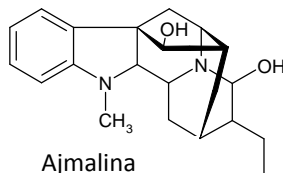
Ergotamina

Działa porażająco na układ współczulny (sympatykolityk), równocześnie przez działanie bezpośrednie powoduje silny skurcz naczyń krwionośnych i narządów zbudowanych z mięśni gładkich, a zwłaszcza macicy. Stosowana w postaci winianu – *Ergotaminum tartaricum* jako *uterotonicum* w krwawieniach macicznych. Uwodorniony alkaloid (dihydroergotamina) rozszerza naczynia krwionośne, powoduje obniżenie ciśnienia krwi.

Rezerpina

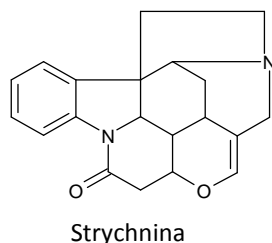
Rezerpina jest estrem metylowym kwasu 3',4',5'-trimetoksybenzoiłorezerpowego. Występuje w korzeniach rauwolfii żmijowej – *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. (*Apocynaceae*). Może być otrzymywana także z innych gatunków roślin rodzaju *Rauwolfia*. Wywiera ośrodkowe działanie sedatywne oraz obwodowe sympatykolytyczne (obniża ciśnienie krwi). Wchodzi w skład niektórych preparatów stosowanych w chorobie nadciśnieniowej oraz jako środki uspokajające. Obecnie stosowana rzadko z uwagi na wprowadzenie do lecznictwa szeregu syntetycznych leków przeciwnadciśnieniowych.

Ajmalina – występuje w korzeniach rauwolfii – *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz.



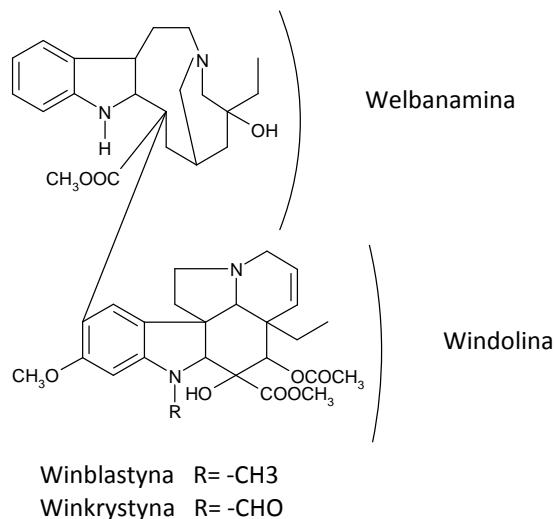
Jest cennym lekiem przeciwartymicznym. Nie ma właściwości hipotensyjnych.

Strychnina – główny alkaloid nasion kulczyby – *Strychnos nux vomica* L. (*Loganiaceae*).



Jest substancją o wybitnie gorzkim smaku. Działa pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy, wzmacnia napięcie mięśni. Stosowana jest w postaci azotanu – *Strychninum nitricum* jako analeptyk. Silnie toksyczna, przedawkowana powoduje napady skurczów tężcowych.

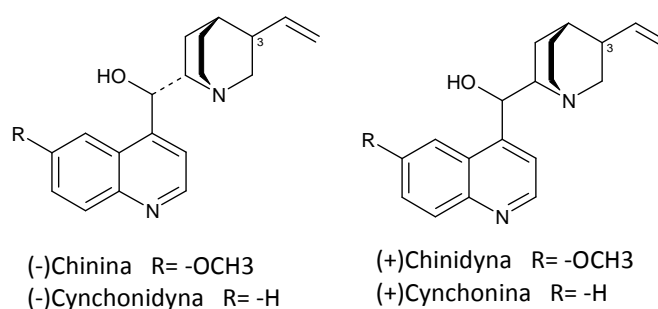
Winkrystyna i winblastyna – dimeryczne alkaloidy indolowe o działaniu cytostatycznym występujące w barwinku różowym *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (*Vinca rosea* L.), (*Apocynaceae*).



Winkrystynę stosuje się w leczeniu ostrej białaczki u dzieci (preparaty: Oncovin i in.). Winblastynę podaje się w ziarnicy złośliwej i nabłoniaku komórkowym (preparaty: Velban, Vincalucoblastin).

Alkaloidy grupy chinoliny

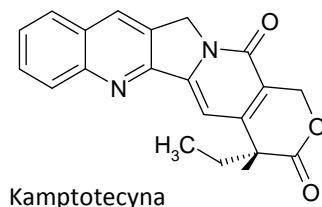
Do najważniejszych przedstawicieli tej grupy należą alkaloidy kory drzewa chinowego: (-)chinina i jej diastereoizomer (+)chinidyna oraz (-)cynchonidyna i jej diastereoizomer (+)cynchonina.



Chinina (3-winylochinklidylo-6'-metoksychinolilokarbinol) – posiada pierścienie chinolinowy i chinuklidynowy połączone ze sobą grupą hydroksymetylenową. Chinina jest głównym składnikiem zespołu alkaloidów kory drzewa chinowego – *Cinchona succirubra* Pavon (*Rubiaceae*), skąd może być otrzymywana w skali przemysłowej. Jest trucizną protoplazmatyczną, działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy. Stosowana w postaci chlorowodoru – *Chininum hydrochloricum* i siarczanu – *Chininum sulfuricum*.

Chinidyna – stosowana jest w postaci siarczanu *Chinidinum sulfuricum* jako lek przeciwarytmiczny.

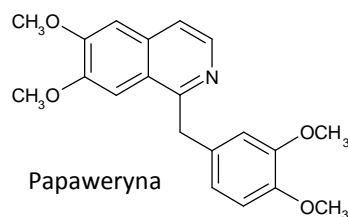
Kamptotecyna – izolowana z kory chińskiego drzewa *Camptotheca acuminata* L. (*Nyssaceae*). Jest inhibitorem topoiizomerazy I, stosowana w postaci pochodnych w onkologii.



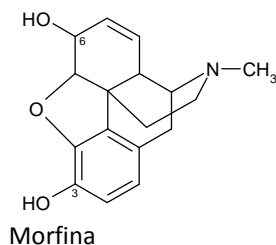
Alkaloidy grupy izochinoliny

Papaweryna [1-(3', 4'-dimetoksybenzylo)-6,7-dimetoksyizochinolina].

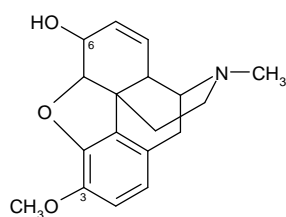
Występuje w opium. Jest silnym spazmolitykiem. Otrzymywana obecnie na drodze syntezy. Stosowana w postaci chlorowodoru – *Papaverinum hydrochloricum*.



Morfina (3,6-dihydroksy-4,5-epoksy-N-metylmorfinen-7)



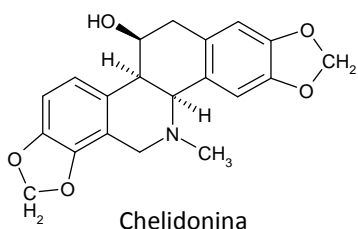
Główny alkaloid opium (około 10%), otrzymywany z opium oraz ze słomy makowej (ekstrakcja ze środowiska kwaśnego). Krystaliczna, lewoskrętna zasada o t.t. 254°C, trudno rozpuszczalna w wodzie, łatwo w ługach (obecność grupy fenolowej). Działa na ośrodkowy układ nerwowy, posiada właściwości przeciwbólne, jest silnie narkotyczna. Stosowana w postaci chlorowodoru – *Morphinum hydrochloricum*.

Kodeina (jednometylowy eter morfiny)

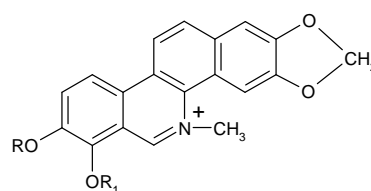
Kodeina

Występuje w opium (około 0,3%). Otrzymywana na drodze syntezy przez wybiórcze metylowanie grupy fenolowej morfiny. Posiada słabe działanie przeciwbólowe, narkotyczne i przeciwkaszlowe. Stosowana jako składnik niektórych leków przeciwkaszlowych najczęściej w postaci fosforanu – *Codeinum phosphoricum*.

Chelidonina, chelerytryna, sangwinaryna – główne alkaloidy jaskótczego ziela *Chelidonium majus* L. (*Papaveraceae*). Różnią się stopniem zasadowości oraz grupami funkcyjnymi.

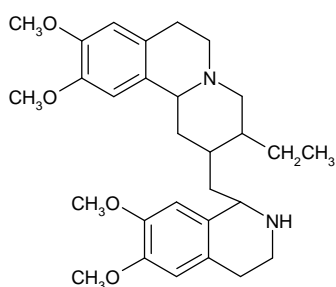


Chelidonina

Chelerytryna R=R1= -CH₃
Sangwinaryna R+R1= -CH₂-

Chelidonina działa na ośrodkowy układ nerwowy. Wykazuje działanie zbliżone do morfiny (przeciwbólowe, narkotyczne) oraz papaweryny (przeciwskurczowe) ale znacznie słabsze. Chelerytryna i sangwinaryna (alkaloidy o charakterze zasad IV-rzędowych) działają na ośrodkowy układ nerwowy. Posiadają poza tym właściwości bakterio- i grzybobstatyczne.

Emetyna – alkaloid występujący obok cefaliny i pokrewnych alkaloidów w korzeniu ipekakuany – *Cephaelis ipecacuanha* Rich. i *C. acuminata* Karst. (*Rubiaceae*).

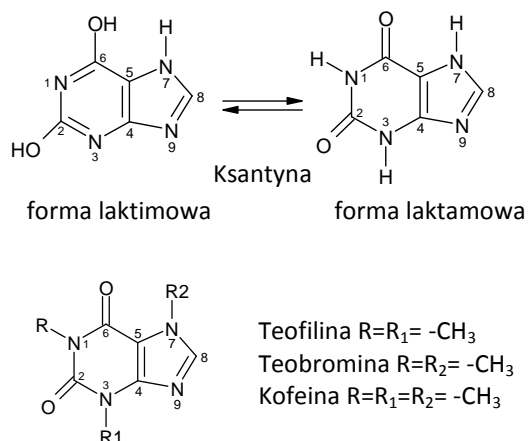


Emetyna

Emetyna jest krystaliczną, podwójną zasadą, trudno rozpuszczalną w wodzie. Posiada właściwości wykrztuśne (w większych dawkach wymiotne) oraz pasożytoobójcze. Cefelina posiada właściwości zbliżone do emetyny, ale działa silniej wymiotnie.

Alkaloidy grupy puryny

Alkaloidy tej grupy są metylowymi pochodnymi ksantyny (2,6-dihydroksypuryny).



Teofilina (1,3-dimetyloksantyna) – występuje w liściach herbaty – *Camellia sinensis* L. (*Theaceae*). Jest otrzymywana na drodze syntezy.

Teobromina (3,7-dimetyloksantyna) – występuje w nasionach kakaowca – *Theobroma cacao* L. (*Sterculiaceae*), otrzymywana na drodze syntezy. Stosowana jako zasada *Theobrominum* oraz w postaci rozpuszczalnej soli złożonej – *Theobrominum Natrium cum Natrio salicylico*.

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) występuje w liściach herbaty – *Theae folium* (*Camellia sinensis* L.), (*Theaceae*) nasionach kawy – *Coffea sp.* L. (*Rubiaceae*), w zarodkach kola – *Cola acuminata* Schott et Endl. (*Sterculiaceae*). Jest pozyskiwana z surowców roślinnych oraz na drodze syntezy. Stosowana jako wolna zasada – *Coffeinum* oraz w postaci rozpuszczalnej soli złożonej – *Coffeinum Natrium benzoicum*.

Alkaloidy grupy puryny należą do pseudoalkaloidów, są mało toksyczne, działają pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy (analeptyki). Najsilniejsze działanie wykazuje kofeina. Teofilina i teobromina posiadają poza tym właściwości diuretyczne.

Surowce lecznicze: *Cinchonae cortex*, *Colae embryo*, *Belladonnae folium*, *Boldi folium*, *Stramonii folium*, *Capsici fructus*, *Lobeliae herba*, *Opium*, *Belladonnae radix*, *Ipecacuanhae radix*, *Strychni semen*, *Chelidonii herba*, *Secalae cornutum*.

Metodyka badań surowców alkaloidowych

Ekstrakcja. W procesie wyodrębniania z surowca i oczyszczania frakcji alkaloidów wykorzystuje się ich podstawową właściwość fizykochemiczną – możliwość zmiany charakteru polarnego i związanych z tym różnic w rozpuszczalności soli alkaloidów i wolnych zasad. Wolne zasady rozpuszczają się w alkoholu, eterze, benzenie, chloroformie, tetrachloroetanie i innych rozpuszczalnikach organicznych, są natomiast nierozpuszczalne w wodzie. Sole alkaloidów rozpuszczają się w wodzie, są nierozpuszczalne w niepolarnych i średnio polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego też wyodrębnienie alkaloidów z surowca może polegać na ekstrakcji soli alkaloidów wodą oraz niższymi alkoholami w środowisku kwaśnym albo wolnych zasad w środowisku alkalicznym średnio polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi.

Dodatek alkaliów powoduje uwolnienie zasad alkaloidowych z ich soli. Surowiec zwilża się roztworem amoniaku (najczęściej 10%), rzadziej roztworami wodorotlenków sodu, potasu, wapnia względnie węglanu sodu, a następnie prowadzi się ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi. Dobór rozpuszczalnika zależy od właściwości ekstrahowanych alkaloidów, od stopnia ich rozpuszczalności w danym rozpuszczalniku. Najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem jest chloroform, w którym większość alkaloidów jest dobrze rozpuszczalna.

Wyciągi pierwotne, szczególnie alkoholowe, są w znacznym stopniu zanieczyszczone substancjami balastowymi. W procesie ich oczyszczania wykorzystuje się różnice w rozpuszczalności soli alkaloidów i zasad oraz substancji balastowych w rozpuszczalnikach organicznych i wodzie. Wyciągi organiczne wytrąsa się z rozcieńczonymi, wodnymi roztworami kwasów mineralnych, powodując przejście soli alkaloidów do warstwy wodnej. W warstwie organicznej pozostają zanieczyszczenia nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne w wodzie. Zalkalizowanie frakcji wodnej, a następnie ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi powoduje przejście uwolnionych z soli zasad (alkaloidów) do fazy organicznej; w wodnym roztworze pozostają zanieczyszczenia.

Analiza jakościowa. Obecność alkaloidów w oczyszczonych wyciągach z surowca można stwierdzić reakcjami osadowymi i barwnymi, które zachodzą z szeregiem odczynników. Nie są one jednak specyficzne tylko dla alkaloidów, większość z nich reaguje z innymi składnikami zasadowymi występującymi w roślinach (aminy, aminoalkohole, białka, cholina itp.). Dlatego też powstanie strątu, zmętnienia czy zabarwienia pod wpływem stosowanych odczynników nie zawsze jest dowodem obecności alkaloidów w badanym wyciągu. Natomiast próba ujemna wyklucza obecność alkaloidów.

Do najczęściej stosowanych należą odczynniki: Dragendorffa (jodobizmutan potasowy) wytrącający pomarańczowożółte osady; Mayera (jodortęcian potasowy) daje białe osady; Hagera (kwas pikrynowy) wytrąca żółte krystaliczne osady; roztwór taniny daje białe osady. Reakcje barwne zachodzą też pod wpływem odczynników odwadniających i utleniających: Fröhdego (kwas siarkowo-molibdenowy), Marquisa (aldehyd mrówkowy z kwasem siarkowym), Mandelina (kwas siarkowo-wanadynowy).

W badaniu tożsamości surowców alkaloidowych powszechnie stosowane są metody chromatograficzne. Chromatografię cienkowarstwową prowadzi się przeważnie na płytkach pokrytych żelalem krzemionkowym. Jako fazy rozwijające stosowane są mieszaniny, w skład których wchodzi chloroform, metanol, aceton, cykloheksan i dietyloamina. Bardzo często stosowane są fazy kwaśne lub alkaliczne: mieszaniny rozpuszczalników organicznych z kwasem solnym, siarkowym, mrówkowym lub amoniakiem.

Wizualizacja alkaloidów na chromatogramach może nastąpić pod działaniem promieni UV (wiele alkaloidów wykazuje charakterystyczną fluorescencję) lub specyficznych odczynników.

Analiza ilościowa. Oznaczanie zawartości alkaloidów w surowcach roślinnych przeprowadza się różnymi metodami:

- I. metody wagowe – (rzadko obecnie stosowane) polegają na wyekstrahowaniu zespołu alkaloidów z surowca i zważeniu osadu po odparowaniu rozpuszczalnika. Są one mało dokładne ze względu na trudności oczyszczenia wyciągu od substancji balastowych i możliwość niedokładnego dosuszenia alkaloidów;
- II. metody miareczkowe – zasada oznaczenia polega na związaniu wyekstrahowanych i oczyszczonych alkaloidów w roztworze wodnym z kwasem solnym lub siarkowym o znanym mianie i odmiareczkowaniu nadmiaru niezwiązanego kwasu za pomocą ługu wobec wskaźnika, najczęściej czerwieni metylowej. W niektórych przypadkach alkaloidy miareczkuje się wprost kwasem solnym. Stosuje się również miareczkowanie jodometryczne, argentometryczne w środowisku niewodnym, potencjometryczne, konduktometryczne;
- III. metody optyczne, w których wykorzystuje się reakcje barwne, jakie dają niektóre alkaloidy z określonymi odczynnikiemami. Z metod tych najczęściej stosowane są metody spektrofotometryczne.

Metody w/w pozwalają na oznaczenie sumy alkaloidów w przeliczeniu na główny składnik.

- IV. Metoda HPLC (chromatografia cieczowa) wprowadzona do FP VIII umożliwia zarówno identyfikację składników zespołu alkaloidów jak również oznaczanie ilościowe poszczególnych z nich.

***Capsici fructus* – owoc pieprzowca**

Syn.: Pieprz turecki, Papryka

Surowcem jest dojrzały owoc pieprzowca rocznego, *Capsicum annuum* L. var. *minimum*. i *C. frutescens* L. (odmiany drobnoowocowe), (*Solanaceae*) o zawartości sumy kapsaicynoidów, oznaczonej metodą HPLC w przeliczeniu na kapsaicynę, nie mniejszej niż 0,4%.

Owoc pieprzowca zawiera od 0,04 do 1,5% protoalkaloidów (kapsaicynoidy), których głównym składnikiem jest kapsaicyna (ok. 70% zespołu). Towarzyszącymi składnikami są pokrewne alkaloidy: dihydrokapsaicyna, homokapsaicyna, homodihydrokapsaicyna, nordihydrokapsaicyna i inne. W surowcu ponadto występują: flawonoidy, karotenoidy, olejek eteryczny (ok. 1,5%), witaminy (C, B₂, E).

Chromatografia cienkowarstwowa *Capsici fructus*

Roztwór badany. 0,5 g sproszkowanego surowca ekstrahować 5 cm³ eteru etylowego, wstrząsając mieszaninę w ciągu 5 minut i przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelom krzemionkowym nanieść 20 i 40 µl roztworu badanego oraz 20 µl roztworu porównawczego (roztwór kapsaicyny w eterze etylowym). Płytkę rozwijać na wys. 15 cm fazą ruchomą A lub B.

- A. n-heksan – octan etylu – kwas mrówkowy (72:24:1 v/v/v)
- B. woda – metanol (20:80 v/v)

Detekcja A. Po wysuszeniu spryskać płytkę roztworem aldehydu anyżowego, ogrzewać 5-10 minut w temp. 110°C. Na chromatogramie widocznych jest 5-6 szaroniebieskich plam, z których kapsaicyna wykazuje wartość R_f 0,15 – 0,25.

Detekcja B. Do wywołania kapsaicynoidów można również zastosować odczynnik chloroanilowy (roztwór tetrachlorobenzochinonu 10g/l w metanolu) lub roztwór dichlorochinonochloroimidu (5g/l) w metanolu. Spryskany chromatogram należy wówczas umieścić w parach amoniaku. Plama kapsaicyny zabarwia się na niebiesko.

Oznaczanie zawartości kapsaicyny w *Capsici fructus* metodą FP IV

Roztwór badany. Odważyć z dokładnością do 0,01 g ok. 2,0 g sproszkowanego surowca (sito 0,28 mm), umieścić w probówce poj. 20 ml z doszlifowanym korkiem, dodać 10 ml bezwodnego acetonu, wytrząsać 10 minut i odstawić na dwie godziny, Odwirować, odmierzyć dokładnie 5 cm³ roztworu, dodać 0,1 g wanadanu amonowego i 0,1 ml 36% kwasu solnego, mieszać, przesączyć przez mały sączeł, przepłukać sączeł bezwodnym acetonem uzupełniając przesącz do 5 ml.

Oznaczenie. Zmierzyć wartość absorbancji promieniowania przy filtrze czerwonym w 0,5 cm kuwecie, używając jako odnośnika wyciągu acetonowego bez odczynników. Odczytać z krzywej wzorcowej zawartość alkaloidów w próbce a następnie obliczyć ich procentową zawartość w surowcu. Norma wg FPIV wynosi nie mniej niż 0,18%.

Krzywa wzorcowa. 20 mg kapsaicyny wzorcowej rozpuścić w 20 cm³ bezwodnego acetonu. Odmierzyć dokładnie do trzech kolbek stożkowych 1,2,3 cm³ roztworu kapsaicyny wzorcowej, uzupełnić do 5 cm³ bezwodnym acetonem, zmieszać i postępować dalej jak podano wyżej, używając jako odnośnika bezwodnego acetonu. Zmierzone wartości absorbancji nanieść na układ współrzędnych i wykreślić krzywą wzorcową.

Metodę chromatografii cieczowej oznaczania kapsaicynoidów opisano w FPVIII, str.1187.

Lobeliae herba – ziele lobelii

Surowcem jest ziele lobelii (stroiczki) rozdętej, *Lobelia inflata* L. (*Lobeliaceae*) zebrane w okresie przekwitania.

W ziele lobelii występują alkaloidy pochodne pirydyny, piperidyny, N-metylopiperidyny (ponad 20 związków), ich zawartość wynosi 0,2-0,6%. Dominującym składnikiem zespołu alkaloidów jest (-)lobelina, w znaczących ilościach występują: lobelanina, lobelanidyna, izolobinina, sedanina. Inne składniki surowca to kwas chelidonowy, fitosterole, żywice.

Chromatografia cienkowarstwowa *Lobeliae herba*

Roztwór badany. 1 g sproszkowanego surowca wytrząsać przez 15 minut z 10 ml 1% roztworu kwasu solnego. Wyciąg odsączyć, surowiec powtórnie wytrząsać przez 15 minut z 10 ml wody. Przesącze połączyć, zalkalizować 25% roztworem amoniaku (papierek uniwersalny) i dwukrotnie wytrząsnąć z chloroformem (porcje po 10 ml). Wyciągi chloroformowe połączyć, oddestylować całkowicie rozpuszczalnik, pozostałość rozpuścić w 1 ml metanolu.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść 30 i 50 µl wyciągu, obok 5 µl roztworu porównawczego (0,01% metanolowy roztwór chlorowodoru lobeliny). Płytkę rozwijać na wys. 15 cm fazą ruchomą **chloroform : metanol** (75:25 v/v).

Detekcja. Po wysuszeniu spryskać płytkę odczynnikami Dragendorffa. Plama lobeliny o R_f ok. 0,5 barwi się pomarańczowo, podobnie jak plamy pozostałych alkaloidów.

Surowce zawierające alkaloidy tropanowe

***Belladonnae folium* – liść pokrzyku**

Syn.: Liść wilczej jagody

Surowcem są wysuszone liście pokrzyku wilczej jagody, *Atropa belladonna* L. (*Solanaceae*) i kwitnące, niekiedy owocujące szczyty pędów rośliny, zawierające nie mniej niż 0,3% alkaloidów obliczonych jako hioscyjamina.

Surowiec zawiera od 0,1 do 1,2% alkaloidów tropanowych. Głównym składnikiem tego zespołu jest (-)hioscyjamina (do 98%), która w czasie suszenia surowca racemizuje do atropiny. W małych ilościach występuje (-)skopolamina oraz w śladowych apotropina i belladonina. Ponadto surowiec zawiera kumaryny: skopoletynę, skopolinę, umbeliferon, związki flawonoidowe: heterozydy kemferolu i kwercetyny oraz garbniki.

Belladonnae pulvis normatus – proszek standaryzowany z liścia pokrzyku jest to sproszkowany liść pokrzyku doprowadzony do zawartości 0,28-0,32% alkaloidów (w przeliczeniu na hioscyjaminę) przez dodanie sproszkowanej laktozy lub liści pokrzyku o niższej zawartości.

***Belladonnae radix* – korzeń pokrzyku**

Syn.: Korzeń wilczej jagody

Surowcem są podziemne narządy pokrzyku wilczej jagody, *Atropa belladonna* L., (*Solanaceae*), zebrane w okresie przekwitania lub owocowania rośliny, zawierające nie mniej niż 0,4% alkaloidów obliczonych jako hioscyjamina.

W surowcu występują alkaloidy tropanowe, których zawartość waha się od 0,4-1,5%. Dominującym składnikiem w świeżo zebranych surowcu jest (-)hioscyjamina, w mniejszych ilościach występują atropina i (-)skopolamina, w śladowych apotropina, belladonina i kuskohigryna. Ponadto składnikami korzenia pokrzyku są: kumaryny (skopolina), kwasy organiczne.

***Stramonii folium* – liść bielunia**

Surowcem jest wysuszony liść bielunia dziędzierzawy, *Datura stramonium* L. (*Solanaceae*) i kwitnące a niekiedy owocujące szczyty pędów rośliny, zawierające nie mniej niż 0,25% alkaloidów obliczonych jako hioscyjamina.

Liść bielunia zawiera od 0,2 do 0,5% alkaloidów tropanowych, których dominującymi składnikami są (-)hioscyjamina oraz (-)skopolamina. Ponadto w surowcu występują: kumaryny (skopolina), flawonoidy oraz garbniki. Liść bielunia może zawierać do 0,6% alkaloidów, głównie hioscyjminy. Zawartość skopolaminy sięga do 20% ogółu alkaloidów.

Surowiec prawie nie jest już stosowany w celach leczniczych z uwagi na możliwość zatrucia (działanie narkotyczne), szczególnie w przypadku palenia papierosów zawierających bieluń.

Chromatografia cienkowarstwowa surowców tropanowych

Roztwór badany. Do 0,6 g sproszkowanej substancji roślinnej dodać 15 ml kwasu siarkowego (0,05 mol/l), wytrząsać 15 min i przesączyć. Przemycać sączek kwasem siarkowym (0,05 mol/l) do uzyskania 20 ml przesączu. Do przesączu dodać 1 ml stężonego wodorotlenku amonowego i wytrząsać 2-krotnie porcjami po 10 ml eteru etylowego wolnego od nadtlenu. Oddzielić warstwy przez wirowanie, jeżeli to konieczne. Połączone warstwy eterowe suszyć nad bezwodnym siarczanem sodu, przesączyć i odparować do sucha na łaźni wodnej. Pozostałość rozpuścić w 0,5 ml metanolu.

Roztwór porównawczy. Rozpuścić 50 mg siarczanu hioscyjminy w 9 ml metanolu. Rozpuścić 15 mg bromowodorku hioscyny (skopolaminy) w 10 ml metanolu. Zmieszać 1,8 ml roztworu bromowodorku hioscyny z 8 ml roztworu siarczanu hioscyjminy.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nakropić 10 µl roztworu badanego i 20 µl roztworu porównawczego. Płytkę rozwijać na wysokość 10 cm fazą ruchomą **stężony wodorotlenek amonowy : woda : aceton (3:7:90 v/v/v)**. Rozwinięty chromatogram wysuszyć przez 15 min w suszarce w temp. 100-105°C, pozostawić do ochłodzenia.

Detekcja A. Spryskać roztworem jodobizmutanu potasu (odczynnik Dragendorffa), stosując ok. 10 ml na płytkę o powierzchni 200 mm², aż będą widoczne pomarańczowe lub brunatne pasma na żółtym tle. Pasma na chromatogramach roztworu badanego wykazują położenie (hioscyjamina znajduje się w dolnej 1/3 części chromatogramu) i zabarwienie zgodne z pasmami na chromatogramach roztworu porównawczego.

Detekcja B. Spryskiwać płytkę roztworem azotynu sodu aż warstwa adsorbenta stanie się przezroczysta i obejrzeć po 15 min. Pasma hioscyjminy na chromatogramach roztworu badanego i roztworu porównawczego zmieniają zabarwienie z brunatnego na czerwobrunatne, ale nie na szarawoniebieskie (atropina) i nie znikają żadne z dodatkowych pasm.

Oznaczanie zawartości sumy alkaloidów tropanowych

Oznaczyć stratę masy po suszeniu 2,000 g sproszkowanej substancji roślinnej, w suszarce w temp. 105°C.

Roztwór badany. Zwilżyć 10,00 g sproszkowanej substancji roślinnej mieszaniną 5 ml wodorotlenku amonowego, 10 ml etanolu (96%) i 30 ml eteru etylowego wolnego od

nadtlenków i dokładnie wymieszać. Przenieść mieszaninę do odpowiedniego perkolatora, jeżeli to konieczne, z pomocą mieszaniny ekstrakcyjnej. Macerować 4 h, następnie perkolować mieszaniną 1 objętości chloroformu i 3 objętości eteru etylowego wolnego od nadtlenków do całkowitego wyekstrahowania alkaloidów. Odparować do sucha kilka mililitrów płynu wypływającego z perkolatora, pozostałość po odparowaniu rozpuścić w kwasie siarkowym (0,25 mol/l) i potwierdzić nieobecność alkaloidów roztworem tetrajodortęcianu potasu. Zagęścić perkolat do ok. 50 ml oddestylowując na łaźni wodnej i przenieść do rozdzielacza, przemywając eterem etylowym wolnym od nadtlenków. Dodać objętość eteru etylowego wolnego od nadtlenków nie mniejszą niż 2,1-krotna objętość perkolatu do uzyskania cieczy o gęstości znacznie poniżej gęstości wody. Wytrząsać roztwór nie mniej niż 3 porcjami po 20 ml kwasu siarkowego (0,25 mol/l), rozdzielić 2 warstwy przez wirowanie, jeżeli to konieczne, i przenieść warstwy kwasowe do drugiego rozdzielacza. Warstwę kwasową doprowadzić do odczynu zasadowego wodorotlenkiem amonowym i wytrząsać 3-krotnie porcjami po 30 ml chloroformu. Połączyć warstwy chloroformowe, dodać 4 g bezwodnego siarczanu sodu i pozostawić 30 min, od czasu do czasu wstrząsając. Zdekantować chloroform i przemyć siarczan sodu 3-krotnie, porcjami po 10 ml chloroformu. Połączyć płyny z przemycia z wyciągiem chloroformowym, odparować do sucha na łaźni wodnej i ogrzewać 15 min w suszarce w temp. 100-105°C. Pozostałość rozpuścić w kilku mililitrach chloroformu, dodać 20,0 ml kwasu siarkowego (0,01 mol/l) i usunąć chloroform przez odparowanie na łaźni wodnej.

Oznaczenie. Miareczkować nadmiar kwasu roztworem wodorotlenku sodu (0,02 mol/l) używając jako wskaźnika mieszaną roztwór czerwieni metylowej.

Obliczyć procentową zawartość sumy alkaloidów, w przeliczeniu na hioscyjaminę, wg poniższego wzoru:

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

d – strata masy po suszeniu w procentach,

n – objętość roztworu wodorotlenku sodu (0,02 mol/l), w mililitrach,

m – masa substancji roślinnej, w gramach.

***Cinchonae cortex* – Kora chinowa**

Wysuszona, nierozdrobniona, cała lub pocięta kora *Cinchona pubescens* Vahl (*Cinchona succirubra* Pav.), *C. calisaya* Wedd., *C. ledgeriana* Moens ex Trimen (*Rubiaceae*) lub ich odmian lub mieszańców zawierająca nie mniej niż 6,5% sumy alkaloidów, z których 30% do 60% stanowią alkaloidy typu chininy.

Chromatografia cienkowarstwowa *Cinchonae cortex*

Roztwór badany. Do 0,10 g sproszkowanej substancji roślinnej umieszczonej w probówce dodać 0,1 ml stężonego wodorotlenku amonowego i 5 ml chlorku metylenu. Silnie wytrząsać od czasu do czasu, w czasie 30 min i przesączyć. Przesącz odparować do sucha na łaźni wodnej, a pozostałość rozpuścić w 1 ml bezwodnego etanolu.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 10 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego (17,5 mg chininy i 2,5 mg chinidyny w 5 ml bezwodnego etanolu). Płytkę rozwijać dwukrotnie na odległość 15 cm fazą ruchomą dietyloamina : octan etylu : toluen (10:20:70 v/v/v). Rozwinięty chromatogram suszyć w suszarce w temp. 100-105°C, pozostawić do ochłodzenia.

Detekcja A. spryskać bezwodnym kwasem mrówkowym, pozostawić do wysuszenia na powietrzu. Obejrzeć w nadfiolecie przy 365 nm. Kolejność pasm obecnych na chromatogramach roztworu porównawczego i badanego (od startu): niebiesko fluoryzujące pasmo chininy, pasmo chinidyny o podobnej fluorescencji. Ponadto na chromatogramie roztworu badanego mogą wystąpić inne fluoryzujące pasma.

Detekcja B. Spryskać odczynnikiem jodoplatynowym. Kolejność pasm obecnych na chromatogramach roztworów porównawczego i badanego (od startu): fioletowe lub fioletowoszare (chinina), intensywnie niebieskie (cynchonidyna), fioletowe lub fioletowoszare (chinidyna), fioletowe (cynchonina). Ponadto na chromatogramie roztworu badanego mogą wystąpić inne pasma.

Oznaczanie zawartości alkaloidów w *Cinchonae cortex*

Roztwór badany. Zmieszać 1,000 g sproszkowanej substancji roślinnej w kolbie stożkowej poj. 250 ml, z 10 ml wody i 7 ml rozcieńczonego kwasu solnego. Ogrzewać 30 min w łaźni wodnej, pozostawić do ochłodzenia i dodać 25 ml chlorku metylenu, 50 ml eteru etylowego i 5 ml roztworu wodorotlenku sodu (200 g/l). Mieszaninę wstrząsać wielokrotnie przez 30 min, dodać 3 g sproszkowanej tragakanty i wstrząsać dopóki mieszanina nie stanie się przezroczysta. Przesączyć przez zwitek waty i przepłukać kolbę i watę pięcioma porcjami, każda po 20 ml mieszaniny 1 objętości chlorku metylenu i 2 objętości eteru etylowego. Połączyć przesącz i popłuczyny, odparować do sucha, pozostałość rozpuścić w 10 ml bezwodnego etanolu. Odparować do sucha 5 ml roztworu, pozostałość rozpuścić w kwasie solnym (0,1 mol/l) i uzupełnić takim samym kwasem do 1000,0 ml.

Roztwór porównawczy. Rozpuścić oddzielnie 30,0 mg chininy i 30,0 mg cynchoniny w kwasie solnym (0,1 mol/l) i uzupełnić każdy roztwór takim samym kwasem do 1000,0 ml.

Oznaczenie. Zmierzyć absorbancję 3 roztworów przy 316 nm i 348 nm stosując kwas solny (0,1 mol/l) jako odnośnik.

Obliczyć procentową zawartość alkaloidów wg poniższych wzorów:

$$X = \frac{[A_{316} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348}]}{[A_{316q} \times A_{348c}] - [A_{316c} \times A_{348q}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

$$Y = \frac{[A_{316} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348}]}{[A_{316c} \times A_{348q}] - [A_{316q} \times A_{348c}]} \times \frac{100}{m} \times \frac{2}{1000}$$

m – masa substancji roślinnej, w gramach;

x – procentowa zawartość alkaloidów typu chininy;

y – procentowa zawartość alkaloidów typu cynchoniny;

A₃₁₆ – absorbancja roztworu badanego przy 316 nm;

A₃₄₈ – absorbancja roztworu badanego przy 348 nm;

A_{316c} – absorbancja roztworu porównawczego zawierającego cynchoninę przy 316 nm w odniesieniu do stężenia 1 mg/1000 ml;

A_{316q} – absorbancja roztworu porównawczego zawierającego chininę przy 316 nm w odniesieniu do stężenia 1 mg/1000 ml;

A_{348c} – absorbancja roztworu porównawczego zawierającego cynchoninę przy 348 nm w odniesieniu do stężenia 1 mg/1000 ml;

A_{348q} – absorbancja roztworu porównawczego zawierającego chininę przy 348 nm w odniesieniu do stężenia 1 mg/1000 ml.

Obliczyć zawartość sumy alkaloidów (x + y) i względną zawartość alkaloidów typu chininy wg poniższego wzoru:

$$\frac{100 \times X}{X + Y}$$

***Colae semen* – Zarodek kola**

Wysuszone całe lub połamane nasiona, pozbawione łupiny nasiennej *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl., *C. vera* K. Schum (*Sterculiaceae*) i ich odmian, jak również *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl. (*Sterculia acuminata* P. Beauv.) o zawartości kofeiny nie mniejszej niż 1,5%.

Chromatografia cienkowarstwowa *Colae semen*.

Roztwór badany. Do 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej dodać 5 ml etanolu (60% v/v). Wytrząsnąć mechanicznie 30 min w temp. 40°C i przesączyć.

Roztwory porównawcze.

Roztwór porównawczy (a). Rozpuścić 25 mg kofeiny w 10 ml etanolu (60% v/v).

Roztwór porównawczy (b). Rozpuścić 50 mg teobrominy w 10 ml fazy ruchomej. Przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym F₂₅₄ nanieść po 20 µl roztworu badanego i roztworów porównawczych. Płytkę rozwijać na odległość 10 cm roztworem woda : metanol : octan etylu (10:13:77 v/v/v). Po rozwinięciu płytkę suszyć przez 5 min na powietrzu.

Detekcja A. Obejrzeć w nadfiolecie przy 254 nm. Chromatogram roztworu badanego wykazuje 2 główne pasma o wygaszonej fluorescencji, których położenie jest zgodne z pasmami na chromatogramie roztworów porównawczych (a) i (b) – kofeina i teobromina.

Detekcja B. Spryskać mieszaniną równych objętości etanolu (96%) i kwasu solnego, a następnie roztworem przygotowanym bezpośrednio przed użyciem przez rozpuszczenie 1 g jodu i 1 g jodku potasu w 100 ml etanolu (96%). Chromatogram roztworu badanego wykazuje czerwono-brunatne pasmo główne o położeniu i zabarwieniu zgodnym z pasmem na chromatogramie roztworu porównawczego(a) – kofeina.

Oznaczanie zawartości alkaloidów w *Colae semen*

Metoda wagowa wg FP IV

Do kolby stożkowej na 100ml z doszlifowanym korkiem odważyć z dokładnością do 0,01 g ok. 7g sproszkowanego surowca, dodać 70 g chloroformu, wytrząsać 2 minuty, dodać 4 ml amoniaku 10%, wytrząsnąć, odstawić na godzinę często wstrząsając. Po odstaniu się cieczy przesączyć 40 g roztworu chloroformowego (ok. 4 g surowca) przez suchy sączonek średnicy 12 cm do kolby stożkowej poj. 100 ml, przy czym podczas sączenia należy przykrywać lejek szkiełkiem zegarkowym. Chloroform całkowicie oddestylować na łaźni wodnej, pozostałość rozpuścić w 2 cm chloroformu, dodać 15 ml gorącej wody i ogrzewać mieszaninę na niewielkim płomieniu do chwili całkowitego ulotnienia się chloroformu, po czym gorący roztwór przesączyć przez sączonek średnicy 7 cm do wysuszonej do stałego ciężaru i zważonej dokładnie zlewki lub parownicy; kolbę i sączonek przemyć trzykrotnie gorącą wodą, biorąc po 10 ml. Połączone przesącze odparować na łaźni wodnej i wysuszyć w temp. 90-100°C do stałego ciężaru. Obliczyć procentową zawartość alkaloidów w surowcu.

Metoda chromatografii cieczowej wg FP VIII

Roztwór badany. Do 1,00 g (m_1) sproszkowanej substancji roślinnej dodać 50 ml metanolu. Ogrzewać 30 min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Pozostawić do ochłodzenia, przesączyć. Przemyć sączonek 10 ml metanolu. Do pozostałości dodać 50 ml metanolu. Postępować jak poprzednio. Połączyć przesącze i popłuczyny w kolbie miarowej poj. 200,0 ml i uzupełnić metanolem do 200,0 ml. Przenieść 20,0 ml tego roztworu do kolby

okrągłodennej i odparować do sucha, pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość przenieść, stosując fazę ruchomą, do kolby miarowej poj. 50,0 ml i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml.

Roztwór porównawczy. W kolbie miarowej poj. 100,0 ml rozpuścić w fazie ruchomej 30,0 mg (m_2) kofeiny i 15,0 mg teobrominy i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml. Przenieść 10,0 ml tego roztworu do kolby miarowej poj. 100,0 ml i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml.

Chromatografia. Rozdział prowadzić na kolumnie o wymiarach 250x4,6mm wypełnionej żelalem krzemionkowym do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi (5 μ m). Elucję prowadzić fazą metanol : woda (25:75 v/v). Objętość nastrzyku dowolna. Szybkość przepływu: 1ml/min. Detekcja przy pomocy spektrofotometru przy długości fali 272 nm.

Przydatność układu. Roztwór porównawczy – rozdzielczość: nie mniej niż 2,5 pomiędzy pikami kofeiny i teobrominy, dostosować objętość wody OD w fazie ruchomej, jeżeli konieczne.

Obliczyć zawartość kofeiny wg poniższego wzoru:

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 50}{m_1 \times A_2}$$

A_1 – powierzchnia pików kofeiny na chromatogramie roztworu badanego;

A_2 – powierzchnia pików kofeiny na chromatogramie roztworu porównawczego;

m_1 – masa badanej substancji roślinnej w roztworze badanym, w gramach;

m_2 – masa kofeiny w roztworze porównawczym, w gramach.

***Ipecacuanhae radix* – korzeń ipekakuany**

Rozdrobnione i wysuszone podziemne narządy *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. (*Rubiaceae*) znane jako Matto Grosso ipekakuana, lub *Cephaelis acuminata* Karsten znane jako Costa Rica ipekakuana, lub mieszanina obu gatunków. Głównymi alkaloidami są emetyna i cefelina.

Wymagana zawartość: nie mniej niż 2,0% sumy alkaloidów, w przeliczeniu na emetynę.

Chromatografia cienkowarstwowa *Ipecacuanhae radix*

Procedura A

Roztwór badany. Do 0,1 g sproszkowanej substancji roślinnej w probówce dodać 0,05 ml stężonego wodorotlenku amonowego, 5 ml eteru etylowego i zmieszać mieszaninę energicznie szklaną bagietką. Pozostawić 30 min i przesączyć.

Roztwór porównawczy. Rozpuścić 2,5 mg chlorowodoru emetyny i 3ml chlorowodoru cefeliny w metanolu, i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 20 ml.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym nanieść po 10 µl roztworu badanego i roztworu porównawczego. Płytkę rozwijać na wysokość 10 cm fazą ruchomą **stężony wodorotlenek amonowy : metanol : octan etylu : toluen** (2:15:18:65 v/v/v/v). Po rozwinięciu płytkę wysuszyć na powietrzu.

Detekcja A. Spryskać roztworem (5 g/l) jodu w etanolu (96%) i ogrzewać 10 min w temp. 60°C. Obejrzeć w świetle dziennym. Chromatogramy roztworu badanego i roztworu porównawczego wykazują w dolnej części żółte pasmo emetyny, a poniżej jasnobrunatne pasmo cefeliny.

Detekcja B. Obejrzeć w nadfiolecie przy 365 nm. Pasma emetyny wykazuje intensywną żółtą fluorescencję, a pasmo cefeliny jasnoniebieską fluorescencję. Chromatogram roztworu badanego wykazuje także inne słabo fluoryzujące pasma. W przypadku substancji roślinnej przygotowanej z *C. acuminata* główne pasma na chromatogramie roztworu badanego wykazują położenie, fluorescencję i wielkość zgodne z pasmami na chromatogramie roztworu porównawczego. W przypadku substancji roślinnej przygotowanej z *C. ipecacuanha*, jedyną różnicą jest występowanie na chromatogramie roztworu badanego znacznie mniejszego pasma cefeliny w porównaniu z odpowiadającym pasmem na chromatogramie roztworu porównawczego.

Procedura B

Roztwór badany. 0,1 g sproszkowanego surowca zwilżyć kilkoma kroplami 25% roztworu amoniaku, dodać 5 ml chloroformu, wytrząsać przez 30 minut i przesączyć.

Chromatografia. Na płytkę o wymiarach 10x20 cm pokrytą żelem krzemionkowym, nanieść 50 µl roztworu badanego i po 5 µl roztworów porównawczych (0,03% metanolowe roztwory emetyny i cefeliny). Płytkę rozwijać dwukrotnie na wys. 10 cm fazą ruchomą **chloroform : metanol** (85:5 v/v). Po każdorazowym rozwinięciu płytkę suszyć przez 5 minut.

Detekcja. Rozwinięty chromatogram spryskać 0,5% roztworem jodu w chloroformie i ogrzewać przez 10 minut w temp. 60°C. Po ostudzeniu chromatogram obejrzeć w świetle dziennym i UV_{365nm}. W świetle dziennym widocznych jest 5 żółto lub żółtobrunatno zabarwionych plam; emetyna (Rf 0,40-0,50) fluoryzuje w świetle UV żółto, cefelina (Rf 0,20-0,30) jasnoniebiesko.

Oznaczanie zawartości alkaloidów w *Ipecacuanhae radix*

Roztwór badany. Do 7,5 g sproszkowanej substancji roślinnej w suchej kolbie, dodać 100 ml eteru etylowego i wytrząsać 5 min. Dodać 5 ml rozcieńczonego wodorotlenku amonowego OD1, wytrząsać 1h. Dodać 5 ml wody i energicznie wstrząsnąć. Zdekantować warstwę eterową do kolby przez zwitek waty. Przemyc pozostałość w kolbie 2 porcjami, każda po 25 ml eteru etylowego dekantując każdą porcję przez ten sam zwitek waty. Połączyć roztwory eterowe i usunąć eter przez destylację. Rozpuścić pozostałość w 2 ml etanolu 90%, odparować do sucha i ogrzewać 5 min. w temp. 100°C. Rozpuścić pozostałość w 5 ml uprzednio zobojętnionego etanolu 90%, ogrzewając na łaźni wodnej.

Oznaczenie. Dodać 15,0 ml kwasu solnego (0,1 mol/l) i miareczkować nadmiar kwasu roztworem wodorotlenku sodu (0,1 mol/l) używając jako wskaźnika 0,5 ml mieszanego roztworu czerwieni metylowej.

1 ml kwasu solnego (0,1 mol/l) odpowiada 24,03 mg sumy alkaloidów, w przeliczeniu na emetynę ($C_{29}H_{40}N_2O_4$).