

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ



ANALIZA FITOCHEMICZNA
ROŚLINNYCH SUBSTANCJI
LECZNICZYCH

SKRYPT DO ĆWICZEŃ

WARSZAWA 2025

ANALIZA FITOCHEMICZNA ROŚLINNYCH SUBSTANCJI LECZNICZYCH

Skrypt do ćwiczeń



**WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY**

Warszawa 2025

Autorzy skryptu:

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Sebastian Granica

Prof. dr hab. n. farm. Anna Kiss

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Jakub Piwowarski

Dr hab. n. farm. Agnieszka Bazyłko

Dr n. med. i n. o zdr. Małgorzata Kołtun-Jasion

Dr n. med. i n. o zdr. Weronika Skowrońska

Dr inż. Aleksandra Kruk

Dr n. farm. Andrzej Parzonko

Dr n. farm. Agnieszka Filipek

Metodyka do wszystkich ćwiczeń została opracowana przez zespół pracowników Katedry Biologii Farmaceutycznej (dawna Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii), w latach 2000–2024.

Podziękowania za pomoc w przygotowywaniu poszczególnych ćwiczeń kierujemy do:

Inż. Moniki Marciniak

Inż. Romana Rudeckiego

Inż. Marii Kahl

ISBN 978-83-7637-642-4

Skład oraz oprawa graficzna skryptu: dr n. med. i n. o zdr. Małgorzata Kołtun-Jasion

Projekt okładki: dr n. med. i n. o zdr. Małgorzata Kołtun-Jasion

SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA	5
ALKALOIDY	7
Oznaczanie zawartości atropiny w surowcach metodą HPLC	12
ANTRAZWIAZKI	28
Badanie chromatograficzne preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki	34
ALAX/BOLDALOIN.....	34
FIGURA 1/SENEFOL/SENES FIX/XENNA	36
NORMOLAX/NORMOSAN/PLANTAGOLAX/PURTAGEN/REGULSON/ SPECIES	
REDUCENTES/TABLETKI PRZECIW NIESTRAWNOŚCI/ ZIOŁA PRZECZYSZCZAJĄCE	38
RADIX RHEI tabletki	40
FLAWONOIDY	45
Oznaczanie zawartości flawonoidów metodą Christa-Millera	52
Oznaczanie zawartości flawonoidów z kwasem borowym.....	54
<i>Crataegi folium cum flore</i>	54
<i>Violae herba cum flore</i>	56
Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej.....	58
<i>Betulae folium</i>	58
<i>Calendulae flos</i>	59
<i>Crataegi folium cum flore</i>	60
<i>Equiseti herba</i>	61
<i>Helichrysi flos</i>	62
<i>Polygoni avicularis herba</i>	63
<i>Sambuci flos</i>	64
<i>Solidaginis virgaureae herba</i>	65
<i>Violae herba cum flore</i>	66
GLIKOZYDY FENOLOWE	72
Oznaczanie zawartości arbutyny metodą kolorymetryczną (FP VI)	76
Oznaczanie zawartości arbutyny metodą HPLC (FP XII)	78
IRYDROIDY	83
Oznaczanie zawartości związków irydoidowych metodą kolorymetryczną (FP VI).....	88
Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej.....	90
OLEJKI ETERYCZNE	94
Oznaczenie zawartości olejku w substancji roślinnej metodą wg FP XII	99
Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej.....	101
<i>Anisi oleum</i>	101
<i>Caryophylli floris aetheroleum</i>	102
<i>Carvi oleum</i>	103
<i>Coriandri oleum</i>	104
<i>Foeniculi oleum</i>	105
<i>Lavandulae oleum</i>	106
<i>Matricariae oleum</i>	107
<i>Menthae piperitae oleum</i>	108
<i>Thymi oleum</i>	109
Badanie jakościowe i ilościowe olejku miętowego metodą chromatografii gazowej.....	110

ĆWICZENIA SPECJALISTYCZNE

ESKULINA	118
Izolacja eskuliny z <i>Hippocastani cortex</i>	121
Potwierdzenie tożsamości i czystości wyizolowanej eskuliny metodą HPLC-DAD	123
Potwierdzenie tożsamości i czystości wyizolowanej eskuliny metodą HPLC-DAD-MS/MS	124
KWAS ROZMARYNOWY	127
Oznaczanie zawartości kwasu rozmarynowego w preparatach metodą densytometryczną po rozdzieleniu TLC	131
KOFEINA	135
Izolacja kofeiny z liści herbaty – potwierdzenie tożsamości izolowanego związku	138
OCENA SKŁADU PREPARATÓW ZAWIERAJĄCYCH WYCIĄGI Z <i>ECHINACEA</i> SP.	142
Badania jakościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z <i>Echinacea</i> sp. według FP IX metodą TLC	145
Badania ilościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z <i>Echinacea</i> sp. według FP IX metodą HPLC-MS	148
SYSTEMATYKA	153
SPIS RYCIN I TABEL	158
BIBLIOGRAFIA	159

PRZEDMOWA

dr Andrzej Parzonko

Warunkiem skutecznej farmakoterapii jest odpowiednia jakość leku. Substancje roślinne oraz leki je zawierające również podlegają badaniom, mającym na celu określić ich przydatność. Jednakże, ze względu na swoją specyfikę, przede wszystkim skomplikowany skład i trudną matrycę, badania substancji i leków roślinnych różnią się od badań leków syntetycznych. Substancje roślinne podlegają badaniom mikroskopowym, mającym na celu potwierdzenie ich tożsamości, ale także badaniom fitochemicznym, mającym na celu potwierdzenie tożsamości substancji roślinnej, wykrycie bądź potwierdzenie obecności określonych związków pochodzenia naturalnego (często odpowiadających za działanie danej substancji) a także określenie ich zawartości. Zajęcia na pracowni fitochemicznej mają na celu wprowadzenie studentów w metodykę pracy z substancjami i lekami roślinnymi. W ramach zajęć studenci poznają chemiczne metody oceny substancji i leków roślinnych: metody przygotowywania wyciągów (sposoby ekstrakcji oraz oczyszczania); metody oceny jakościowej, czyli wykrywania związków czynnych (metody chemiczne, i instrumentalne m.in. TLC, GC, HPLC) oraz metody oceny ilościowej (spektrofotometria, GC, HPLC). Niniejszy skrypt ma w tym pomóc. W skrypcie zawarte są opisy poszczególnych ćwiczeń wraz z teoretycznym wprowadzeniem do ćwiczenia, opisy metod analitycznych wykorzystanych w ćwiczeniu, znajduje się w nim także miejsce na opracowanie wyników i sprawozdanie z wykonanego ćwiczenia. Mamy nadzieję, że ułatwi on studentom zrozumienie i przyswojenie zagadnień związanych z analizą substancji i leków roślinnych.

Opracowanie rozdziału: dr inż. Aleksandra Kruk, prof. Anna Kiss

Cel ćwiczenia:

- Przypomnienie ogólnych wiadomości na temat związków z grupy alkaloidów oraz metod ich badania.
- Oznaczanie zawartości alkaloidów tropanowych (atropiny) w substancji roślinnej, metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).
- Poznanie właściwości farmakologicznych i wykorzystanie w terapii związków oraz poszczególnych substancji roślinnych.

Substancje roślinne:

Belladonnae folium (FPXII)

Boldi folium (FPXII)

Capsici fructus (FPXII)

Chelidonii herba (FPXII)

Cinchonae cortex (FPXII)

Colae semen (FPXII)

Ephedrae herba (FPXII)

Fumariae herba (FPXII)

Guaranae semen (FPXII)

Hydrastidis rhizoma (FPXII)

Ipecacuanhae radix (FPXII)

Magnoliae officinalis cortex (FPXII)

Passiflorae herba (FPXII)

Stephaniae tetrandrae radix (FPXII)

Stramonii folium (FPXII)

Uncariae rhynchophyllae ramulus cum uncis (FPXII)

1. Wstęp:

Alkaloidy to grupa organicznych substancji roślinnych o charakterze zasadowym, zawierających azot związany heterocyklicznie (z nielicznymi wyjątkami: poch. fenyloalkilaminy czy kolchicina). Biogeneza alkaloidów w roślinach jest skomplikowanym procesem metabolicznym, który obejmuje wiele etapów i szlaków biochemicznych. Najczęściej prekursorami w tym procesie są aminokwasy (wyjątkiem są tzw. pseudoalkaloidy wywodzące się biogenetycznie z aktywnego izoprenu), które, w zależności od rodzaju alkaloidu, są przekształcane poprzez specyficzne szlaki metaboliczne (np. terpenowe alkaloidy indolowe rodzin Rubiaceae i Apocynaceae, zawierające cząsteczkę sekologaniny w swojej strukturze) oraz przechodzą dodatkowe modyfikacje, warunkujące ich funkcje i właściwości. I tak alkaloidy wywodzące się z aminokwasów (w tym z kwasu nikotynowego i antranilowego) i zawierające azot związany heterocyklicznie zaliczamy to **alkaloidów właściwych**.

Związki, nie zawierające azotu heterocyklicznego (poch. fenyloalkiloaminy czy indoloalkiloaminy) zaliczamy do **protoalkaloidów**. Związki zawierające w swojej cząsteczce azot heterocykliczny, ale cała struktura wywodzi się z aktywnego izoprenu, nazywane są **pseudoalkaloidami**.

Alkaloidy w roślinach rzadko występują w postaci wolnych zasad, częściej tworzą sole z kwasami organicznymi, takimi jak kwas winowy, cytrynowy czy szczawiowy. Funkcja alkaloidów w roślinach nie jest całkowicie poznana, ale według jednej z głównych hipotez pełnią one rolę ochronną przed szkodnikami, stąd część alkaloidów jest silnymi inhibitorami cholinoesteraz (np. galantamina, fizostygmina) czy ma działanie cholinergiczne (np. atropina). Są to związki optycznie czynne, często lewoskrętne i charakteryzujące się znaczną lipofilnością, co umożliwia im łatwe przenikanie przez błony śluzowe oraz barierę krew-mózg, wpływając na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) m.in. przez obecność cząsteczki azotu w ich strukturze.

Alkaloidy mogą działać na OUN depresyjnie (np. morfina, skopolamina) lub pobudzająco (np. strychnina, kofeina, efedryna). Działają również na autonomiczny układ nerwowy: efedryna ma działanie sympatykomimetyczne, rezerpina i niektóre alkaloidy sporyszowe – sympatykolityczne, pilokarpina – parasympatykomimetyczne, a atropina – parasympatykolityczne. Niektóre, takie jak winblastyna czy taksol, mają zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej lub stały się podstawą do opracowania półsyntetycznych pochodnych.

Obecnie alkaloidy i zawierające je surowce nadal mają ważne znaczenie w leczeniu. Wyciągi i substancje roślinne z *Atropa belladonna*, *Fumaria officinalis*, *Chelidonium majus* i *Peumus boldus* są stosowane w terapii różnych schorzeń, głównie ze względu na działanie rozkurczające (spazmolityczne). Ponadto, warto zaznaczyć, że wiele surowców azjatyckich zawierających alkaloidy, posiada swoje monografie w Farmakopei Polskiej (np. *Uncariae rhynchophyllae ramulus cum uncis*, *Magnoliae officinalis cortex*, *Stephaniae tetrandrae radix*) i może być dostępnych na europejskim rynku farmaceutycznym.

Alkaloidy izolowane z materiału roślinnego lub pozyskiwane na drodze syntezy lub półsyntezy z prekursorów naturalnych są nadal stosowane w leczeniu. Typowym przykładem jest morfina pozyskiwana z opium (legalne uprawy maku lekarskiego w Turcji) lub słomy makowej, winblastyna z barwinka różowego i chinina z kory chinowej, stosowane odpowiednio w leczeniu bólu, chemioterapii oraz malarii. Współczesna farmakologia korzysta również z syntetycznie otrzymywanych alkaloidów pochodzenia naturalnego, takich jak teofilina, galantamina czy papaweryna. Należy jednak pamiętać o toksyczności alkaloidów, która może prowadzić do zatrucia (np. pomylenie liści zimowita jesiennego zawierającego silnie

toksyczną kolchicynę z liśćmi czosnku niedźwiedziego) i/lub uzależnień (np. bieluń, pokrzyk wilcza jagoda czy liście azjatyckiej rośliny *Mitragyna speciosa* zawierające alkaloid mitragyninę – antagonistę receptora opioidowego). Warto też wspomnieć o tym, że wiele gatunków roślin zawierających alkaloidy o znaczeniu toksykologicznym jest powszechnie uprawiana w ogrodach jako rośliny ozdobne np.: tojad mocny (*Aconitum firmum*), którego główny związek czynny – akonityna zyskała miano, ze względu na ryzyko zatrucia śmiertelnego – “arszeniku roślinnego”.

Ze względu na biosyntezę i budowę alkaloidy można sklasyfikować następująco:

- powstałe z ornityny i lizyny – tropanowe, pirolizydynowe, chinolizydynowe, piperydynowe
- powstałe z kwasu nikotynowego – pirydynowe
- powstałe z fenyloalaniny i tyrozyny – izochinolinowe oraz pochodne fenyloetyloaminy,
- powstałe z tryptofanu – indolowe, pochodne indoloalkiloaminy, niektóre alkaloidy chinolinowe
- powstałe z histydyny – imidazolowe i purynowe
- powstałe z kwasu antranilowego – furochinolinowe
- pseudoalkaloidy – wywodzące się biogenetycznie z izoprenu.

Jedną z kluczowych grup alkaloidów są alkaloidy tropanowe. Jest to grupa około 200 związków chemicznych, które występują głównie w rodzinach Solanaceae, Erythroxylaceae i Convolvulaceae. Mają one strukturę opartą na bicyklicznym szkielecie tropanu, który składa się z sześcioczłonowego pierścienia pirolidynowego i pięcioczłonowego pierścienia piperydynowego. Związki te są estrami alkoholu tropanowego (3 α -hydroksytropanu – atropina lub 3 β -hydroksytropanu – kokaina) z różnymi kwasami alifatycznymi lub organicznymi.

Wśród alkaloidów tropanowych, hioscyamina, atropina, skopolamina i kokaina mają kluczowe znaczenie farmakologiczne. Hioscyamina w swojej strukturze zawiera węgiel asymetryczny. W roślinie powstaje tylko forma lewoskrętna (-), która w czasie suszenia rośliny przechodzi w racemat – ($\pm$) atropinę, która wykazuje słabsze działanie od formy (-). Forma prawoskrętna (+) jest praktycznie pozbawiona aktywności farmakologicznej. Hioscyamina i atropina działają głównie jako parasympatykolityki, są kompetytywnymi antagonistami (inhibitorami) wszystkich podtypów receptorów muskarynowych (M1–M5). Silne powinowactwo wykazują zwłaszcza do podtypów M1 i M2. Efektem jest działanie rozkurczające na mięśnie gładkie: przewodu pokarmowego, dróg żółciowych i dróg moczowych oraz rozszerzenie

żrenic. Powyższe działania są wykorzystywane w lecznictwie (preparaty galenowe, krople do oczu itp.). Efektem niepożądanym, działania tych związków, związanym z wpływem na receptory M jest zmniejszenie wydzielania gruczołów (np. suchość w ustach). Atropina, wykazuje także działanie blokujące nerw błędny, powodując przyspieszenie akcji serca, bez znaczącego wpływu na ciśnienie krwi. W wyższych dawkach może powodować skurcz naczyń, zaczerwienienie twarzy i hipertensję. W toksycznych dawkach alkaloidy tropanowe mogą wywołać pobudzenie, halucynacje, delirium, a nawet śpiączkę. Zatrucie atropiną objawia się rozszerzeniem źrenic, porażeniem gruczołów potowych i pobudzeniem psychomotorycznym. Skopolamina, podobnie jak atropina, działa obwodowo, ale silniej wpływa na OUN, działając uspokajająco i narkotycznie oraz potęgując działanie morfiny. Butylobromek skopolaminy (preparat *Skopolan*) stosowany jest w leczeniu stanów skurczowych mięśni gładkich. Kokaina, pozyskiwana z liści krasnodrzewu pospolitego (*Erythroxylum coca* Lam.), działa jako miejscowy anestetyk (nie stosowany obecnie w lecznictwie w Polsce) i sympatykomimetyk, zwiększając poziom noradrenaliny i dopaminy, co prowadzi do wzrostu ciśnienia, euforii oraz silnego uzależnienia psychicznego.

Głównymi roślinnymi źródłami alkaloidów tropanowych są: *Atropa belladonna* L. (atropina z korzeni i liści), *Datura stramonium* L. (atropina i skopolamina z liści) oraz *Hyoscyamus niger* L. (niewielkie ilości hioscyjminy, skopolaminy i atropiny w liściach, ~0,05%). Popularne preparaty, wykorzystujące działanie rozkurczowe wyciągu z pokrzyku wilczej jagody, wynikające z obecności atropiny, to *Cholitol*, *Spasticol*, *Hemorol* i *Kapsiplast*.

Do oznaczania alkaloidów w surowcach roślinnych wykorzystywane są różne metody analityczne. Testy chemiczne (reakcje Marquisa, Vitaliego lub reakcja mureksydowa, znane z zajęć z Chemii Leków) służą do wstępnej identyfikacji i jakościowej analizy alkaloidów, umożliwiając tanie, szybkie i łatwe ocenienie ich obecności w roślinach. W niektórych przypadkach stosowana jest chromatografia gazowa, jednak jest ograniczona jedynie do lotnych alkaloidów lub wymaga wcześniejszego ich przekształcenia w lotne pochodne. Najczęściej stosowaną metodą jest wysokosprawną chromatografia cieczowa (HPLC), która umożliwia ich rozdzielenie, identyfikację i oznaczanie w próbkach roślinnych. Metoda ta korzysta z różnych detektorów, takich jak UV-VIS (wykorzystuje charakterystyczne pasma absorpcyjne alkaloidów w zakresie UV-VIS), fluorescencyjny (wykorzystuje właściwości fluorescencyjne niektórych alkaloidów) oraz masowy (pozwala na określanie mas cząsteczkowych alkaloidów), co zwiększa dokładność i czułość analizy. Ponadto, w analizie alkaloidów metodą HPLC, dodatek soli chaotropowych (np. NaPF₆) poprawia rozdział i zapobiega ogonowaniu pików w czasie separacji tej grupy związków. Istotnym

elementem w analizie surowców alkaloidowych jest wyodrębnienie zespołu alkaloidów z materiału roślinnego.

Alkaloidy tropanowe są związkami nietrwałymi. W środowisku kwaśnym i podwyższonej temperaturze łatwo ulegają rozkładowi. Z tego względu ekstrakcję (uwolnienie z połączeń z innymi związkami) prowadzimy w temperaturze pokojowej poprzez wytrząsanie stosując słabo zakwaszony alkohol (0,05 mol/l kwasu winowego w 20% metanolu). Otrzymany ekstrakt należy oczyścić rozpuszczalnikiem organicznym (dichlorometan) usuwając tym samym większość związków niebędących alkaloidami. Po alkalizacji środowiska, ekstrakcję alkaloidów tropanowych prowadzimy również dichlorometanem, wykorzystując tym razem właściwości zasadowe badanych związków, co wiąże się z ich elucją do warstwy organicznej.

Oznaczanie zawartości atropiny w surowcach metodą HPLC

Materiał do badań (proszę zaznaczyć badany surowiec):

☐ *Belladonnae radix*

☐ *Hyoscyami folium*

☐ *Belladonnae folium* (FP XII)

☐ *Stramonii folium* (FP XII)

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu do badań:

Dokładnie około 0,6 g surowca przenieść do kolby stożkowej ze szlifem o pojemności 100 ml, dodać 20 ml 0,05 mol/l kwasu winowego w 20% metanolu, wytrząsać w wytrząsarce mechanicznej przez 15 minut, przesączyć przez sączek bibułowy do rozdzielacza o pojemności 100 ml. Ekstrakcję powtórzyć. Połączone wyciągi kwaśne oczyścić przez dwukrotne wytrząsanie z dichlorometanem w rozdzielaczu, używając każdorazowo po 20 ml rozpuszczalnika. Frakcje dichlorometanowe odrzucić. Kwaśny wyciąg wodno-metanolowy zalkalizować używając około 1 ml 25% amoniaku, a następnie czterokrotnie ekstrahować alkaloidy dichlorometanem używając każdorazowo 20 ml dichlorometanu. Połączone wyciągi osuszyć poprzez wsypanie bezwodnego siarczanu sodowego do kolby, zbrylony siarczan sodowy odsączyć przez sączek bibułowy, a przesącz oddestylować do sucha na wyparce próżniowej.

Oznaczenie zawartości metodą HPLC:

Po ostudzeniu kolby, suchą pozostałość rozpuścić w 5 ml fazy ruchomej stosowanej w metodzie HPLC. Następnie ok. 2 ml roztworu przesączyć przez sączek strzykawkowy ($\varnothing$ 0,45 μ m) do kolbki stożkowej o pojemności 25 ml. Pobrać za pomocą strzykawki typu Hamilton około 100 μ l analizy i nastrzyknąć na kolumnę chromatograficzną poprzez wprowadzenie próbki do pętli nastrzykowej (pętla 20 μ l).

Warunki oznaczenia:

Aparatura:	chromatograf cieczowy firmy Shimadzu (LC-10AT)
Kolumna:	RP-18 firmy Machery-Nagel (250 $\times$ 4 mm; $\varnothing$ 4 mm; d_p 5 μ m)
Detektor:	UV-VIS firmy Shimadzu (SPD-6AV)
Faza ruchoma:	acetonitryl – woda – kwas octowy (40:60:0,5, v:v:v) + 10 mM NaPF ₆

Przepływ: 1,0 ml/minutę
Długość fali: 230 nm
Ilość analitu: 20 µl
(wprowadzonego na kolumnę)

Warunki analizy HPLC dotyczą tzw. układu faz odwróconych tzn. faza stacjonarna jest mniej polarna od fazy ruchomej, na którą składa się mieszanina rozpuszczalników o charakterze polarnym. Ponadto, dodatek NaPF₆ jeszcze bardziej zwiększa polarność układu tak aby związki o charakterze niepolarnych słabych zasad miały możliwość zatrzymania się na kolumnie.

2. Obliczenia:

Zawartość atropiny w surowcu proszę obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{P \times V}{v \times m \times 1853030} [\%]$$

X – zawartość atropiny [%]

V – objętość próbki badanej [ml]

v – objętość próbki wprowadzonej na kolumnę [ml]

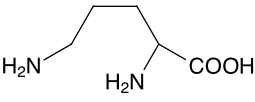
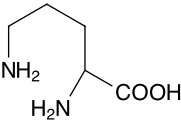
m – naważka surowca [mg]

P – pole powierzchni pod pikiem

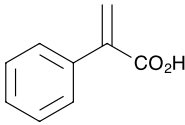
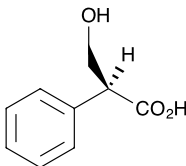
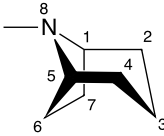
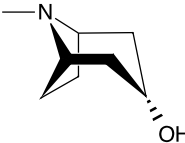
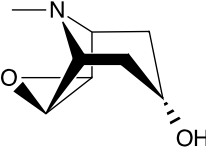
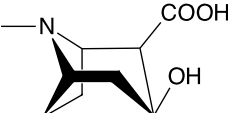
3. Wnioski:

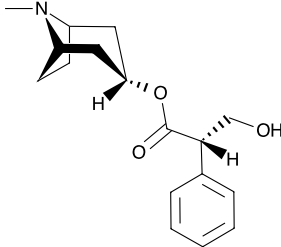
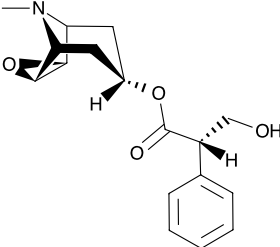
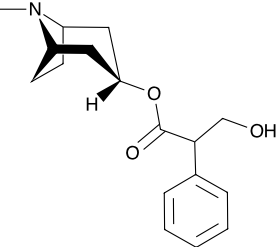
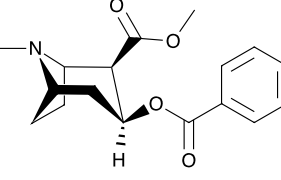
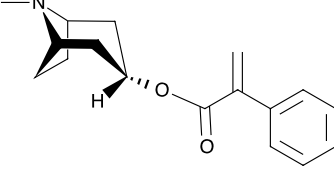
Karta wzorów

I. Alkaloidy powstałe z ornityny i lizyny

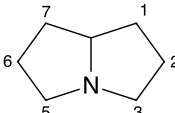
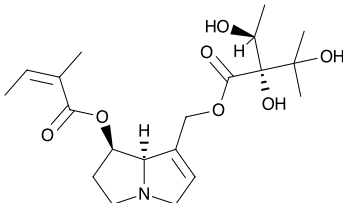
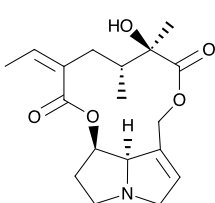
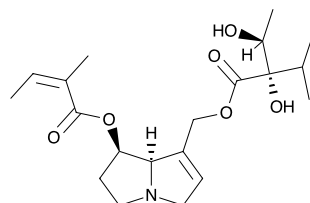
	
Ornityna	Lizyna

1) Alkaloidy tropanowe

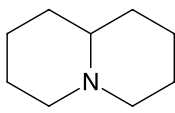
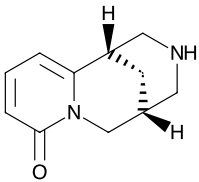
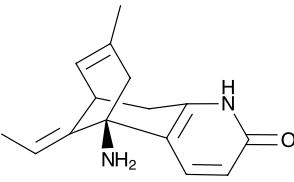
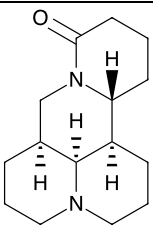
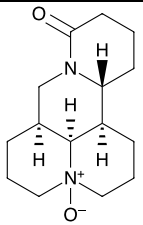
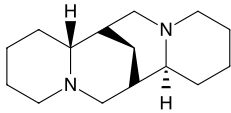
		
Kwas atropowy	Kwas tropowy	Tropan
		
Tropanol	Skopolan	Ekgonina

		
(-)-Hioscyjamina	(-)-Hioscyna (-)-Skopolamina	(+/-)-Atropina
		
Kokaina	Apoatropina	

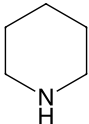
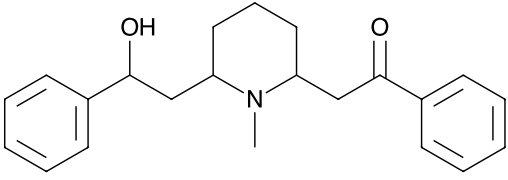
2) Alkaloidy pirolizydynowe

		
Pirolizydyna		
		
Echimidyna	Senecjonina	Symfytyna

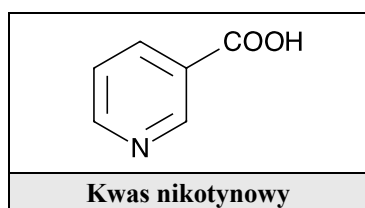
3) Alkaloidy chinolizydynowe

		
Chinolizydyna		
		
Cytizyna	Hupercyna A	Matryna
		
Oksymatryna	Sparteina	

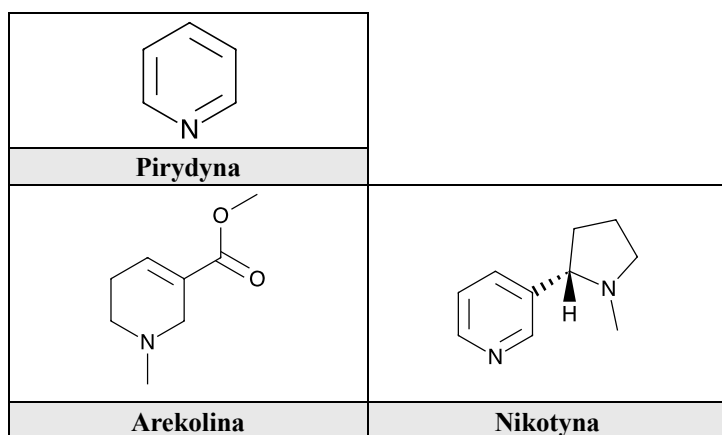
4) Alkaloidy piperydynowe

	
Piperydyna	Lobelina

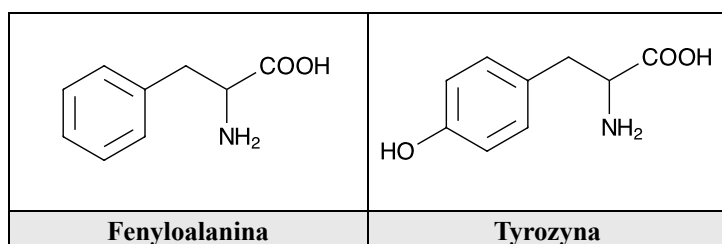
II. Alkaloidy powstałe z kwasu nikotynowego



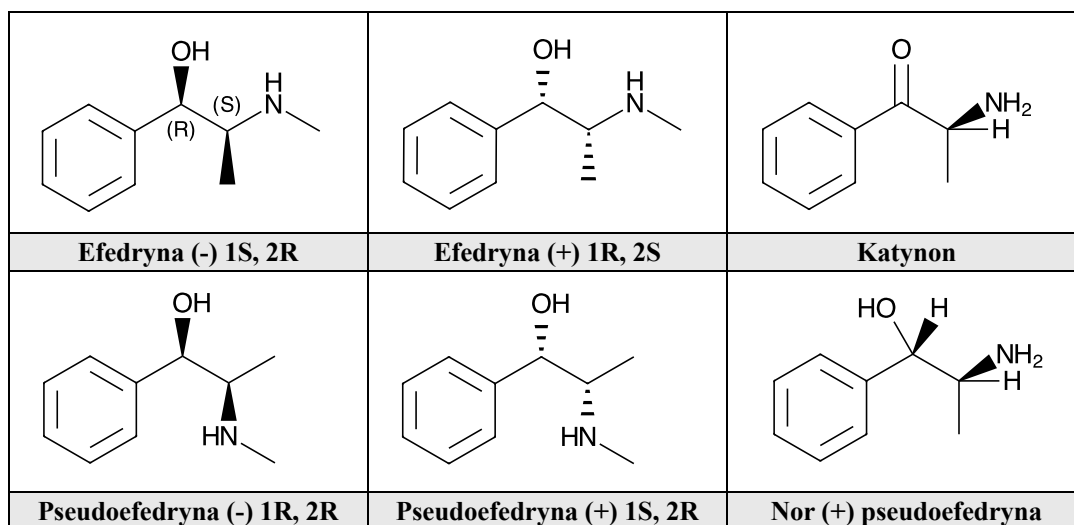
1) Alkaloidy pirydynowe

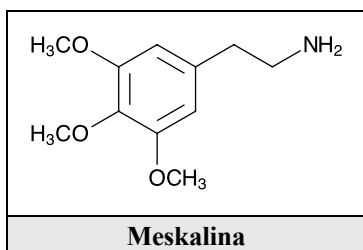


III. Alkaloidy powstałe z fenyloalaniny i tyrozyny

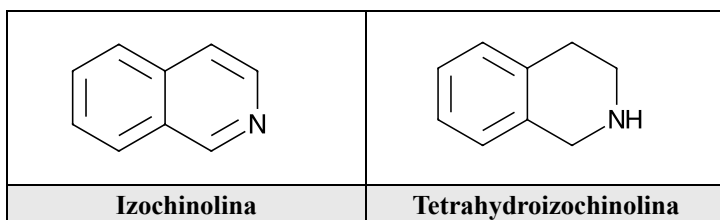


1) Pochodne fenyletyloaminy

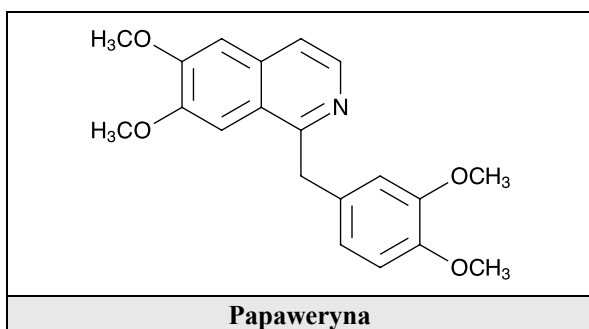




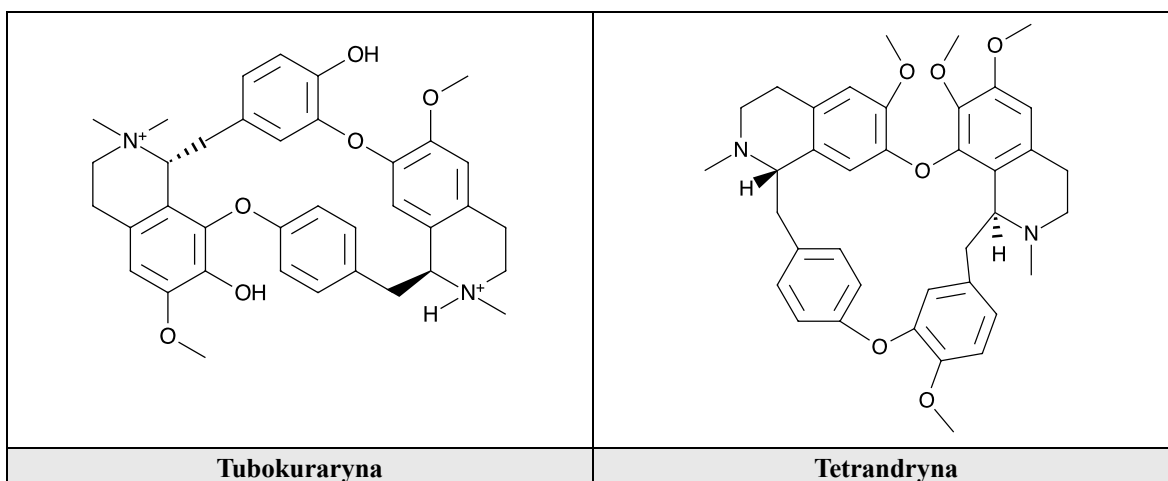
2) Alkaloidy izochinolinowe



- grupa benzyloizochinoliny



- grupa bis-benzyloizochinoliny



- grupa aporfiny (apomorfiny)

Boldyna	Izokorydyna	Laurotetanina

Magnofloryna	Nucyferyna

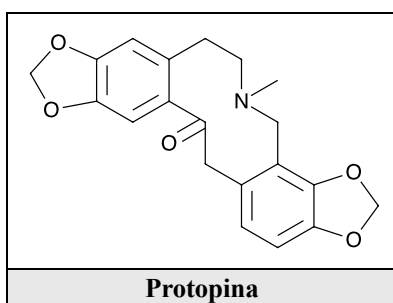
- grupa protoberberyny

Berberyna	Hydrastyna

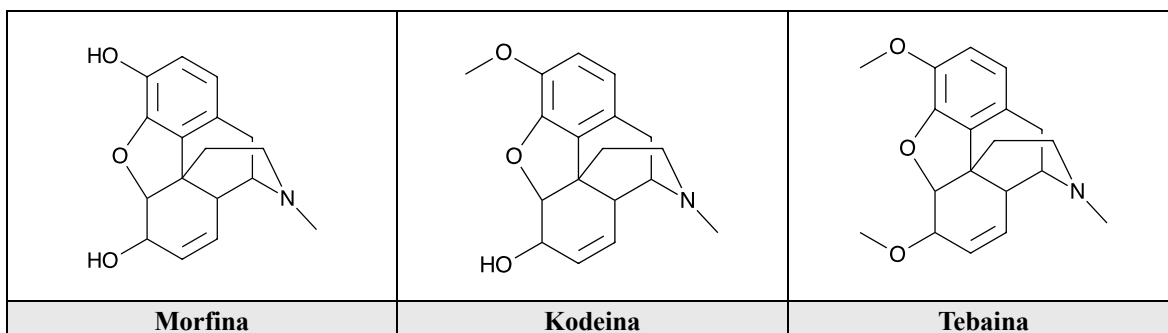
- pochodne benzofenantrydyny

Chelerytryna	Chelidonina	Sangwinaryna

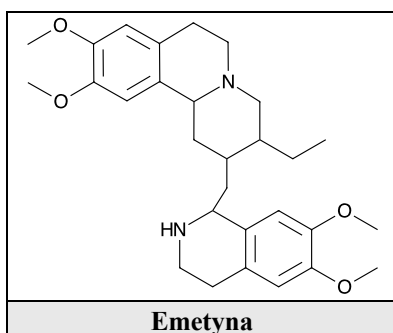
- pochodne protopiny



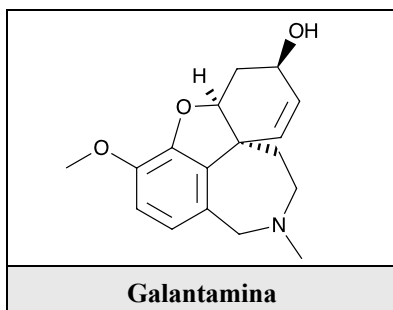
- grupa morfinianu



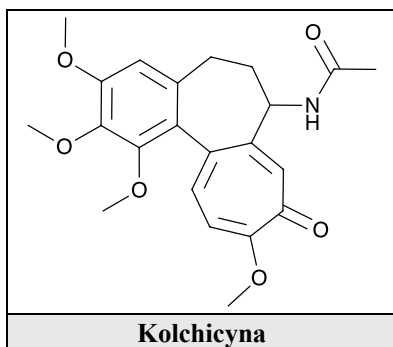
- grupa emetyny (alkaloidy izochinolino-monoterpenowe)



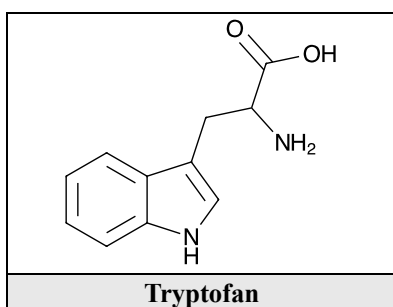
- alkaloidy Amaryllidaceae



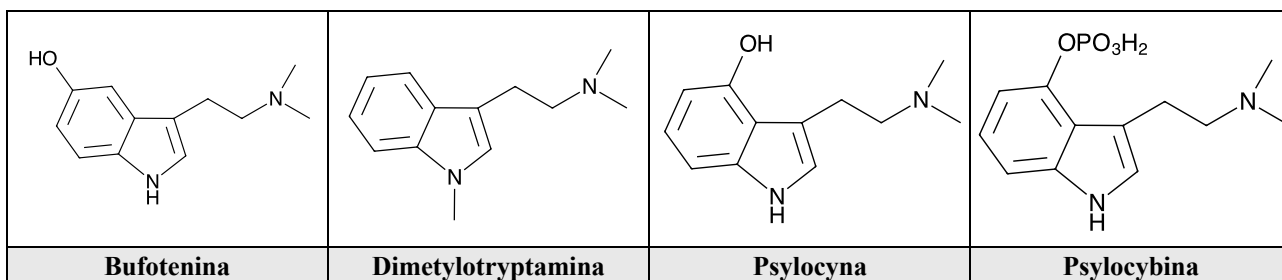
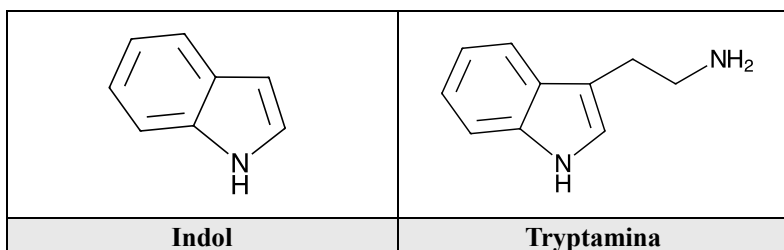
- alkaloidy Colchicum



IV. Alkaloidy powstałe z tryptofanu

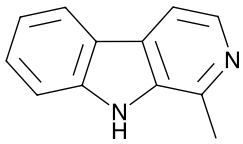
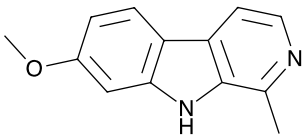
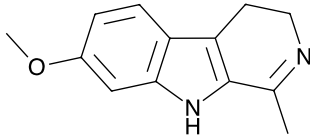


1) Pochodne indoloalkiloaminy

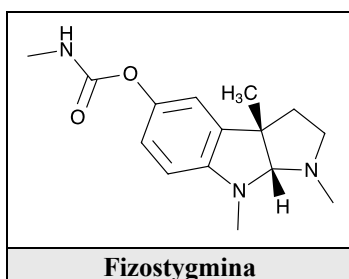


2) Alkaloidy indolowe

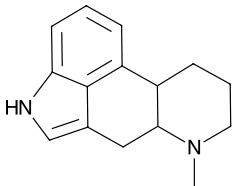
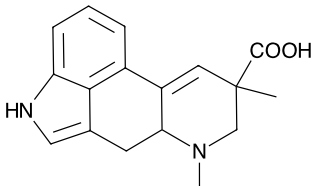
- pochodne harmanu

		
Harman	Harmina	Harmalina

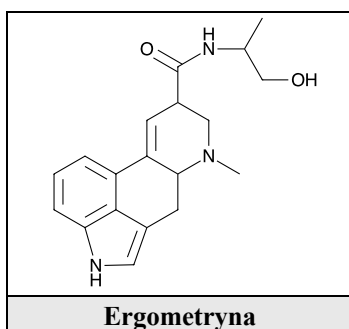
- pochodne eseryny



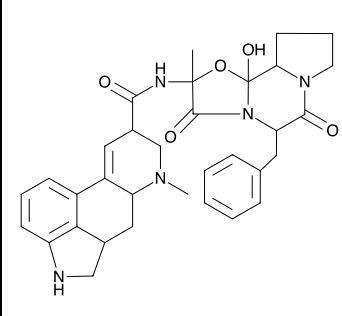
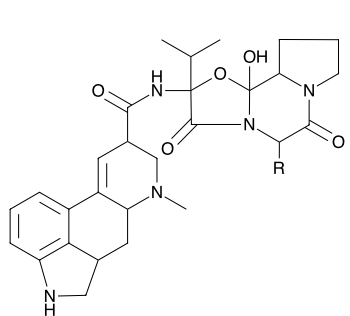
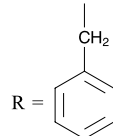
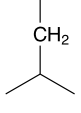
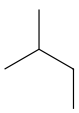
- alkaloidy sporyszowe

	
Ergolina	Kwas D-lizergowy

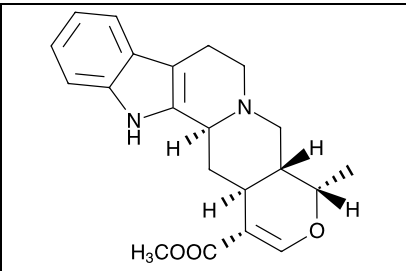
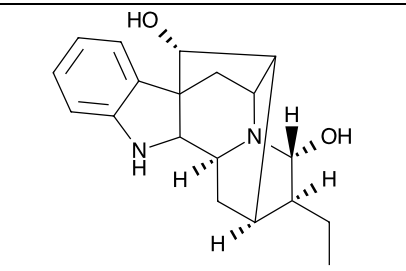
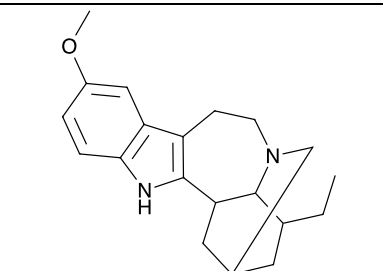
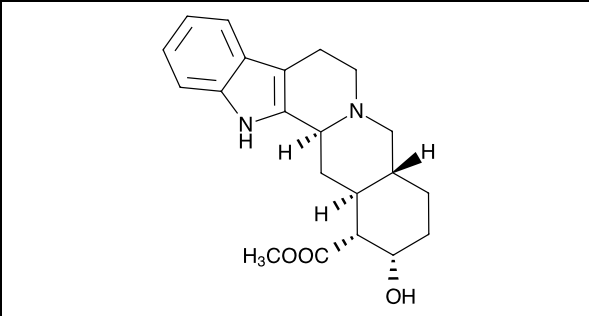
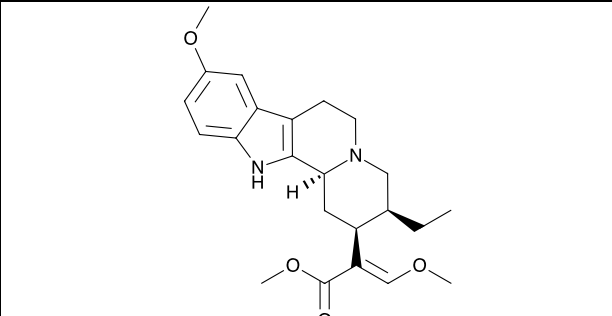
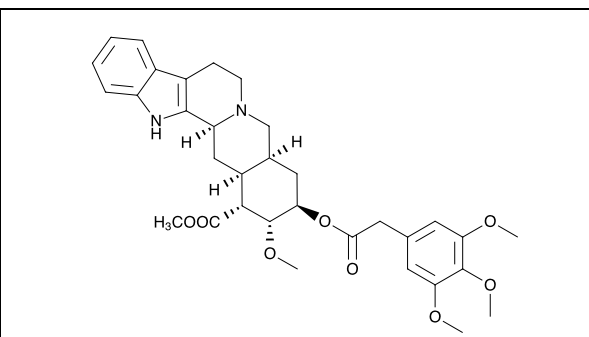
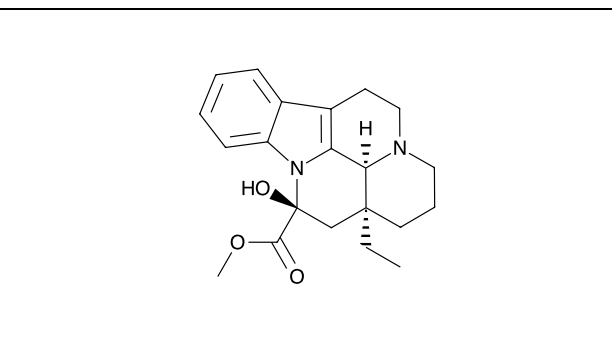
- proste amidy kwasu D-lizergowego



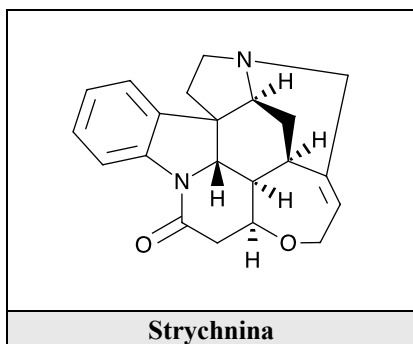
- alkaloidy peptydowe

		$R =$ 
Ergotamina		Ergokryptyna
		$R =$ α  β 
		Ergokryptyna

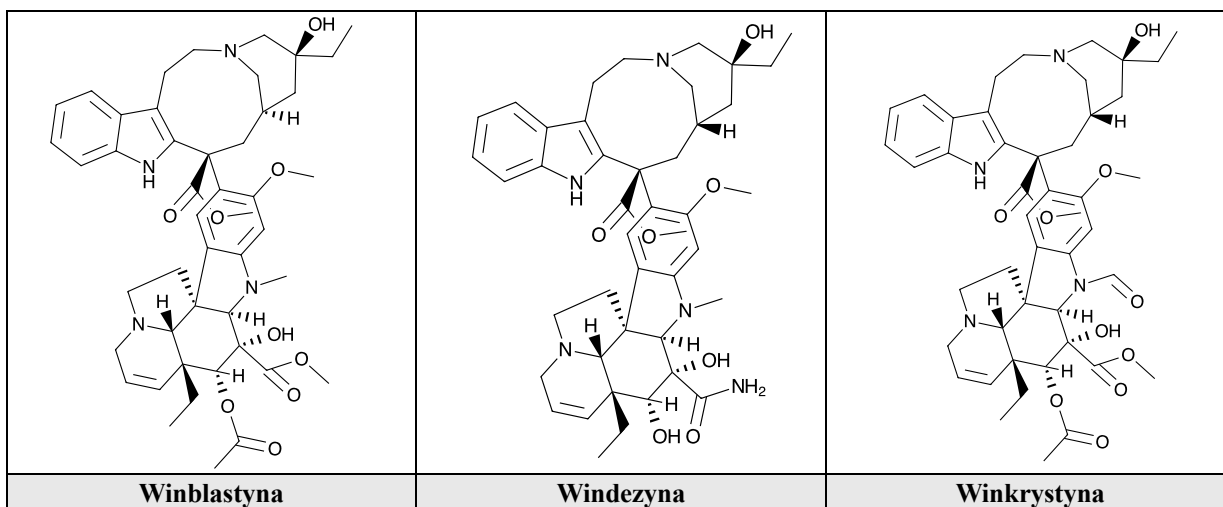
3) Monoterpenowe alkaloidy indolowe

		
Ajmalicyna	Ajmalina	Ibogaina
		
Johimbina	Mitragynina	
		
Rezerpina	Winkamina	

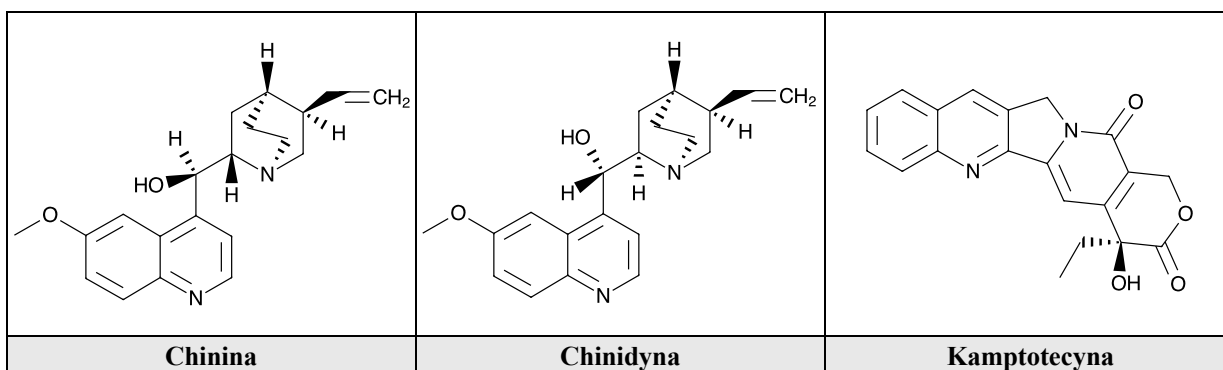
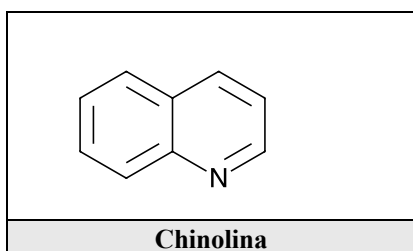
- Alkaloidy strychnos



- Dimeryczne alkaloidy indolowe

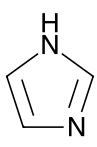
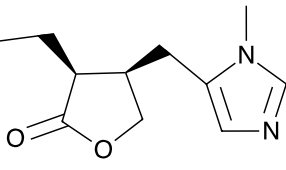


4) Alkaloidy chinolinowe

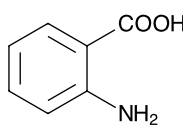
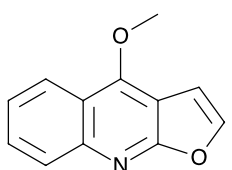
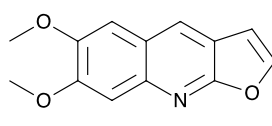
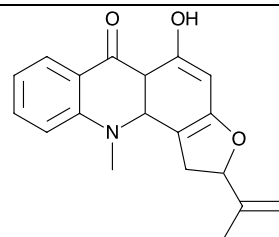


V. Alkaloidy powstałe z histydyny

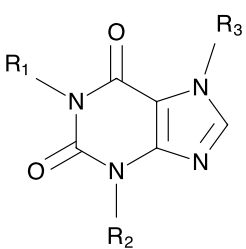
1) Alkaloidy imidazolowe

	
Imidazol	Pilokarpina

2) Alkaloidy furochinolinowe

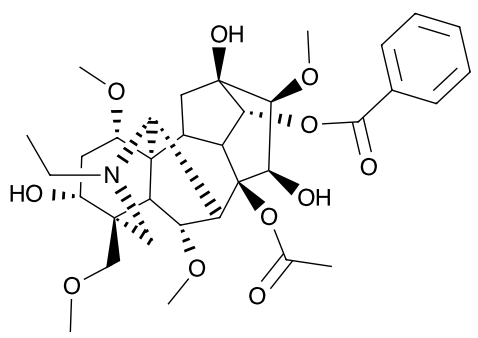
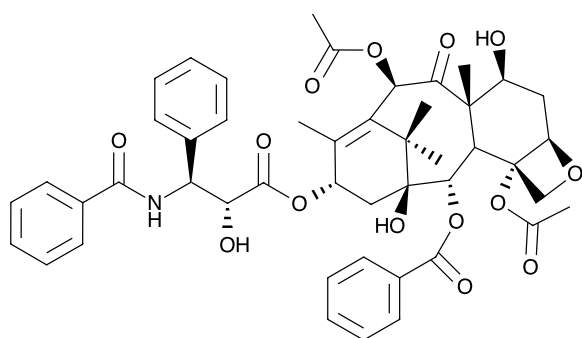
			
Kwas antralinowy	Dyktamina	Koskusaginina	Rutakrydon

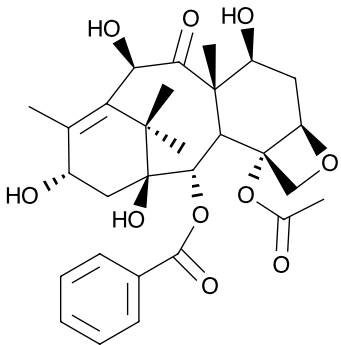
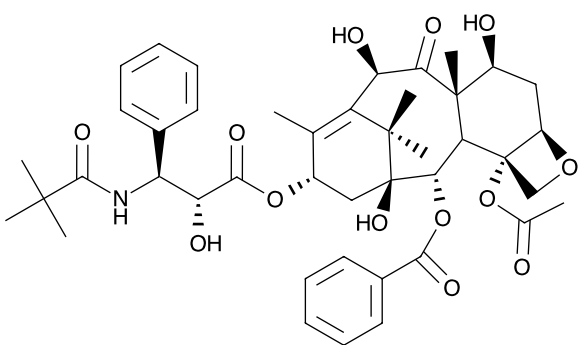
3) Alkaloidy purynowe

Nazwa związku	Wzór strukturalny	R ₁	R ₂	R ₃
Kofeina		CH ₃	CH ₃	CH ₃
Teofilina		H	CH ₃	CH ₃
Teobromina		CH ₃	CH ₃	H

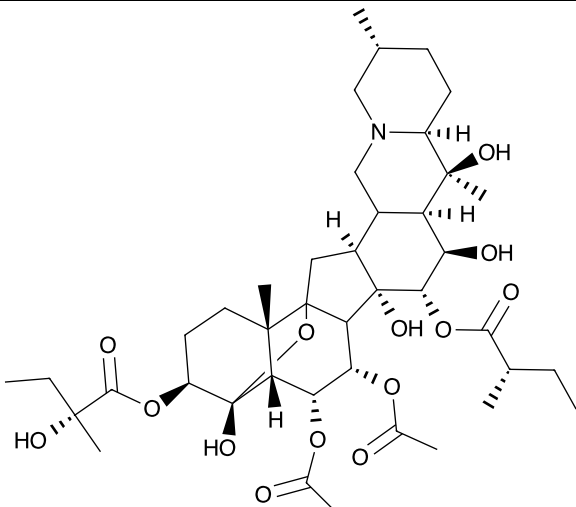
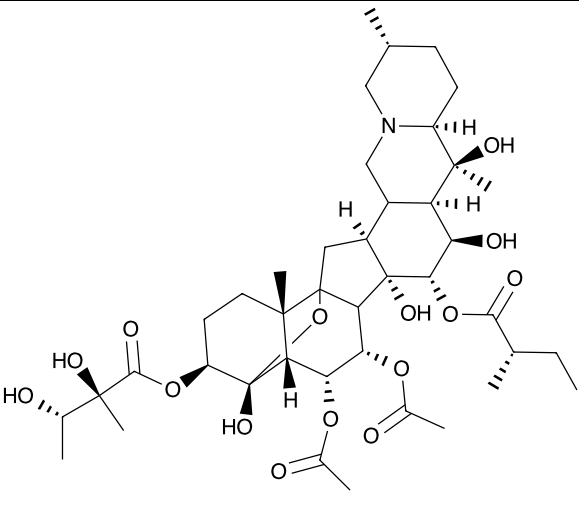
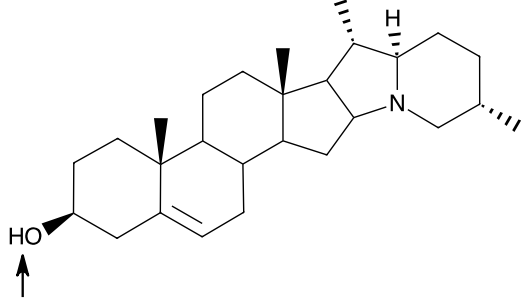
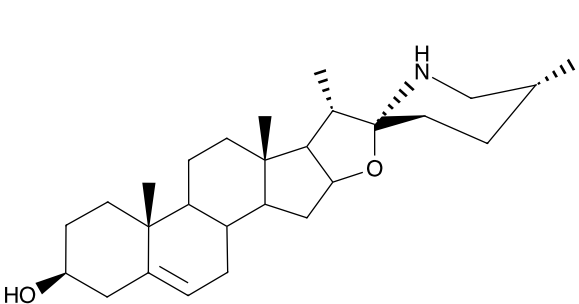
VI. Alkaloidy wywodzące się biogenetycznie z izoprenu (pseudoalkaloidy)

1) Alkaloidy diterpenowe

	
Akonityna	Taksol

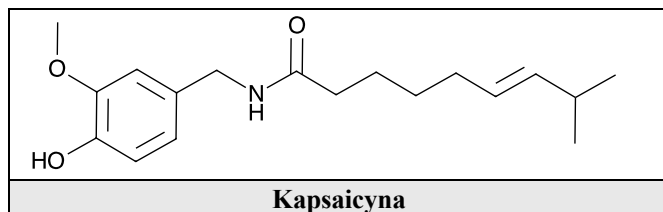
	
10-dezacetylobakatyna	Docetaksel

2) Alkaloidy steroidowe

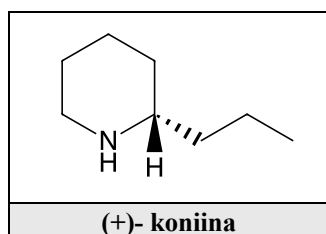
	
Protoweratryna A	Protoweratryna B
 W postaci glikozydów: miejsce łączenia 2-4 cz. cukru; np. α-solanina	
Solanidyna	Solasodyna

VII. Inne metabolity wtórne zawierające w swojej cząsteczce atom azotu

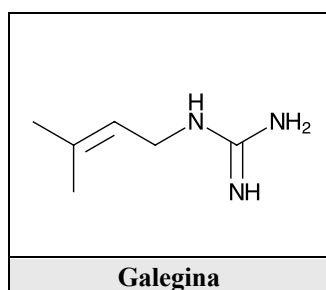
1) Pochodne wanililoaminy



2) Koniina



3) Zasady guanidynowe



Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr Małgorzata Kołtun-Jasion

Cel ćwiczenia:

- Poznanie budowy i właściwości chemicznych związków z grupy antranoidów.
- Badanie preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).
- Charakterystyka właściwości farmakologicznych i wykorzystanie w terapii związków oraz poszczególnych substancji roślinnych.

Substancje roślinne:

Aloë

Frangulae cortex (FPXII)

Hyperici herba (FPXII)

Rhamni purshianae cortex (FPXII)

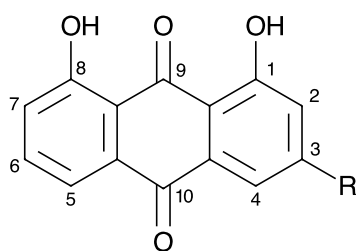
Rhei radix (FPXII)

Sennae foliolum (FPXII)

Sennae fructus (FPXII)

1. Wstęp:

Antrazwiązki to grupa trójcyklicznych pochodnych 1,8-dihydroksyantracenu, znanych ze swojego działania łagodnie (*laxantia*) lub silnie (*purgantia*) przeczyszczającego. Charakterystycznym elementem struktury chemicznej tej grupy związków jest obecność podstawników hydroksylowych w pozycji C₁ i C₈ oraz podstawnika w pozycji C₃ pierścienia 1,8-dihydroksyantracenu (*Ryc. 1*). Antrazwiązki występują w roślinach zarówno w formach wolnych (jako aglikony), jak również w postaci glikozydów (najczęściej *O*- i *C*- glikozydy), których część cukrową stanowi zazwyczaj D-glukoza, L-ramnoza, rzadziej apioza.

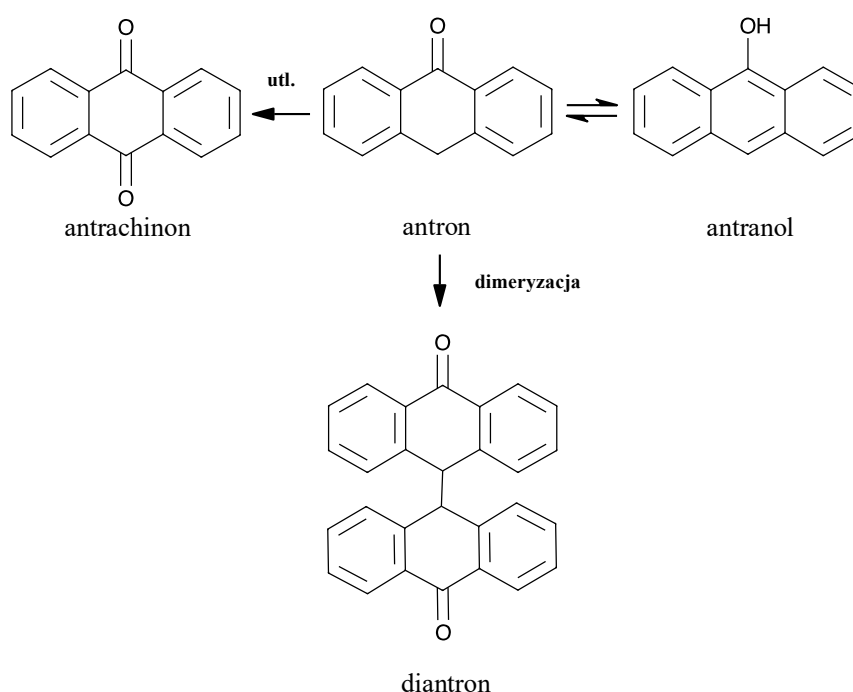


R = -CH₃; -CH₂OH; -COOH

Rycina 1: Wzór strukturalny 1,8-dihydroksy-3-R-antrachinonu.

Elementem struktury warunkującym aktywność antrazwiązków są wolne aglikony uwolnione z ich form glikozydowych w jelicie grubym, w wyniku hydrolizy enzymatycznej pod wpływem mikrobioty jelitowej (aktywność enzymu β -glukozydazy). Wolne aglikony pochodnych antracenu mogą występować w postaci utlenionej (antrachinonony), oraz produktów o niższym stopniu utlenienia (antranoli i antronów), a także w postaci związków dimerycznych (diantronów). Rozróżniamy diantrony o budowie symetrycznej (izodiantrony; złożone z 2 jednakowych antronów) np. sennidyny A, B lub heterodiantrony (zbudowane z 2 różnych antronów) np. sennidyny C, D, palmidyny, reidyny.

Antrazwiązki są substancjami stałymi, barwy czerwonej, pomarańczowej lub żółtej (antrachinony). Formy glikozydowe (w przeciwieństwie do aglikonów) dobrze rozpuszczają się w wodzie i etanolu, natomiast słabo w rozpuszczalnikach organicznych np.: w chloroformie. W roślinach przeważa obecność form glikozydowych, głównie pochodnych antronów, antranoli, a także form dimerycznych. Podczas suszenia surowca ulegają utlenieniu do pochodnych antrachinonu a częściowo także hydrolizie enzymatycznej do aglikonów. Formą najaktywniejszą są antrony, powstające w wyniku procesów rozpadu form dimerycznych, a także na drodze procesów oksydoredukcyjnych (Ryc. 2).



Rycina 2: Przemiany zachodzące w obrębie grupy antrazwiązków.

Charakterystyczną reakcją warunkującą detekcję pochodnych **1,8-dihydroksyantrachinonu** jest **reakcja Bornträgera**, stosowana także w mikroskopowej identyfikacji antrazwiążków w roślinnych surowcach leczniczych. Pochodne 1,8-dihydroksyantrachinonu, uwolnione z form glikozydowych tworzą z alkaliami (np. zasadowym roztworem KOH) rozpuszczalne w wodzie fenolany, o charakterystycznym, intensywnym, czerwonym zabarwieniu. Pochodne antronów i antranoli inicjują z kolei powstawanie żółtego zabarwienia, przechodzącego początkowo w pomarańczowe, a potem w czerwone na skutek postępującego procesu ich utlenienia.

Powszechnie stosowaną metodą identyfikacji antrazwiążków (rozdziału aglikonów) w surowcu roślinnym jest chromatografia cienkowarstwowa (zwykle z użyciem żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej), poprzedzona ekstrakcją surowca metanolem lub etanolem, mieszaniną alkohol/woda, ewentualnie samą wodą. W celu otrzymania wolnych form monomerycznych w postaci antrachinonów, dimery poddaje się działaniu kwasu azotowego i ogrzewa w temperaturze 120°C, co poprzedza reakcję z roztworem wodorotlenku potasu (rozpad form dimerycznych do monomerów i utlenienie form zredukowanych). Jako fazy ruchome stosuje się najczęściej mieszaniny rozpuszczalników o różnym stopniu polarności, m.in.: metanol, octan etylu, kwas mrówkowy, dichlorometan, woda w różnych stosunkach objętościowych. Po odparowaniu fazy ruchomej, na rozwiniętych chromatogramach (przed wywołaniem) w świetle UV widoczne są pasma o żółtej, pomarańczowej lub różowej fluorescencji, które po wywołaniu chromatogramu roztworem wodorotlenku potasu, przybierają intensywne czerwone zabarwienie. Identyfikacja związków odbywa się poprzez porównanie wartości współczynników R_f oraz barwy plam z roztworami substancji wzorcowych, analizowanych w takich samych warunkach.

Do najpopularniejszych surowców pochodzenia naturalnego stosowanych w codziennej praktyce aptecznej, w których składzie zidentyfikowano obecność antrazwiążków należą:

- Owoc i liść senesu *Senna alexandrina* Mill. (syn. *Cassia acutifolia* Delile i *Cassia angustifolia* Vahl.), w których zidentyfikowano głównie obecność sennozydów A, B, C, D (diantrony), związków śluzowych oraz flawonoidów. Preparaty: *Senefol*, *Xenna (saszetki do zaparzania)*, *Xenna Extra Comfort (tabl)*.
- Korzeń rzewienia dłoniastego (*Rheum palmatum* L.) lub rzewienia lekarskiego (*Rheum officinale* Baill.), zawierających mono i diglikozydy reiny, chryzofanolu, aloemodyny, emodyny, fiscjonu oraz wolne aglikony głównie reinę, a także garbniki i szczawian wapnia.

W świeżo zebranym korzeniu rzewienia (*Rhei radix*) występują m.in. heterodiantrony: reidyny i palmidyny. Preparaty: *Digest-Tonic*, *Radirex*.

- Kora kruszyny pospolitej (*Rhamnus frangula* L.), bogata w glukofranguliny A i B, franguliny A i B, a także garbniki, saponiny i alkaloidy peptydowe. Preparaty: *Alax*, *Normosan*.
- Stężyły sok z liści aloesu zwany aloną (*Aloe barbadensis* Mill.; *Aloe ferox* Mill.), który zawiera aloinę A i B, aloemodynę, chryzofanol, aloinozydy A i B (alona przylądkowa), 7-hydroksyaloinę (alona barbadoska). Preparaty: *Alax*, *Boldaloin*.
- Kora szakłaku amerykańskiego (*Rhamnus purshiana* L.), w której zidentyfikowano obecność kaskarozydów A, B, C, D, aloiny, deoksyaloiny. Preparaty: dostępna jedynie w postaci suplementów diety.

Antrazwiązki wywierają drażniący wpływ na receptory błony śluzowej jelita grubego, skracając tym samym czas pasażu treści jelitowej. Mechanizmem działania pochodnych antrachinonu na poziomie komórkowym jest hamowanie ATP-azowej pompy sodowo-potasowej, wpływając na ograniczenie resorpcji zwrotnej wody i elektrolitów. W efekcie dochodzi do uwodnienia mas kałowych, zwiększenia ich objętości, co przyczynia się do ułatwienia wypróżnienia. Dwutorowy mechanizm działania antrazwiązków, jest odpowiedzialny za wysoką efektywność i silny efekt przeczyszczający uzyskany po 8-14 godzinach od momentu przyjęcia preparatu zawierającego tę grupę związków (alona szybciej – efekt obserwowany po około 4 godzinach).

W związku z mechanizmem działania związanym z aktywnością ATP-azowej pompy sodowo-potasowej surowce zawierające antrazwiązki mogą wchodzić w interakcje z glikozydami nasercowymi, lekami steroidowymi oraz tiazydowymi lekami moczopędnymi.

Istotnym ograniczeniem stosowania preparatów zawierających antrazwiązki są stany zapalne przewodu pokarmowego, w szczególności wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Crohna, owrzodzenia czy czynne krwawienia z przewodu pokarmowego. Przy długotrwałym stosowaniu preparatów zawierających surowce bogate w pochodne 1,8-dihydroksyantrachinonu może dojść do rozwinięcia zespołu leniwego/nadwrażliwego jelita, uszkodzenia wątroby i nerek a także niebezpiecznego ubytku witamin i soli mineralnych (zwłaszcza potasu). **Preparaty zawierające antrazwiązki nie powinny być stosowane u kobiet w ciąży oraz dzieci poniżej 12 roku życia.** U osób dorosłych, bez wyraźnych przeciwwskazań zdrowotnych nie powinny być stosowane dłużej niż 7 dni.

Do surowców roślinnych zawierających antrazwiązki o innych kierunkach działania, zaliczamy ziele dziurawca (*Hyperici herba*). Surowiec zawiera m.in. naftodiantrony (hiperycyna, pseudohiperycyna), a także pochodne floroglucynoli (hiperforynę), oraz rzadkie biflawonoidy (biapigenina, amentoflawon). Preparaty zawierające wyciągi etanolowe z ziele dziurawca znajdują zastosowanie w łagodzeniu epizodów depresyjnych o łagodnym i umiarkowanym nasileniu (Preparat: *Deprim, Nervomix, Sedomix, Intractum Hyperici*). **Uwaga:** hiperycyna działa fotouczulająco (może wywołać stany zapalne i poparzenia skóry).

KARTY PRACY

Badanie chromatograficzne preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki

ALAX/ BOLDALOIN

1. Przygotowanie wyciągów do badań chromatograficznych (proszę zaznaczyć badany preparat):

- | | |
|------------------------------------|----------------------------|
| ☐ ALAX | 1 tabletka, 10 ml metanolu |
| ☐ BOLDALOIN | 1 tabletka, 5 ml metanolu |

Preparat: badany preparat rozdrobnić w moździerzu i umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać odpowiednią ilość rozpuszczalnika. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Substancja roślinna (Aloë): odważyć dokładnie około 0,25 g sproszkowanej substancji roślinnej, umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 20 ml metanolu. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

2. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	octan etylu – metanol – woda (100:17:13, v:v:v)
Wzorce:	roztwór aloiny w metanolu roztwór aloemodyny w metanolu
Nanoszenie:	10 µl wyciągu badanego preparatu 10 µl wyciągu substancji roślinnej po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	komora pozioma, droga rozwijania 9 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₂₅₄ , następnie spryskać 5% metanolem roztworem KOH

3. Obserwacje:

4. Wnioski:

Badanie chromatograficzne preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki

FIGURA 1/ SENEFOL/ SENES FIX/ XENNA

1. Przygotowanie wyciągów do badań chromatograficznych (proszę zaznaczyć badany preparat):

- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| ☐ FIGURA 1 | 1 g, 7 ml etanolu 50% |
| ☐ SENES FIX | 0,5 g, 7 ml etanolu 50% |
| ☐ SENEFOL | 1 tabletka, 5 ml etanolu 50% |
| ☐ XENNA | 1 tabletka, 5 ml etanolu 50% |

Preparat: badany preparat rozdrobnić w moździerzu i umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać odpowiednią ilość rozpuszczalnika. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Substancja roślinna (*Sennae folium*): Odważyć dokładnie około 0,5 g sproszkowanej substancji roślinnej, umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 7 ml 50% roztworu etanolu. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

2. Warunki oznaczenia:

- | | |
|-------------------|---|
| Faza stacjonarna: | żel krzemionkowy |
| Faza ruchoma: | kwasy octowy – woda – octan etylu – <i>n</i> -propanol (1:30:40:40, v:v:v:v) |
| Wzorce: | roztwór sennozydu A w metanolu
roztwór sennozydu B w metanolu
roztwór reiny w metanolu |
| Nanoszenie: | 10 µl wyciągu badanego preparatu
10 µl wyciągu substancji roślinnej
po 5 µl roztworów wzorców |
| Rozwijanie: | komora pozioma, droga rozwijania 9 cm |
| Wywołanie: | chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, spryskać 20% roztworem kwasu azotowego i ogrzewać 10 minut w temp. 120°C. Pozostawić do ochłodzenia, następnie spryskać 5% metanolem roztworem KOH |

3. Obserwacje:

4. Wnioski:

Badanie chromatograficzne preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki

NORMOLAX/ NORMOSAN/ PLANTAGOLAX/ PURTAGEN/ REGULSON/
SPECIES REDUCENTES/ TABLETKI PRZECIW NIESTRAWNOŚCI/
ZIOŁA PRZECZYSZCZAJĄCE

1. Przygotowanie wyciągów do badań chromatograficznych (proszę zaznaczyć badany preparat):

☐ NORMOSAN	0,7 g, 5 ml metanolu
☐ PLANTAGOLAX	1,0 g, 5 ml metanolu
☐ SPECIES REDUCENTES	5,0 g, 15 ml metanolu
☐ NORMOLAX	1 tabletka, 5 ml metanolu
☐ TABLETKI PRZECIW NIESTRAWNOŚCI	1 tabletka, 5 ml metanolu
☐ PURTAGEN	1 saszetka, 10 ml metanolu
☐ REGULSON	1 saszetka, 10 ml metanolu
☐ ZIOŁA PRZECZYSZCZAJĄCE	1 saszetka, 10 ml metanolu

Preparat: badany preparat rozdrobnić w moździerzu i umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać odpowiednią ilość rozpuszczalnika. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Substancja roślinna (*Frangulae cortex*): odważyć dokładnie około 0,25 g sproszkowanej substancji roślinnej, umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

2. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	octan etylu – metanol – woda (100:17:13, v:v:v)
Wzorce:	roztwór frangulin w metanolu roztwór franguloemodyny w metanolu
Nanoszenie:	20 µl wyciągu badanego preparatu 10 µl wyciągu substancji roślinnej po 5 µl roztworów wzorców

Rozwijanie: komora pozioma, droga rozwijania 9 cm
Wywołanie: chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV₂₅₄,
następnie spryskać 5% metanolem z roztworem KOH

3. Obserwacje:

4. Wnioski:

Badanie chromatograficzne preparatów rynkowych zawierających antrazwiązki

RADIX RHEI tabletki

1. Przygotowanie wyciągów do badań chromatograficznych:

☐ RADIX RHEI tabl. 1 tabletka, 5 ml metanolu

Preparat: badany preparat rozdrobnić w moździerzu i umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać odpowiednią ilość rozpuszczalnika. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Substancja roślinna (*Rhei radix*): odważyć dokładnie około 0,25 g sproszkowanej substancji roślinnej, umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu. W kolbie umieścić lejek, aby ograniczyć parowanie rozpuszczalnika i ogrzać do wrzenia. Ostudzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

2. Warunki oznaczenia:

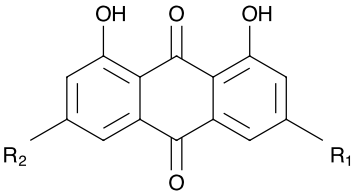
Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – octan etylu – eter naftowy (1:25:75, v:v:v)
Wzorce:	roztwór reiny w metanolu roztwór aloemodyny w metanolu
Nanoszenie:	10 µl wyciągu badanego preparatu 10 µl wyciągu substancji roślinnej po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	komora pionowa, droga rozwijania 9 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzeć w świetle UV ₂₅₄ , następnie spryskać 5% metanolem roztworem KOH

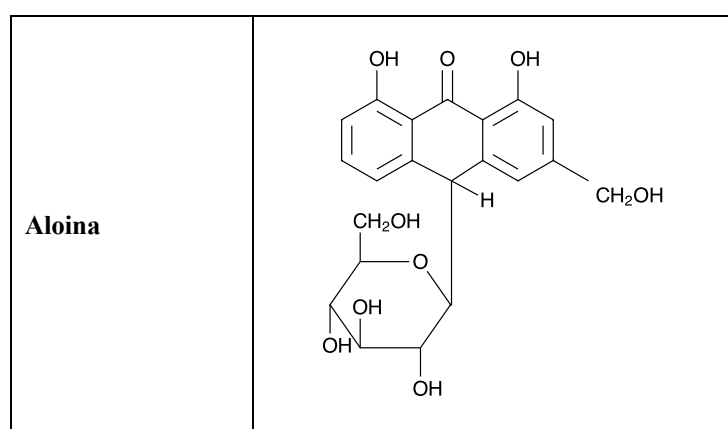
3. Obserwacje:

4. Wnioski:

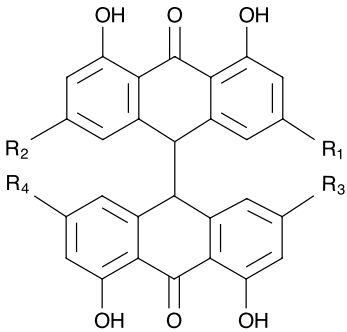
Karta wzorów

1) Pochodne 1,8-dihydroksyantrachinonu

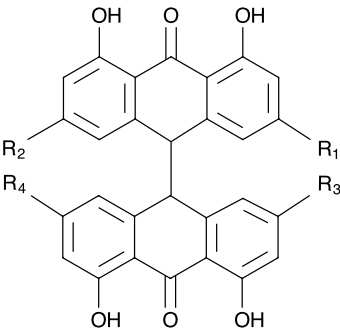
Nazwa związku	Wzór strukturalny	R ₁	R ₂
Reina		COOH	H
Aloeemodyna		CH ₂ OH	H
Chryzofanol		CH ₃	H
Franguloemodyna		CH ₃	OH
Fiscjon		CH ₃	OCH ₃



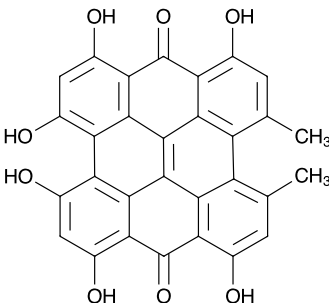
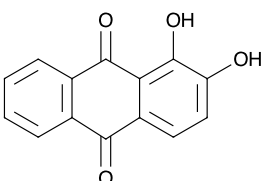
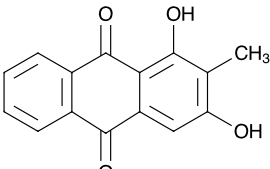
2) Homodiantrony

Nazwa związku	Wzór strukturalny	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Dialoeemodynodiantron		CH ₂ OH	H	CH ₂ OH	H
Dichryzofanolodiantron		CH ₃	H	CH ₃	H
Diemodynodiantron		CH ₃	OH	CH ₃	OH
Difiscjonodiantron		CH ₃	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃
Sennidyny A, B		COOH	H	COOH	H

3) Heterodiantrony

Nazwa związku	Wzór strukturalny	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Palmidyna A		CH ₃	OH	CH ₂ OH	H
Palmidyna B		CH ₃	H	CH ₂ OH	H
Palmidyna C		CH ₃	H	CH ₃	OH
Palmidyna D		CH ₃	H	CH ₃	OCH ₃
Reidyna A		CH ₃	OH	COOH	H
Reidyna B		CH ₃	H	COOH	H
Reidyna C		CH ₃	OCH ₃	COOH	H
Sennidyna C, D		CH ₂ OH	H	COOH	H

4) Antrazwiązki o innych (niż przeczyszczające) kierunkach działania

Nazwa związku	Wzór strukturalny
Hiperycyna	
Alizaryna	
Rubiadyna	

Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr Weronika Skowrońska

Cel ćwiczenia:

- Poznanie budowy i właściwości fizyko-chemicznych związków z grupy flawonoidów.
- Oznaczenie zawartości związków z grupy flawonoidów metodą kolorymetryczną (FP XII).
- Poznanie właściwości farmakologicznych i wykorzystanie w terapii związków oraz poszczególnych substancji roślinnych.
- Potwierdzenie tożsamości flawonoidowych substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

Substancje roślinne:

Betulae folium (FPXII)

Crataegi folium cum flore (FPXII)

Crataegi fructus (FPXII)

Equiseti herba (FPXII)

Ginkgonis folium (FPXII)

Helichrysi inflorescentia

Polygoni avicularis herba (FPXII)

Sambuci flos (FPXII)

Solidaginis herba (FPXII)

Solidaginis virgaureae herba (FPXII)

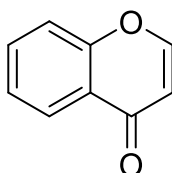
Sylbi mariani fructus (FPXII)

Tiliae flos (FPXII)

Violae herba cum flore (FPXII)

1. Wstęp:

Flawonoidy należą do związków polifenolowych i stanowią jedną z najliczniejszych i najbardziej rozpowszechnionych grup związków chemicznych występujących w roślinach wyższych. Strukturalnie są uważane jako pochodne benzo- γ -pironu, czyli chromonu (Ryc. 3).

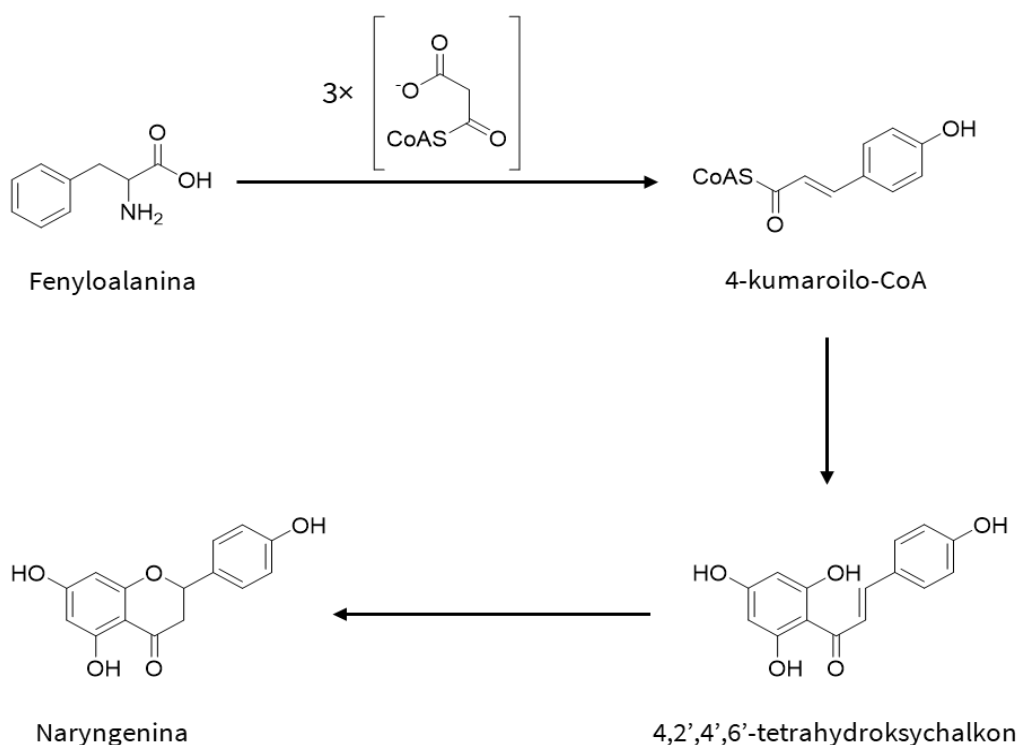


Rycina 3: Struktura chemiczna benzo- γ -pironu.

Najważniejszą rolą flawonoidów w roślinach jest ich ochrona przed promieniowaniem UV. Ponadto, ze względu na swoje zabarwienie – najczęściej w odcieniach

od żółtego do pomarańczowego, nadają kwiatom kolor zwabiając m.in. owady. Dodatkowo, niektóre flawonoidy charakteryzują się aktywnością hamującą wzrost organizmów powodujących choroby, jak grzyb pasożytniczy *Fusarium oxysporum*, chroniąc roślinę przed zakażeniem.

Biosynteza flawonoidów wywodzi się ze szlaku metabolicznego fenylopropanoidów, w którym to aminokwas fenyloalanina jest wykorzystywany do wytworzenia 4-kumaroilo-koenzymu A (CoA). Następnie, w wyniku przyłączenia 3 cząsteczek malonylo-CoA, powstaje produkt pośredni z grupy chalkonów zawierający dwa pierścienie fenolowe. Na drodze reakcji sprzęgania dochodzi do wytworzenia trzeciego pierścienia i tym samym powstania podstawowego układu flawonoidów (Ryc. 4). Cząsteczka ta może ulegać kolejnym modyfikacjom metabolicznym, które prowadzą do powstania kolejnych grup pochodnych.



Rycina 4: Uproszczony schemat biosyntezy flawonoidów.

Ze względu na budowę chemiczną flawonoidy różnią się między sobą przede wszystkim obecnością lub brakiem podwójnego wiązania w układzie pironu, liczbą i miejscowaniem grup hydroksylowych oraz ich metylacją. Ponadto różnią się połączeniami glikozydowymi z cukrami, kwasami uronowymi, organicznymi i fenolowymi. Możemy wyróżnić również

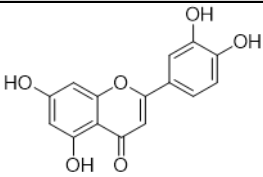
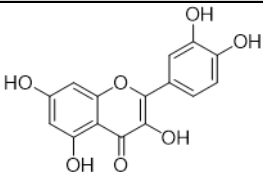
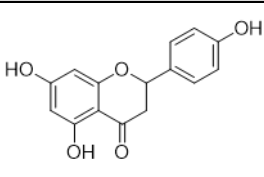
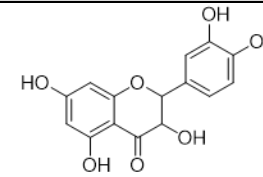
różne typy połączeń glikozydowych (np. *O*-glikozydy, *C*-glikozydy), a także różną liczbę przyłączonych cząsteczek (zwykle od 1 do 5).

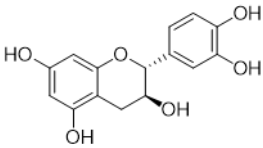
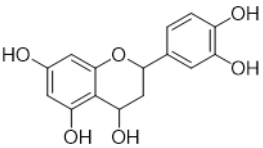
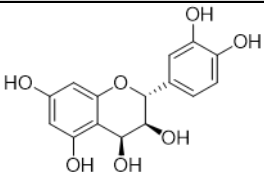
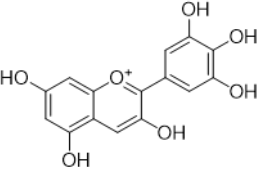
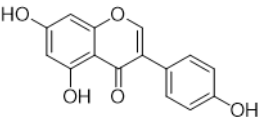
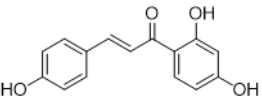
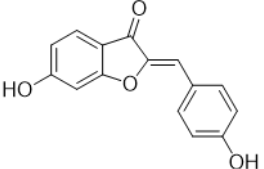
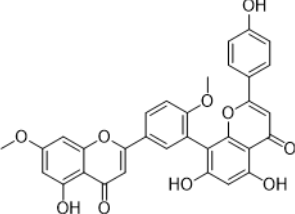
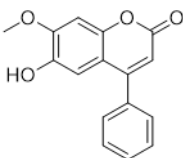
Na podstawie struktury chemicznej flawonoidy możemy podzielić na następujące grupy (*Tab. 1*):

- Flawony (np. apigenina, luteolina);
- Flawonole (np. kemferol, kwercetyna);
- Flawanony (np. naryngenina, hesperetyna);
- Flawanonole (np. dihydrokemferol, taksyfolina);
- Flawanole, wśród których wyróżniamy:
 - Flawan-3-ole (np. epikatechina, katechina);
 - Flawan-4-ole (np. apiforol, luteoforol);
 - Flawan-3,4-diole (leukoantocyjanidyny, np. leukocyjanidyna, leukopeonidyna);
 - Proantocyjanidyny (głównie oligomery katechiny i epikatechiny oraz ich estry z kwasem galusowym) - nazywane również garbnikami skondensowanymi;
- Izoflawonoidy (np. genisteina, daidzeina);
- Antocyjanidyny (np. cyjanidyna, delfinidyna);
- Chalkony (np. izolikwirtygenina);
- Aurony (np. hispidol);
- Biflawonoidy (np. bilobetyna, ginkgetyna);
- Neoflawonoidy (np. dalbergina).

Do pochodnych flawonoidów zaliczamy flawonolignany, które są zbudowane z jednostki flawonoidowej i jednostki fenylopropanoidowej (alkohol koniferylowy). Do najważniejszych substancji chemicznych z tej grupy zaliczamy m.in. sylibinę A i B, izosylibinę A i B, sylidianinę czy sylikrystynę. Związki te, wraz z flawonoidem – taksyfoliną, tworzą kompleks o nazwie sylimaryna, obecny w owocach ostropestu plamistego.

Tabela 1: Struktury głównych grup chemicznych flawonoidów.

Flawony	Flawonole	Flawanony	Flawanonole
 Luteolina	 Kwercetyna	 Naryngenina	 Taksyfolina

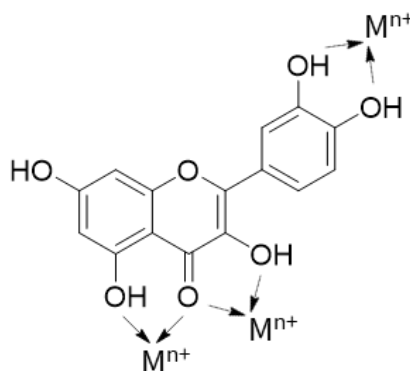
Flawanole			
Flawan-3-ole	Flawan-4-ole	Flawan-3,4-diole	
 Katechina	 Luteoforol	 Leukocyjanidyna	
Antocyjanidyny	Izoflawonoidy	Chalkony	Aurony
 Delfinidyna	 Genisteina	 Izolikwirtygenina	 Hispidol
Biflawonoidy		Neoflawonoidy	
 Ginkgetyna		 Dalbergina	

Flawonoidy są niejednorodną grupą związków chemicznych, w związku z czym charakteryzują się wielokierunkową aktywnością biologiczną. Działanie farmakologiczne wielu związków chemicznych i substancji roślinnych flawonoidowych zostało potwierdzone w badaniach, również klinicznych. Główne kierunki działania flawonoidów i ich zastosowania w leczeniu obejmują wzmacnianie i uszczelnianie ścian naczyń krwionośnych (np. rutyna, diosmina), zwiększanie diurezy (np. pochodne kwercetyny, kemferolu i mirycetyny), aktywność przeciwzapalną i przeciwutleniającą (np. apigenina, luteolina i ich pochodne), wpływ na układ krążenia poprzez zwiększanie przepływu wieńcowego, działanie wazodylatacyjne i hipotensyjne (np. witeksyna), spazmolityczne na mięśnie przewodu pokarmowego, drogi żółciowe (np. izosalipurpozyd) i drogi oddechowe (np. kirsilineol), ochronne i regeneracyjne na komórki wątroby (np. sylimaryna), aktywność przeciwwrzodową (np. likwirtyna) i przeciwgrzybiczą (np. pinobaksyna, pinocembryna). Ponadto izoflawony wykazują działanie estrogenne (np. genisteina).

Najczęściej flawonoidy są żółtymi lub bezbarwnymi substancjami stałymi, choć np. antocyjanidyny i ich glikozydy, antocyjany, posiadają zabarwienie od czerwonego do fioletowego. Aglikony flawonoidów na ogół są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach

organicznych, a nierozpuszczalne w wodzie. Natomiast w postaci glikozydów są dobrze rozpuszczalne w gorącej wodzie lub niższych alkoholach. Flawonoidy wykazują charakterystyczną fluorescencję w świetle UV, intensyfikującą się pod wpływem alkaliów. Wykrywanie flawonoidów opiera się na ich zdolności tworzenia barwnych kompleksów z jonami metali (żółta fluorescencja).

Jedną z częściej stosowanych metod oznaczania kolorymetrycznego zawartości aglikonów flawonoidów w substancjach roślinnych jest metoda Christa-Millera. Opiera się ona na tworzeniu połączeń chelatowych z jonami glinu (Ryc. 5). W pierwszym etapie reakcji konieczne jest przeprowadzenie hydrolizy glikozydów, aby otrzymać aglikony flawonoidów. W tym celu podczas ekstrakcji substancji roślinnej stosujemy dodatek kwasu solnego (hydroliza kwaśna). Uwolnione aglikony, nierozpuszczalne w wodzie, są następnie ekstrahowane octanem etylu. Aby reakcja barwna kompleksowania jonów glinu przebiegała ilościowo, niezbędne jest zachowanie warunków bezwodnych. Dlatego też **frazcję octanową należy osuszyć, sączyć przez watę (bez wyciskania!)** do kolby miarowej. Pomiar absorpcji powstałych kompleksów prowadzi się w mieszaninie octanu etylu, metanolu i kwasu octowego, ponieważ w ich środowisku maksima absorpcji kwercetyny i kemferolu mają najbardziej zbliżone wartości.



Rycina 5: Kompleksy aglikonów flawonoidów z jonami metali (M^{n+}).

Metoda Christa-Millera nie może być wykorzystywana do oznaczania zawartości flawonoidów w substancjach roślinnych zawierających C-glikozydy flawonoidowe (związki takie jak witeksyna czy orientyna występujące w np. *Crataegi folium cum flore* czy *Violae herba cum flore*), ponieważ w zastosowanych warunkach nie zachodzi całkowita hydroliza tych związków. Dlatego też, do oznaczania zawartości flawonoidów w substancjach roślinnych zawierających C-glikozydy flawonoidów stosuje się metodę oznaczania z kwasem borowym. Metoda ta polega na tworzeniu barwnych kompleksów glikozydu flawonoidowego z kwasem

borowym w obecności kwasu szczawiowego, których intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia badanych związków. Reakcja ta zachodzi wyłącznie w warunkach bezwodnych – w środowisku bezwodnego kwasu mrówkowego i bezwodnego kwasu octowego. (Ryc. 6). Reakcja jest specyficzna dla flawonoidów posiadających wiązanie podwójne między drugim i trzecim atomem węgla.



Rycina 6: Kompleksy aglikonów flawonoidów z jonami boru.

Wykrywanie flawonoidów w surowcach roślinnych jest również możliwe z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej. Umożliwia to ich charakterystyczna fluorescencja w świetle UV, np. flawonole wykazują żółtą fluorescencję. Ponadto, możemy wywołać zabarwienie, od barwy jasnozielonej do pomarańczowej, stosując odczynniki takie jak roztwór chlorku glinu lub estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego.

KARTY PRACY

Oznaczanie zawartości flawonoidów metodą Christa-Millera

1. Wykonanie oznaczenia:

Odważkę sproszkowanej substancji roślinnej przenieść do kolby okrągłodennej ze szlifem o poj. 100 ml, dodać 20 ml acetonu, 2 ml 25% roztworu kwasu solnego i 1 ml roztworu metenaminy (urotropiny). Następnie zawartość kolby ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut od rozpoczęcia wrzenia. Dodatek metenaminy zapobiega błędom oznaczenia spowodowanym przez barwne związki kompleksowe, jakie mogą dawać z chlorkiem glinu leukoantocyjany występujące w surowcu. Otrzymany hydrolizat przesączyć przez watę do kolby miarowej poj. 100 ml, po czym osad wraz z watą umieścić w tej samej kolbie okrągłodennej, dodać 20 ml acetonu i gotować ponownie przez 10 minut. Wytrawianie w ten sam sposób powtórzyć, a otrzymane wyciągi przesączyć do kolby miarowej i uzupełnić acetonem do 100 ml. Następnie, dokładnie 20 ml zhydrolizowanego wyciągu przenieść do rozdzielacza, dodać 20 ml wody i ekstrahować 15 ml octanu etylu. Ekstrakcję aglikonów z fazy nieorganicznej (wodnej) wykonać jeszcze trzy razy, stosując każdorazowo 10 ml octanu etylu. Połączone fazy organiczne przemyć dwukrotnie 40 ml wody, przesączyć przez watę (zachowując środowisko bezwodne) do kolby miarowej i dopełnić octanem etylu do 50 ml. Do trzech kolb miarowych poj. 25 ml odmierzyć po 10 ml tego roztworu. Do dwóch kolb dodać po 2 ml roztworu chlorku glinu i uzupełnić wszystkie kolby do 25 ml mieszaniną kwasu octowego z metanolem. Po 45 minutach zmierzyć absorbancję roztworu z chlorkiem glinu wobec roztworu porównawczego, w kuwetach 1-centymetrowych przy długości fali 425 nm.

2. Obliczenia:

Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na **hiperozyd**, **izokwercytryzyd** lub **kwercetynę**, zgodnie z wymaganiami monografii substancji roślinnej, proszę obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{A \times k}{m}$$

A – absorbancja roztworu badanego

k – przelicznik: dla hiperozydu oraz izokwercytryzydu k=1,25; dla kwercetyny k=0,875

m – odważka substancji roślinnej [g]

Zawartość flawonoidów proszę przeliczyć na (zaznaczyć badany surowiec):

Hiperozyd:

- ☐ *Betulae folium* (nie mniej niż 1,5%)
- ☐ *Calendulae flos* (nie mniej niż 0,4%)
- ☐ *Polygoni avic. herba* (nie mniej niż 0,3%)
- ☐ *Solidaginis virgaureae herba* (nie mniej niż 0,5% i nie więcej niż 1,5%)

Izokwercytrozyd:

- ☐ *Equiseti herba* (nie mniej niż 0,3%)
- ☐ *Sambuci flos* (nie mniej niż 0,8%)

Kwercetynę:

- ☐ *Helichrysi flos* (nie mniej niż 0,5%)

3. Wnioski:

Oznaczanie zawartości flawonoidów z kwasem borowym

Crataegi folium cum flore

1. Wykonanie oznaczenia:

Odważkę sproszkowanej substancji roślinnej przenieść do kolby okrągłodennej ze szlifem o poj. 250 ml, dodać 40 ml 60% etanolu. Następnie zawartość kolby ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 10 minut (od momentu osiągnięcia wymaganej temperatury) w temp. 60°C. Otrzymany wyciąg ostudzić i przesączyć przez watę do kolby miarowej poj. 100 ml, po czym osad wraz z watą umieścić w kolbie okrągłodennej, dodać 40 ml 60% metanolu i ogrzewać ponownie przez 10 minut w temp. 60°C. Po ostudzeniu wyciąg przesączyć do tej samej kolby miarowej i połączone wyciągi uzupełnić 60% metanolem do 100 ml. Następnie do trzech kolb okrągłodennych o poj. 100 ml odpipetować po 5 ml wyciągu i odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuścić w 8 ml mieszaniny metanolu i lodowatego kwasu octowego (10:100, v:v) i przenieść ilościowo do kolb miarowych o poj. 25 ml. Kolby przemyć 3 ml mieszaniny metanolu i lodowatego kwasu octowego (10:100, v:v) i przenieść ilościowo do tych samych kolb miarowych o poj. 25 ml. Do dwóch kolb (próby badane) dodać 10 ml roztworu kwasu borowego i kwasu szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym. Do trzeciej kolby (odnośnik) dodać 10 ml bezwodnego kwasu mrówkowego i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym. Po 30 minutach zmierzyć absorbancję roztworu z kwasem borowym wobec roztworu porównawczego, w kuwetach 1-centymetrowych przy długości fali 410 nm.

2. Obliczenia:

Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na **hiperozyd**, zgodnie z wymaganiami monografii substancji roślinnej, proszę obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{A \times k}{m}$$

A – absorbancja roztworu badanego

k – przelicznik: dla hiperozydu k=1,235

m – odważka substancji roślinnej [g]

Zawartość flawonoidów proszę przeliczyć na:

Hiperozyd:

Crataegi folium cum flore (nie mniej niż 1,5%)

3. Wyniki i wnioski:

Oznaczanie zawartości flawonoidów z kwasem borowym

Violae herba cum flore

1. Wykonanie oznaczenia:

Odważkę sproszkowanej substancji roślinnej przenieść do kolby okrągłodennej ze szlifem o poj. 250 ml, dodać 40 ml 60% etanolu. Następnie zawartość kolby ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 10 minut (od momentu osiągnięcia wymaganej temperatury) w temp. 60°C. Otrzymany wyciąg ostudzić i przesączyć przez watę do kolby miarowej poj. 100 ml, po czym osad wraz z watą umieścić w kolbie okrągłodennej, dodać 40 ml 60% metanolu i ogrzewać ponownie przez 10 minut w temp. 60°C. Po ostudzeniu wyciąg przesączyć do tej samej kolby miarowej i połączone wyciągi uzupełnić 60% metanolem do 100 ml. Następnie do trzech kolb okrągłodennych o poj. 100 ml odpipetować po 5 ml wyciągu i odparować do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuścić w 8 ml mieszaniny metanolu i lodowatego kwasu octowego (10:100, v:v) i przenieść ilościowo do kolb miarowych o poj. 25 ml. Kolby przemyć 3 ml mieszaniny metanolu i lodowatego kwasu octowego (10:100, v:v) i przenieść ilościowo do tych samych kolb miarowych o poj. 25 ml. Do dwóch kolb (próby badane) dodać 10 ml roztworu kwasu borowego i kwasu szczawiowego w bezwodnym kwasie mrówkowym i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym. Do trzeciej kolby (odnośnik) dodać 10 ml bezwodnego kwasu mrówkowego i uzupełnić bezwodnym kwasem octowym. Po 30 minutach zmierzyć absorbancję roztworu z kwasem borowym wobec roztworu porównawczego, w kuwetach 1-centymetrowych przy długości fali 405 nm.

2. Obliczenia:

Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na **wiolantynę**, zgodnie z wymaganiami monografii substancji roślinnej, proszę obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{A \times k}{m}$$

A – absorbancja roztworu badanego

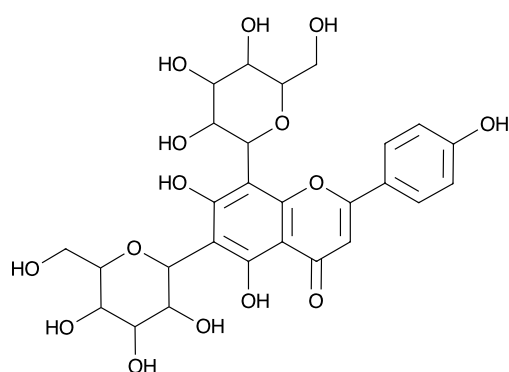
k – przelicznik: dla wiolantyny k=1,25

m – odważka substancji roślinnej [g]

Zawartość flawonoidów proszę przeliczyć na:

Wiolantynę (Ryc. 7):

Violae herba cum flore (nie mniej niż 1,5%)



Rycina 7: Wzór strukturalny wiolantyny.

3. Wyniki i wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Betulae folium

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 0,5 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu i umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – woda – metyloetyloketon – octan etylu (10:10:30:50, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwercytryny w metanolu roztwór hiperozydu w metanolu
Nanoszenie:	10 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolem z roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolem z roztworem Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Calendulae flos

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml metanolu i utrzymywać we wrzeniu 10 minut. Kolbę przykryć szklanym lejkiem, aby zapobiec nadmiernemu parowaniu rozpuszczalnika. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwask mrówkowy – woda – octan etylu (10:10:80, v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu kawowego w metanolu roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu roztwór rutozydu w metanolu
Nanoszenie:	20 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolemowym roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolemowy roztwór Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Crataegi folium cum flore

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml metanolu i ogrzewać na łaźni wodnej 65°C przez 5 minut. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – woda – metyloetyloketon – octan etylu (10:10:30:50, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu roztwór hiperozydu w metanolu
Nanoszenie:	20 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolem z roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolem z roztworem Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Equiseti herba

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml metanolu i utrzymywać we wrzeniu 10 minut. Kolbę przykryć szklanym lejkiem, aby zapobiec nadmiernemu parowaniu rozpuszczalnika. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna: żel krzemionkowy

Faza ruchoma: kwas mrówkowy – kwas octowy – woda – octan etylu
(7,5:7,5:18:67, v:v:v:v)

Wzorce: roztwór kwasu kawowego w metanolu

roztwór hiperozydu w metanolu

roztwór rutozydu w metanolu

Nanoszenie: 10 µl badanego wyciągu

po 5 µl roztworów wzorców

Rozwijanie: chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm

Wywołanie: chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolemowym roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolemowy roztwór Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Helichrysi flos

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml metanolu i ogrzewać na łaźni wodnej 65°C przez 5 minut. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – kwas octowy – woda – octan etylu (11:11:27:100, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu
Nanoszenie:	20 µl badanego wyciągu 5 µl roztworu wzorca
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₃₆₅ , a następnie spryskać roztworem AlCl ₃

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Polygoni avicularis herba

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 1,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml metanolu i utrzymywać we wrzeniu 10 minut. Kolbę przykryć szklanym lejkiem, aby zapobiec nadmiernemu parowaniu rozpuszczalnika. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – kwas octowy – woda – octan etylu (7:7:14:72, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu kawowego w metanolu roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu roztwór hiperozydu w metanolu
Nanoszenie:	20 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolem z roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolem z roztworem Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Sambuci flos

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 0,5 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu i umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – woda – metyloetyloketon – octan etylu (10:10:30:50, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu kawowego w metanolu roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu roztwór hiperozydu w metanolu roztwór rutozydu w metanolu
Nanoszenie:	10 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolem z roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolem z roztworem Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Solidaginis virgaureae herba

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 0,75 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 5 ml metanolu i utrzymywać we wrzeniu 10 minut. Kolbę przykryć szklanym lejkiem, aby zapobiec nadmiernemu parowaniu rozpuszczalnika. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna: żel krzemionkowy

Faza ruchoma: kwas mrówkowy – woda – metyloetyloketon – octan etylu
(6:6:18:30, v:v:v:v)

Wzorce: roztwór kwasu chlorogenowego w metanolu
roztwór kwercytryny w metanolu
roztwór rutozydu w metanolu

Nanoszenie: 20 µl badanego wyciągu
po 5 µl roztworów wzorców

Rozwijanie: chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm

Wywołanie: chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolem z roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego (1% metanolem z roztworem Naturstoffreagenz A).

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Violae herba cum flore

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: 2,0 g sproszkowanej substancji roślinnej umieścić w kolbie stożkowej poj. 50 ml, dodać 10 ml etanolu 70% i ogrzewać na łaźni wodnej 65°C przez 5 minut. Wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej poj. 25 ml.

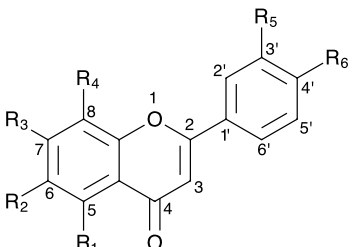
Warunki oznaczenia:

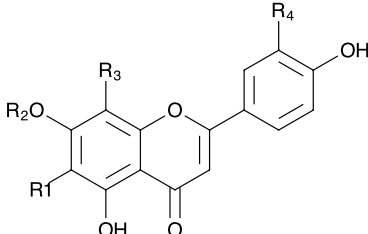
Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	kwas mrówkowy – kwas octowy – woda – octan etylu (11:11:27:100, v:v:v:v)
Wzorce:	roztwór kwasu kawowego w metanolu roztwór hiperozydu w metanolu roztwór rutozydu w metanolu
Nanoszenie:	10 µl badanego wyciągu po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	chromatogram rozwijać na dystansie 10 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. 100-105°C, a następnie gorącą płytkę spryskać metanolemowym roztworem estru aminoetylowego kwasu difenylborowego (1% metanolemowy roztwór Naturstoffreagenz A).

2. Obliczenia:

3. Obserwacje i wnioski:

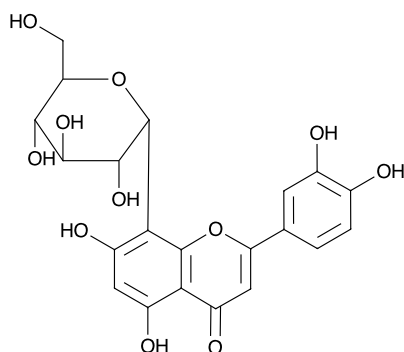
Karta wzorów

FLAWONY							
Nazwa związku		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Apigenina		OH	-	OH	-	-	OH
Bajkaleina		OH	OH	OH	-	-	-
Chryzyna		OH	-	OH	-	-	-
Diosmetyna		OH	-	OH	-	OH	OCH ₃
Luteolina		OH	-	OH	-	OH	OH
Nobiletyna		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Wogonina		OH	-	OH	OCH ₃	-	-

C- glikozydy FLAWONÓW					
Nazwa związku		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Izoorientyna		Glc	H	H	OH
Izoszaftozyd		Ara	H	Glc	H
Izowitekryna		Glc	H	H	H
Orientyna		H	H	Glc	OH
Saponaryna		Glc	Glc	H	H
Szaftozyd		Glc	H	Ara	H
Wicenina-2		Glc	H	Glc	H
Witekryna		H	H	Glc	H

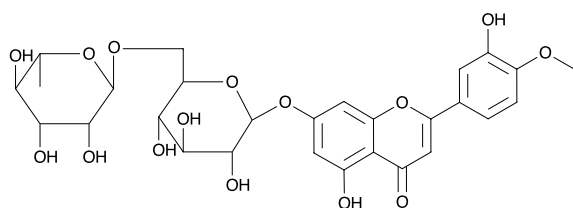
Ara – arabinosa; Glc – glukoza

Przykład C-glikozydów:



Orientyna (8-C-glukozyd luteoliny)

Przykład *O*-glikozydów:



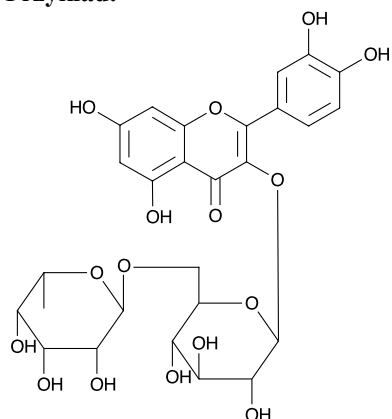
Diosmina (7-*O*-rutynozyd diosmetyny)

FLAWONOLE						
Nazwa związku		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Izoramnetyna		OH	OH	OCH ₃	OH	-
Kemferol		OH	OH	-	OH	-
Kwercetyna		OH	OH	OH	OH	-
Mirycetyna		OH	OH	OH	OH	OH

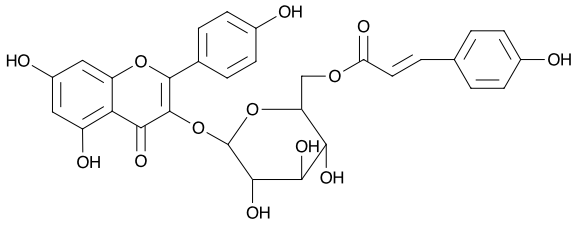
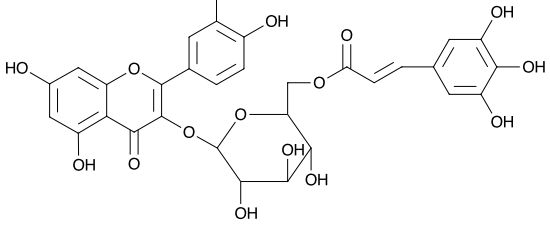
<i>O</i> - glikozydy KWERCETYNY				
Nazwa związku			R ₁	R ₂
Awikularyna	3- <i>O</i> - arabinozyd kwercetyny		Ara	H
Hiperozyd	3- <i>O</i> - galaktozyd kwercetyny		Gal	H
Izokwercytryna	3- <i>O</i> - glukozyd kwercetyny		Glc	H
Kwercytryna	3- <i>O</i> - ramnozyd kwercetyny		Rha	H
Rutozyd	3- <i>O</i> - rutynozyd kwercetyny (diglikozyd)		Glc, Rha	H
Spireozyd	4'- <i>O</i> - glukozyd kwercetyny		H	Glc

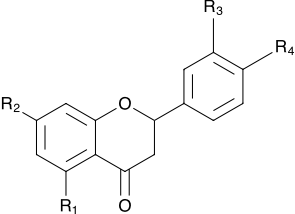
Ara – arabinoza; Gal – galaktoza; Glc – glukoza; Rha – ramnoza

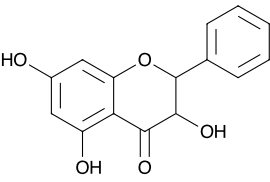
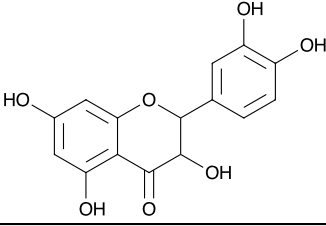
Przykład:

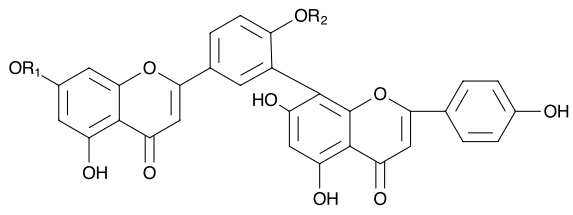


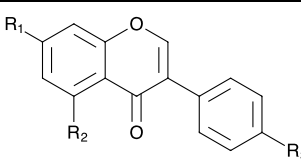
Rutozyd (3-*O*-ramnoglukozyd kwercetyny; 3-rutynozyd kwercetyny)

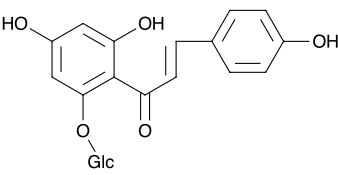
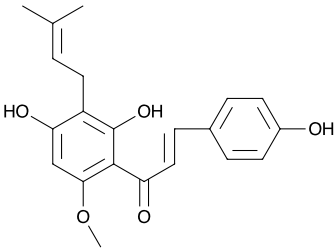
GLIKOZYDOESTRY FLAWONOLI	
	
3-O-(6''-p-kumaroilo)-glukozyd kemferolu (Tylozyd)	3-O-(6''-galoilo)-galaktozyd kwercetyny

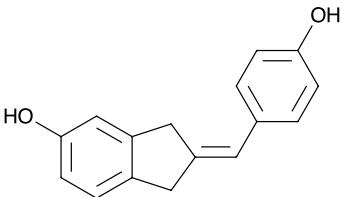
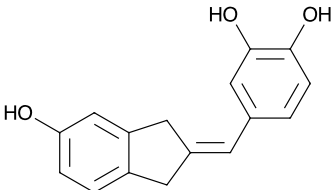
FLAWANONY					
Nazwa związku		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Eriodykcjol		OH	OH	OH	OH
Hesperetyna		H	OH	OH	OCH ₃
Litwirytygenina		H	OH	-	OH
Naryngenina		OH	OH	-	OH
Pinocembryna		OH	OH	-	H

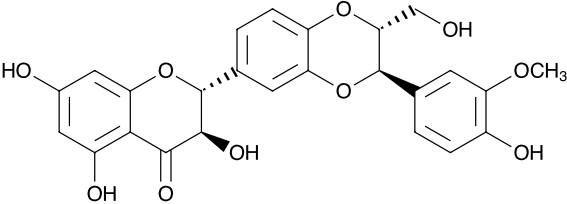
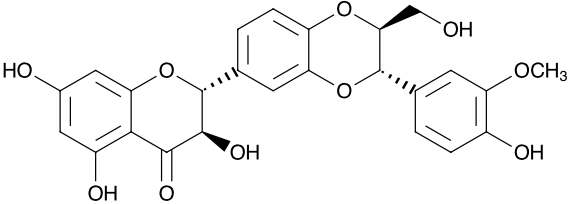
FLAWANOLOLE	
	
Pinobaksyna	Taksyfolina

BIFLAWONOIDY			
Nazwa związku		R ₁	R ₂
Armentoflawon		H	H
Bilobetyna		H	CH ₃
Ginkgetyna		CH ₃	CH ₃

IZOFLAWONY				
Nazwa związku		R1	R2	R3
Formononetyna		OH	H	OCH3
Genisteina		OH	OH	OH

CHALKONY	
	
Izosalipurpozyd	Ksantohumnnol

AURONY	
	
Hispidol	Sulfuretyna

FLAWONOLIGNANY	
	
Sylibina A	Sylibina B

Notatki:

GLIKOZYDY FENOLOWE

Opracowanie rozdziału: dr inż. Aleksandra Kruk, prof. Jakub Piwowski

Cel ćwiczenia:

- Poznanie budowy i właściwości chemicznych związków z grupy glikozydów fenolowych.
- Oznaczenie zawartości arbutyny w badanym surowcu z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej (FP VI) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (FP XII).
- Porównanie oznaczenia ilościowego metodą kolorymetryczną i metodą wykorzystującą HPLC.
- Charakterystyka właściwości farmakologicznych i wykorzystanie w terapii poszczególnych substancji roślinnych.

Substancje roślinne:

Filipendulae ulmariae flos
Salicis cortex (FPXII)

Uvae ursi folium (FPXII)
Vitis idaeae folium

1. Wstęp:

Glikozydy to związki chemiczne składające się z części cukrowej (glikonu) i niecukrowej (aglikonu). Powstają w procesie glikozydacji przy udziale enzymów glikozylotransferaz, w których cukry tworzą wiązanie hemiacetalowe z aglikonem, zazwyczaj w konfiguracji β . Są to krystaliczne, optycznie czynne związki, dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych. Hydrolizują do cukru i aglikonu na drodze hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej.

Ze względu na atom łączący część cukrową z aglikonem, glikozydy dzielimy na: C-glikozydy, O-glikozydy, S-glikozydy i N-glikozydy. W zależności od rodzaju grupy cukrowej, możemy wyróżnić glukozydy (pochodne glukozy), galaktozydy (pochodne galaktozy), rybozydy (pochodne rybozy), fruktozydy (pochodne fruktozy). Natomiast, ze względu na budowę aglikonu, glikozydy klasyfikowane są na: fenolowe, nasercowe (kardenolidy, bufadienolidy), saponinowe (saponozydy), kumarynowe, flawonoidowe, antraglikozydy, antocyjanowe (antocyjanozydy), irydoidowe i wiele innych. Biodostępność glikozydów często zależy od procesów zachodzących w jelicie cienkim i grubym, gdzie ulegają

hydrolizie pod wpływem enzymów jelitowych i/lub mikrobioty. W roślinach pełnią funkcje obronne, transportowe, magazynujące oraz stabilizujące nietrwałe związki przed rozkładem.

Glikozydy fenolowe są grupą, w których to struktura aglikonu jest oparta na fenolu lub jego pochodnych, takich jak fenylopropan lub fenyloetan. Wśród nich, można wyróżnić pochodne hydrochinonu oraz pochodne aldehydu/alkoholu salicylowego (saligeniny).

Hydrochinon wykazuje działanie bakteriostatyczne poprzez destabilizację ściany komórkowej bakterii, co zwiększa hydrofobowość ścian bakterii Gram-ujemnych oraz ich agregację, co w konsekwencji zapobiega adhezji bakterii do komórek gospodarza. Ponadto, hydrochinon wpływa na syntezę melaniny poprzez kompetencyjną inhibicję tyrozynazy (enzymu przekształcającego tyrozinę w melaninę). Ze względu na potencjalne działanie hepatotoksyczne hydrochinonu, zaleca się, aby preparaty zawierające hydrochinon lub jego pochodne były stosowane tylko doraźnie. Do ważniejszych glikozydów fenolowych będących pochodnymi hydrochinonu należą: arbutyna, metyloarbutyna i pirozyd.

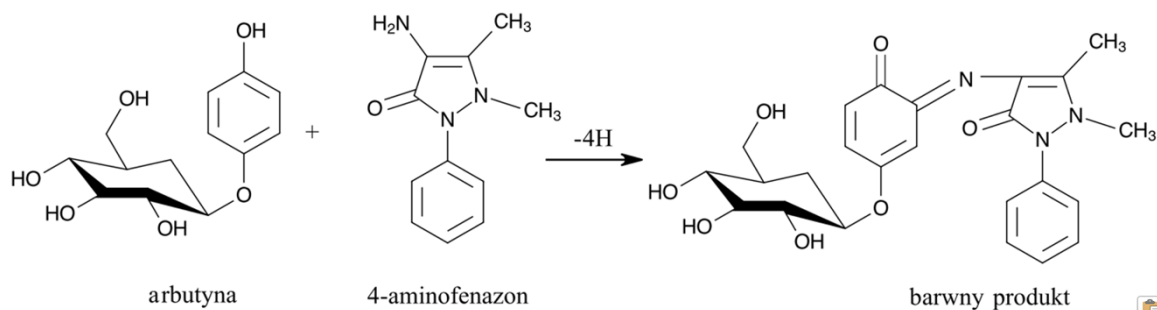
Arbutyna jest zbudowana z hydrochinonu oraz glukozy. Po podaniu doustnym surowca zawierającego arbutynę, jest ona wchłaniana w jelicie cienkim, a także w jelicie grubym. W jelicie cienkim arbutyna jest częściowo wchłaniana w formie niezmienionej przez transportery glukozy, natomiast pozostała arbutyna jest hydrolizowana w jelicie grubym do hydrochinonu pod wpływem działania enzymów wydzielanych przez mikrobiotę jelitową. W wyniku hydrolizy powstaje hydrochinon, który trafia do krwioobiegu, a następnie do wątroby. W wątrobie hydrochinon ulega detoksykacji poprzez glukuronidację (połączenie z kwasem glukuronowym przy udziale UDP-glukuronylotransferaz) lub siarczanowanie (przyłączenie grupy siarczanowej) co zwiększa jego rozpuszczalność i ułatwia eliminację wraz z moczem. Usuwany glukuronid hydrochinonu trafia wraz z krwią do moczu, gdzie może być następnie rozkładany przez β -glukuronidazy w tym również wydzielane przez bakterie *Escherichia coli* (będące patogenem najczęściej odpowiedzialnym za zakażenia dróg moczowych), co prowadzi do uwolnienia wolnego hydrochinonu (niezwiązanego z kwasem glukuronowym lub grupą siarczanową). W moczu hydrochinon wykazuje działanie antyseptyczne, co jest powodem, dla którego surowce zawierające arbutynę są stosowane w leczeniu infekcji dróg moczowych. Surowcami roślinnymi bogatymi w arbutynę są głównie *Uvae ursi folium* (preparaty: Uversan, Urofort, Nefrosept), *Vitis idaeae folium* (preparaty: Diuronis, Urosan, Urosept, Nefrobonisan), a także o mniejszym znaczeniu farmaceutycznym *Pyri folium*, *Bergeniae folium* oraz *Callunae herba*.

Wśród glikozydów będących pochodnymi aldehydu salicylowego ważnym związkiem jest salicyna. Jest ona wchłaniana w jelicie cienkim przez transportery glukozy, lecz również

może ulegać rozkładowi w jelicie grubym przez mikrobiotę jelitową i być następnie wchłaniana w formie aglikonu- aldehydu salicylowego, saligeniny. W obydwu przypadkach powstaje saligenina, która wraz z krwią jest transportowana do wątroby. Następnie w wątrobie enzymy fazy I (cytochrom P450) utleniają ją do kwasu salicylowego, który wykazuje właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe poprzez zahamowanie enzymów z grupy cyklooksygenaz (COX-1 i COX-2). Surowcami roślinnymi będącymi źródłem salicyny są *Salicis cortex* (preparaty: Enterosol, Salicortex, Rutinosal C, Salisal, Infektoten, Pyrosal, Pyrosan, Reumacor, Reumosol, Termasil), *Filipendulae ulmariae herba* (preparaty: Infektoten, Reumaherb), a także w mniejszym stopniu *Populi gemmae folium, cortex*.

Większość glikozydów fenolowych łatwo rozpuszcza się w wodzie, dlatego do analiz jakościowych i ilościowych przygotowuje się wyciągi wodne z surowców roślinnych i/lub produktów leczniczych zawierających badane związki. Glikozydy zawierające wolną grupę fenolową (np. arbutyna) oznacza się metodą Emersona (metoda kolorymetryczna), wykorzystując fakt, że w środowisku zasadowym, w obecności heksacyjanożelazianu potasu (środek utleniający), fenole tworzą z 4-aminofenazonem czerwone produkty kondensacji o strukturze chinoidowej (Ryc. 8). Powstały barwnik jest trwały w rozpuszczalnikach organicznych np. dichlorometanie, a natężenie barwy powstałego roztworu (absorbancja przy długości fali 455 nm) wprost proporcjonalne do ilości badanego związku.

Należy pamiętać, że proste i szybkie metody kolorymetryczne mają pewne ograniczenia: są niespecyficzne i mogą dawać fałszywie dodatnie wyniki. Z tego względu obecnie do rozdzielania, identyfikacji i precyzyjnego oznaczania ilościowego konkretnych związków najczęściej stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), w połączeniu z różnymi detektorami np.: UV-VIS i/lub spektrometrem mas.



Rycina 8: Schemat reakcji Emmersona z arbutyną.

KARTY PRACY

Oznaczanie zawartości arbutyny metodą kolorymetryczną (FP VI)

1. Opis ćwiczenia:

Do kolby okrągłodennej ze szlifem przenieść dokładnie:

- Surowiec – dokładnie około 0,4 g surowca
- Tabletki – 1 roztarta w moździerzu tabletki
- Mieszanka – dokładnie około 0,8 g mieszanki,

a następnie dodać **50 ml wody destylowanej** i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej przez 30 minut. Wyciąg po ochłodzeniu przesączyć przez watę do kolby miarowej na 250 ml i uzupełnić wodą do kreski. Uzyskany wyciąg w ilości 5 ml przenieść do rozdzielacza, dodać 45 ml wody, 1 ml 2% roztworu 4-aminofenazonu, 0,5 ml 3,5% roztworu amoniaku i 1 ml 8% heksacyjanożelazianu potasu, stosując podaną w przepisie kolejność. Po dodaniu każdego odczynnika roztwór dokładnie zmieszać. Całość pozostawić na 5 minut, a następnie ekstrahować trzykrotnie dichlorometanem, stosując każdorazowo 25 ml rozpuszczalnika. Warstwy dichlorometanu połączyć i przesączyć przez watę (w celu usunięcia pozostałości wody) do kolby miarowej na 100 ml. Kolbę uzupełnić dichlorometanem.

Absorbancję roztworu proszę zmierzyć za pomocą spektrofotometru przy długości fali $\lambda = 455 \text{ nm}$, stosując jako odnośnik czysty dichlorometan.

Surowiec lub preparat:

Masa naważki/preparatu:

Absorbancja:

2. Obliczenia:

Zawartość procentową pochodnych hydrochinonu w przeliczeniu na arbutynę proszę obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{7,716 \times A}{m}$$

A – absorbancja próby

m – masa surowca [g]

3. Wyniki i wnioski:

Zawartość procentowa pochodnych hydrochinonu w przeliczeniu na arbutynę w badanej próbce wynosi:

Oznaczanie zawartości arbutyny metodą HPLC (FP XII)

1. Opis ćwiczenia:

Do kolby okrągłodennej ze szlifem przenieść dokładnie:

- Surowiec – dokładnie około 0,8 g surowca
- Tabletki – dokładnie około 0,8 g rozartej w moździerz tabletke Urosept
- Mieszanka – dokładnie około 0,8 g mieszanki,

a następnie dodać **20 ml wody dejonizowanej** i ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 10 minut. Wyciąg po ochłodzeniu przesączyć przez watę do kolby miarowej na 50 ml, po czym osad wraz z watą umieścić ponownie w kolbie okrągłodennej, dodać kolejne 20 ml wody i ogrzewać przez kolejne 10 minut. Wyciąg ostudzić, przesączyć do kolby miarowej i uzupełnić do 50 ml. Wyciąg przesączyć przez sącze do kolby odrzucając pierwsze 2 ml przesącza.

Przygotowanie roztworu wzorcowego arbutyny: rozpuścić dokładnie około 10 mg arbutyny w fazie ruchomej i uzupełnić do 10 ml.

Warunki oznaczenia:

Aparatura:	chromatograf cieczowy firmy Shimadzu (LC-10AT)
Kolumna:	RP-18 firmy Machery-Nagel (250 × 4 mm; ø 4 mm; d _p 5 µm)
Detektor:	UV-VIS firmy Shimadzu (SPD-6AV)
Faza ruchoma:	metanol – woda (10:90, v/v)
Przepływ:	1,2 ml/minutę
Detekcja:	280 nm

Zastosowane warunki analizy HPLC to tzw. układ faz odwróconych, czyli faza stacjonarna jest mniej polarna od fazy ruchomej, na którą składa się mieszanina rozpuszczalników o charakterze polarnym.

2. Obliczenia:

Zawartość procentową arbutyny obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{F_1 \times m_2 \times 100 \times 5}{F_2 \times m_1}$$

F_1 – pole powierzchni pików arbutyny roztworu badanego

F_2 – pole powierzchni pików arbutyny roztworu wzorcowego

m_1 – naważka surowca w gramach

m_2 – naważka wzorcowej arbutyny w gramach

3. Wyniki i wnioski:

Procentowa zawartość arbutyny w badanej próbce wynosi:

4. Podsumowanie:

Wzorcowy roztwór arbutyny:

Masa naważki:

Czas retencji:

Pole powierzchni (F_2):

Surowiec/preparat:

Masa naważki:

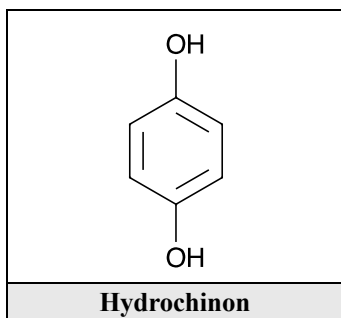
Czas retencji:

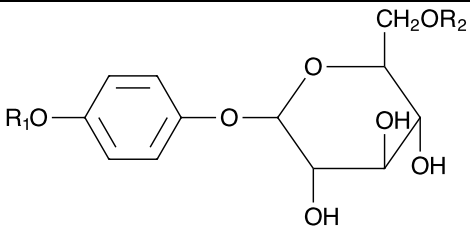
Pole powierzchni (F_1):

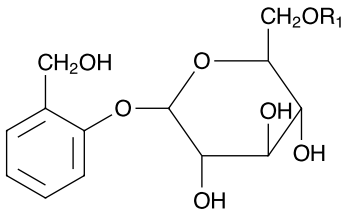
Tabela 2: Ocena zawartości arbutyny w badanych preparatach

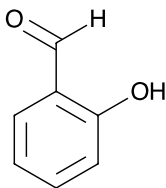
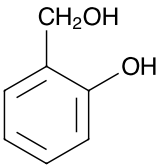
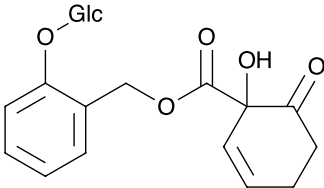
Surowiec/preparat	Zawartość arbutyny oznaczona metodą kolorymetryczną	Zawartość arbutyny oznaczona metodą HPLC	Norma zawartości arbutyny
.....			

Karta wzorów



Nazwa związku	Wzór	R ₁	R ₂
Arbutyna		H	H
Metyloarbutyna		CH ₃	H
Pirozyd		H	C(O)-CH ₃

Nazwa związku	Wzór	R ₁
Salicyna		H
Populina		C(O)-C ₆ H ₅
Fragilina		C(O)-CH ₃

		
Aldehyd salicylowy	Saligenina	Salikortyna

Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr Małgorzata Koltun-Jasion, dr Agnieszka Filipek

Cel ćwiczenia:

- Poznanie budowy oraz właściwości fizyko-chemicznych związków z grupy irydoidów.
- Oznaczanie zawartości związków irydoidowych metodą kolorymetryczną (FP VI) oraz potwierdzenie tożsamości irydoidowych substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).
- Poznanie właściwości farmakologicznych i wykorzystanie w terapii związków i substancji roślinnych.

Substancje roślinne:

Centaurii herba (FPXII)

Euphrasiae herba

Gentianae radix (FPXII)

Harpagophyti radix (FPXII)

Menyanthidis trifoliatae folium (FPXII)

Oleae folium (FPXII)

Plantaginis lanceolate folium (FPXII)

Valerianae radix (FPXII)

Verbasci flos (FPXII)

Verbenae herba (FPXII)

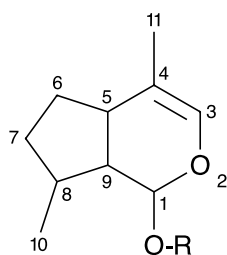
1. Wstęp:

Irydoidy to związki pochodzenia naturalnego, o charakterze monoterpenów cyklopentanowych, których podstawowym szkieletem jest układ pierścieni cyklopentanu i α -piranu. Irydoidy są związkami ciekłymi lub krystalicznymi, często o smaku gorzkim. Glikozydy irydoidów ulegają hydrolizie pod wpływem kwasów lub enzymu β -glukozydazy. Produktem ich rozpadu jest glukoza oraz aglikon, który w wyniku polimeryzacji daje przejściowe produkty o charakterystycznym zielonym, niebieskim lub fioletowym zabarwieniu, aż do produktu końcowego o barwie brunatnej/czarnej.

Irydoidy występują głównie w roślinach dwuliściennych, m.in w rodzinach: Gentianaceae, Menyanthaceae, Scrophulariaceae, Valerianaceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Oleaceae. Grupa irydoidów obejmuje substancje o budowie prostej (nieglikozydowej), a także związki o charakterze glikozydowym, do których należą struktury złożone z 9 atomów węgla (typ aukubiny), 10 atomów węgla (typ asperulozydu) oraz sekoirydoidy mające otwarty pierścień cyklopentanowy. Część cukrową stanowi najczęściej glukoza, połączona z aglikonem

przez węgiel w pozycji C₁. Cechą charakterystyczną dla wszystkich irydoidów jest także występowanie wiązania podwójnego między atomami węgla C₃ i C₄.

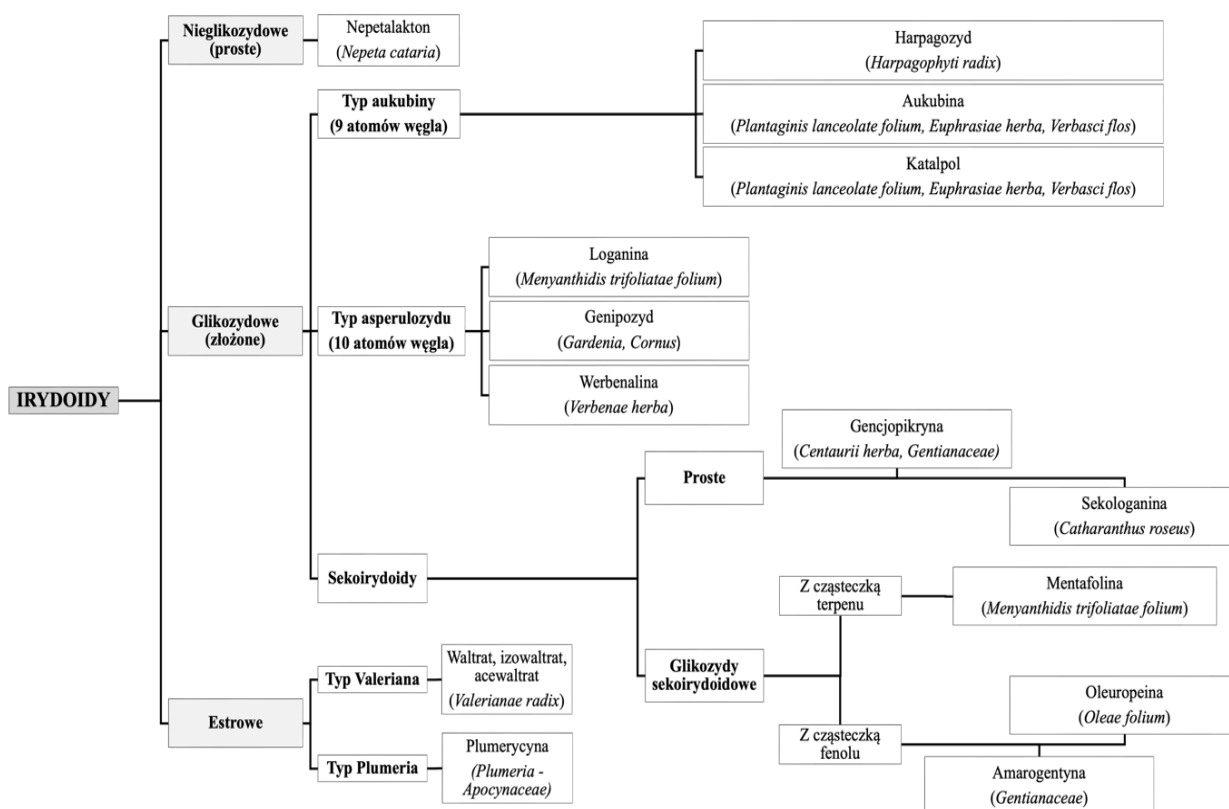
Ogólny schemat budowy irydoidów zaprezentowano na poniższej rycinie (Ryc. 9).



Rycina 9: Struktura chemiczna cyklopentano- α -piranu.

Odrębną grupę stanowią irydoidy estrowe, do których należą irydoidy typu *Valeriana* (walepotriaty). Pod względem budowy chemicznej są to połączenia pomiędzy trójestrem polihydroksycyklopentanopiranu z odpowiednim kwasem np. izowalerianowym. Walepotriaty są związkami niestabilnymi. Łatwo ulegają rozkładowi w wyższej temperaturze oraz w obecności kwasów i zasad, dając produkty rozpadu tj. baldrynal i waltroksal.

Podział związków z grupy irydoidów na podstawie ich budowy chemicznej oraz surowce roślinne (gatunki lub rodziny) zawierające poszczególne struktury chemiczne została podsumowana na poniższym schemacie (Ryc. 10).



Rycina 10: Podział związków z grupie irydoidów na podstawie ich budowy chemicznej.

Do wykrywania glikozydów irydoidowych stosuje się różne odczynniki, których wspólnym mianownikiem jest obecność kwasu w ich składzie. Najczęściej wykorzystywanym jest odczynnik Ehrlicha, zawierający aldehyd *p*-dimetyloaminobenzoowy w roztworze kwasu solnego, który po ogrzaniu z glikozydami irydoidowymi prowadzi do pojawienia się charakterystycznego niebieskiego (lub zielonkawego) zabarwienia. W ekstrakcji glikozydów irydoidowych z substancji roślinnych stosuje się wrzącą wodę, aby inaktywować enzym β -glukozydazę i zminimalizować rozpad glikozydów. Ponadto, w tym samym celu stosuje się również dodatek węglanu wapnia, aby zobojętnić kwasy organiczne, które występują w surowcach. Natomiast otrzymane wyciągi należy odpowiednio oczyścić np. poprzez sączenie na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu, co pozwala na związanie związków polifenolowych (flawonoidy, garbniki, kwasy fenolowe) ze złożem w formie nierozpuszczalnych połączeń. Obecność irydoidów można wykryć za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym, a także ocenić ich zawartość stosując metody spektrofotometryczne.

Związki chemiczne należące do grupy irydoidów charakteryzują się dużym zróżnicowaniem właściwości biologicznych obserwowanych w obrębie grupy. Poniżej przedstawiono najważniejsze z nich:

- *goryczowe np. gencjopikryna, mentaolina, amarogentyna
- przeciwdrobnoustrojowe – bakteriostatyczne, grzybobójcze, przeciwwirusowe, np. nepetalakton, aukubina
- przeciwbólowe/przeciwzapalne np. harpagozyd, aukubina, loganina, genipozyd, oleuropeina
- uspokajające np. walepotriany
- kardioprotekcyjne/hipotensyjne np. oleoeuropeina
- spazmolityczne i moczopędne np. katalpol.

*Z grupą substancji goryczowych związane jest pojęcie **wskaźnika goryczy**, będącego wartością liczbową największego rozcieńczenia preparatu lub wyciągu z 1g surowca, która wykazuje jeszcze smak gorzki. Jako roztworu wzorcowego (w celu określenia różnic osobniczych) używa się chlorowodoru chininy. Wskaźnik goryczy jest przypisywany do trzech substancji roślinnych goryczowych: *Gentianae radix*, *Centaurii herba* i *Menyanthidis folium*.

Do najczęściej wykorzystywanych w terapii surowców pochodzenia roślinnego, zawierających związki z grupy irydoidów należy niewątpliwie korzeń kozłka lekarskiego

(*Valerianae radix*; *Valeriana officinalis*), będący składnikiem preparatów łagodnie uspokajających oraz ułatwiających zasypianie np. *Valused*, *Persen forte*. Ponadto, surowce zawierające sekoirydoidy o wybitnie gorzkim smaku (*remedia amara*) są cenionymi składnikami preparatów pobudzających łaknienie. Przykładowo, korzeń goryczki oraz liść bobrka wchodzi w skład surowca farmaceutycznego oraz tradycyjnego produktu leczniczego – nalewki gorzkiej (*Tinctura amara*), stosowanej pomocniczo w zaburzeniach dyspeptycznych, a także okresowej utracie apetytu. Korzeń goryczki wchodzi także w skład ziół poprawiających trawienie (*species digestivae*) (FP XII). Liść babki lancetowatej (*Plantaginis folium*; *Plantago lanceolata*) jest składnikiem monopreparatów np. *Sirupus plantaginis*, stosowanych w nieżytach górnych dróg oddechowych, a także preparatów złożonych o działaniu wykrztuśnym, przeciwzapalnym czy immunomodulującym np. zioła przeciwkaszlowe (*species antiechicae*) (FP XII), *Echinasal Pectobonisol* czy *Plantifort*.

KARTY PRACY

Oznaczanie zawartości związków irydoidowych metodą kolorymetryczną (FP VI)

1. Opis ćwiczenia:

Material do badań (proszę zaznaczyć badany surowiec):

- | | |
|--|-------------------------------------|
| ☐ <i>Plantaginis lanceolatae folium</i> | 0,5 g surowca; 0,3 g węglanu wapnia |
| ☐ <i>Plantaginis majoris folium</i> | 1,0 g surowca; 0,6 g węglanu wapnia |
| ☐ <i>Euphrasiae herba</i> | 0,5 g surowca; 0,3 g węglanu wapnia |
| ☐ <i>Verbasci flos</i> | 1,0 g surowca; 0,6 g węglanu wapnia |

Przygotowanie wyciągu i wykonanie oznaczenia:

Odważkę (naczynko wagowe!) sproszkowanej substancji roślinnej przenieść do kolby okrągłodennej ze szlifem o poj. 250 ml, dodać odpowiednią naważkę węglanu wapnia i 100 ml wody. Następnie zawartość kolby ogrzewać na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut, często mieszając. W tym czasie przygotować kolumnę z tlenkiem glinu. Otrzymany wyciąg ostudzić i przesączyć przez kolumnę do zlewki, pierwsze 5 ml przesączu odrzucić. Następnie do 3 probówek odmierzyć dokładnie:

- 0,5 ml przesączu,
- 1 ml metanolu,
- 2 ml roztworu 4-dimetyloaminobenzaldehydu z dodatkiem kwasu solnego
- 1,5 ml wody destylowanej.

Zawartość probówek ogrzewać 3 minuty we wrzącej łaźni wodnej, szybko schłodzić, przenieść ilościowo do kolb miarowych o poj. 10 ml i uzupełnić wodą. Po 15 minutach zmierzyć absorbancję niebiesko zabarwionych roztworów przy długości fali 590 nm, stosując wodę jako odnośnik.

Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu:

Kolumnę szklaną o średnicy 1 cm i wysokości ok. 30 cm uszczelnić w dolnej części małym zwitkiem waty i wsypać około 1,2 g tlenku glinu.

2. Obliczenia:

Zawartość irydoidów w badanym surowcu roślinnym, w przeliczeniu na aukubinę proszę obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{1,968 \times A}{m} [\%]$$

A – absorbancja roztworu badanego

m – odważka substancji roślinnej [g]

3. Wnioski:

Zawartość irydoidów w badanej naważce, w przeliczeniu na aukubinę wynosi.....

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

1. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu:

Odważkę sproszkowanej substancji roślinnej (jak w oznaczeniu ilościowym) przenieść do kolby okrągłodennej ze szlifem o poj. 100 ml, dodać 5 ml metanolu (*Verbasci flos* – 7 ml), ogrzać do wrzenia, pozostawić 1 minutę (zdjąć wcześniej, jeżeli rozpuszczalnik zbyt szybko odparowuje) i ochłodzony wyciąg przesączyć przez sączek bibułowy.

Warunki oznaczenia:

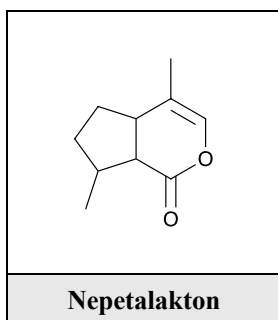
Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	<i>n</i> -propanol – toluen – kwas octowy – woda (5:4:2:2, v/v/v/v)
Wzorzec:	roztwór aukubiny w metanolu
Nanoszenie:	10 µl wyciągu substancji roślinnej 5 µl roztworu wzorca
Rozwijanie:	komora pionowa, droga rozwijania 9 cm
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć strumieniem ciepłego powietrza, spryskać mieszaniną etanolowego roztworu 4-dimetyloaminobenzaldehydu z kwasem solnym i ogrzewać 5 minut w temp. 90°C

2. Obserwacje:

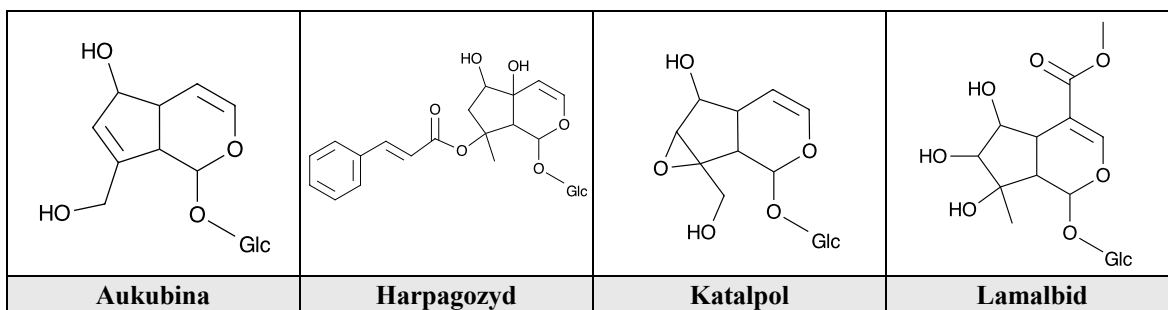
3. Wnioski:

Karta wzorów

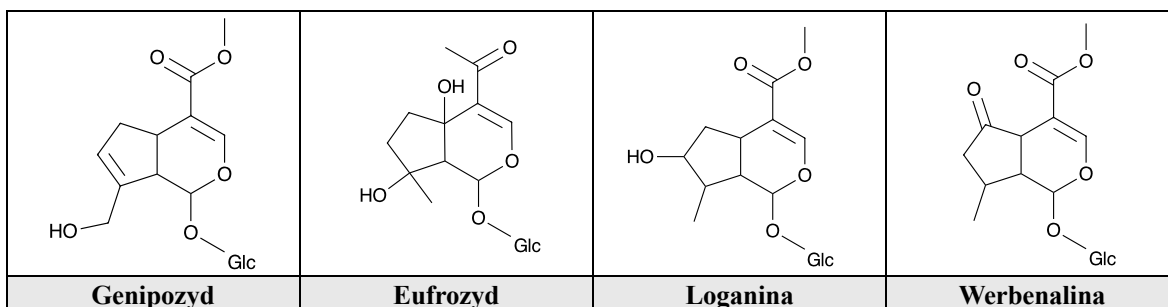
1) Irydoidy nieglikozydowe (proste)



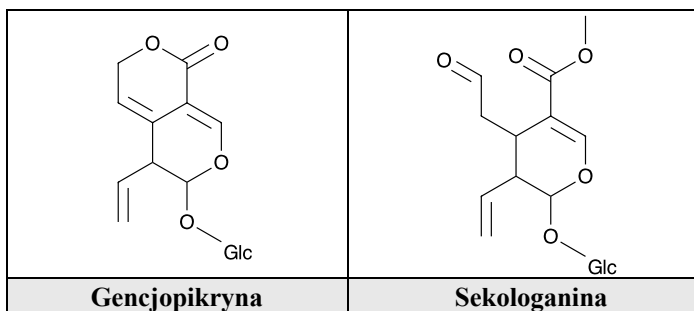
2) Glikozydy irydoidowe (zawierające 9 atomów węgla – typ aukubiny)



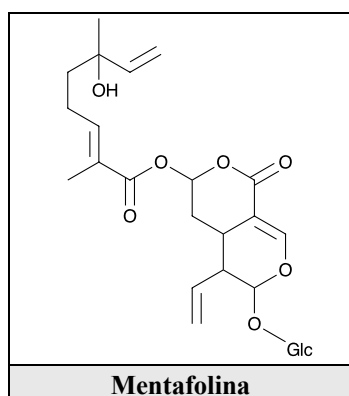
3) Glikozydy irydoidowe (zawierające 10 atomów węgla – typ asperulozydu)



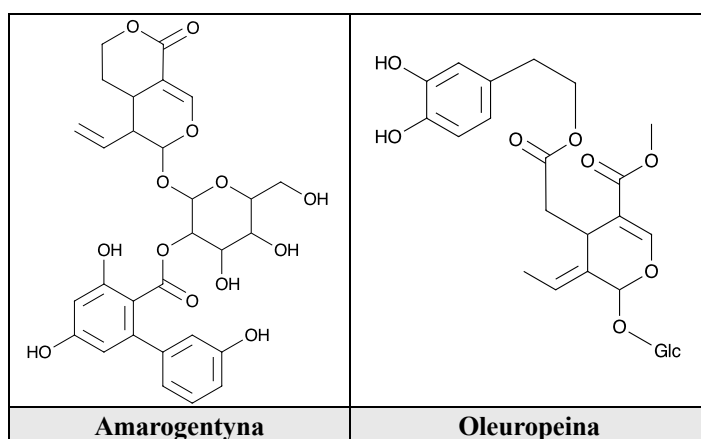
4) Sekoirydoidy proste



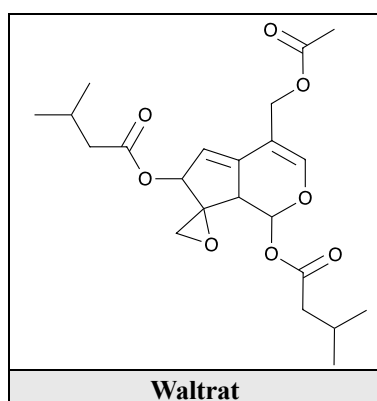
5) Glikozydy sekoirydoidowe z przyłączoną cząsteczką terpenu



6) Glikozydy sekoirydoidowe z przyłączoną cząsteczką fenolu



7) Irydoidy estrowe (typ Valeriana)



Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr hab. Agnieszka Bazylko

Cel ćwiczenia:

- Podsumowanie ogólnych wiadomości na temat substancji roślinnych olejkowych, olejków eterycznych i ich składników oraz metod ich badania.
- Ocena wartości badanej olejkowej substancji roślinnej metodą FP XII (monografia substancji roślinnej, zawartość).
- Potwierdzenie tożsamości olejkowej substancji roślinnej metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wg FP XII (monografia substancji roślinnej, tożsamość pkt. C).
- Badanie tożsamości oraz jakości olejku miętowego metodą chromatografii gazowej.
- Poznanie właściwości farmakologicznych, wykorzystanie w terapii związków, olejków i substancji roślinnych.

Substancje roślinne:

Absinthii herba (FPXII)

Anisi fructus (FPXII)

Auranti amari epicarpium et mesocarpium (FPXII)

Carvi fructus (FPXII)

Caryophylli flos (FPXII)

Coriandri fructus (FPXII)

Eucalypti folium (FPXII)

Foeniculi amari fructus (FPXII)

Foeniculi dulcis fructus (FPXII)

Juniperi galbulus (FPXII)

Lavandulae flos (FPXII)

Levistici radix (FPXII)

Lupuli flos (FPXII)

Matricariae flos (FPXII)

Melissae folium (FPXII)

Menthae piperitae folium (FPXII)

Salviae officinalis folium (FPXII)

Thymi herba (FPXII)

Zingiberis rhizoma (FPXII)

1. Wstęp:

Olejkowe substancje roślinne, olejki eteryczne oraz substancje chemiczne otrzymywane z olejków są teraz jedną z najczęściej stosowanych w lecznictwie grup substancji i przetworów pochodzenia naturalnego.

Olejki eteryczne wytwarzane są tylko przez rośliny wyższe. Gromadzą się one w specjalnych strukturach wydzielniczych, wśród których wyróżniamy struktury

zewnątrztkankowe (włoski wydzielnicze) oraz wewnątrztkankowe (zbiorniki, przewody i komórki wydzielnicze). Pełnią głównie rolę w rozmnażaniu roślin jako atraktanty, a także istotne jest dla roślin ich działanie zwalczające patogeny.

Olejki eteryczne to mieszaniny substancji lotnych charakteryzujących się silnym, przeważnie przyjemnym zapachem. Definiują je ich cechy fizykochemiczne oraz technologia otrzymywania. Wśród cech fizykochemicznych olejków eterycznych wymienia się płynny stan skupienia, lotność z parą wodną, lipofilność, czynność optyczną, charakterystyczny zapach, czasem kolor oraz gęstość przeważnie mniejszą od gęstości wody. Najstarszą i do tej pory najczęściej wykorzystywaną metodą otrzymywania olejków jest destylacja z parą wodną. Jest ona również jedną z podstawowych farmakopealnych metod otrzymywania olejków, drugą metodą farmakopealną jest wyciskanie, wykorzystywane jedynie do otrzymywania olejków eterycznych z owoców cytrusowych.

Związki chemiczne obecne w olejkach eterycznych można podzielić na 3 grupy. Pierwsza to terpeny, przede wszystkim monoterpeny oraz seskwiterpeny, druga to pochodne fenyletanu. Natomiast trzecia to inne drobnocząsteczkowe związki lotne, między innymi niektóre związki siarki, azotu, produkty rozpadu kwasów tłuszczowych czy związków terpenowych, kumaryny, ftalidy oraz kwasy organiczne. Najlichniesza grupa związków obecna w olejkach to związki monoterpenowe, niektóre z nich, takie jak tymol, mentol czy kamfora, są szeroko stosowane w lecznictwie jako izolowane pojedyncze substancje chemiczne. Związkiem chemicznym stosowanym w lecznictwie jako izolowana substancja z grupy pochodnych fenyletanu jest eugenol, którego silne działanie dezynfekujące jest wykorzystywane w stomatologii.

Olejkowe substancje roślinne, olejki eteryczne oraz izolowane substancje chemiczne wykazują wiele kierunków działań. Wśród nich wymienia się działanie silnie drażniące, rozgrzewające, powodujące przekrwienie tkanek, które wykorzystywane są w bólach reumatycznych czy neuralgicznych (olejki eteryczne z rodziny Pinaceae), działanie bakteriobójcze i grzybobójcze (olejki pozyskiwane z roślin z rodzaju *Melaleuca*), wykrztuśne (ziele tymianku), działanie moczopędne (olejek jałowcowy), uspokajające (korzeń arcydzięgla litworu), zwiększające wydzielanie soków trawiennych (ziele piołunu), żółciopędne i żółciotwórcze (olejek miętowy), przeciwzapalne (kwiat rumianku), rozkurczające (owoce z rodziny Apiaceae) i przeciwpasożytnicze (ziele piołunu). Są również wykorzystywane ze względu na właściwości poprawiające smak i zapach leków (olejek cytrynowy). W dawnych czasach wykorzystywano również je jako środki poronne (owoc jałowca).

Wbrew powszechnemu mniemaniu szczególnie olejki eteryczne oraz izolowane substancje chemiczne charakteryzują się silnym działaniem mogącym prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych. Najczęściej obserwowane działania niepożądane to drażnienie skóry i błon śluzowych, reakcje alergiczne oraz skurcze krtani i/lub oskrzeli.

Niektóre substancje chemiczne, składniki olejków eterycznych mogą uszkadzać ośrodkowy układ nerwowy (tujon), czy działać halucynogennie (mirystycyna). Jest to związane z faktem, że są to małe, lipofilne cząsteczki, łatwo wchłaniające się z przewodu pokarmowego oraz przenikające barierę krew-mózg.

Należy pamiętać, że działanie olejkowej substancji roślinnej nie musi być takie samo jak olejku z niej pozyskiwanego. Zależy to od zawartości olejku w substancji roślinnej oraz obecności w niej związków z innych grup chemicznych,

Ze względu na ich lotność preparaty zawierające olejki eteryczne lub substancje chemiczne izolowane z olejków można stosować w postaci inhalacji.

Tok badań według farmakopei sprawdzający wartość olejkowych substancji roślinnych jest oczywiście inny od toku badań olejków eterycznych, które są przetworami roślinnymi.

Olejkowe substancje roślinne, tak jak wszystkie substancje roślinne, w monografii farmakopealnej posiadają swoją definicję, czyli opis jaka to jest część rośliny, z jakiego gatunku lub gatunków pozyskiwana, a następnie opisane są badania potwierdzające ich tożsamość, inne badania (jak oznaczenie zawartości popiołu czy zanieczyszczeń) oraz oznaczenie zawartości olejku metodą objętościową.

Monografia olejków eterycznych również rozpoczyna się od definicji, czyli opisu z jakiej części rośliny, z jakiego gatunku czy gatunków powinien być on otrzymany. W drugiej części znajduje się opis właściwości organoleptycznych olejku oraz jego rozpuszczalności, a następnie znajduje się opis badań potwierdzających jego tożsamość metodą chromatografii cienkowarstwowej. W części badania podane są wartości stałych fizykochemicznych oraz liczb, w jakich powinien mieścić się badany olejek, aby był uznany za spełniający wymagania farmakopealne. Spośród stałych fizykochemicznych bada się gęstość względną olejku, współczynnik załamania światła oraz skręcalność optyczną. W zależności od składu chemicznego wyznacza się liczbę kwasową, liczbę estrową, liczbę estrową po acetylacji i/lub liczbę nadtlenną.

Liczba kwasowa to ilość mg wodorotlenku potasu potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów zawartych w 1 g badanego olejku.

Liczba estrowa to ilość mg wodorotlenku potasu potrzebna do zmydlenia estrów zawartych w 1 g badanego olejku.

Liczba estrowa po acetylacji to ilość mg wodorotlenku potasu potrzebna do zmydlenia estrów zawartych w 1 g badanego olejku, uprzednio poddanego acetylacji kwasem octowym.

Różnica liczby estrowej po acetylacji oraz liczby estrowej mówi o ilości wolnych alkoholi w badanym oleju.

Liczba nadtlenkowa jest to liczba wyrażająca w miliekwiwalentach aktywnego tlenu ilość nadtlenków zawartych w 1000 g badanego olejku.

Jeżeli wartości tych parametrów nie mieszczą się w wartościach podawanych w farmakopei może to świadczyć o nieodpowiednim otrzymaniu olejku, zbyt długim przechowywaniu lub przechowywaniu w złych warunkach. W badaniach ocenia się również między innymi możliwe zanieczyszczenie olejku olejami lub produktami żywienia. Ostatnią częścią badań jest wyznaczenie profilu chromatograficznego metodą chromatografii gazowej. Profil taki pokazuje zarówno skład jakościowy badanego olejku, również potwierdzając jego tożsamość oraz zawartość poszczególnych składników w nim obecnych.

KARTY PRACY

Oznaczenie zawartości olejku w substancji roślinnej metodą wg FP XII

1. Warunki oznaczenia:

Oznaczenie zawartości olejku wg FP XII oraz PhEu wykonuje się metodą objętościową po destylacji z parą wodną w aparacie Clevengera. Dawniej według Farmakopei Polskiej stosowany był aparat Derynga.

Warunki destylacji: naważkę substancji roślinnej, stopień jej rozdrobnienia, objętość wody potrzebną do destylacji oraz czas destylacji określają monografie farmakopealne. Informacje te zostały zebrane w poniższej tabeli (Tab. 3). Substancję roślinną umieścić w kolbie, dodać wodę (stopniowo, porcjami, aby dokładnie zwilżyć całą substancję roślinną w kolbie). Następnie kolbę zamontować w aparacie. Przed rozpoczęciem destylacji do odbieralnika wypełnionego wodą dodać 0,5 ml ksylenu. W przypadku destylacji olejku z ziela tymianku proces prowadzi się bez dodatku ksylenu. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia i utrzymywać we wrzeniu przez określony w monografii farmakopealnej czas mierzony od pojawienia się pierwszej kropli olejku w odbieralniku. Po zakończeniu destylacji i ostygnięciu aparatu (przez 30 minut) otrzymany roztwór olejku w ksylenie przy pomocy kranu trójdzielnego umieścić w kalibrowanej rurce aparatu i odczytać jego objętość. Od odczytanej objętości należy odjąć objętość dodanego ksylenu. Uzyskany wynik proszę (objętość olejku) przeliczyć na 1 kg substancji roślinnej i porównać z wymaganiami Farmakopei.

Tabela 3: Warunki destylacji olejków wg. FP XII.

Substancja roślinna	Naważka [g]	Objętość wody [ml]	Objętość ksylenu [ml]	Czas destylacji [h]
<i>Anisi fructus</i>	10	100	0,5	2
<i>Carvi fructus</i>	10	200	0,5	1,5
<i>Caryophylli flos</i>	2	100	0,5	2
<i>Coriandri fructus</i>	30	200	0,5	2
<i>Foeniculi fructus</i>	10	200	0,5	2
<i>Lavandulae flos</i>	20	500	0,5	2
<i>Matricariae flos</i>	30	500	0,5	4
<i>Menthae piperitae folium</i>	20	200	0,5	2
<i>Thymi herba</i>	30	400	-	2

2. Obliczenia:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Anisi oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy F ₂₅₄
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (93:7, v/v)
Wzorce:	roztwór anetolu w toluenie (10 µl/ml) roztwór aldehydu anyżowego w toluenie (2 µl/ml) roztwór linalolu w toluenie (1 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 50 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene plus 450 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₂₅₄ , spryskać roztworem 4-acetylobenzoesanu metylu

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Caryophylli floris aetheroleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy F ₂₅₄
Faza ruchoma:	toluen
Wzorce:	roztwór eugenolu w tolunie (7,5 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 10 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene + 390 µl metanolu cz.d.a. 5 µl roztworu wzorca
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₂₅₄ , spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C - 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Carvi oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy F ₂₅₄
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (95:5, v/v)
Wzorce:	roztwór karweolu w ksylenie (5 µl/ml) roztwór karwonu w ksylenie (10 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 50 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylenie + 450 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₂₅₄ , spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Coriandri oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (95:5, v/v)
Wzorce:	roztwór octanu geranylu w toluenie (5 mg/ml) roztwór linalolu w toluenie (3 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 50 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene + 450 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Foeniculi oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (93:7, v/v)
Wzorce:	roztwór fenchonu w tolunie (2 µl/ml) roztwór anetolu w tolunie (16 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 50 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene + 450 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej i spryskać roztworem kwasu fosforomolibdenowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Lavandulae oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (95:5, v/v)
Wzorce:	roztwór cyneolu w toluenie (10 µl/ml) roztwór octanu linalilu w toluenie (5 µl/ml) roztwór linalolu w toluenie (5 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 100 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene + 300 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Matricariae oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (95:5, v/v)
Wzorce:	roztwór gwajazulenu w tolenu (0,1 mg/ml) roztwór bisabololu w tolenu (1 µl/ml) roztwór octanu bornylu w tolenu (2 mg/ml)
Nanoszenie:	10 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylenie po 10 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Menthae piperitae oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy F ₂₅₄
Faza ruchoma:	toluen – octan etylu (95:5, v/v)
Wzorce:	roztwór mentolu w toluenie (5 mg/ml) roztwór tymolu w toluenie (1 mg/ml) roztwór cyneolu w toluenie (2 µl/ml) roztwór octanu mentylu w toluenie (1 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 100 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylenie + 300 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, obejrzyć w świetle UV ₂₅₄ , spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości substancji roślinnych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Thymi oleum

1. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	chlorek metylenu
Wzorce:	roztwór tymolu w chlorku metylenu (0,2 mg/ml) roztwór karwakrolu w chlorku metylenu (1 µl/ml)
Nanoszenie:	10 µl mieszaniny: 50 µl zebranego w czasie destylacji roztworu olejku w ksylene + 450 µl metanolu cz.d.a. po 5 µl roztworów wzorców
Wywołanie:	chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać kilka minut w temp. 100°C – 105°C.

2. Obserwacje:

3. Wnioski:

Badanie jakościowe i ilościowe olejku miętowego metodą chromatografii gazowej

1. Opis ćwiczenia:

Aparatura:	Chromatograf gazowy firmy Shimadzu (GC-17A)
Kolumna:	Zebtron ZB-Wax (100% glikol polietylenowy) Kolumna kapilarna, długość 30 m, $\varnothing$ 0,53 mm
Gaz nośny:	Argon
Detektor:	Płomieniowo-jonizacyjny (FID)
Warunki analizy:	Temperatura dozownika: 230°C Temperatura detektora: 250°C Zakres temperatury analizy: 50°C – 100°C – 180°C Przyrost temperatury: 10°C/minutę; 5°C/minutę Przepływ gazu nośnego: 8 ml/minutę Podział: 1:10

Oznaczenie jakościowe:

Roztwory do analizy:

- 0,5% roztwór olejku miętowego w metanolu
- Roztwór mentolu wzorcowego w metanolu (3,0 mg/ml)

Do analizy proszę pobierać po 1 μ l roztworów.

Oznaczenie ilościowe:

Roztwory do analizy:

- 0,5% roztwór olejku miętowego w metanolu z dodatkiem anetolu wzorcowego (1,5 mg/ml)
- Roztwór anetolu wzorcowego w metanolu (3,0 mg/ml)

Do analizy proszę pobierać po 1 μ l roztworów.

2. Obliczenia:

Zawartość mentolu w olejku proszę obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{m \times P_m \times f \times 10}{v \times P_a \times c} [\%]$$

X – zawartość mentolu [%]

P_m – pole powierzchni piku mentolu

v – objętość próbki wprowadzonej na kolumnę [μl]

P_a – pole powierzchni piku anetolu

m – masa anetolu dodanego do próbki [μg]

C – stężenie roztworu olejku

f – współczynnik korekcyjny (równy 0,87)

Obliczenie zawartości mentolu w badanym olejku miętowym:

3. Wnioski:

3.1. Wnioski z oznaczenia jakościowego. Czy można potwierdzić tożsamość olejku miętowego?

3.2. Wnioski z oznaczenia ilościowego. Czy badany olejek spełnia wymagania FP XII?

Karta wzorów

Składniki olejków eterycznych:

1) Monoterpeny ($C_{10}H_{16}$)

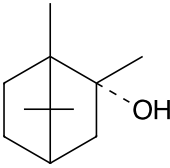
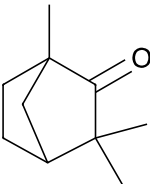
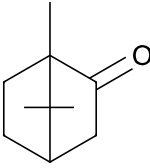
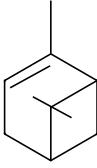
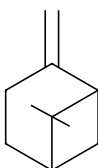
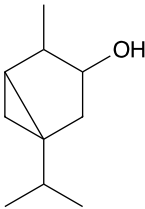
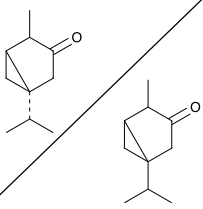
a) acykliczne (łańcuchowe) i ich tlenowe pochodne

Cytral A = Geranial (trans)	Cytral A = Neral (cis)	Cytronelal	Cytronelol	Geraniol
Linalol	Mircen	Nerol	Ocymen	

b) Monoterpeny monocykliczne (jednopierscieniowe) i ich tlenowe pochodne

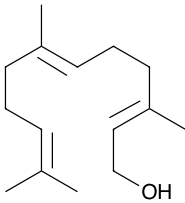
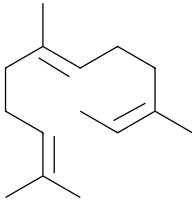
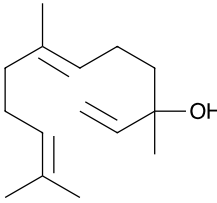
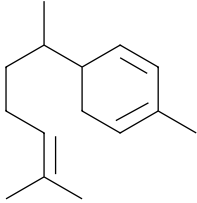
Askarydol	Eukaliptol (1,8-cyneol)	Felandren (α/β)	Karwon	Karwakrol
Limonen	Mentol	Menton	(α/β) Terpineol	Tymol
Pulegon	p-cymen			

c) Monoterpeny dicykliczne i ich pochodne

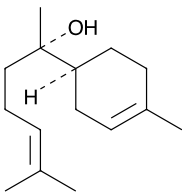
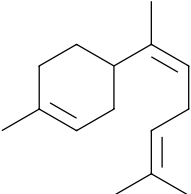
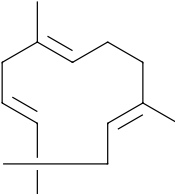
				
Borneol	Fenchon	Kamfora	α-Pinen	β-Pinen
				
Tujol	(α/β) Tujon			

2) Seskwiterpeny (C₁₅H₂₄)

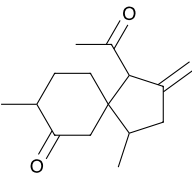
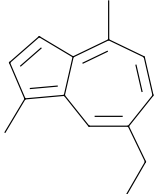
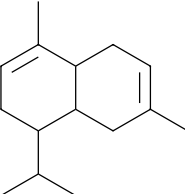
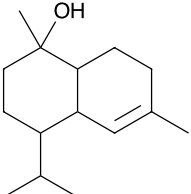
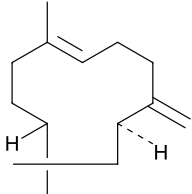
a) acykliczne

			
Farnehol	Farnezen	Nerolidol	Zingiberen

b) monocykliczne

		
α-Bisabobol	Bisabolen	α-Kariofilen = α-Humulen

c) dicykliczne

				
Akoron	Chamazulen	α-Kadinen	Kadinol	β-Kariofilen

d) tricykliczne – laktony seskwiterpenowe

Alantolakton	Artabsyna	Matrycyna	Nobilina

3) Pochodne fenylopropenu (C6-C3)

a) aldehydy

Aldehyd anyżowy	Aldehyd cynamonowy

a) fenole

Anetol	Apiol	Eugenol
Estragol - metylochawikol	Safrol	Wanilina

b) etery fenolowe

α-Azaron (trans)	β-Azaron (cis)	Kalamol

Notatki:

ĆWICZENIA SPECJALISTYCZNE

Opracowanie rozdziału: prof. Sebastian Granica

Cel ćwiczenia:

- Izolacja eskuliny z kory kasztanowca (*Hippocastani cortex*).
- Przeprowadzenie procesu separacji eskuliny od fraksyny.
- Weryfikacja tożsamości i czystości wyizolowanego związku.

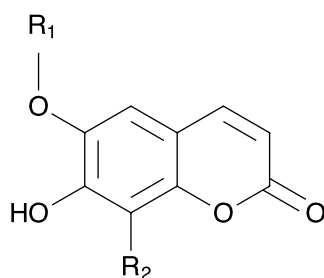
Substancje roślinne:

Hippocastani cortex

1. Wstęp:

Kora kasztanowca stosowana jest w lecznictwie obok nasienia kasztanowca. Surowiec ten zawiera głównie kumaryny proste w tym eskulinę i towarzyszącą jej fraksynę (Ryc .11). Wyciąg z kory lub wyizolowana eskulina wchodzi w skład preparatów działających uszczelniająco i wzmacniająco na naczynia włosowate (np. *Venacorn*, *Venescin*).

Oba te związki przyczyniają się do szerokiego spektrum biologicznej aktywności kasztanowca, a także mają swoje specyficzne zastosowania terapeutyczne.



R ₁	R ₂	Związek	Masa molowa (g/mol)
-O-glukoza	-H	Eskulina	340,3
-OCH ₃	-O-glukoza	Fraksyna	370,3

Rycina 11: Wzory strukturalne eskuliny i fraksyny.

Eskulina

Eskulina jest glikozydem kumarynowym, który występuje w korze kasztanowca (kasztanowiec zwyczajny, kasztanowiec kalifornijski) oraz w zielonej wydzielinie (dafnina) wawrzynka wilczelyko. Jest to związek, który wykazuje szereg właściwości biologicznych, z których najważniejsze to działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe i antyoksydacyjne. Eskulina jest szczególnie znana ze swojej zdolności do absorpcji promieniowania ultrafioletowego (UV), co sprawia, że jest używana w niektórych preparatach kosmetycznych jako środek chroniący przed szkodliwym działaniem UV.

W medycynie eskulina jest ceniona za jej właściwości wzmacniające naczynia krwionośne. Działa ona uszczelniająco na ściany naczyń, co pomaga w redukcji przepuszczalności naczyń krwionośnych, a tym samym zmniejsza ryzyko powstawania obrzęków. Z tego powodu eskulina jest jednym z ważnych składników w leczeniu przewlekłej niewydolności żylniej oraz innych schorzeń związanych z zaburzeniami krążenia.

Eskulina ma także silne działanie przeciwzapalne, które opiera się głównie na hamowaniu ścieżki sygnałowej NF- κ B, co prowadzi do zmniejszenia produkcji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Działanie to zostało potwierdzone w modelach takich jak zapalenie jelita grubego, artretyzm czy ostre uszkodzenie płuc. Ponadto, eskulina charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi, co jest kluczowe dla ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Działa poprzez wychwytywanie wolnych rodników oraz modulowanie aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak superoksydaza dysmutaza (SOD) i glutation (GSH). Dzięki temu eskulina może przeciwdziałać uszkodzeniom komórek wywołanym przez stres oksydacyjny. Właściwości przeciwbakteryjne eskuliny obejmują hamowanie wzrostu zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, a także niektórych grzybów. Dodatkowo, wykazuje działanie przeciwwirusowe, co sugeruje jej potencjalne zastosowanie w terapii zakażeń wirusowych.

Fraksyna

Fraksyna, podobnie jak eskulina, jest kumaryną występującą w korze kasztanowca. Jest ona glikozydem fraksydolu, który ma właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i antyoksydacyjne. Fraksyna, dzięki swoim właściwościom przeciwzapalnym, znajduje zastosowanie w leczeniu stanów zapalnych, takich jak zapalenie żył czy hemoroidy.

Podobnie jak eskulina, fraksyna wykazuje zdolność do wzmocnienia naczyń krwionośnych i zmniejszenia ich przepuszczalności. To działanie jest szczególnie korzystne w terapii obrzęków pochodzenia żylnego oraz innych zaburzeń mikrokrażenia. Dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym, fraksyna pomaga również w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym, co może przyczyniać się do ogólnej poprawy zdrowia układu sercowo-naczyniowego.

Eskulina i fraksyna, jako aktywne składniki kory kasztanowca, odgrywają kluczową rolę w jego działaniu terapeutycznym. Oba te związki wspierają leczenie zaburzeń krążenia, wzmacniając naczynia krwionośne i zmniejszając ich przepuszczalność, co jest niezwykle istotne w terapii przewlekłej niewydolności żylniej, obrzęków oraz hemoroidów. Dodatkowo, ich właściwości przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i antyoksydacyjne sprawiają, że są one cennymi składnikami nie tylko w medycynie, ale także w kosmetologii. W połączeniu z innymi aktywnymi związkami obecnymi w korze kasztanowca, takimi jak saponiny triterpenoidowe, eskulina i fraksyna tworzą silny kompleks substancji biologicznie czynnych, które wspierają zdrowie i dobre samopoczucie.

Izolacja eskuliny z *Hippocastani cortex*

1. Opis ćwiczenia:

Rozdrobnioną korę kasztanowca (10 g) umieścić w kolbie okrągłodennej o poj. 250 ml i dodać 100 ml metanolu. Kolbę ogrzewać pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Wyciąg przesączyć przez watę do kolby stożkowej o poj. 250 ml. Następnie powtórzyć ekstrakcję. Połączone wyciągi (~200 ml) odparować do sucha w wyparce próżniowej.

Suchą pozostałość rozpuścić w 25 ml wody destylowanej i przesączyć przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu. Po przesączeniu wyciągu, kolumnę przemyć 40 ml wody, a połączone przesączy przesłać do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml i odparować do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuścić na ciepło w 5 ml wody, przesłać do kolby stożkowej o pojemności 50 ml i pozostawić do krystalizacji w lodówce.

Wykrystalizowany osad odsączyć na lejku Büchnera i przemyć niewielką ilością metanolu. Osad pozostawić do osuszenia na 10 minut, a następnie zważyć. 0,2 g uzyskanego osadu rozpuścić w 10 ml metanolu. Na płytkę chromatograficzną nanieść rozpuszczony krystalizat w postaci dwóch, 4-centymetrowych pasm ($2 \times 0,04$ ml). Płytki rozwijać do wysokości 8 cm, dokładnie wysuszyć i oglądać w świetle UV. Pasma odpowiadające wzorcowej eskulinie zaznaczyć ołówkiem.

Pasma odpowiadające eskulinie zeszkrobać na lejek Schotta i eluować związek z żelu trzykrotnie 5 ml metanolu (za każdym razem). Metanol odparować do sucha w wyparce próżniowej. Tożsamość i czystość uzyskanego związku badać metodą HPLC-DAD.

Formowanie kolumny z tlenku glinu

Kolumnę szklaną 2×30 cm umieścić w kolbie ssawkowej. Po uszczelnieniu dolnej części kolumny małym zwitkiem waty, napęlić ją do około $\frac{1}{2}$ wysokości zawiesiną tlenku glinu w 50% metanolu. Następnie otworzyć kran i włączyć niewielkie podciśnienie aż do opadnięcia warstwy tlenku glinu do poziomu 7 – 10 cm jednocześnie nie dopuszczając do wysuszenia kolumny. Uformowaną kolumnę przemyć 50 ml wody destylowanej, stosując niewielkie podciśnienie. Po przemyciu kolumny, kran zamknąć i odłączyć próżnię.

2. Warunki oznaczenia:

Adsorbent:	żel krzemionkowy (10 × 10 cm)
Faza ruchoma:	octan etylu – kwas octowy – woda (15:5:4, v:v:v)
Nanoszenie:	2 × 0,04 ml krystalizatu
Wzorce:	roztwór eskuliny w metanolu (1 mg/ml)

Potwierdzenie tożsamości i czystości wyizolowanej eskuliny metodą HPLC-DAD

1. Warunki oznaczenia:

Aparat:	LC-20, Shimadzu, Detektor SPD-10, Shimadzu
Kolumna:	RP-18, 150 × 4,6 mm, 3.5 μm, Synergy Fusion Phenomenex
Faza ruchoma:	1% kwas octowy – metanol (70:30, v/v)
Szybkość przepływu:	1 ml/minutę
Długość fali:	280 nm
Wzorce:	roztwory eskuliny i fraksyny w metanolu (1 mg/ml)

Odparowaną do sucha frakcję wyizolowanej eskuliny oraz 10 mg pierwotnego krystalizatu rozpuścić w 10 ml mieszaniny 1% kwas octowy - metanol (1:1). Na kolumnę chromatograficzną nastrzyknąć roztwory wzorcowe oraz próbkę pierwotnego krystalizatu i wyizolowanej eskuliny. Tożsamość wyizolowanej eskuliny proszę porównywać z czasem retencji substancji wzorcowej (*Tab. 4*).

2. Omówienie wyników:

Tabela 4: Charakterystyka widma UV eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów.

Badany roztwór	Czas retencji R_t [minuty]	Uwagi
Eskulina		
Fraksyna		
Krystalizat		
Wyizolowana eskulina		

3. Wnioski:

Potwierdzenie tożsamości i czystości wyizolowanej eskuliny metodą HPLC-DAD-MS/MS

1. Warunki oznaczenia:

Aparat:	Dionex Ultimate 3000, detektor DAD, spektrometr mas typu pułapka jonowa (AmazonSL, Bruker)
Kolumna:	RP-18; 50 × 2,1 mm; 1,9 μm, HypersilGOLD
Faza ruchoma:	A – woda – acetonitryl – kwas mrówkowy (95:5:0,1; v/v/v) B – acetonitryl – kwas mrówkowy (99,9:0,1; v/v)
Gradient:	0-13 minut, 1% → 40% B
Szybkość przepływu:	0,2 ml/minutę
Detekcja:	280 nm, 230 nm
Analiza MS:	dodatnia i ujemna polaryzacja, detekcja neural loss 162 amu
Wzorce:	mieszanina eskuliny i fraksyny w metanolu (1 mg/ml)

Na kolumnę chromatograficzną proszę nastrzyknąć kolejno 2 μl surowego wyciągu, 2 μl mieszaniny wzorców oraz 2 μl wyizolowanej eskuliny. Tożsamość wyizolowanej eskuliny proszę porównać z czasem retencji, widmem UV-Vis oraz widmem masowym substancji wzorcowej (Tabl. 5 i 6).

2. Omówienie wyników:

Tabela 5: Charakterystyka widm UV eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów.

Badany roztwór	Czas retencji R _t [minuty]	Maxima UV [nm]
Eskulina		
Fraksyna		
Kryształizat		
Wyizolowana eskulina		

Tabela 6: Charakterystyka widm masowych eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów.

Badany roztwór	MS ⁺	MS ²⁺	MS ⁻	MS ²⁻
Eskulina				
Fraksyna				
Krystalizat				
Wyizolowana eskulina				

3. Wnioski:

Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr hab. Agnieszka Bazylko

Cel ćwiczenia:

- Zapoznanie się z wykorzystaniem metody densytometrycznej po rozdziale TLC do ilościowego oznaczania kwasu rozmarynowego w preparatach w składzie, których występują substancje roślinne pozyskane z roślin z rodziny Lamiaceae.

Substancje roślinne:

Melissae folium (FP XII)

Menthae piperitae folium (FP XII)

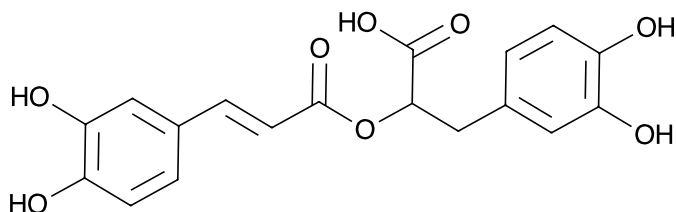
Rosmarini folium (FP XII)

Salviae officinalis folium (FP XII)

Thymi herba (FP XII)

1. Wstęp:

Kwas rozmarynowy (RA) (Ryc. 12) to związek, który można znaleźć w różnych roślinach. Pierwotnie wyizolowany i nazwany na cześć rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae), RA występuje również w wielu innych roślinach klasyfikowanych w podrodzinie Nepetoideae, rodzinie Lamiaceae, takich jak szalwia, mięta, tymianek, melisa lekarska, bazylia, oregano i inne. Obecność RA można znaleźć także w innych roślinach, przede wszystkim u przedstawicieli rodziny Boraginaceae, ale także w wielu innych (np. Apiaceae, Araliaceae, Cucurbitaceae, Rubiaceae, Plantaginaceae, Polygonaceae, oraz w niektórych rogatek, paprociach i trawach morskich). W świecie roślin kwas rozmarynowy występuje w formie wolnej, zestryfikowanej, glikozydowej oraz w formie połączeń o charakterze oligomerów. Kwas rozmarynowy chemicznie to ester kwasu kawowego i kwasu α -hydroksydihydrokawowego.



Rycina 12: Wzór strukturalny kwasu rozmarynowego.

Zawartość RA może być wykorzystana jako parametr do oszacowania jakości substancji roślinnej (np. liście melisy lekarskiej [*Melissa officinalis*, Lamiaceae] i liście rozmarynu wg FP XII powinny zawierać odpowiednio $\geq 4\%$ i $\geq 3\%$ całkowitej zawartości kwasów hydroksycynamonowych w przeliczeniu na RA).

Związek ten można stosować miejscowo, dopłucnie, donosowo i poprzez wlew dożylny. Jednak główną drogą podania jest podanie doustne. W badaniach *in vivo* wykazano, że po doustnym podaniu wchłania się około 1% zastosowanej dawki RA, a wchłanianie związku następuje za pośrednictwem enterocytów poprzez transport parakomórkowy.

Badanie *ex vivo* przeprowadzone na nieuszkodzonej skórze ludzkiej wykazało, że po podaniu zewnętrznym RA gromadzi się w naskórku, podczas gdy penetracja do hydrofilowej warstwy skóry właściwej może być znikoma.

RA jest dystrybuowany z albuminami osocza. Miejscowe zastosowanie RA u szczurów spowodowało dystrybucję do krwi, skóry, kości i mięśni; po podaniu dożylnym związek wykryto również w tkankach miękkich narządów wewnętrznych, takich jak śledziona, wątroba, płuca i serce. Podobnie, po podaniu dootrzewnowym u myszy, największą ilość RA znaleziono w nerkach, a następnie w płucach, śledzionie i wątrobie. Interesującym aspektem dystrybucji RA jest stężenie osiągnięte w mózgu. Bariera krew-mózg skutecznie zapobiega penetracji RA do ośrodkowego układu nerwowego. Sugerowane jest natomiast, że ukierunkowane podanie (donosowe) z wykorzystaniem określonej formułacji może skutkować przejściem przez barierę krew-mózg i osiągnięciem wyższych stężeń w mózgu, ale także zmniejszeniem ilości RA, która jest dystrybuowana w celu metabolizowania.

Wysoko kwaśne środowisko żołądka może prowadzić do $\geq 50\%$ redukcji stężenia RA. Obecność mikroorganizmów powoduje degradację RA do prostszych związków fenolowych, które zostają wchłonięte w przewodzie pokarmowym. Wewnątrz organizmu cząsteczka kwasu rozmarynowego ulega zmianom strukturalnym, a także reakcjom koniugacji. Można wykryć różne metabolity RA, zwykle szybko po jego zastosowaniu (0,5–2 h). Metabolity są najprawdopodobniej wynikiem reakcji enzymatycznych zarówno enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy, jak i enzymów wątrobowych oraz jelitowych. Wydalanie przez nerki stanowi główną ścieżkę jego eliminacji.

Przeprowadzono liczne badania *in vitro* w celu wykazania korzystnego działania RA. Niektóre z potwierdzonych aktywności obejmują działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym), przeciwwirusowe, ściągające, przeciwbólowe, przeciwzapalne (poprzez hamowanie lipooksygenazy, cyklooksygenazy, hamowanie wydzielania mediatorów prozapalnych oraz układu dopełniacza),

przeciwhiperglikemiczne (poprzez hamowanie aktywności amylazy trzustkowej i glukozydaz oraz uwrażliwianie transporterów glukozy), hepatoprotekcyjne (poprzez hamowanie włóknienia, i wymiatanie reaktywnych form tlenu), immunomodulujące (poprzez stymulację komórek układu odpornościowego), przeciwnowotworowe (przeciwko różnym typom raka, w tym raka jelita grubego, trzustki, piersi, płuc, jajników, czerniaka i kilku innych), kardioprotekcyjne, a także neuroprotektoryjne. Oprócz badań *in vitro*, badania kliniczne wskazują korzyści z zastosowania RA w zaburzeniach dermatologicznych, alergicznych i zwyrodnieniowych stawów, a także w poprawie sprawności poznawczej i leczeniu zespołu metabolicznego.

Badania potwierdzające skuteczność i korzyści zdrowotne wyciągów zawierających RA wykazały także brak poważnych działań niepożądanych po podaniu doustnym. Natomiast badanie, w którym testowano 2-miesięczne stosowanie kremu zawierającego RA, nie wykazało żadnych miejscowych działań niepożądanych na skórę dotkniętą atopowym zapaleniem skóry.

Chromatografia cienkowarstwowa należy do jednych z najczęściej wykorzystywanych metod w badaniach jakościowych substancji i przetworów roślinnych, a także wyciągów z nich otrzymanych. W badaniach tożsamościowych według Farmakopei Polski XII jest podstawową metodą chromatograficzną. Jest także stosowana do analizy jakościowej nieznanego materiału, screeningu procesu izolacji związków z materiału roślinnego, a także do tworzenia profili chromatograficznych (fingerprint'ów). Profile chromatograficzne mogą być wykorzystywane do identyfikacji substancji roślinnej, pokazania różnic między gatunkami, odmianami czy materiałem zebrany z różnych miejsc, ale także do porównania próbek handlowych w celu wykrycia zafałszowań czy zanieczyszczeń.

Nowoczesna chromatografia cienkowarstwowa to szeroka dostępność gotowych płytek z różnorodnymi adsorbentami stosowanymi jako fazy stacjonarne, coraz większy stopień automatyzacji procesu chromatografowania (aplikatory, komory do automatycznego rozwijania, aparaty do wywoływania chromatogramów), a także wykorzystanie programów komputerowych do nadzorowania procesu chromatografowania.

Coraz częściej tradycyjną chromatografię cienkowarstwową (TLC – *thin layer chromatography*) zastępuje wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC – *high performance thin-layer chromatography*). Różnica pomiędzy tymi dwiema metodami to rodzaj zastosowanej płytki chromatograficznej, a dokładniej zastosowanie płytek o innej średnicy ziaren adsorbentu. W chromatografii cienkowarstwowej stosowane są płytki z adsorbentem o średnicy ziarna od 10 do 100 mikrometrów, natomiast w HPTLC średnica ziaren adsorbentu

na płytce to 3 do 7 mikrometrów. Zastosowanie absorbentu o mniejszej średnicy ziarna zwiększa specyficzność, powtarzalność i dokładność metody.

W połączeniu z densytometrią chromatografię cienkowarstwową można wykorzystać również do oznaczeń ilościowych. Densytometry dokonują pomiaru światła odbitego lub światła, które przechodzi przez materiał płytki chromatograficznej, przekształcając widoczne na płytce plamy/pasma na piki, których pole powierzchni można wykorzystać do obliczenia zawartości substancji chemicznych.

Oznaczanie zawartości kwasu rozmarynowego w preparatach metodą densytometryczną po rozdziale TLC

1. Opis ćwiczenia:

Do kolby stożkowej ze szlifem o pojemności 100 ml odważyć dokładnie około 1,5 g preparatu i zalać 15 ml 60% metanolu. Zawartość kolby umieścić na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej. Następnie otrzymany wyciąg przesączyć przez watę do kolby miarowej o pojemności 25 ml. Proces powtórzyć, całość uzupełnić metanolem do kreski. Do kolby stożkowej o pojemności 25 ml przesączyć przez sączek około 2 ml otrzymanego uprzednio wyciągu.

2. Przygotowanie roztworu substancji wzorcowej do krzywej wzorcowej:

Odważyć dokładnie 1 mg kwasu rozmarynowego i rozpuścić w 1 ml metanolu (cz.d.a.). Pobrać odpowiednio 20 μ l, 100 μ l i 180 μ l roztworu, co odpowiada 20 μ g, 100 μ g i 180 μ g kwasu rozmarynowego. Uzupełnić do 1 ml metanolem.

3. Warunki oznaczenia:

Faza stacjonarna:	żel krzemionkowy
Faza ruchoma:	toluen – mrówczan etylu – kwas mrówkowy (7:4:1, v/v/v)
Komora chromatograficzna:	pionowa (każda płytka rozwijana w oddzielnej komorze)
Droga rozwijania:	9 cm

Na płytkę chromatograficzną nanieść, za pomocą aplikatora Linomat 5 (CAMAG), po 5 μ l:

- każdego z rozcieńczeń do krzywej wzorcowej (po 1 powtórzeniu)
- badaną próbkę (po 4 powtórzenia).

Prędkość nanoszenia próbek należy określić jako 50 nl/s. Chromatogram rozwinać, a następnie suszyć do zaniku zapachu kwasu (około 30 minut) pod wyciągiem, w temperaturze pokojowej. Odczytu absorbancji należy dokonać przy użyciu densytometru CAMAG TLC Scanner 4, przy długości fali 330 nm.

Składy badanych preparatów (proszę zaznaczyć badany preparat):

☐ **Flatuvit**

<i>Menthae pip. folium</i>	35,0 g
<i>Carvi fructus</i>	20,0 g
<i>Chamomillae anthodium</i>	20,0 g
<i>Thymi herba</i>	15,0 g
<i>Foeniculi fructus</i>	10,0 g

☐ **Nervosan**

<i>Valerianae radix</i>	40%
<i>Millefolii herba</i>	20%
<i>Menthae pip. folium</i>	15%
<i>Melissae folium</i>	15%
<i>Chamomillae anthodium</i>	10%

☐ **Septosan**

1 saszetka 2 g zawiera:

<i>Thymi herba</i>	1,0 g
<i>Salviae folium</i>	0,5 g
<i>Menthae pip. folium</i>	0,5 g

☐ **Ziola do płukania gardła**

<i>Quercus cortex</i>	25%
<i>Chamomillae anthodium</i>	25%
<i>Millefolii herba</i>	20%
<i>Salviae folium</i>	15%
<i>Thymi herba</i>	15%

☐ **Ziola przeciwkaszlowe**

<i>Althaeae radix</i>	30%
<i>Plantaginis lanceolatae folium</i>	25%
<i>Malvae folium</i>	20%
<i>Foeniculi fructus</i>	15%
<i>Thymi herba</i>	10%

4. Obserwacje i obliczenia:

5. Wyniki i wnioski:

Zawartość kwasu rozmarynowego w badanym preparacie wynosi

Notatki:

Opracowanie rozdziału: dr Małgorzata Koltun-Jasion

Cel ćwiczenia:

- Izolacja kofeiny z liści herbaty (*Theae folium*).
- Ocena tożsamości i jednorodności wyizolowanego związku metodą chromatografii cinkowarstwowej (TLC).
- Oznaczanie temperatury topnienia wyizolowanego związku.

Substancje roślinne:

Coffeae semen

Colae semen (FP XII)

Guaranae semen (FP XII)

Mate folium (FP XII)

Theae folium (*Camelliae sinensis non fermentata folia* (FP XII))

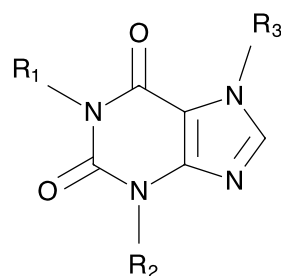
1. Wstęp:

Kofeina (3,7-dihydro-1,3,7-trimetylo-1H-puryno-2,6-dion; 1,3,7-trimetyloksantyna), obok teofiliny i teobrominy należy do alkaloidów purynowych, zaliczanych do grupy pochodnych histydyny (Ryc. 13). W stanie czystym występuje w postaci białych, delikatnych, igiełkowatych kryształów o jedwabistym połysku i gorzkim smaku. Pomimo obecności czterech atomów azotu w cząsteczce, kofeina ma charakter słabej zasady. W celu poprawy efektywności ekstrakcji kofeiny z roztworów wodnych lub innych matryc, a także jej stabilności jednym z etapów analizy jest alkalizacja roztworu. Kofeina słabo rozpuszcza się w zimnej wodzie (1 część kofeiny rozpuszcza się w 80 częściach wody w 15°C), bardzo dobrze w wodzie gorącej a także rozpuszczalnikach organicznych np. etanolu, chloroformie i benzenie. Temperatura topnienia bezwodnej kofeiny wynosi 234-237°C.

Najpopularniejszym źródłem kofeiny są nasiona kawy arabskiej (*Coffea arabica* L.) oraz kawy liberyjskiej (*Coffea liberica*), w których zawartość kofeiny szacowana jest na 0,3–2,5%, a także liście herbaty (*Theae folium*; *Camelia sinensis* L.), w których zawartość kofeiny sięga do 4,5%. Dobrym źródłem kofeiny są także zarodki kola (*Colae semen*) zawierające do 2,5% kofeiny, nasiona guarany (*Guaranae semen*; do 5%) oraz liście

ostrokrzewu paragwajskiego (*Mate folium*) zawierające do 2% tego związku. Kofeina może być izolowana z surowców naturalnych oraz pozyskiwana na drodze syntezy.

Po podaniu doustnym kofeina jest szybko i całkowicie (tj. 99%) wchłaniana z przewodu pokarmowego, głównie z jelita cienkiego. Kofeina, w przeciwieństwie do jej metabolitów ksantynowych łatwo przenika do płynów ustrojowych (śliny, mleka, żółci), a także z uwagi na hydrofobowy charakter cząsteczki przekracza barierę krew-mózg i barierę łożyskową.



R ₁	R ₂	R ₃	Związek	Masa molowa (g/mol)
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	Kofeina	194,2
-H	-CH ₃	-CH ₃	Teobromina	180,2
-CH ₃	-CH ₃	-H	Teofilina	180,2

Rycina 13: Wzory strukturalne alkaloidów purynowych.

Kofeina jest naturalnie występującym psychostymulantem działającym jako antagonist receptorów adenozytowych (A1, A2A, A2B, A3), co w głównej mierze odpowiada za jej działanie pobudzające ośrodkowy układ nerwowy (analeptyk), stymulując aktywność ośrodków rdzeniowych, naczynioruchowych i oddechowych. Ponadto kofeina promuje wydzielanie neuroprzekaźników takich jak: dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina i acetylocholina, co skutkuje zniesieniem objawów zmęczenia, zwiększeniem wydolności fizycznej organizmu oraz poprawą funkcji kognitywnych. Działanie rozkurczające na mięśnie gładkie, takie jak mięśnie oskrzeli i naczyń krwionośnych kofeiny wynika z jej nieselektywnego, kompetycyjnego hamowania fosfodiesterazy (PDE) i wzrostu poziomu cAMP. Ponadto, kofeina pobudza wydzielanie soku żołądkowego oraz wykazuje działanie moczopędne.

Kofeina występuje jako składnik monopreparatów, surowców farmaceutycznych (*Coffeinum*, *Coffeinum Natrium benzoicum*), a także preparatów złożonych, dostępnych

zarówno bez recepty lekarskiej (kategoria dostępności OTC), jak również w lekach wydawanych z przepisu lekarza. Kofeina wchodzi w skład preparatów złożonych, nasilając przeciwbólowe działanie innych leków np. paracetamolu (np. *Effergal codeine*, *Apap forte*; *Panadol Extra*, *Solpadeine*, *Cefalgin*), kwasu acetylosalicylowego (np. *Etopiryna*), propyfenazonu (np. *Saridon*), metanozolu sodowego (np. *Vemonis Femi*), a także niektórych preparatów zawierających pochodne ergotaminy, stosowanych w przebiegu napadów migrenowych oraz łagodzeniu bólu pochodzenia naczyniowego (np. *Coffecorn mite*; *Coffecorn forte*). Ponadto kofeina wchodzi w skład licznych suplementów diety i wyrobów medycznych stosowanych jako preparaty wspomagające utratę wagi oraz wspierających organizm w stanach zmęczenia i znużenia. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dzienne spożycie kofeiny nie powinno przekraczać 400-450 mg/dzień u osoby dorosłej, natomiast u dzieci – nie więcej niż 2,5 mg na kilogram masy ciała. Dawka śmiertelna kofeiny wynosi natomiast 10–12 g.

Izolacja kofeiny z liści herbaty (*Theae folium*) – potwierdzenie tożsamości izolowanego związku

1. Opis ćwiczenia:

Odważkę herbaty liściastej (10 g) umieścić w zlewce o poj. 250 ml, dodać 5 g węgla wapnia (alkalizacja) oraz 100 ml wrzącej wody. Zlewkę przykryć szkiełkiem zegarkowym i ogrzewać na płycie grzejnej przez 30 minut od chwili zawrzenia, utrzymując w łagodnym wrzeniu. Ekstrakcję surowca powtórzyć stosując analogiczne warunki przez 10 minut. Wyciąg wodny przesączyć przez watę, ochłodzić pod bieżącą wodą, przenieść do rozdzielacza o poj. 250 ml i ekstrahować kofeinę dichlorometanem. Ekstrakcję prowadzić trzykrotnie używając za każdym razem 50 ml rozpuszczalnika (**uwaga:** wytrząsać łagodnie, gdyż może powstać emulsja). Zebrane warstwy dichlorometanowe przesączyć przez watę, a następnie odparować do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczać metanolem (2×5 ml metanolu), przenieść do kolby stożkowej o pojemności 25 ml i wstawić do lodówki na 15–30 minut, aż do wykrystalizowania kofeiny. Krystaliczną kofeinę odsączyć na lejku Büchnera i przemyć zimnym metanolem (do zaniku niebieskiej barwy). Odsączoną kofeinę należy wysuszyć, a następnie zważyć.

Tożsamość i czystość związku należy ocenić metodą TLC oraz oznaczając jego temperaturę topnienia. Wartości R_f i temperatury topnienia należy porównać z wzorcową kofeiną (Tab. 7).

Ocena tożsamości i jednorodności związku metodą TLC

Adsorbent:	żel krzemionkowy F ₂₅₄
Faza ruchoma:	aceton – chloroform – n-butanol – 25% amoniak (3:3:4:1, v/v/v/v)
Wzorce:	kofeina w mieszaninie metanol:aceton (1:1) (1 mg/ml) teofilina w mieszaninie metanol:aceton (1:1) (1 mg/ml) teobromina w 10% HCl (1 mg/ml)
Nanoszenie:	5 µl wyizolowanego związku 10 µl przesącza po odsączonym osadzie po 5 µl roztworów wzorców
Rozwijanie:	droga rozwijania 8 cm
Detekcja:	chromatogram dokładnie wysuszyć, obejrzeć w świetle UV ₂₅₄ .

2. Obserwacje (z uwzględnieniem kopii chromatogramu):

3. Wyniki i wnioski:

Oznaczanie temperatury topnienia wyizolowanego związku

1. Wyniki:

Tabela 7: Charakterystyka wyizolowanej kofeiny

Badana substancja	Współczynnik R_f [mm]	Temperatura topnienia [°C]	Masa uzyskanej substancji [g]	Wydajność izolacji [%]
Wyizolowana kofeina				
Wzorzec kofeiny			-	-

2. Wnioski:

Notatki:

OCENA SKŁADU PREPARATÓW ZAWIERAJĄCYCH WYCIĄGI Z *ECHINACEA* SP.

Opracowanie rozdziału: dr Weronika Skowrońska

Cel ćwiczenia:

- Badanie jakościowe i ilościowe preparatów zawierających wyciągi z *Echinacea* sp. metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz chromatografii cieczowej (HPLC-MS) (FP IX).

Substancje roślinne:

Echinaceae angustifoliae radix (FP XII)

Echinaceae pallidae radix (FP XII)

Echinaceae purpureae herba (FP XII)

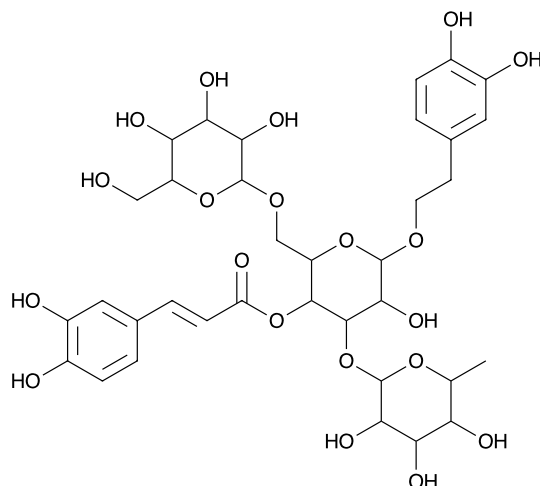
Echinaceae purpureae radix (FP XII)

1. Wstęp:

Jeżówka (*Echinacea*) to rodzaj roślin z rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Farmakopealnymi substancjami roślinnymi są: korzeń jeżówki wąskolistnej (*Echinaceae angustifoliae radix*), korzeń jeżówki bladej (*Echinaceae pallidae radix*), ziele jeżówki purpurowej (*Echinaceae purpureae herba*), a także korzeń jeżówki purpurowej (*Echinaceae purpureae radix*).

Według Europejskiej Agencji Leków korzeń jeżówki bladej i korzeń jeżówki wąskolistnej to tradycyjne produkty lecznicze roślinne wykorzystywane w leczeniu objawów przeziębienia. Natomiast korzeń i ziele jeżówki purpurowej jako tradycyjnie były stosowane w leczeniu niewielkich ran powierzchniowych, jednak posiadają one również dobrze udokumentowane zastosowanie (*well-established use*) w krótkotrwałym zapobieganiu i leczeniu przeziębienia. W wielu badaniach wykazano immunomodulującą aktywność tych substancji roślinnych zarówno na modelach komórkowych, jak i w badaniach prowadzonych na zwierzętach i na ludziach. Ponadto wykazano ich aktywność przeciwwirusową, m.in. hamowanie namnażania wirusów grypy i opryszczki, a także działanie przeciwbakteryjne. Na rynku dostępne są preparaty zawierające wszystkie farmakopealne substancje roślinne z rodzaju *Echinacea*. Dominują produkty zawierające ziele jeżówki purpurowej, np. tabletki „Echinerba” (Labofarm) lub „Succus Echinaceae” (Phytopharm), wskazane do stosowania jako wspomagające odporność. Najczęściej są wskazane

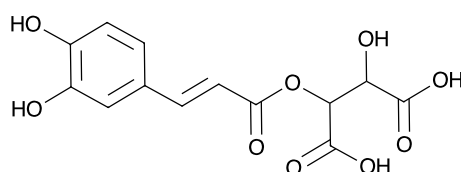
do stosowania w leczeniu infekcji górnych dróg oddechowych. Ponadto, mogą występować w preparatach stosowanych zewnętrznie, w leczeniu ran, stanów zapalnych skóry czy wrzodów. Ze względu na działanie immunomodulujące substancji roślinnych nie powinny być one stosowane u osób cierpiących na choroby autoimmunologiczne, AIDS czy gruźlicę.



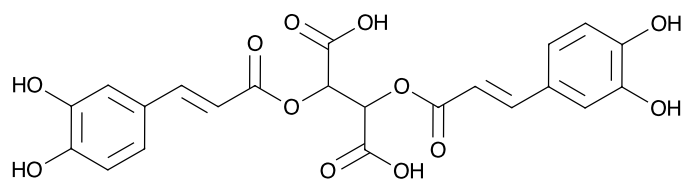
Rycina 14: Wzór strukturalny echinakozydu.

Główną grupą związków chemicznych w wymienionych substancjach roślinnych są kwasy fenolowe – pochodne kwasu kawowego. Korzeń jeżówki wąskolistnej i korzeń jeżówki białej charakteryzują się obecnością echinakozydu (Ryc. 14), związku z grupy fenylopropanoidów (znanych również pod nazwą fenyloetanoidów) o silnym działaniu przeciwzapalnym. Według FP XII *Echinaceae angustifoliae radix* powinien zawierać nie mniej niż 0,5%, a *Echinaceae pallidae radix* nie mniej niż 0,2% echinakozydu. Ponadto, w tych substancjach roślinnych występuje kwas kawowy, kwas kaftarowy, kwas chlorogenowy, cynaryna i kwas cykoriowy.

Natomiast w ziele i korzeniu jeżówki purpurowej echinakozyd nie występuje, lub występują jego śladowe ilości. W tych substancjach roślinnych w badaniu zawartości oznaczamy sumę kwasów kaftarowego (Ryc. 15) i cykoriowego (Ryc. 16), która powinna wynosić nie mniej niż 0,1% dla *Echinaceae purpureae herba* i 0,5% dla *Echinaceae purpureae radix*.



Rycina 15: Wzór strukturalny kwasu kaftarowego.



Rycina 16: Wzór strukturalny kwasu cykoriowego.

Badanie zawartości odpowiednich związków w substancjach roślinnych z rodzaju *Echinacea* prowadzimy z wykorzystaniem chromatografii cieczowej.

Badania jakościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z *Echinacea* sp. według FP IX metodą TLC

Proszę zaznaczyć badany preparat:

- ☐ Preparat: *Echinacea* (suplement diety) 1 kapsułka
- ☐ Surowiec roślinny: korzeń jeżówki purpurowej 1 g sproszkowanego korzenia

*lub inny preparat handlowy zawierający korzeń jeżówki purpurowej

1A. Potwierdzenie tożsamości metodą TLC:

Przygotowanie wyciągu: odpowiednią ilość badanego preparatu/substancji roślinnej przenieść do szklanej probówki. Dodać 5 ml chlorku metylenu i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut. Wyciąg po ekstrakcji przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej.

Warunki oznaczenia:

- Faza stacjonarna: żel krzemionkowy (płytki 10 × 5 cm)
- Faza ruchoma: bezwodny kwas mrówkowy – cykloheksan – octan etylu – toluen (0,9:3:6:24, v/v/v/v)
- Wzorzec: roztwór β -sitosterolu
- Nanoszenie: 30 μ l wyciągu badanego wyciągu
5 μ l roztworu wzorcowego β -sitosterolu
- Suszenie: 10 minut w strumieniu zimnego powietrza
- Detekcja: płytkę spryskać roztworem aldehydu anyżowego i ogrzewać 3 minuty w temp 100°C. Chromatogramy obejrzyć w świetle widzialnym.
- Wyniki: tożsamość potwierdzić porównując chromatogramy z monografią farmakopealną (FP IX) *Echinaceae purpureae radix*.

Badania jakościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z *Echinacea* sp. według FP IX metodą TLC

Proszę zaznaczyć badany preparat:

- | | |
|---|----------------------------|
| ☐ Preparat: <i>Succus Echinaceae</i> | 10 µl preparatu |
| ☐ Preparat: <i>Echinerba</i> | 1 tabletka |
| ☐ Preparat: <i>Echinacea ratiopharm MAX</i> | 1 tabletka |
| ☐ Preparat: <i>Echinacea (Activlab Pharma)</i> | 2 kapsułki (odważyć 0,5 g) |
| ☐ Preparat: <i>Herbatka ziołowa jeżówka ziele (Herbapol)</i> | 1 g sproszkowanego ziela |
| ☐ Surowiec roślinny: ziele jeżówki purpurowej | 1 g sproszkowanego ziela |

*lub inny preparat handlowy zawierający ziele jeżówki purpurowej

1B. Potwierdzenie tożsamości metodą TLC:

Przygotowanie wyciągu: odpowiednią ilość badanego preparatu/substancji roślinnej (tabletki – po uprzedniej mikronizacji w moździerzu) przenieść do plastikowej probówki na 12 ml. Dodać 5 ml metanolu i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut. Wyciąg po ekstrakcji przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej.

UWAGA: preparat *Succus Echinaceae* nanosimy bezpośrednio na żel krzemionkowy.

Warunki oznaczenia:

- | | |
|-------------------|--|
| Faza stacjonarna: | żel krzemionkowy (płytki 10 × 5 cm) |
| Faza ruchoma: | bezwodny kwas mrówkowy – woda – metyloetyloketon – octan etylu (3:3:9:15, v/v/v/v) |
| Wzorzec: | roztwór kwasu chlorogenowego |
| Nanoszenie: | 30 µl wyciągu badanego wyciągu
5 µl roztworu wzorcowego kwasu chlorogenowego |
| Suszenie: | 10 minut w strumieniu zimnego powietrza, następnie 2 minuty w temp. 100°C |
| Detekcja: | ciepłą płytkę spryskać 1% roztworem estru aminoetylowego kwasu difenyloborowego w metanolu. Chromatogramy obejrzeć w świetle UV ₃₆₆ . |
| Wyniki: | tożsamość potwierdzić porównując chromatogramy z monografią farmakopealną (FP IX) <i>Echinaceae purpureae herba</i> . |

2. Obserwacje:

3. Wnioski (potwierdzenie tożsamości):

Badania ilościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z *Echinacea* sp. według FP IX metodą HPLC-MS

Proszę zaznaczyć badany preparat:

- ☐ Preparat: *Echinacea* (suplement diety) 2 kapsułki (odważyć 0,5 g)
☐ Surowiec roślinny: korzeń jeżówki purpurowej 0,5 g sproszkowanego korzenia

*lub inny preparat handlowy zawierający korzeń jeżówki purpurowej

1A. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: odważyć dokładnie 0,5 g badanego preparatu/surowca roślinnego i przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 100 ml. Dodać 80 ml 70% etanolu i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez 15 minut. Po ekstrakcji uzupełnić 70% etanolem do 100 ml i wymieszać. Przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej, pobrać 0,5 ml przesączu do fiolki, dodać 0,5 ml 0,1% kwasu mrówkowego i umieścić w autosamplerze.

Warunki oznaczenia:

Aparat:	LC-20, Shimadzu, Detektor SPD-10, Shimadzu
Kolumna:	Luna C-18, 25 × 4,6 mm, 5 μm
Temperatura:	35°C
Faza ruchoma:	A: kwas mrówkowy, woda (1:999, v/v) B: acetonitryl
Szybkość przepływu:	1,5 ml/minutę
Detekcja:	330 nm
Objętość nastrzyku:	10 μl
Gradient:	0 minut, 10% B 0-13 minut, 10 → 22% B 13-14 minut, 22 → 40% B 14-20 minut, 40% B

Przygotowanie roztworu porównawczego kwasu chlorogenowego: do kolby miarowej przenieść ilościowo 10 mg kwasu chlorogenowego i rozpuścić w 70% roztworze etanolu. Poddawać działaniu ultradźwięków przez 15 minut. Uzupełnić 70% etanolem do 10 ml. Przenieść 4 ml przygotowanego roztworu do kolby miarowej i uzupełnić 70% etanolem do 100 ml.

Badania ilościowe preparatów roślinnych zawierających wyciągi z *Echinacea* sp. według FP IX metodą HPLC-MS

Proszę zaznaczyć badany preparat:

- | | |
|---|----------------------------|
| ☐ Preparat: <i>Succus Echinaceae</i> | 5 ml |
| ☐ Preparat: <i>Echinerba</i> | 1 tabletka |
| ☐ Preparat: <i>Echinacea ratiopharm MAX</i> | 1 tabletka |
| ☐ Preparat: <i>Echinacea (Activlab Pharma)</i> | 2 kapsułki (odważyć 0,5 g) |
| ☐ Preparat: <i>Herbatka ziołowa jeżówka ziele (Herbapol)</i> | 0,5 g sproszkowanego ziela |
| ☐ Surowiec roślinny: ziele jeżówki purpurowej | 0,5 g sproszkowanego ziela |

*lub inny preparat handlowy zawierający ziele jeżówki purpurowej

1B. Opis ćwiczenia:

Przygotowanie wyciągu: odpowiednią ilość badanego preparatu/surowca roślinnego (tabletki po uprzedniej mikronizacji w młynku) przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 100 ml. Dodać 80 ml 70% etanolu i ekstrahować w łaźni ultradźwiękowej przez 15 minut. Po ekstrakcji uzupełnić 70% etanolem do 100 ml i wymieszać. Przesączyć przez sączek bibułowy do kolby stożkowej, pobrać 0,5 ml przesączu do fiolki, dodać 0,5 ml 0,1% kwasu mrówkowego i umieścić w autosamplerze.

UWAGA: W przypadku *Succus Echinaceae* odpowiednią ilość preparatu przenieść do kolby miarowej o poj. 100 ml i uzupełnić 70% etanolem do kreski. Przenieść 0,5 ml do fiolki, dodać 0,5 ml 0,1% kwasu mrówkowego i umieścić w autosamplerze.

Warunki oznaczenia:

Aparat:	LC-20, Shimadzu, Detektor SPD-10, Shimadzu	
Kolumna:	Luna C-18, 25 × 4,6 mm, 5 μm	
Temperatura:	35°C	
Faza ruchoma:	A: kwas mrówkowy, woda (1:999, v/v) B: acetonitryl	
Szybkość przepływu:	1,5 ml/minutę	
Detekcja:	330 nm	
Objętość nstrzyku:	10 μl	
Gradient:	0 minut, 10% B	13-14 minut, 22 → 40% B
	0-13 minut, 10 → 22% B	14-21 minut, 40% B

Przygotowanie roztworu porównawczego kwasu chlorogenowego: do kolby miarowej przenieść ilościowo 10 mg kwasu chlorogenowego i rozpuścić w 70% roztworze etanolu. Poddawać działaniu ultradźwięków przez 15 minut. Uzupełnić 70% etanolem do 10 ml. Przenieść 4 ml przygotowanego roztworu do kolby miarowej i uzupełnić 70% etanolem do 100 ml.

Chromatogramy należy porównać z monografią farmakopealną (FP IX) *Echinaceae purpureae radix* lub *Echinaceae purpureae herba* (w zależności od składu badanego preparatu), a następnie wyznaczyć powierzchnię pików i obliczyć zawartość kwasu kaftarowego i kwasu cykoriowego zgodnie z poniższymi wzorami.

2. Obliczenia:

a) Procentowa zawartość kwasu kaftarowego:

$$X = \frac{A_1 \times C_2 \times 100 \times 0,881}{A_2 \times C_1} [\%]$$

b) Procentowa zawartość kwasu cykoriowego:

$$X = \frac{A_3 \times C_2 \times 100 \times 0,695}{A_2 \times C_1} [\%]$$

A_1 – pole powierzchni pików kwasu kaftarowego na chromatogramie roztworu badanego

A_2 – pole powierzchni pików kwasu chlorogenowego na chromatogramie roztworu porównawczego

A_3 – pole powierzchni pików kwasu cykoriowego na chromatogramie roztworu badanego

C_1 – stężenie roztworu badanego, w mg/ml

C_2 – stężenie kwasu chlorogenowego w roztworze porównawczym, w mg/ml

0,695 – współczynnik korelacji pików wyznaczony na podstawie zaobserwowanej odpowiedzi układu chromatograficznego

0,881 – współczynnik korelacji pików pomiędzy kwasem kaftarowym i kwasem chlorogenowym

3. Wnioski:

Zawartość kwasu kaftarowego w badanym preparacie wynosi

Zawartość kwasu cykoriowego w badanym preparacie wynosi

Notatki:

Tabela 8: Systematyka roślinnych substancji leczniczych oraz źródeł ich pochodzenia.

Substancja roślinna		Gatunek		Rodzina	
łacińska	polska	łacińska	polska	łacińska	polska
<i>Absinthii herba</i>	ziele piołunu	<i>Artemisia absinthium</i>	bylica piołun	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Aloë</i>	alona	<i>Aloe vera</i> <i>Aloe ferox</i>	aloes zwyczajny (barbadoski) aloes uzbrojony	<i>Asphodelaceae</i>	złotogłowowate
<i>Althaeae folium</i>	liść prawoślazu	<i>Althaea officinalis</i>	prawoślaz lekarski	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Althaeae radix</i>	korzeń prawoślazu	<i>Althaea officinalis</i>	prawoślaz lekarski	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Anisi fructus</i>	owoc anyżu	<i>Pimpinella anisum</i>	biedrzeniec anyż	<i>Apiaceae</i>	selerowate
<i>Auranti amari epicarpium et mesocarpium</i>	owocnia pomarańczy gorzkiej	<i>Citrus × aurantium</i>	pomarańcza gorzka	<i>Rutaceae</i>	rutowate
<i>Belladonnae folium</i>	liść pokrzyku	<i>Atropa belladonna</i>	pokrzyk wilcza jagoda	<i>Solanaceae</i>	psiankowate
<i>Betulae folium</i>	liść brzozy	<i>Betula pendula</i> (syn. <i>Betula verrucosa</i>) <i>Betula pubescens</i>	brzoza brodawkowata (syn. brzoza zwisła) brzoza omszona	<i>Betulaceae</i>	brzozowate
<i>Boldi folium</i>	liść boldo	<i>Peumus boldus</i>	boldoa aromatyczna	<i>Monimiaceae</i>	poleńcowate
<i>Capsici fructus</i>	owoc pieprzowca	<i>Capsicum annum</i>	papryka roczna	<i>Solanaceae</i>	psiankowate
<i>Carvi fructus</i>	owoc kminku	<i>Carum carvi</i>	kminek pospolity	<i>Apiaceae</i>	selerowate
<i>Caryophylli flos</i>	kwiat goździkowca	<i>Syzygium aromaticum</i>	goździkowiec wonny	<i>Myrtaceae</i>	mirtowate
<i>Centaurii herba</i>	ziele tysiącznika	<i>Centaurium erythraea</i>	centuria pospolita	<i>Gentianaceae</i>	goryczkowate
<i>Chelidonii herba</i>	ziele glistnika	<i>Chelidonium majus</i>	glistnik jaskółcze ziele	<i>Papaveraceae</i>	makowate
<i>Cinchonae cortex</i>	kora chinowca	<i>Cinchona succirubra</i>	chinowiec soczystoczerwony	<i>Rubiaceae</i>	marzanowate
<i>Coffeae semen</i>	nasienie kawy	<i>Coffea arabica</i> <i>Coffea librica</i>	kawa arabska kawa liberyjska	<i>Rubiaceae</i>	marzanowate
<i>Colae semen (embryo)</i>	zarodek kola	<i>Cola nitida</i>	kola błyszcząca	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Coriandri fructus</i>	owoc kolendry	<i>Coriandrum sativum</i>	kolendra siewna	<i>Apiaceae</i>	selerowate

Substancja roślinna		Gatunek		Rodzina	
łacińska	polska	łacińska	polska	łacińska	polska
<i>Crataegi folium cum flore</i>	kwiatostan głogu	<i>Crataegus monogyna</i> <i>Crataegus laevigata</i>	głóg jednoszyjkowy głóg dwuszyjkowy	<i>Rosaceae</i>	różowate
<i>Crataegi fructus</i>	owoc głogu	<i>Crataegus monogyna</i> <i>Crataegus laevigata</i>	głóg jednoszyjkowy głóg dwuszyjkowy	<i>Rosaceae</i>	różowate
<i>Echinaceae angustifoliae radix</i>	korzeń jeżówki wąskolistnej	<i>Echinacea angustifolia</i>	jeżówka wąskolistna	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Echinaceae pallidae radix</i>	korzeń jeżówki bladej	<i>Echinacea pallida</i>	jeżówka blada	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Echinaceae purpureae radix</i>	korzeń jeżówki purpurowej	<i>Echinacea purpurea</i>	jeżówka purpurowa	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Echinaceae purpureae herba</i>	ziele jeżówki purpurowej	<i>Echinacea purpurea</i>	jeżówka purpurowa	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Ephedrae herba</i>	ziele prześli	<i>Ephedra sinica</i>	prześl chińska	<i>Ephedraceae</i>	prześlownate
<i>Equiseti herba</i>	ziele skrzypu	<i>Equisetum arvense</i>	skrzyp polny	<i>Equisetaceae</i>	skrzypowate
<i>Eucalypti folium</i>	liść eukaliptusa	<i>Eucalyptus globulus</i>	eukaliptus gałkowy	<i>Myrtaceae</i>	mirtowate
<i>Euphrasiae herba</i>	ziele świetlika	<i>Euphrasia stricta</i> <i>Euphrasia rostkoviana</i> <i>Euphrasia officinalis</i>	świetlik wyprężony świetlik łąkowy świetlik lekarski	<i>Orobanchaceae</i>	zarazowate
<i>Filipendulae ulmariae flos</i>	kwiat wiązówki błotnej	<i>Filipendula ulmaria</i>	wiązówka błotna	<i>Rosaceae</i>	różowate
<i>Foeniculi amari fructus</i>	owoc kopru włoskiego (odmiany gorzkiej)	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i>	koper włoski (odmiana gorzka)	<i>Apiaceae</i>	selerowate
<i>Foeniculi dulcis fructus</i>	owoc kopru włoskiego (odmiany słodkiej)	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>dulce</i>	koper włoski (odmiana słodka)	<i>Apiaceae</i>	selerowate
<i>Frangulae cortex</i>	kora kruszyny	<i>Frangula alnus</i>	kruszyna pospolita	<i>Rhamnaceae</i>	szakłakowate
<i>Fumariae herba</i>	ziele dymnicy	<i>Fumaria officinalis</i>	dymnica pospolita	<i>Papaveraceae</i>	makowate
<i>Gentianae radix</i>	korzeń goryczki	<i>Gentiana lutea</i>	goryczka żółta	<i>Gentianaceae</i>	goryczkowate
<i>Ginkgonis folium</i>	liść miłorzębu	<i>Ginkgo biloba</i>	miłorząb japoński	<i>Ginkgoaceae</i>	miłorzębowate
<i>Guaranae semen</i>	nasienie guarany	<i>Paullinia cupana</i>	paulinia guarana	<i>Sapindaceae</i>	mydleńcowate

Substancja roślinna		Gatunek		Rodzina	
łacińska	polska	łacińska	polska	łacińska	polska
<i>Harpagophyti radix</i>	korzeń hakorośli	<i>Harpagophytum procumbens</i>	hakorośl rozesłana	<i>Pedaliaceae</i>	połapkowate
<i>Helichrysi flos</i>	kwiat kocanek	<i>Helichrysum arenarium</i>	kocanki piaskowe	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Hippocastani semen</i>	nasienie kasztanowca	<i>Aesculus hippocastanum</i>	kasztanowiec pospolity	<i>Sapindaceae</i>	mydleńcowate
<i>Hydrastidis rhizoma</i>	kłącze gorzknika kanadyjskiego	<i>Hydrastis canadensis</i>	gorzchnik kanadyjski	<i>Ranunculaceae</i>	jaskrowate
<i>Hyperici herba</i>	ziele dziurawca	<i>Hypericum perforatum</i>	dziurawiec zwyczajny	<i>Hypericaceae</i>	dziurawcowate
<i>Ipecacuanhae radix</i>	korzeń wymiotnicy	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	wymiotnica prawdziwa	<i>Rubiaceae</i>	marzanowate
<i>Juniperi galbulus</i>	szyszkojagoda jałowca	<i>Juniperus communis</i>	jałowiec pospolity	<i>Cupressaceae</i>	cyprysowate
<i>Lavandulae flos</i>	kwiat lawendy	<i>Lavandula angustifolia</i> (syn. <i>Lavandula officinalis</i>)	lawenda wąskolistna	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Levistici radix</i>	korzeń lubczyku	<i>Levisticum officinale</i>	lubczyk ogrodowy	<i>Apiaceae</i>	selerowate
<i>Lupuli flos</i> <i>Lupuli strobilus</i>	kwiat chmielu szyszka chmielu	<i>Humulus lupulus</i>	chmiel zwyczajny	<i>Cannabaceae</i>	konopiowate
<i>Magnoliae officinalis cortex</i>	kora magnolii lekarskiej	<i>Magnolia officinalis</i>	magnolia lekarska	<i>Magnoliaceae</i>	magnoliowate
<i>Malvae folium</i>	liść ślazu	<i>Malva sylvestris</i> <i>Malva neglecta</i>	ślaz dziki ślaz zaniedbany	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Malvae sylvestris flos</i>	kwiat ślazu dzikiego	<i>Malva sylvestris</i> <i>Malva neglecta</i>	ślaz dziki ślaz zaniedbany	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Mate folium</i>	liść ostrokrzewu paragwajskiego	<i>Ilex paraguariensis</i>	ostrokrzew paragwajski	<i>Aquifoliaceae</i>	ostrokrzewowate
<i>Matricariae flos</i> (<i>Chamomillae flos/anthodium</i>)	kwiat rumianku	<i>Matricaria recutita</i> (syn. <i>Chamomilla recutita</i>)	rumianek lekarski	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Melissae folium</i>	liść melisy	<i>Melissa officinalis</i>	melisa lekarska	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Menthae piperitae folium</i>	liść mięty pieprzowej	<i>Mentha × piperita</i>	mięta pieprzowa	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Menyanthidis trifoliatae folium</i>	liść bobrka	<i>Menyanthes trifoliata</i>	bobrek trójlistkowy	<i>Menyanthaceae</i>	bobrkowate
<i>Millefolii herba</i>	ziele krwawnika	<i>Achillea millefolium</i>	krwawnik pospolity	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Oleae folium</i>	liść oliwki	<i>Olea europaea</i>	oliwka europejska	<i>Oleaceae</i>	oliwkowate

Substancja roślinna		Gatunek		Rodzina	
łacińska	polska	łacińska	polska	łacińska	polska
<i>Quercus cortex</i>	kora dębu	<i>Quercus robur</i> <i>Quercus petraea</i> <i>Quercus pubescens</i>	dąb szypułkowy dąb bezszypułkowy dąb omszony	<i>Fagaceae</i>	bukowate
<i>Passiflorae herba</i>	ziele męczennicy	<i>Passiflora incarnata</i>	męczennica cielistą	<i>Passifloraceae</i>	męczennicowate
<i>Plantaginis lanceolatae folium</i>	liść babki lancetowatej	<i>Plantago lanceolata</i>	babka lancetowata	<i>Plantaginaceae</i>	babkowate
<i>Polygoni avicularis herba</i>	ziele rdestu ptasiego	<i>Polygonum aviculare</i>	rdest ptasi	<i>Polygonaceae</i>	rdestowate
<i>Rhamni purshianae cortex</i>	kora szakłaku amerykańskiego	<i>Rhamnus purshiana</i>	szakłak amerykański	<i>Rhamnaceae</i>	szakłakowate
<i>Rhei radix</i>	korzeń rzewienia	<i>Rheum palmatum</i>	rzewień palczasty	<i>Polygonaceae</i>	rdestowate
<i>Rosmarini folium</i>	liść rozmarynu	<i>Rosmarinus officinalis</i>	rozmaryn lekarski	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Salicis cortex</i>	kora wierzby	<i>Salix purpurea</i> <i>Salix daphnoides</i> <i>Salix fragilis</i>	wierzba purpurowa wierzba wawrzynkowa wierzba krucha	<i>Salicaceae</i>	wierzbowate
<i>Salviae officinalis folium</i>	liść szalwii	<i>Salvia officinalis</i>	szalwia lekarska	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Sambuci flos</i>	kwiat bzu czarnego	<i>Sambucus nigra</i>	dziki bez czarny	<i>Viburnaceae</i>	kalinowate
<i>Sennae foliolum</i>	listek senesu	<i>Senna alexandrina</i> <i>Senna angustifolia</i>	strączyniec ostrolistny strączyniec wąskolistny	<i>Fabaceae</i>	bobowate
<i>Solidaginis herba</i>	ziele nawłoci	<i>Solidago canadensis</i> <i>Solidago gigantea</i>	nawłóć kanadyjska nawłóć olbrzymia	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Solidaginis virgaureae herba</i>	ziele nawłoci pospolitej	<i>Solidago virguarea</i>	nawłóć pospolita	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Stephaniae tetrandrae radix</i>	korzeń stefanii	<i>Stephania tetrandra</i>	<i>Stephania</i> czworoboczna	<i>Menispermaceae</i>	miesięcznikowate
<i>Stramonii folium</i>	liść bielunia	<i>Datura stramonium</i>	bieluń dziędzierzawa	<i>Solanaceae</i>	psiankowate
<i>Sylibi mariani fructus</i>	owoc ostropestu plamistego	<i>Silybum marianum</i>	ostropest plamisty	<i>Asteraceae</i>	astrowate
<i>Tiliae flos</i>	kwiat lipy	<i>Tilia cordata</i> <i>Tilia platyphyllos</i>	lipa drobnolistna lipa szerokolistna	<i>Malvaceae</i>	ślazowate
<i>Theae folium</i>	liść herbaty	<i>Camellia sinensis</i>	herbata chińska	<i>Theaceae</i>	herbatowate

Substancja roślinna		Gatunek		Rodzina	
łacińska	polska	łacińska	polska	łacińska	polska
<i>*Camelliae sinensis non fermentata folia</i>	liść niefermentowany herbaty	<i>Camellia sinensis</i>	herbata chińska	<i>Theaceae</i>	herbatowate
<i>Thymi herba</i>	ziele tymianku	<i>Thymus vulgaris</i>	tymianek pospolity	<i>Lamiaceae</i>	jasnotowate
<i>Unacaridae rhynchophyllae ramulus cum uncis</i>	łodyga czepoty chińskiej z kolcem	<i>Unacaria rhynchophylla</i>	czepota chińska	<i>Rubiaceae</i>	marzanowate
<i>Uvae ursi folium</i>	liść mącznicy	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	mącznica lekarska	<i>Ericaceae</i>	wrzosowate
<i>Valerianae radix</i>	korzeń kozłka	<i>Valeriana officinalis</i>	kozłek lekarski	<i>Valerianaceae</i>	kozłkowate
<i>Verbasci flos</i>	kwiat dziewanny	<i>Verbascum thapsus</i> <i>Verbascum phlomoides</i> <i>Verbascum thapsiforme</i>	dziewanna drobnokwiatowa dziewanna kutnerowata dziewanna wielkokwiatowa	<i>Scrophulariaceae</i>	trędownikowate
<i>Verbenae herba</i>	ziele werbeny	<i>Verbena officinalis</i>	werbena (witułka) lekarska	<i>Verbenaceae</i>	werbenowate
<i>Violae herba cum flore</i>	ziele fiołka trójbarwnego	<i>Viola arvensis</i> <i>Viola tricolor</i>	fiołek polny fiołek trójbarwny	<i>Violaceae</i>	fiołkowate
<i>Vitis idaeae folium</i>	liść brusznicy	<i>Vaccinium vitis-idaee</i>	borówka brusznica	<i>Ericaceae</i>	wrzosowate
<i>Zingiberis rhizoma</i>	kłącze imbiru	<i>Zingiber officinale</i>	imbir lekarski	<i>Zingiberaceae</i>	imbirowate

SPIS RYCIN I TABEL

Ryciny:

Rycina 1: Wzór strukturalny 1,8-dihydroksy-3-R-antrachinonu.....	28
Rycina 2: Przemiany zachodzące w obrębie grupy antrazwiązków.....	29
Rycina 3: Struktura chemiczna benzo- γ -pironu	45
Rycina 4: Uproszczony schemat biosyntezy flawonoidów	46
Rycina 5: Kompleksy aglikonów flawonoidów z jonami metali (M^{n+})	49
Rycina 6: Kompleksy aglikonów flawonoidów z jonami boru	50
Rycina 7: Wzór strukturalny wiolantyny	57
Rycina 8: Schemat reakcji Emmersona z arbutyną	74
Rycina 9: Struktura chemiczna cyklopentano- α -piranu	84
Rycina 10: Podział związków z grupie irydoidów na podstawie ich budowy chemicznej	84
Rycina 11: Wzory strukturalne eskuliny i fraksyny	118
Rycina 12: Wzór strukturalny kwasu rozmarynowego	127
Rycina 13: Wzory strukturalne alkaloidów purynowych.....	136
Rycina 14: Wzór strukturalny echinakozydu	143
Rycina 15: Wzór strukturalny kwasu kaftarowego	143
Rycina 16: Wzór strukturalny kwasu cykoriowego	144

Tabele:

Tabela 1: Struktury głównych grup chemicznych flawonoidów.....	47
Tabela 2: Ocena zawartości arbutyny w badanych preparatach.....	80
Tabela 3: Warunki destylacji olejków wg. FP XII	99
Tabela 4: Charakterystyka widma UV eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów	123
Tabela 5: Charakterystyka widm UV eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów	124
Tabela 6: Charakterystyka widm masowych eskuliny, fraksyny oraz badanych izolatów ...	125
Tabela 7: Charakterystyka wyizolowanej kofeiny	140
Tabela 8: Systematyka roślinnych substancji leczniczych oraz źródeł ich pochodzenia.....	153

BIBLIOGRAFIA

1. Bazyłko A., Naruszewicz M.; Rozdział: Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), w połączeniu z densytometrią, do badań substancji roślinnych, Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych, pod red. E. Grześkowiaka, A. Jelińskiej i M. Zając; UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, str. 209-223, Poznań 2010.
2. Bruneton J., Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. Intercept Ltd, Londres, Paris, New York 1999.
3. Derry CJ, Derry S, Moore RA. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, Issue 12. Art. No.: CD009281. DOI: 10.1002/14651858.CD009281.pub2
4. Europejska Agencja Leków (EMA), European Union herbal monograph on *Echinaceae purpureae herba*. Dostęp: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-echinacea-purpurea-l-moench-herba-recens_en.pdf (data dostępu 17.09.2024).
5. Farmakopea Polska, wydanie XII, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa 2020.
6. Hitl M, Kladar N, Gavaric N, Bozin B. Rosmarinic Acid–Human Pharmacokinetics and Health Benefits. *Planta Medica*, 2021, 87(4):273-282. DOI: 10.1055/a-1301-8648.
7. Kiss AK i wsp., Lek pochodzenia naturalnego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN: 9788320064452. Warszawa 2021.
8. Kohlmünzer, S. Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
9. Matławska I. (Red.) Farmakognozja, Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej. Poznań 2006.
10. Strzelecka H. i wsp., Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych, podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1987.

