

**Wirginia Janiszowska
Bogusław Wilkomirski**

Farmakognozja

**Skrypt dla studentów
Wydziału Biologii UW
Specjalności
Biotechnologia Medyczna**

Warszawa 2010

Autorzy skryptu:

Prof. dr hab. Wirginia Janiszowska
Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biochemii UW
wjanisz@biol.uw.edu.pl

Prof. dr hab. Bogusław Wiłkomirski
Zakład Systematyki i Geografii Roślin Instytutu Botaniki UW
Bowi@bot.uw.edu.pl

Druk: BEL Studio Sp. z o.o.,
01-355 Warszawa, ul. Powstańców Śl. 67B,
www.bel.com.pl Tel.: 22 656 92 22

SPIS TREŚCI

Przedmowa	5
I. Część teoretyczna	7
I. 1. Farmakognozja ogólna.....	7
I. 1. 1. Rys historyczny i przedmiot farmakognozji.....	7
I. 1. 2. Pochodzenie i podział surowców roślinnych.....	8
I.1.3. Metody otrzymywania i badań surowców roślinnych oraz wyodrębnionych substancji czynnych.....	10
II.4. Przegląd taksonomiczny oraz farmakognostyczny surowców i substancji roślinnych.....	20
I.2. Farmakognozja szczegółowa - Metabolizm pierwotny i wtórny.....	26
I.2.1. Metabolity pierwotne.....	28
I.2.1.1. Szlaki biosyntezy metabolitów pierwotnych.....	28
I.2.1.2. Metabolity pierwotne o znaczeniu medycznym.....	32
I.2.2. Metabolity wtórne o znaczeniu medycznym.....	34
II. Część praktyczna (przepisy do ćwiczeń)	73
II.1. Izolowanie fosfatydylocholiny z żółtek jaj kurzych	73
II.2 Izolowanie witaminy E z liści roślin dwuliściennych.....	75
II.3. Izolowanie chinonów poliprenylowych z liści roślin dwuliściennych.....	78
II.4. Izolowanie kwasów triterpenowych z liści borówki brusznicy albo kwiatów nagietka lub słonecznika.....	81
II.5. Izolowanie steroli roślinnych	84
II.6. Oznaczanie zawartości glikozydów nasercowych i konwalatoksyny w liściach konwalii za pomocą reakcji Baljeta.....	87
II.7. Izolowanie prowitaminy A z korzeni marchwi	90
II.8. Izolowanie likopenu z owoców pomidora	92
II.9. Otrzymywanie karotenoidów z liści	95
II.10. Wykrywanie różnic w składzie glikozydów fenolowych w surowcach farmakognostycznych.....	98
II.11. Izolowanie barwników antocyjanowych z kwiatów bławatka lub czarnej malwy	100
II.12. Wydzielanie i charakterystyka apiiny z korzenia pietruszki	104
II.13. Otrzymywanie chlorku rubrobrassycyny z czerwonej kapusty	108
II.14. Wyodrębnianie rutozydu z kwitnących pędów gryki.....	110
II.15. Porównanie zawartości flawonoidów w surowcach flawonoidowych metodą Christa-Müllera.....	112
II.16. Porównanie zawartości garbników w materiale roślinnym za pomocą wytrącania octanem miedzi(II).....	113
II.17. Otrzymywanie kofeiny z liści herbaty.....	115
II.18. Oznaczanie kofeiny w liściach herbaty metodą jodometryczną.....	117

II.19. Wyodrębnienie lobeliny z ziela stroiczki rozdętej	119
II.20. Wydzielanie berberyny z korzeni i kory berberysu pospolitego.....	121
II.21. Identyfikacja olejków eterycznych.....	123
II.22. Oznaczanie wody i popiołu w różnych surowcach farmakognostycznych	125
III. Wykaz stosowanych skrótów.....	128
IV. Bibliografia.....	131

PRZEDMOWA

Niezwykłe szybki rozkwit medycyny i nauk okołomedycznych na przełomie XX i XXI wieku spowodował rosnące zainteresowanie tymi dziedzinami biologów i biotechnologów. Jedną z ważnych gałęzi nauki pozostających w kręgu szeroko rozumianych dyscyplin związanych z medycyną jest farmakognozja, zajmująca się surowcami naturalnymi czy to roślinnymi, grzybowymi, zwierzęcymi czy mineralnymi, których składniki wykazują właściwości pozwalające na ich zastosowanie w lecznictwie. Spośród tych wszystkich źródeł surowców niewątpliwie najważniejsze są rośliny. To właśnie w świecie roślin ogromne znaczenie mają procesy metabolizmu wtórnego, w których na wyspecjalizowanych szlakach biosyntezy powstają związki charakterystyczne dla określonych gatunków. Dlatego też, zasadniczym przedmiotem zainteresowania farmakognozji jest fitochemia. Pamiętać jednak należy, że nowoczesna farmakognozja nie ogranicza się do badania składu chemicznego surowca. Przedmiotem jej zainteresowania jest także pochodzenie i metody pozyskiwania surowca, jego właściwości fizyczno-chemiczne, sposób przetwarzania, a także metody instrumentalne pozwalające z jednej strony na wyodrębnienie interesujących pochodnych, z drugiej zaś na zbadanie ich czystości i aktywności biologicznej. Ostatnio farmakognozja uwzględniła także szlaki i przemiany biochemiczne prowadzące do wytworzenia związków mających lub mogących mieć zastosowanie w lecznictwie. Wszystko to razem powoduje, że współczesne podręczniki farmakognozji są bardzo obszerne, a skrypty do ćwiczeń wykonywanych przez studentów Uniwersytetów Medycznych zbyt szczegółowe dla słuchaczy innych uczelni.

Mając świadomość braku odpowiednich materiałów dydaktycznych dla studentów nowej specjalności „Biotechnologia medyczna” na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego postanowiliśmy napisać niniejszy skrypt, który powinien umożliwić poznanie teoretycznych i praktycznych podstaw farmakognozji w zakresie niezbędnym dla studentów naszego wydziału. Skrypt składa się z dwóch części: teoretycznej i praktycznej. W części teoretycznej zostały wyodrębnione dwa działy. Pierwszy z nich, nazwany farmakognozą ogólną, z jednej strony przybliży historię i rozwój tej dziedziny nauki, z drugiej zaś omawia pochodzenie i podział surowców roślinnych, a także metody otrzymywania różnych związków naturalnych oraz techniki badania ich czystości i jednorodności chemicznej. Dział ten kończy krótki przegląd taksonomiczny i farmakologiczny surowców roślinnych.

Drugi z działów części teoretycznej, nazwany farmakognozą szczegółową, pozwala na zrozumienie różnic między metabolizmem pierwotnym i wtórnym oraz ich wzajemne powiązanie, co zilustrowano na uproszczonych schematach. Ponadto umożliwia poznanie biosyntezy, budowy i charakterystyki przykładowych związków najważniejszych grup substancji pierwotnych i wtórnych o znaczeniu medycznym.

Oba działy są pomyślane jako podstawowa pomoc dydaktyczna do wykładów prowadzonych w ramach przedmiotu „Farmakognozja” dla studentów Wydziału Biologii UW wybierających nową specjalność „Biotechnologia medyczna”.

W części praktycznej umieszczono szczegółowe przepisy zadań wykonywanych samodzielnie przez studentów w ramach ćwiczeń laboratoryjnych. Każdy z przepisów zawiera krótki wstęp teoretyczny, pozwalający poznać bardziej szczegółowo określony związek lub proces chemiczny, co stanowi istotne rozszerzenie części teoretycznej w bardziej szczegółowych aspektach. Z drugiej strony ćwiczenia zebrane w niniejszym skrypcie umożliwiają studentom poznanie typowych technik laboratoryjnych stosowanych w celu scharakteryzowania materiału roślinnego pod względem przydatności w lecznictwie oraz wyizolowania, zidentyfikowania, scharakteryzowania i oznaczenia ilościowego związków stosowanych w praktyce medycznej.

Skrypt kończy się wybraną bibliografią zawierającą zarówno klasyczne opracowania książkowe, jak i bardziej szczegółowe atrykuły przeglądowe oraz oryginalne prace naukowe do wykorzystania przez studentów bardziej zainteresowanych przedmiotem i pragnących pogłębić swoją wiedzę. Jesteśmy przekonani, że skrypt ułatwi naszym studentom opanowanie podstaw farmakognozji i przyczyni się do wzrostu zainteresowania tą fascynującą dziedziną wiedzy.

Kończąc chcieliśmy bardzo serdecznie podziękować Panu doktorowi Markowi Długoszowi za wykonanie wszystkich rysunków do niniejszego opracowania.

Autorzy

Warszawa, 2010

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

I.1. Farmakognozja ogólna

Bogusław Wiłkomirski

I.1.1. Rys historyczny i przedmiot farmakognozji

Zainteresowanie problemami, którymi zajmuje się współczesna farmakognozja, towarzyszyło człowiekowi od zarania dziejów i rozpoczęło się znacznie wcześniej niż początki bardziej usystematyzowanej wiedzy dotyczącej związków chemicznych. Było to związane ze świadomością, że rośliny mogą nie tylko służyć jako źródło materiałów ułatwiających, a czasami wręcz umożliwiających życie, ale także z wiedzą, że niektóre z roślin potrafią zabijać, inne zaś, umiejętnie zastosowane przynosiły ulgę w cierpieniu.

Już w czasach starożytnych powstawały dokumenty opisujące aktualną wiedzę o truciznach i lekach pochodzenia naturalnego. Najbardziej znanym tego typu dokumentem starożytnym jest **Papirus Ebersa** – odkryty w Tebach (Egipt) w 1862 r. przez niemieckiego archeologa Georga Ebersa, przechowywany w Muzeum Uniwersytetu w Lipsku. Papirus pochodzi mniej więcej z roku 1550 p.n.e. (jego fragmenty są prawdopodobnie odpisem z o wiele starszych źródeł). Historycy uważają go za najważniejszy dokument staroegipskiej medycyny, pierwowzór dzisiejszej farmakopei. Również **Rigweda i Atharweda** – dwa z czterech najstarszych pism hinduizmu – spisane z przekazów ustnych w latach 1000 – 800 p.n.e., zawierają wzmianki o trujących substancjach naturalnych.

W ostatnim stuleciu przed narodzeniem Chrystusa i w pierwszych dwóch wiekach naszej ery przyrodnicy greccy i rzymscy (Dioskorydes, Celsus, Galen) obszernie opisywali lecznicze surowce naturalne. Niezwykły przyrodnik i lekarz renesansowy Paracelsus pierwszy wysunął tezę, że trujące lub lecznicze działanie określonego surowca wynika z obecności w nich związków czynnych i że ta sama substancja może być trucizną lub lekarstwem, a zależy to tylko od dawki.

Epoka wielkich odkryć geograficznych końca XV i początków XVI wieku (Dias, Kolumb, Vasco da Gama, Magellan) spowodowała, że do Europy zaczęły docierać, nowe egzotyczne surowce, do których należała, między innymi, kora chinowa. Wraz z poznaniem ważnych medycznie i gospodarczo właściwości nieznanych dotąd surowców roślinnych, zaczęto zakładać liczne ogrody botaniczne, aby na miejscu pozyskiwać cenne preparaty. Z kolei, opracowanie przez szwedzkiego przyrodnika XVIII wieku Karola Linneusza systemu klasyfikacji organizmów żywych oraz minerałów stworzyło podstawy do klasyfikacji botanicznej i ułatwiło poszukiwanie roślin dostarczających surowców leczniczych.

Początek wieku XIX zaznaczył się pierwszymi właściwymi badaniami fitochemicznymi, polegającymi na izolowaniu poszczególnych składników czynnych z ekstraktów roślinnych. Były to, przede wszystkim, trujące alkaloidy roślinne, np. morfina wyodrębniona w 1805 r z maku przez F. Seturnera, strychnina otrzymana w 1818 r z

nasion kulczyby przez P. J. Pelletiera i J. Caventou, czy wyizolowana przez tych samych badaczy z kory drzewa chinowego w 1820 r. chinina. Do bardzo istotnych odkryć fitochemicznych dalszych lat XIX wieku należy otrzymanie różnych glikozydów o wyraźnej aktywności biologicznej, np. amigdaliny, salicyny czy digitaliny.

W dobie wielkich odkryć fitochemicznych pierwszej połowie XIX wieku w nauce pojawia się i upowszechnia termin **farmakognozja**. Nazwa pochodzi od greckich słów *pharmakon*(lek) i *gnosis* (wiedza). Do badaczy, którzy pierwsi używali w swoich pracach nowego terminu należą: austriacki lekarz J. Schmidt (1811) i polski aptekarz C. A. Seydler (1815). Początkowo farmakognozja była głównie dyscypliną opisującą surowce naturalne pod względem anatomicznym i morfologicznym, w miarę rozwoju metod izolowania aktywnych składników, a także określania ich struktury i właściwości stała się odrębnym działem nauk farmaceutycznych, wykorzystującym najnowsze zdobycze różnych dziedzin chemii, biologii i fizyki.

I.1.2. Pochodzenie i podział surowców roślinnych

Surowcami roślinnymi w znaczeniu farmakognostycznym nazywamy rośliny zawierające związki czynne mające zastosowanie w lecznictwie. Rośliny takie pozyskuje się ze specjalnie do tego celu prowadzonych upraw albo z populacji roślin dziko rosnących. Zdecydowanie większe znaczenie praktyczne (75 - 80% surowców roślinnych wykorzystywanych do produkcji leków) ma pozyskiwanie roślin z uprawy, niemniej jednak zbiór roślin dziko rosnących ciągle jeszcze ma (i zapewne tak będzie w najbliższych latach) istotne znaczenie w przygotowaniu preparatów stosowanych w farmacji. Używając roślin z zasobów naturalnych należy pamiętać o gatunkach chronionych, o możliwości nadmiernego wyniszczenia populacji w wyniku zbyt intensywnego zbioru na niektórych stanowiskach a także o tym, że postępująca antropopresja prowadzi do kurczenia się naturalnych stanowisk części gatunków.

Przykładami roślin cennych z farmakognostycznego punktu widzenia, których zasoby w Polsce są na tyle duże, iż bez problemu mogą być zbierane z dzikich populacji są: brzoza brodawkowata (*Betula verrucosa*), dzika róża (*Rosa canina*), dziki bez czarny (*Sambucus nigra*), krwawnik pospolity (*Achillea millefolium*), czy mniszek lekarski (*Taraxacum officinale*). Natomiast niektóre rośliny dawniej powszechnie zbierane z naturalnych stanowisk, np. rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*), centuria pospolita (*Centaurium umbellatum*), są coraz intensywniej uprawiane ze względu na ich zanikanie na wielu naturalnych stanowiskach.

Uprawa roślin dostarczających surowców farmakognostycznych przewyższa pod wieloma względami zbiór roślin dziko żyjących. Pomijając względy ochrony przyrody – o których była już mowa – uprawa zwykle pozwala na uzyskanie większego zbioru z określonej powierzchni, zmniejsza koszty (mechanizacja zbioru i korzystna pod względem transportowym lokalizacja uprawy), a także dostarcza surowca w miarę jednolitego pod względem morfologicznym. Niejednokrotnie również rośliny z uprawy mogą zawierać więcej substancji czynnych niż ich dziko rosnące odpowiedniki. Przykładami roślin uprawianych w Polsce na dużą skalę w celach pozyskiwania naturalnych związków aktywnych biologicznie są: mięta pieprzowa (*Mentha piperica*), szalwia lekarska (*Salvia officinalis*), naparstnica wełnista (*Digitalis lanata*), czy kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*).

Zarówno w przypadku roślin dziko żyjących, jak i celowo uprawianych należy pamiętać, że zawartość aktywnych składników jest zmienna i dla danego gatunku zależy od wieku rośliny, momentu zbioru w trakcie okresu wegetacyjnego, pogody, a czasami nawet od pory dnia. W przypadku roślin dziko żyjących możliwe jest też pojawianie się chemotypów, w których proporcje poszczególnych składników zależą od warunków siedliskowych.

Zbioru nadziemnych części roślin należy dokonywać w suche dni, po wyschnięciu rosy, najlepiej w godzinach intensywnego nasłonecznienia (przede wszystkim w przypadku roślin z dużą zawartością olejków eterycznych). Pogoda nie ma większego znaczenia w przypadku zbioru części podziemnych roślin.

Podziału surowców roślinnych dokonuje się zwykle albo w oparciu o organy roślin używanych do otrzymywania substancji aktywnych, albo w związku z zawartością związków o potencjalnym znaczeniu leczniczym. Przegląd surowców w aspekcie najważniejszych grup substancji czynnych zawartych w roślinach należących do różnych taksonów zostanie przedstawiony w rozdziale I. 1. 4., natomiast w tej części skryptu zajmiemy się omówieniem różnych części roślin, mogących być surowcami farmakognostycznymi.

Organami roślin, stosowanymi jako surowce farmakognostyczne są:

- kwiat (*flos*)
- liść (*folium*)
- ziele (*herba*)
- owoc (*fructus*)
- korzeń (*radix*)
- kłącze (*rhizoma*)
- nasienie (*semen*)
- kora (*cortex*)

W niektórych źródłem substancji aktywnych mogą być także surowce o budowie beztkankowej, np. ziarna skrobi, zarodniki, gruczoły i substancje o charakterze wydzielin. W tym rozdziale zostanie przedstawiona tylko ogólna charakterystyka organów roślinnych stosowanych jako surowce farmakognostyczne, natomiast bardziej szczegółowe omówienie wybranych problemów taksonomicznego i fitochemicznego podziału surowców zostanie dokonane w rozdziale I. 1. 4.

Kwiat jest silnie skróconym i przekształconym pędem, którego elementy są bezpośrednio lub pośrednio związane z rozmnażaniem. Kwiaty są często używanym surowcem farmakognostycznym, gdyż z jednej strony wiele substancji aktywnych biologicznie występuje w dużych ilościach właśnie w tych organach, z drugiej zaś kwiaty są jednym z najbardziej charakterystycznych elementów morfologicznych, dzięki czemu możliwa jest łatwa i szybka identyfikacja taksonu, do którego należy roślina. Do grupy kwiatowych surowców farmakognostycznych obok pojedynczych kwiatów (*flos*) należą niekiedy albo same płatki korony (*Flos verbasci*), albo też całe kwiatostany – nawet zbierane z częścią łodygi i górnymi liśćmi (*Inflorescentia Crataegi*).

Liść jest bocznym organem łodygi, charakteryzującym się ograniczonym wzrostem. Związki liści powstają z zewnętrznych warstw komórek. W liściach zachodzi wiele przemian metabolicznych, a podstawową funkcją liści jest fotosynteza i wymiana gazowa. U większości gatunków liście stanowią zasadniczą część masy rośliny. Liście są częstym surowcem źródłem związków aktywnych biologicznie, przy czym w

farmakognozji wykorzystuje się liście asymilacyjne, których podstawową funkcją jest przeprowadzanie fotosyntezy, i które z reguły są płaskie i duże.

Nieco innym surowcem jest **ziele** (*herba*). W farmakognozji surowce tej grupy są nadziemnymi częściami roślin zielnych, składającymi się albo z całych osobników zbieranych w fazie kwitnienia, albo tylko kwitnących wierzchołków pędów w przypadku gatunków, których dolna część łodygi ulega zdrewnieniu. W wyjątkowych przypadkach w surowcach tego typu mogą znajdować się owoce (*Herba Lobeliae*).

Owoc jest organem charakterystycznym dla roślin okrytonasiennych, powstającym z zalążni słupka, a w niektórych przypadkach także z płonnych elementów kwiatu, zrastających się z zalążnią. Owoc składa się z owocni i nasion rozlokowanych w jednej lub większej liczbie komór nasiennych. Surowiec farmakognostyczny stanowią liczne owoce, a rośliny których owoce dostarczają wielu ważnych związków należą do rodziny baldaszkowatych.

Organem stanowiącym podziemną część osi rośliny jest **korzeń**, którego główną funkcją jest pobieranie wody wraz z rozpuszczonymi w niej związkami oraz umocowanie rośliny w podłożu. W odróżnieniu od kłączy korzeń pozbawiony jest tworów liściowych. Surowcami farmakognostycznymi są zwykle korzenie roślin dwuliściennych o budowie wtórnej.

Innym podziemnym organem rośliny wykorzystywanym do otrzymywania aktywnych biologicznie związków jest **kłącze**, czyli przekształcony podziemny pęd rośliny o skróconych międzywęźlach. W węzłach kłącza występują liście łuskowate. Kłącza pełnią funkcję spichrzową i mogą odgrywać rolę w rozmnażaniu wegetatywnym. Ze względu na funkcje magazynowe zawierają wiele związków, z których część wykazuje właściwości lecznicze. Wśród surowców farmakognostycznych znajdują się zarówno kłącza roślin jedno i dwuliściennych.

Nasiona są organami przetrwalnymi rozwijającymi się z zalążka po procesie zapłodnienia i spełniają podstawową rolę w rozprzestrzenianiu się roślin. Nasiona są bogatym źródłem materiałów zapasowych, a także wielu aktywnych produktów metabolizmu wtórnego i z tego względu wiele nasion stanowi cenny surowiec farmakognostyczny.

Ostatnią z wymienionych grup surowców farmakognostycznych jest **kora**, czyli zespół tkanek występujących na zewnątrz pierścienia miazgi pędów nadziemnych i podziemnych. Surowiec farmakognostyczny zwykle stanowi kora wtórna wytworzona przez miazgę roślin dwuliściennych, najczęściej drzewiastych. W wyjątkowych przypadkach surowcem może być kora wtórna korzeni (*Cortex Berberidis*). Kora wielu roślin zawiera wiele związków o różnym działaniu fizjologicznym (*Cortex Fraxini*, *Cortex Cinchonae*).

I.1.3. Metody otrzymywania i badań surowców roślinnych oraz wyodrębnionych substancji czynnych

Pozyskanie surowca farmakognostycznego rozpoczyna się w momencie zbioru roślin dziko rosnących bądź celowo uprawianych. Terminy zbioru roślin zostały ustalone na podstawie czynników warunkujących optymalną zawartość pożądaných związków. W związku z tym kwiaty należy pozyskiwać na początku lub w pełni kwitnienia roślin określonych gatunków i nie zbierać kwiatów przekwitłych, a nawet przekwitających. Również ziele zbiera się na początku kwitnienia roślin, a tylko w niektórych przypadkach

przedłuża się ten okres na pełnię kwitnienia (*Herba Millefolii*). Owoce (szczególnie te soczyste) zbiera się zawsze w stanie jędrności, gdyż wartość użytkowa owoców przejrzałych szybko spada. Największą wartość użytkową mają liście dobrze wyrośnięte, ale jeszcze młode. Natomiast korzenie i kłącza wykopuje się najczęściej jesienią lub wczesną wiosną, kiedy następuje w nich nagromadzenie cennych składników. Przy zbiorze roślin dziko żyjących zaleca się pozyskiwanie zawsze tylko jednego gatunku, aby uniknąć możliwej pomyłki.

Kolejnym etapem jest suszenie surowca, które polega na usunięciu takiej ilości wody z tkanek rośliny, aby została zahamowana aktywność enzymów odpowiedzialnych za procesy rozkładu. Proces suszenia jest ważnym etapem technologicznym, decydującym w wielu przypadkach o jakości surowca. Zasadniczymi parametrami procesu suszenia są: temperatura, ruch powietrza i grubość warstwy surowca. Generalną zasadą jest suszenie materiału możliwie najszybciej po zbiorze, w możliwie krótkim czasie i przy szybkim przepływie powietrza. Taki sposób postępowania gwarantuje utrzymanie koncentracji aktywnych związków na poziomie zbliżonym do istniejącego w świeżym materiale. Proces suszenia powoduje także zanik niektórych związków występujących w świeżym materiale. Niekiedy jest to bardzo korzystne, jak w przypadku roślin z rodziny *Ranunculaceae*, które zawierają związki drażniące skórę.

Prawidłowy sposób suszenia jest szczególnie ważny w przypadku pewnych grupy metabolitów. Należą do nich alkaloidy i niektóre typy glikozydów. Rośliny zawierające te związki należy suszyć możliwie szybko i w stosunkowo wysokiej temperaturze około 50°C. W niektórych przypadkach (liście naparstnicy) dopiero temperatura powyżej 40°C powoduje przemianę natywnych glikozydów w glikozydy wtórne, stosowane jako leki nasercowe. Natomiast surowce, z których pozyskuje się olejki eteryczne suszy się w niższych temperaturach, gdyż podniesienie temperatury suszenia powyżej 35°C powoduje zmniejszenie zawartości olejków. Przestrzeganie właściwej procedury suszenia liści pozwala na otrzymanie łatwo kruszącego się surowca o barwie zbliżonej do naturalnej.

Kwiaty lub kwiatostany są surowcem bardziej delikatnym niż liście i wymagającym większej staranności przy suszeniu. W zależności od gatunku suszy się same płatki lub korony, całe kwiaty lub całe kwiatostany. Kwiaty suszy się w temperaturze niższej niż większość liści; temperatura suszenia zwykle wynosi 30 – 35°C. Prawidłowo wysuszone kwiaty zachowują prawie niezmienną barwę.

Surowcem najtrudniejszym do prawidłowego suszenia są owoce. Bardziej trwałe owoce mięsiste suszy się rozłożone w cienkich warstwach początkowo w temperaturze 30°C, po czym stopniowo podwyższa się temperaturę do 60°C. Mało trwałe owoce mięsiste (maliny, jeżyny) suszy się po rozłożeniu pojedynczych owoców na sitach płóciennych. Jeżeli oberwane pojedyncze owoce są bardzo nietrwałe i wycieka z nich sok (*Fructus Sambuci*), suszy się całe owocostany. Prawidłowo wysuszone owoce mają naturalną barwę i są lekko ciągliwe.

Pozostałe typy surowców farmakognostycznych (korzenie, kłącza, kora, nasiona) są znacznie łatwiejsze do suszenia. Korzenie i kłącza myje się przed suszeniem, chyba że zachodzi ryzyko wyplukania łatwo rozpuszczalnych w wodzie aktywnych substancji. W takiej sytuacji należy poprzestać na mechanicznym usunięciu resztek podłoża. Surowiec w większości przypadków suszy się bez mechanicznej obróbki wstępnej, jedynie bardzo grube korzenie lub kłącza dzieli się na mniejsze części.

Wysuszony surowiec umieszcza się w opakowaniach przepuszczających

powietrze. W zależności od typu surowca może on być następnie wykorzystany jako materiał zielarski, albo po badaniach makroskopowych lub mikroskopowych (mających na celu potwierdzenie tożsamości botanicznej i uniknięcie pomyłek) poddany obróbce laboratoryjnej w celu wyizolowania pożądaných substancji, używanych do produkcji leków.

Wyodrębnianie i identyfikacja chemicznych składników o aktywności biologicznej (mających zastosowanie medyczne) ma zasadnicze znaczenie w farmakognozji. Dysponując odwodnionym materiałem można przystąpić do zasadniczego etapu izolowania niskocząsteczkowych związków naturalnych – najczęściej metabolitów wtórnych.

Najczęściej stosowana jest metoda ekstrakcji na gorąco. Polega ona na przeprowadzeniu do roztworu składników badanego surowca za pomocą odpowiednich rozpuszczalników w temperaturze wrzenia (jeżeli prowadzony ekstrakcję bezpośrednio w kolbie pod chłodnicą zwrotną), bądź ochłodzonych poniżej temperatury wrzenia (podczas ekstrakcji w różnego typu ekstraktorach). Najbardziej popularnym typem automatycznego ekstraktora jest ekstraktor Soxhleta (rysunek 1.) Substancję przeznaczoną do ekstrakcji umieszcza się w aparacie w porowatej gilzie wykonanej z twardej bibuły filtracyjnej. U dołu umieszcza się kolbę zawierającą rozpuszczalnik, natomiast na szczycie aparatu montuje się chłodnicę zwrotną, najlepiej o dużej wydajności chłodzenia. Kolbę z rozpuszczalnikiem ogrzewa się do łagodnego wrzenia po czym pary rozpuszczalnika skraplają się w chłodnicy i spływają do gilzy. Po osiągnięciu górnego poziomu rurki przelewowej następuje zasysanie rozpuszczalnika zawierającego pewną część ekstrahowanej substancji przez syfon i gromadzenie się w dolnej kolbie. Proces ten powtarza się automatycznie. Zaletą ekstrakcji w aparacie Soxhleta jest automatyzacja i możliwość ustawienia wielostanowiskowego zestawu, natomiast ujemną stroną opisanego aparatu jest to, iż temperatura cieczy spływającej do gilzy ekstrakcyjnej jest dużo niższa od temperatury wrzenia rozpuszczalnika, co powoduje wydłużenie czasu ekstrakcji.



Fot. 1. Ekstraktor Soxhleta.

W przypadku ekstrakcji surowca zawierającego duże ilości związków o bardzo

różnej polarności, stosujemy często dwie kolejne ekstrakcje przy użyciu nisko i wysokopolarnego rozpuszczalnika, uzyskując w ten sposób wstępny rozdział niektórych klas substancji.

Otrzymane w wyniku ekstrakcji wyciągi poddaje się bądź zagęszczeniu, bądź odparowaniu do sucha, najczęściej pod zmniejszonym ciśnieniem. Taka procedura pozwala na obniżenie temperatury, w której następuje proces usuwania rozpuszczalnika. Urządzeniem używanym do tego celu najczęściej jest wyparka obrotowa (Rys. 2).



Fot. 2. Wyparka obrotowa

W wyniku usunięcia rozpuszczalnika ekstrakcyjnego uzyskujemy surową mieszaninę związków naturalnych. Dzieje się tak ze względu na duże podobieństwo zasadniczych właściwości fizyczno-chemicznych wyodrębnianych substancji nawet wtedy, gdy należą do różnych klas związków chemicznych. Zatem przed przystąpieniem do identyfikacji powstaje problem rozdziału mieszaniny uzyskanych w wyniku procedury ekstrakcyjnej podobnych (w ogólnym rozumieniu fizyczno-chemicznym) substancji. Rozdział taki jest zwykle konieczny w celu oczyszczenia pożądaných związków chemicznych od substancji balastowych. Do rozdziału złożonych mieszanin wykorzystuje się różnice w chemicznych i fizycznych właściwościach ich składników, np. różnice w lotności, rozpuszczalności, właściwościach adsorpcyjnych, współczynnika podziału, rozmiarze cząsteczek, czy szybkości reakcji. Wszystkie te różnice we właściwościach wykorzystuje się w szeroko pojętych metodach chromatograficznych.

Twórcą chromatografii był rosyjski botanik i biochemik Michaił Cwiet (1872 – 1919, Fot. 3), który w roku 1905 w murach Szkoły Głównej dokonał rozdzielania barwników roślinnych, przepuszczając ekstrakt z liści przez kolumnę szklaną zawierającą sproszkowany węgiel wapnia. Wydarzenie to upamiętnia tablica umieszczona na północnej ścianie budynku. Odkrycie to zostało na 30 lat zapomniane, po czym nastąpił triumfalny rozkwit, coraz to bardziej udoskonalanych metod chromatograficznych, bez których dzisiaj nie mogłyby się obyć nauki biologiczne, chemiczne, medyczne, rolnicze.



Fot. 3. Portret Michaiła Cwieta, odkrywcy chromatografii

Chromatografia rozumiana jako rozdzielanie substancji przy wykorzystaniu różnic w ich właściwościach fizyczno-chemicznych jest pojęciem metodycznym bardzo szerokim. Aby ułatwić zrozumienie pojęć związanych z chromatografią stosuje się zwyczajowo pewne jej podziały. Tak jak przy każdym podziale, tak i w tym przypadku, istotne jest przyjęcie kryteriów, według których podział zostaje dokonany. I tak, jeśli istotą podziału chromatografii jest typ praw fizyczno-chemicznych rządzących rozdziałem substancji, wyróżniamy: chromatografię adsorpcyjną, podziałową, jonowymienną, powinowactwa, oraz sitową (sączenie molekularne). Przyjęcie za podstawę podziału techniki eksperymentalnej daje w wyniku chromatografię cienkowarstwową, kolumnową, gazową, wysokociśnieniową czy bibulową. Wreszcie kierunek wędrówki rozpuszczalnika może być podstawą podziału chromatografii na wstępującą, zstępującą i dwukierunkową. Opierając się na ilości rozdzielanych substancji dokonujemy podziału na chromatografię analityczną i preparatywną.

Zdecydowanie najważniejszy dla rozumienia istoty metod chromatograficznych jest podział oparty na prawach fizyczno-chemicznych powodujących podział substancji. I nie ma przy tym znaczenia czy od strony technicznej jest to bardzo prosty układ szklanej rury (jak w doświadczeniu Cwieta), czy bardzo skomplikowany i najeżony elektroniką układ współczesnego chromatografu.

Chromatografia adsorpcyjna polega na naniesieniu na początek systemu chromatograficznego (górną kolumny, punkt startowy, komora nastrzykowa automatycznego aparatu) rozdzielanej mieszaniny i rozwijaniu tego systemu odpowiednimi rozpuszczalnikami. Różnice w adsorpcji rozdzielanych związków spowodowane różną polarnością powodują wolniejszą lub szybszą ich wędrówkę wzdłuż systemu. Generalnie im wyższa polarność związku chemicznego (spowodowana głównie obecnością grup funkcyjnych w cząsteczce), tym silniejsze właściwości adsorpcyjne przejawia substancja. W przypadku stosowania klasycznej techniki chromatografii kolumnowej konieczne jest stosowanie szeregu rozpuszczalników o rosnącej mocy eluowania (coraz bardziej polarnych). Należy tutaj zaznaczyć, że chociaż chromatografia cienkowarstwowa (TLC) w swoich zastosowaniach opiera się najczęściej na praktycznym zastosowaniu zjawisk adsorpcji, to jednak znane są przykłady zastosowań TLC opartych na zjawisku podziału czy wymiany jonowej. Ważną wielkością, pozwalającą na identyfikację substancji jest współczynnik przesunięcia, czyli R_f .

DROGA PRZEBYTA PRZEZ SYBSTANCJĘ

$$R_f = \frac{\text{DROGA PRZEBYTA PRZEZ SYBSTANCJĘ}}{\text{DROGA PRZEBYTA PRZEZ ROZPUSZCZALNIK}}$$

R_f jest to stosunek odległości przebytej przez migrującą substancję do odległości przebytej przez czoło rozpuszczalnika w tym samym czasie. Ponieważ współczynnik ten zależy nie tylko od natury samej substancji, zastosowanego adsorbenta i od użytego rozpuszczalnika, ale także (choć w małym stopniu) od zmiennych czynników (temperatura, szczelność komory chromatograficznej, grubość warstwy adsorbenta), zwykle dla dokładności porównujemy nie tylko bezwzględną wartość współczynnika przesunięcia, ale także porównujemy go z wielkością uzyskaną dla wzorca czystej substancji w tych samych warunkach.

Chromatografia podziałowa polega na wykorzystaniu różnej rozpuszczalności rozdzielanych składników mieszaniny w dwóch nie mieszających się ze sobą rozpuszczalnikach (w układzie podziałowym). Jeden z rozpuszczalników – faza stacjonarna umieszczony jest na nieruchomym nośniku. Drugi rozpuszczalnik – faza ruchoma przesuwa się względem pierwszego. Badane substancje dzielą się pomiędzy fazę ruchomą i nieruchomą zgodnie z ich rozpuszczalnością w tych fazach. Istotnym parametrem decydującym o możliwościach podziału jest współczynnik podziału substancji (k), czyli stosunek stężenia substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej do jej stężenia w fazie nieruchomej, który w stanie równowagi i w danej temperaturze ma wielkość stałą.

STĘŻENIE W FAZIE RUCHOMEJ

$$R_f = \frac{\text{STĘŻENIE W FAZIE RUCHOMEJ}}{\text{STĘŻENIE W FAZIE NIERUCHOMEJ}}$$

Najszybciej wędrują składniki posiadające największą wartość współczynnika podziału. Inaczej mówiąc, substancje, które lepiej rozpuszczają się w fazie nieruchomej migrują wolniej i to właśnie prowadzi do rozdziału. Również w tym przypadku należy pamiętać, że podczas chromatografii podziałowej, poza podziałem składników między dwie fazy ciekłe, często mają miejsce zjawiska związane w mniejszym lub większym stopniu z adsorpcją substancji na nośniku. Siły adsorpcji hamują ruch podczas procesu chromatograficznego.

Chromatografia jonowymienna jest prowadzona przy użyciu wymiennicy jonowych, czyli substancji stałych o budowie jonowej, które w zetknięciu z roztworem wymieniają część swoich jonów na jony obecne w roztworze. Substancje jonowymienne nazywane potocznie jonitami dzielimy na kationity i anionity.

Kationity zawierają dysocjujące grupy kwaśne (obdarzone ładunkiem ujemnym) np. COO^- , $-\text{SO}_3^-$, fenolowe lub fosforanowe, które na zasadzie podwójnej wymiany, przyłączają z roztworu rozdzielanej mieszaniny kationy, np. Ca^{2+} , oddając atom wodoru.

Anionity zawierają dysocjujące grupy zasadowe, np. $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, ugrupowania amin I-, II- lub III-rzędowych (obdarzone ładunkiem dodatnim), które przyłączają z roztworu rozdzielanej mieszaniny aniony, np. Cl^- .

W chromatografii jonowymiennej podstawą rozdziału mieszaniny cząsteczek jest ich całkowity ładunek. Zaprojektowanie właściwych warunków (pH, moc jonowa roztworu) pozwala na wiązanie jonów z roztworu oraz oddawanie ich po odpowiedniej zmianie tych warunków.

W chromatografii na sitach molekularnych, zwanej sączeniem molekularnym lub filtracją żelową, rozdzielanie mieszaniny cząsteczek odbywa się na podstawie ich wielkości i kształtu. W tym typie chromatografii stosuje się żele polisacharydowe pęczniące w środowisku wodnym i wytwarzające zwartą sieć o określonej wielkości porów. Wielkość porów jest charakterystyczna dla danego rodzaju sita, a poszczególne rodzaje sit różnią się rozmiarami porów. Ciecz wymywająca opływa ziarna żelu umieszczone w kolumnie. Substancje rozpuszczone o dużych rozmiarach przechodzą bezpośrednio przez kolumnę. Cząsteczki o mniejszych rozmiarach wnikają w pory ziaren i wciskają się w oczka sieci. Im mniejsze są rozmiary tych cząsteczek, tym wolniejsza jest ich migracja w żelu. Rozdział opiera się na różnicy masy cząsteczkowej rozdzielanych związków. Ten rodzaj chromatografii ma największe zastosowanie przy oczyszczaniu związków wielkocząsteczkowych (np. białek). W badaniach fitochemicznych może służyć do oczyszczania drobnocząsteczkowych metabolitów wtórnych od balastu substancji wielkocząsteczkowych.

W chromatografii powinowactwa, znajdującej główne zastosowanie w badaniach makrocząsteczek, wykorzystuje się specyficzne, niekowalencyjne i o wysokim powinowactwie wiązanie się białka z inną cząsteczką zwaną ligandem, co umożliwia wyodrębnienie jednego białka z mieszaniny wielu różnych białek. Za pomocą tej metody możemy uzyskać bardzo znaczne oczyszczenie białek enzymatycznych. W metodzie tej szczególne znaczenie ma charakter nośnika. Jego struktura chemiczna, porowatość, a zarazem odpowiednie usieciowanie powinny pozwalać na łatwą wędrówkę makrocząsteczek z zachowaniem jednocześnie stałych parametrów przepływu cieczy.

W nowoczesnych badaniach z zastosowaniem chromatografii bardzo istotna jest dokładność i szybkość rozdziału, a także możliwość zachowania powtarzalności procedury. Dlatego też używa się powszechnie zautomatyzowanych metod, przy wykorzystaniu skomputeryzowanych zestawów chromatografii gazowej i cieczonej.

Chromatografia gazowa, ściślej gazowo-cieczowa (GLC) i wysoko sprawna (wysokorozdzielcza) chromatografia cieczowa (HPLC) są najbardziej nowoczesnymi technikami chromatograficznymi o czułości i rozdzielczości niespotykanej w tradycyjnych systemach chromatograficznych. W GLC cienka warstwa mało lotnej cieczy jest osadzona na powierzchni stałego nieaktywnego adsorpcyjnie nośnika i stanowi fazę nieruchomą. Analizowana substancja przepływa w strumieniu nieczynnego gazu nośnego (azot, argon, hel), stanowiącego odpowiednik ruchomego rozpuszczalnika. GLC jest więc przykładem nowoczesnej techniki wykorzystującej zjawisko podziału. Właściwy proces rozdziału zachodzi w kolumnie chromatograficznej umieszczonej w piecu, gwarantującym utrzymanie żądanej temperatury. Do wykrywania substancji rozdzielonych w kolumnie chromatograficznej służą detektory, których działanie ogólnie opiera się na różnej reakcji na właściwości fizyczno-chemiczne czystego gazu nośnego i gazu zawierającego substancję eluowaną z kolumny. Rejestrowane zmiany są proporcjonalne albo do stężenia molowego, albo do masy pojawiającej się substancji. Do wykrywania drobnocząsteczkowych metabolitów wtórnych najczęściej stosuje się detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID).

HPLC, a także UHPLC, czyli ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa, jest przykładem współczesnego rozwinięcia chromatografii kolumnowych różnych typów (adsorpcyjnej, podziałowej, sitowej). Daje ona możliwości bardzo wysokiej rozdzielczości, jest metodą analityczną znacznie szybszą i bardziej czułą od klasycznej chromatografii kolumnowej. Daje przy tym także ciągłą możliwość detekcji. Detektorami w aparatach

HPLC są najczęściej spektrometry UV-VIS, spektrometry masowe, laserowe spektrometry rozproszeniowe lub amperometry. Nowoczesne chromatografy zostały przedstawione na rysunkach 4 i 5.



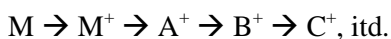
Fot.4. Nowoczesny skomputeryzowany zestaw do chromatografii gazowej



Fot.5. Chromatograf ciekłowy

Potwierdzenie tożsamości chromatograficznej substancji wyodrębnionej z materiału roślinnego nie jest do końca równoznaczne z identyfikacją, a już na pewno pozwala na ustalenie struktury związku chemicznego. Rozszyfrowanie budowy chemicznej ma szczególne znaczenie w przypadku nowych substancji. Nowoczesna identyfikacja substancji polega głównie na zastosowaniu metod spektralnych. Najogólniej rzecz ujmując metody spektralne polegają na oddziaływaniu na cząsteczki związku chemicznego odpowiednim zakresem promieniowania elektromagnetycznego i rejestrowaniu „odpowiedzi cząsteczek” w postaci widma. Metody spektralne są zatem metodami fizycznymi, czyli oddziaływaniem nie powodującym modyfikacji strukturalnych, a użyta do analizy próbka może być wykorzystana do kolejnych metod identyfikacji. Z tych ogólnych rozważań dotyczących metod spektralnych wymyka się spektroskopia masowa (MS), w której struktura korpuskularnie bombardowanej cząsteczki ulega zniszczeniu. Zatem MS nie jest metodą fizyczną, moglibyśmy zaliczyć ją do metod chemicznych, traktując fragmentację cząsteczki jako szczególny rodzaj reakcji chemicznej. Nie jest to jednak wadą spektroskopii masowej, gdyż niezwykle wysoka czułość tej metody pozwala na zarejestrowanie widma z ilości mikrogramowych. Zastosowanie pojedynczej metody spektralnej w połączeniu z różnego typu chromatografią potwierdza tożsamość danej pochodnej. Natomiast pełne ustalenie struktury nowego związku chemicznego wymaga kompleksowego zastosowania różnych metod spektralnych.

W takim przypadku ustalenie struktury rozpoczyna się zwykle od wykonania widma masowego. Zasadniczą ideą działania spektrometru masowego jest fragmentacja cząsteczki i identyfikacja powstających jonów w zależności od stosunku ich masy do ładunku. Ponieważ najczęściej ładunek jest jednostkowy, w praktyce jony są rozdzielane ze względu na masę. Istnieje wiele metod jonizacji cząsteczek, jednak zasada ustalania struktury związku organicznego polega w pierwszym rzędzie na ustaleniu masy tzw. jonu molekularnego M^+ . Jon molekularny może zawierać ilość energii wewnętrznej wystarczającą do tego, aby rozpaść się na cząsteczkę obojętną i jon fragmentaryczny A^+ . Jon taki może rozpadać się dalej, tworząc dalsze jony fragmentaryczne (B^+ , C^+ , itd.).



Taka fragmentacja cząsteczki może odbywać się na różnych drogach, splatających się ze sobą, ale nigdy nie jest przypadkowa. Po prostu, pewne miejsca cząsteczki (wiązania, podstawniki, grupy funkcyjne) są bardziej podatne na rozpad. Zatem z drogi fragmentacji i masy powstających fragmentów można wnioskować o strukturze cząsteczki. Ustalenie masy molowej cząsteczki przed wprowadzeniem MS było możliwe jedynie na drodze analizy elementarnej. Zaletą MS jest oprócz wysokiej czułości możliwość sprzężenia z metodami chromatograficznymi, zwłaszcza z chromatografią gazową. Chromatograf rozdziela analizowaną próbkę na pojedyncze związki chemiczne, które są kolejno kierowane do spektrometru mas celem ich jednoznacznej identyfikacji. Taka technika (GCMS) jest stosowana szeroko nie tylko w badaniach fitochemicznych, ale także w przemyśle i podczas kontroli antydopingowych sportowców. Choć MS jest stosowana głównie do identyfikacji i ustalania struktury drobnocząsteczkowych związków organicznych, pewne jej odmiany mogą służyć do detekcji mas nawet do 100.000 daltonów i są pomocne w badaniach białek i polimerów. Modyfikacja ICP – MS, w której jonizowana substancja jest wprowadzana do plazmy o temperaturze 10.000K doskonale nadaje się do analizy pierwiastków metalicznych.

Z klasycznych metod spektralnych najdłuższymi falami (o częstotliwości radiowej) posługuje się jądrowy rezonans magnetyczny (NMR). Spektroskopia ta polega na wzbudzeniu spinów jądrowych znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym poprzez szybkie zmiany pola magnetycznego, a następnie rejestrację promieniowania elektromagnetycznego powstającego na skutek zjawisk relaksacji, gdzie przez relaksację rozumiemy powrót układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej. Mówiąc prościej, pewne jądra umieszczone w silnym polu magnetycznym są w stanie absorbować promieniowanie jądrowe. Najlepsze efekty uzyskuje się dla jąder o spinie $\frac{1}{2}$, np. ^1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N . Najbardziej popularny jest protonowy rezonans magnetyczny i na jego przykładzie można omówić zalety tej metody w ustalaniu struktury cząsteczek organicznych. Cechami, które umożliwiają interpretację widma są:

- częstotliwości rezonansowe, które są różne w zależności od chemicznego otoczenia jądra,
- powierzchnia sygnału proporcjonalna do liczby protonów dających taki sygnał,
- rozszczepienie sygnałów na multiplety dzięki sprzężeniu spinowo-spinowemu.

Teoria matematyczna, która tłumaczy wystąpienie mówionych wyżej cech jest bardzo skomplikowana, jednak jej poznanie nie jest absolutnie konieczne do interpretacji większości widm. Położenie sygnału w widmie NMR określa przesunięcie chemiczne. Zakresy wartości przesunięć chemicznych odpowiadające absorpcji przez jądra znajdujące

się w otoczeniu określonych grup chemicznych są znane i opracowane w postaci odpowiednich tablic. Porównanie zarejestrowanych przesunięć chemicznych z wartościami tablicowymi umożliwia identyfikację struktury chemicznej badanego związku.

Charakterystyczne cechy widma pozwalają zatem wyciągnąć wnioski na temat grup funkcyjnych, liczby protonów, porządku ułożenia protonów w cząsteczce i liczby protonów w grupie sąsiedniej w stosunku do grupy, dla której obserwujemy sygnał rezonansowy. W niektórych przypadkach protonowy rezonans magnetyczny daje również pewne informacje o stereochemii cząsteczki. Na przykład, stała sprzężenia (J) w multipletach jest zmienna i tak, J_{trans} jest większa od J_{cis} dla protonów olefinowych w wiązaniu glikozydowym, co pozwala na rozróżnienie typu wiązań glikozydowych (α lub β) w związkach naturalnych. Interesującym z fitochemicznego punktu widzenia przykładem zastosowania NMR jest ustalanie stereochemii ważnych metabolitów wtórnych, jakimi są sterole. W sterolach roślinnych konfiguracja grup alkilowych w pozycji 24 ma związek z rozwojem ewolucyjnym roślin i może być ustalana za pomocą wysokorozdzielczego NMR.

Na podobnych zasadach opiera się rezonans węglowy (^{13}C). O ile rezonans protonowy był źródłem informacji przede wszystkim o grupach funkcyjnych, to spektroskopia ^{13}C NMR pozwala wnikać bezpośrednio w strukturę węglowego szkieletu cząsteczki. Znacznie większy zakres przesunięć chemicznych daje praktycznie możliwość otrzymania osobnego sygnału dla każdego atomu węgla wchodzącego w skład cząsteczki metabolitu o typowych dla związków drobnocząsteczkowych masach molowych. Ponieważ węgiel jest głównym składnikiem związków organicznych, metoda ta ma duże znaczenie mimo takich wad jak: niska czułość (^{13}C stanowi tylko około 1% całej zawartości tego pierwiastka w przyrodzie, wobec 99% izotopu ^{12}C , którego jądro ma spin 0 i jest nieaktywne w zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego) oraz skomplikowany charakter widma wymagający zastosowania technik komputerowych.

Obok klasycznych zastosowań w analizie chemicznej zjawisko rezonansu magnetycznego ma także zastosowanie w diagnostyce medycznej do ukazywania patologii w zakresie tkanek i narządów. W tej odmianie tomografii zjawisko rezonansu jądrowego odnosi się do jąder wodoru obecnych w cząsteczkach wody, która znajduje się w wszystkich tkankach ludzkiego organizmu. Obrazowanie medyczne znajduje największe zastosowanie w badaniach mózgu i pozwala na uzyskanie informacji dostępnych poprzednio tylko w czasie sekcji zwłok.

W analizie spektralnej interesującym zakresem fal krótszych jest podczerwień (IR). Pochłonięte przez cząsteczkę promieniowanie podczerwone ulega zamianie w energię rotacji i oscylacji, co w rezultacie powoduje pojawianie się w widmie charakterystycznych pasm. Ze względu na stosunkowo niewielkie koszty aparatury i prostotę wykonywania widm spektroskopia w podczerwieni jest metoda powszechnie stosowana w badaniach fitochemicznych. Widma IR wykonuje się przede wszystkim w celu ustalenia obecności grup funkcyjnych oraz do celów porównawczych, gdyż charakterystyczny wygląd pewnych rejonów widma może być traktowany jako „odcisk palca” cząsteczki.

Widma w zakresie promieniowania widzialnego oraz ultrafioletowego nie mają zbyt dużego zastosowania do identyfikacji substancji, niemniej jednak mogą być pomocne przy ustalaniu obecności charakterystycznych chromoforów w cząsteczce.

Dla pełnego opisu budowy cząsteczki związku organicznego należy określić także jej stereochemię. Charakterystyka szkieletu węglowego i obecnych w cząsteczce grup

funkcyjnych mogła zostać dokonana przy zastosowaniu opisanych powyżej metod spektralnych. Konfigurację podstawników w podstawowym szkielecie cząsteczki (\square lub \square , *cis* lub *trans*, *syn* lub *anti*) ustala się za pomocą metod chiralooptycznych, takich jak: optyczna dyspersja rotacyjna (ORD) i dichroizm kołowy (CD).

Zastosowanie opisanych metod chromatograficznych i spektralnych pozwala na pełną identyfikację składników o aktywności biologicznej izolowanych z surowców farmakognostycznych, a w sytuacji uzyskiwania nowych, nieznanych dotąd metabolitów, określenia pełnej struktury.

I.1.4. Przegląd taksonomiczny oraz farmakognostyczny surowców i substancji roślinnych

Taksonomia jest jedną z najstarszych dziedzin biologii, gdyż relacje między żywymi organizmami od wieków pasjonowały badaczy. Klasyczna taksonomia do celów porządkowania świata roślinnego używała cech morfologicznych i anatomicznych. Wraz z rozwojem metod izolowania i ustalania struktury związków naturalnych nauka gromadziła coraz więcej danych na temat chemicznych składników roślin. Odpowiednia liczba informacji stworzyła możliwość wykorzystania cech fitochemicznych jako podstawy do klasyfikacji roślin i w ten sposób powstała nowa gałąź systematyki, zwana chemotaksonomią. W zależności do wielkości cząsteczek stanowiących markery taksonomiczne można wyróżnić chemotaksonomię mikromolekularną (związki drobnocząsteczkowe) oraz chemotaksonomię makromolekularną (związki wielkocząsteczkowe). Z punktu widzenia farmakognozji zdecydowane większe znaczenie ma podejście mikromolekularne, przy czym najważniejszymi markerami są produkty metabolizmu wtórnego, gdyż brak powszechności ich występowania stanowi największy walor taksonomiczny. Znajomość podstaw chemotaksonomii pozwala na łatwiejsze poszukiwanie nowych surowców farmakognostycznych. W roślinach blisko spokrewnionych ze sobą należy spodziewać się przede wszystkim różnic ilościowych w profilach zawartości metabolitów, natomiast przy porównywaniu roślin należących do różnych taksonów wysokiej rangi, powinny pojawiać się różnice jakościowe dotyczące obecności różnych klas związków chemicznych.

Niektóre z metabolitów występują powszechnie w roślinach. Do takich związków należą np. sterole i pewne flawonoidy (kemferol, kwercetyna). Inne, jak niektóre alkaloidy (nikotyna) pojawiają się w kilku rodzinach roślin, niekiedy odległych pod względem systematycznym. Są i takie związki (morfina), które znaleziono dotąd jedynie w gatunkach rodzaju *Papaver*.

Rośliny należące do niektórych rodzin są szczególnie często wykorzystywane jako surowce farmakognostyczne. Jako przykłady takich rodzin można wymienić:

Rodzina *Ranunculaceae*. W roślinach należących do tej rodziny występują różnorodne cenne składniki, alkaloidy diterpenowe (rodzaje *Aconitum*, *Delphinium*, *Consolida*), glikozydy kardenolidowe (*Adonis*) i bufadienolidowe (*Helleborus*), glikozydy cyjanogenne (*Thalictrum*, *Aquilegia*).

Rodzina *Cruciferae*. Dla licznych przedstawicieli tej rodziny charakterystyczne jest występowanie tzw. glikozydów gorczycznych, W niektórych rodzajach (*Syrenia*, *Erysimum*) występują glikozydy kardenolidowe.

Rodzina *Ericaceae*. W większości roślin należących do tej rodziny znajdują się duże ilości glikozydów fenolowych, a także seskwi-, di, i triterpeny.

Rodzina *Compositae*. Jedna z najliczniejszych rodzin roślin naczyniowych obejmująca około 30.000 gatunków. Rośliny należące do tej rodziny zawierają związki izoprenoidowe, olejki eteryczne, flawonoidy i poliacetyleny.

Rodzina *Solanaceae*. Ważną cechą roślin należących do tej rodziny jest duża zawartość alkaloidów tropanowych, pirydynowych i piperydynowych, a także glikoalkaloidów steroidowych (*Solanum*). Występują także liczne związki fenolowe i flawonoidowe, natomiast brak jest garbników.

Rodzina *Liliaceae*. Rośliny należące do tej rodziny mogą być źródłem glikozydów bufadienolidowych (*Urginea*), kardenolidowych (*Convallaria*) oraz alkaloidów (*Veratrum*, *Colchicum*). W wielu roślinach występują saponiny steroidowe.

Jeden z najczęściej stosowanych w farmakognozji podziałów surowców roślinnych związany jest z zawartością określonych składników. Najważniejszymi grupami surowców są: surowce alkaloidowe, glikozydowe, garbnikowe, flawonoidowe i olejkowe. Poniżej przedstawiono krótki przegląd tych grup surowców.

Surowce alkaloidowe

Mianem surowców alkaloidowych określane są te rośliny, których organy (korzenie, liście, owoce i nasiona) gromadzą duże ilości alkaloidów. Alkaloidy spotyka się w zasadzie w całym świecie roślinnym, jednak ich rozpowszechnienie nie jest jednolite. W roślinach niższych związki tego typu są stosunkowo rzadkie, również rzadko występują alkaloidy u paprotników. Wyjątkiem jest rodzaj *Lycopodium*, w którym znaleziono ponad 70 związków typu alkaloidowego. Wśród nagonasiennych większe ilości alkaloidów występują jedynie w rodzajach *Taxus* i *Ephedra*. Najwszechstronniej i to zarówno w sensie ilościowym jak i jakościowym, alkaloidy występują w roślinach okrytonasiennych, a jako przykłady rodzin, których gatunki są bogate w ten typ związków, można wymienić *Ranunculaceae*, *Berberidaceae*, *Solanaceae* czy *Leguminosae*. Liczba wyizolowanych alkaloidów roślinnych przekracza 5 tysięcy. Jako ciekawostkę można podać, że związki alkaloidowe pojawiają się również u zwierząt, czego przykładem może samandaryna występująca u salamandry plamistej (*Salamandra maculosa*). Bliższa charakterystyka biochemiczna – struktura i biosynteza – wybranych alkaloidów (jak również innych grup związków o znaczeniu medycznym) zostanie przedstawiona w dalszej części skryptu), w tym miejscu zostaną podane tylko te wiadomości, które mają znaczenie dla izolowania pochodnych alkaloidowych.

Alkaloidy są zwykle ciałami stałymi, znane są jedynie nieliczne wyjątki (arekolina, nikotyna, pilokarpina), mające ciekły stan skupienia. Zasadniczą wspólną cechą ich struktury jest obecność atomu lub atomów azotu w cząsteczce i poza nielicznymi wyjątkami (niektóre pochodne purynowe, kolchicyna) zasadowy charakter. W postaci wolnych zasad alkaloidy są słabo rozpuszczane w wodzie, natomiast zdecydowanie lepiej rozpuszczają się w typowych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak eter dietylowy, chloroform, aceton czy etanol. Z kolei, sole alkaloidów nie są rozpuszczalne w tych rozpuszczalnikach organicznych, wykazując przy tym dobrą rozpuszczalność w wodzie. Te różnice w rozpuszczalności są istotne zarówno w czasie preparatyki z materiału roślinnego, jak i w trakcie analizy tych związków. Żywe tkanki roślinne zwykle zawierają alkaloidy w postaci soli z kwasami organicznymi, rozpuszczone w soku komórkowym. Rzadziej spotyka się alkaloidy w formie wolnych zasad, a wyjątkowo w postaci pochodnych cukrowych lub w połączeniu z garbnikami. W wielu przypadkach ekstrakcja surowców alkaloidowych prowadzi do otrzymania wyciągu zawierającego drobnocząsteczkowe substancje balastowe o charakterze zasadowym (aminy, puryny,

betainy, sole amonowe), które utrudniają wyizolowanie alkaloidów, dlatego klasyczna procedura przerobu roślinnych surowców alkaloidowych składa się z dwóch kolejnych etapów, czyli wyodrębniania surowej frakcji alkaloidowej i jej oczyszczania.

Wyodrębnianie frakcji alkaloidowej rozpoczyna się najczęściej od alkalizacji rozdrobnionego surowca niewielką ilością stężonego wodnego roztworu amoniaku (etap przeprowadzania alkaloidów z soli w wolne zasady). W niektórych przypadkach do alkalizacji można stosować węglan sodu, natomiast należy unikać mocnych zasad (KOH), ze względu na możliwość powstawania mydeł. Kolejną fazą preparatyki jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem organicznym, którym najczęściej jest chloroform (stosować można również inne rozpuszczalniki o średniej polarności). Jeżeli alkaloidy są stosunkowo dobrze rozpuszczalne w wodzie (kolchicina), albo lotne z parą wodną (nikotyna, sparteina), ekstrakcję można przeprowadzać w środowisku wodnym. W wyniku procedury ekstrakcyjnej otrzymuje się wyciąg zawierający alkaloidy w postaci wolnych zasad, niestety obciążony także zasadowymi związkami niealkaloidowymi. Takie ekstrakty organiczne wytrząsa się z rozcieńczonymi wodnymi roztworami kwasów nieorganicznych, w wyniku czego powstają dobrze rozpuszczalne sole alkaloidów lokujące się w fazie wodnej. Natomiast nierozpuszczalne w wodzie substancje balastowe pozostają w fazie organicznej. Jeżeli teraz zawierający sole alkaloidów roztwór wodny zakalizujemy, to spowodujemy ponowne powstanie wolnych alkaloidów, które w trakcie wytrąsania z rozpuszczalnikiem organicznym przejdą do fazy organicznej. Po otrzymaniu czystych alkaloidów wydajność reakcji a także jednorodność preparatu można określać metodami chemicznej analizy wagowej lub objętościowej, metodami chromatograficznymi, albo metodami biologicznymi.

Alkaloidy są substancjami o wysokiej i zróżnicowanej aktywności biologicznej. Ogromna większość alkaloidów jest silnie trująca. Do tej grupy związków należą najsilniejsze trucizny roślinne, takie jak koniina, akonityna, strychnina czy fizostygmina. Obecnie w lecznictwie rzadko wykorzystywane są surowce alkaloidowe, czy też otrzymywane z nich wyciągi, natomiast wykorzystywane są liczne alkaloidy postaci czystej.

Jako typowe roślinne surowce alkaloidowe wymienić można korzeń pokrzyki wilczej jagody (*Radix Belladonnae*), ziele stroiczkii rozdętej (*Herba lobeliae*), korzeń wymiotnicy (*Radix Imecacuanhae*) oraz liść bielunia (*Folium Stramonii*). Przykładami alkaloidów wykorzystywanymi w lecznictwie są: morfina wykazująca działanie przeciwbólowe, kodeina i narkotyna stosowana w lekach wykrztuśnych, rezerpina obniżająca ciśnienie tętnicze krwi, winblastyna, winkrystyna i taksol stosowane jako leki cytostatyczne w onkologii oraz kokaina, której działanie miejscowo znieczulające znalazło zastosowanie w okulistyce i laryngologii.

Surowce glikozydowe

Najważniejszą grupą roślinnych surowców glikozydowych są rośliny zawierające specyficzną grupę glikozydów, których aglikonem są związki steroidowe z nienasyconym pierścieniem laktonowym w pozycji C-17 i w położeniu \square i resztą cukrową dołączoną w pozycji C-3. Pierścień laktonowy może być pięcioczłonowy z jednym wiązaniem podwójnym (glikozydy kardenolidowe) lub sześcioczłonowy z dwoma wiązaniami podwójnymi (glikozydy bufadienolidowe). Glikozydy obu tych grup noszą wspólną nazwę glikozydów nasercowych (kardiotonicznych) ze względu na silne działanie na mięsień sercowy. Aktywność biologiczną wykazują jedynie połączenia glikozydowe, same aglikony glikozydów nasercowych są praktycznie pozbawione działania kardiotonicznego.

Glikozydy nasercowe są jednymi z najlepszych leków stosowanych w terapii niedomogi mięśnia sercowego. Należy jednak pamiętać, że są to związki silnie toksyczne i jakiegokolwiek przedawkowanie może prowadzić do śmiertelnego zatrucia. Choć mechanizm działania glikozydów nasercowych nie został dokładnie poznany, przyjmuje się, że zwiększają one siłę i szybkość skurczu, zmniejszają częstotliwość pracy serca wynikającą z przedłużenia fazy rozkurczu, zwiększają napięcie mięśnia sercowego, a także hamują przewodzenie bodźców. W ten sposób praca serca staje się bardziej ekonomiczna a okres refrakcji (wypoczynku serca) ulega wydłużeniu.

Glikozydy nasercowe dobrze rozpuszczają się w wodzie, nieco słabiej w metanolu, etanolu i rozpuszczalnikach organicznych o średniej polarności (aceton, octan etylu) i są praktycznie nierozpuszczalne w niskopolarnych rozpuszczalnikach węglowodorowych. Dobrą metodą wyodrębniania glikozydów nasercowych jest ekstrakcja na gorąco 70% etanolem.

Typowymi surowcami roślinnymi stosowanymi do przemysłowego uzyskiwania glikozydów nasercowych są: liść naparstnicy wełnistej i purpurowej (*Folium Digitalis lanatae [purpureae]*), ziele konalii (*Herba Convallariae*), ziele miłka wiosennego (*Herba Adonis vernalis*) i nasienie strofantusa (*Semen Strophanti*). Preparaty z naparstnicy są obecnie wycofywane z lecznictwa, preparaty z konwalii i miłka wiosennego są stosowane w przewlekłej niewydolności mięśnia sercowego, a leki na bazie związków aktywnych strofantusa podaje się w leczeniu ostrej niewydolności serca i w dusznicy napadowej. Działanie zbliżone do kardenolidowych glikozydów strofantusa mają glikozydy bufadienolidowe z cebuli morskiej (*Scillae bulbosae*).

Mniej znaną grupą glikozydów są antraglikozydy, których aglikonem są pochodne antracenu. Antraglikozydy są krystalicznymi substancjami rozpuszczalnymi w wodzie i najbardziej polarnych rozpuszczalnikach organicznych (metanol, etanol). W chloroformie i mniej od niego polarnych rozpuszczalnikach organicznych praktycznie się nie rozpuszczają. Najbardziej znaną i wykorzystywaną w lecznictwie aktywnością fizjologiczną antraglikozydów jest działanie przeczyszczające. Związki te nie wchłaniają się praktycznie w jelicie cienkim, natomiast w jelicie grubym pod działaniem flory bakteryjnej rozpadają się na pochodne o silnym działaniu przeczyszczającym. Niektóre z antrazwiązków wykazują działanie lityczne wobec kamieni nerkowych i moczowych, a także działanie przeciwnowotworowe wykorzystywane w terapii ostrych białaczek. Surowcami służącymi do otrzymywania antraglikozydów są: kora kruszyny (*Cortex Frangulae*), korzeń marzanny (*Radix Rubiae*) i korzeń rzewienia (*Radix Rhei*).

Surowce garbnikowe

Ta grupa surowców zawiera rośliny, w których w większych ilościach znajdują się stosunkowo rozpowszechnione związki określane wspólną nazwą – garbniki. Pod względem budowy chemicznej garbniki są związkami naturalnymi o stosunkowo dużej masie molowej (500 – 3000), mające charakter polifenoli. Cechą charakterystyczną garbników jest łatwość tworzenia trwałych połączeń z białkami, co spowodowało ich pozamedyczne zastosowanie w procesie wyprawiania skór. Ze względu na różnorodność budowy chemicznej garbniki dzielimy na hydrolizujące – wśród których wyróżniamy galotanoidy (produktem hydrolizy może być kwas galusowy i glukoza lub inny cukier) i elagotanoidy (produktem hydrolizy jest elagowy, glukoza i kwas *m*-digalusowy – oraz niedyrolizujące, których podstawową strukturą jest katechina, jej izomer epikatechina oraz produkty ich utleniania. Garbniki posiadają wiele cech wspólnych, takich jak: cierpki i ściągający smak, zdolność do tworzenia trwałych i nierozpuszczalnych połączeń z

białkami, możliwość aglutynacji erytrocytów i wytrącanie nierozpuszczalnych konglomeratów z białkami i śluzami oraz z metalami ciężkimi i toksynami bakteryjnymi.

Wysoka polarność garbników związana z obecnością dużej liczby grup hydroksylowych powoduje, że związki te dobrze rozpuszczają się w wodzie, metanolu i etanolu, są natomiast nierozpuszczalne w niskopolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego też najbardziej typową metodą izolowania surowców garbnikowych jest ekstrakcja na gorąco roztworami alkoholowo-wodnymi lub wodnymi. W przypadku surowców bogatych w pektyny otrzymane wodne wyciągi uwalnia się od pektyn wytrącając je etanolem.

Najważniejszymi surowcami garbnikowymi są: kora dębowa (*Cortex Quercus*), dębianka (*Galla*), kłącze wężownika (*Rhizoma Bistortae*) i kłącze pięciornika (*Rhizoma Tormentillae*). Specyficznym typem surowca roślinnego, nie należącym do grupy podstawowych organów roślinnych jest dębianka, zwana inaczej galasem dębowym. Dębianki powstają na pączkach młodych pędów dębu galasowego. Te patologiczne narośla powstają z tkanki merystematycznej po nakłuciu pąka przez samicę galasownika, złożeniu jaj i rozwoju larw. W lecznictwie garbniki są wykorzystywane w produkcji środków ściągających i przeciwzapalnych stosowanych w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych. Część preparatów zawierających garbniki ma zastosowanie w leczeniu nieżyłtów przewodu pokarmowego.

Surowce flawonoidowe

Flawonoidy są bardzo rozpowszechnionymi barwnikami roślinnymi o barwie żółtej i jasno pomarańczowej występującymi przede wszystkim w kwiatach i owocach, ale także w liściach, a nawet korze i korzeniach. W roślinach występują najczęściej w postaci pochodnych glikozydowych. Szczególnie powszechnie w świecie roślin występują glikozydy kwercetyny, kemferolu i luteoliny. Obecność reszt cukrowych powoduje, że glikozydy flawonoidowe dobrze rozpuszczają się w wodzie i krótkołańcuchowych alkoholach, natomiast wolne aglikony charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie i znacznie lepszą w typowych rozpuszczalnikach organicznych.

Zarówno roślinne surowce flawonoidowe, jak i wyodrębnione z nich wolne i glikozydowo związane flawonoidy znajdują wszechstronne zastosowanie w lecznictwie. Flawonoidy wykazują działanie antyoksydacyjne, hamujące syntezę czynników prozapalnych, moczopędne, uszczelniające krwionośne naczynia włosowate, ochronne w stosunku do komórek wątroby. W wielu preparatach leczniczych spełniają także rolę składników wspomagających zasadnicze działanie lecznicze.

Ze względu na rozpowszechnienie obecności związków flawonoidowych znanych jest wiele surowców, z których możemy izolować te związki. Do najważniejszych należą: liść brzozy (*Folium Betulae*), liść miłorzębu (*Folium ginkgo*), kwiat jasnoty białej (*Flos Lamii albi*), kwiat bzu czarnego (*Flos Sambuci*), kwiatostan głogu (*Inflorescentia Crataegi*), ziele dziurawca (*Herba hyperici*) oraz ziele skrzypu (*Herba equiseti*). Z surowców tych glikozydy flawonoidowe pozyskuje się metodą ekstrakcji wodą lub metanolem.

Surowce olejkowe

Olejki eteryczne występujące w wielu surowcach farmakognostycznych są dużą grupą substancji zróżnicowanych pod względem struktury chemicznej, ale o zbliżonych cechach fizycznych, co wyraża się w podobieństwie metod ich otrzymywania. Do takich cech należą, brak rozpuszczalności w wodzie, lipofilność, niskie temperatury wrzenia (łatwa lotność), gęstość zwykle mniejsza od wody, charakterystyczny najczęściej przyjemny zapach. Pod względem struktury chemicznej olejki eteryczne są mieszaninami

różnorodnych związków (w olejkach eterycznych stwierdzono ponad 1500 różnych pochodnych), należących w zdecydowanej większości do mono- i seskwiterpenów, występujących w postaci węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów i eterów, a ponadto do pochodnych aromatycznych, zarówno węglowodorów, jak i ich pochodnych z różnymi grupami funkcyjnymi. Rzadziej w olejkach eterycznych spotyka się pochodne fenylopropanu, związki zawierające siarkę i azot oraz kwasy organiczne. Choć w skład jednego olejku eterycznego może wchodzić nawet kilkadziesiąt różnych związków, to większość olejków zawiera jeden dominujący składnik.

Olejki eteryczne są fizjologicznymi wydaliniami roślin gromadzącymi się zarówno w strukturach zewnątrztkankowych (włoski gruczołowe), jak i wewnątrztkankowych (komórki, zbiorniki i przewody olejkowe). Choć olejki eteryczne są bardzo rozpowszechnione w świecie roślin, to jednak ich zawartość w roślinach różnych gatunków jest wysoce zróżnicowana. W pączkach kwiatowych goździkowca korzennego (*Syzygium aromaticum*) dostarczającego znanej przyprawy – goździków zawartość ta może dochodzić nawet 20 %, podczas gdy w kwiatach róży wynosi ona zaledwie 0,01%.

Za surowce farmakognostyczne uznaje się rośliny, w których zawartość użytecznego farmakologicznego olejku przekracza 0,1%. Do ważniejszych surowców olejkowych zaliczamy: kwiat rumianku (*Flos Chamomillae*), liść mięty pieprzowej (*Folium Menthae piperitae*), owoc anyżu (*Fructus Anici*), owoc kopru włoskiego (*Fructus Foeniculi*), kłącze tataraku (*Rhizoma Calami*), korzeń omanu (*Radix Inuale*) i owoc kminku (*Fructus Carvi*). Pomimo różnorodności surowców wyróżnia się trzy zasadnicze metody otrzymywania olejków eterycznych. Pierwsza z nich polega na destylacji z parą wodną całych roślin lub ich części. Jej zastosowanie ogranicza labilność termiczna niektórych olejków, dlatego destylację z parą wodną stosuje się jedynie do olejków, których składniki nie ulegają destrukcji w temperaturze wrzenia wody. Wadą tej metody jest też utrata składników rozpuszczalnych w wodzie. Drugi ze sposobów otrzymywania olejków opiera się na ekstrakcji wykorzystującej lipofilność olejków eterycznych. Do ekstrakcji używa się łatwo lotnych i niskopolarnych rozpuszczalników organicznych, np. eteru naftowego. Najcenniejsze olejki ekstrahuje się tłuszczami stałymi. Ostatnią metodą otrzymywania olejków jest ich wytłaczanie. W ten sposób otrzymuje się, np. olejki cytrusowe.

Zarówno surowce olejkowe, jak i olejki eteryczne i ich pojedyncze składniki wykazują różnorodną aktywność farmakologiczną, która przejawia się w działaniu antyseptycznym, przeciwzapalnym, rozkurczającym, wykrztuśnym, moczopędnym, rozszerzającym naczynia krwionośne, żółciopędne i żółciotwórcze oraz pobudzające wydzielanie soku żołądkowego.

I.2. Farmakognozja szczegółowa – Metabolizm pierwotny i wtórny

Wirginia Janiszowska

W omówieniu substancji naturalnych i surowców farmakognostycznych uwzględniono zarówno metabolity pierwotne niezbędne do życia rośliny jak i tzw. metabolity wtórne. Podział na związki pierwotne występujące praktycznie w każdej roślinie i spełniające podstawowe funkcje fizjologiczne, energetyczne, budulcowe lub zapasowe (cukry proste, skrobia, aminokwasy, białka, tłuszcze, chlorofile, kwasy nukleinowe) oraz metabolity wtórne, będące wytworem wyspecjalizowanej przemiany materii często ograniczonej do większych lub mniejszych grup systematycznych królestwa roślin został wprowadzony już w 1913 roku. Jednak w żaden sposób nie można oddzielić procesów metabolizmu pierwotnego od metabolizmu wtórnego, ponieważ wszystkie związki wtórne wywodzą się od substancji pierwotnych, co schematycznie przedstawiono na Rys. 1. Jak widać główne grupy metabolitów wtórnych wywodzą się biogenetycznie z aktywnej jednostki dwuwęglowej tj. acetyloCoA (poliketydy, antybiotyki, lipidy, izoprenoidy, pseudoalkaloidy), z kwasu szikimowego (pochodne fenylopropanu, flawonoidy), cukrów (oligosacharydy, glikozydy) i aminokwasów (antybiotyki, alkaloidy). Z kolei prekursorzy heterozwiązków (flawonoidy, witaminy E, K₁, nikotyna) powstają w wyniku kondensacji co najmniej dwóch związków wywodzących się z różnych prekursorów wspomnianych wcześniej. Znajomość dróg biosyntezy farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych ma nie tylko znaczenie w farmakognozji dynamicznej, ale przede wszystkim w optymalizacji procesów ich syntezy w warunkach *in vitro* (kultury kalusowe, zawieszinowe, korzeni transformowanych), a także w procesach biotransformacji przeprowadzanych przez mikroorganizmy.

Dzięki postępowi nauki coraz częściej okazuje się, że wiele tzw. związków wtórnych pełni funkcję swoistej broni chemicznej skierowanej przeciwko konkurencyjnym roślinom, patogenom oraz roślinożercom danej rośliny czy grupy roślin, umożliwiając im prawidłowe funkcjonowanie w określonym środowisku. Z drugiej strony jest wielce prawdopodobne, że związki te, lub niektóre z nich, mogą w niedalekiej przyszłości mieć istotne znaczenie w lecznictwie. W świetle ostatnich, intensywnie prowadzonych badań, wydaje się więc, że termin „metabolity wtórne” jest niewłaściwy ale czasami użyteczny i dlatego też, ciągle jest stosowany w literaturze.

W niniejszym opracowaniu omówione zostaną te grupy związków lub pojedyncze związki, które odgrywają znaczącą rolę jako składniki surowców farmakognostycznych lub jako środki lecznicze. Zostaną opisane, często w uproszczeniu, drogi ich biosyntezy, a także ich właściwości farmakologiczne. Ze względu na zwięzłość tego opracowania nie jest możliwe uwzględnienie wszelkich danych dotyczących biochemii i aktywności biologicznej wszystkich substancji naturalnych, szczególnie tych najliczniejszych należących do izoprenoidów, flawonoidów czy alkaloidów i dlatego zostaną omówione tylko przykładowe związki należące do każdej z omawianych grup.

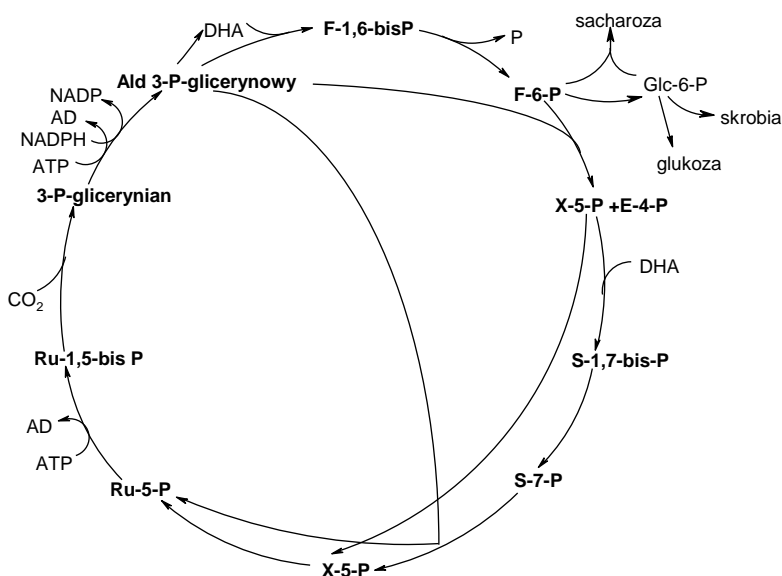
Osoby zainteresowane pogłębieniem wiedzy z tej dziedziny mogą ją czerpać z wielostronicowych opracowań monograficznych, które ukazały się do tej pory.

I.2.1. Metabolity pierwotne

I.2.1.1. Szlaki biosyntezy metabolitów pierwotnych

Fotosynteza

Podstawowym procesem biochemicznym prowadzącym do wytworzenia związków organicznych jest fotosynteza zachodząca w chloroplastach roślin zielonych i sinic. W procesie tym, przy udziale barwników fotosyntetyzujących (chlorofile, karotenoidy) zorganizowanych wraz z towarzyszącymi białkami w fotosystem I i II następuje przemiana energii świetlnej w energię chemiczną. W fazie świetlnej fotosyntezy zachodzącej w błonach tylakoidów, następuje adsorpcja światła o określonej długości fali prowadząca do wybicia elektronu z chlorofilu na wyższy poziom energetyczny i przekazanie go na plastochinon. I tak rozpoczyna się fotosyntetyczny transport elektronów, podczas którego następuje fotoliza wody oraz wytworzenie wysokoenergetycznego ATP i zredukowanego NADPH₂ wykorzystywanych w reakcjach fazy ciemnej fotosyntezy zwanej cyklem Calvina lub cyklem fotosyntetycznej redukcji CO₂ (Rys. 2). W cyklu tym karboksylaza rybulozo-bisfosforanowa (rubisco) katalizuje połączenie CO₂ z rybulozo-1,5-bisfosforanem, powstałym w tymże cyklu, co prowadzi do utworzenia 2 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu. W wyniku kolejnych reakcji i wzajemnych przekształceń produktów cyklu Calvina powstają cukry proste, które mogą kondensować do di-, tri-, oligo- i polisacharydów.

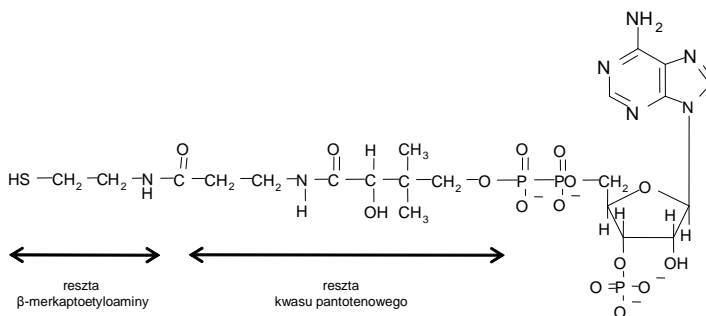


Rys. 2. Schemat cyklu Calvina. Zastosowano skróty: F-1,6-bisP – fruktozo-1,6-difosforan, F-6-P – fruktozo-6-fosforan, E-4-P – erytrozo-4-fosforan, X-5-P – ksylulozo-5-fosforan, S-1,7-bisP – sedoheptulozo-1,7-difosforan, DHAP – fosforan dihydroksyacetonu, S-7-P – sedoheptulozo-7-fosforan, Ru-5-P – rybulozo-5-fosforan, Ru-1,5-bisP – rybulozo-1,5-difosforan, Glc-6-P – glukoza-6-fosforan

Przemiany cukrów prostych

Glukoza, w postaci 6-fosforanu, jako główny materiał energetyczny roślin, w cyklu pentozowym ulegając przekształceniu do pentoz, tetroz i trioz prowadzi do wytworzenia niezbędnego dla wielu procesów syntezy biochemicznej związku NADPH_2 .

Z kolei, w wieloetapowym procesie glikolizy z 6-fosfoglukozy powstają dwie cząsteczki trójwęglowego kwasu pirogronowego oraz, w efekcie końcowym, dwie cząsteczki ATP. Pirogronian jest dawcą szkieletu węglowego trzech aminokwasów - Ala, Val i Leu. Natomiast inne metabolity pośrednie glikolizy dostarczają szkielety węglowe Ser, Cys i Gly (3-fosfoglicerynian) oraz Phe, Tyr i Trp (fosfoenolpirogronian). W warunkach tlenowych w obecności pirofosforanu tiaminy, kwasu liponowego i koenzymu A (Rys. 3) dehydrogenaza pirogronianowa przekształca kwas pirogronowy poprzez oksydacyjną dekarboksylację w acetylokoenzym A – aktywnego dawcę jednostki dwuwęglowej w wielu procesach biochemicznych. W roślinach powstaje on także z kwasów tłuszczowych podczas β -oksydacji, z aminokwasów ketogennych (leucyny,



Rys. 3. Struktura koenzymu A

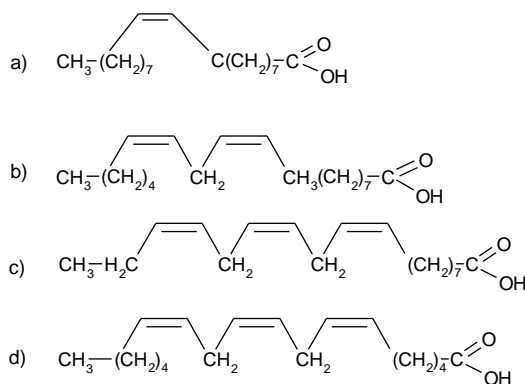
izoleucyny, lizyny, fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu) i kwasu octowego. Niekiedy może powstawać również z przemian glicyny, seryny i cysteiny.

W cyklu kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa) acetylokoenzym A łączy się z kwasem szczawiooctowym tworząc kwas cytrynowy, który w szeregu kolejnych reakcjach przekształca się do kwasu wyjściowego. Cykl Krebsa jest źródłem wielu kwasów organicznych występujących w roślinach, a także szkieletów węglowych aminokwasów (α -ketoglutaran - Glu, Gln, Pro, Arg, szczawiooctan - Asp, Asn, Met, Thr, Ile, Lys).

Biosynteza aminokwasów aromatycznych

Aminokwasy aromatyczne powstają na szlaku kwasu szikimowego (główny związek pośredni), którego substratami wyjściowymi są fosfoenolpirogronian i powstająca w cyklu pentozowym 4-fosfoerytroza. Oba związki łącząc się dają kwas 7-fosfo-2-keto-3-dezoksyaraboheptulowy (Rys. 4). W wyniku kolejnych reakcji cyklizacji, dehydratacji i redukcji powstaje kwas szikimowy, a z niego, po fosforylacji, przyłączeniu cząsteczki fosfoenolpirogronianu i defosforylacji, powstaje kwas choryzmowy, który z

do kwasu palmitynowego. Dalsze wydłużanie i utlenianie do kwasów nienasyconych zachodzi w mitochondriach i mikrosomach. Ssaki, w tym także człowiek, nie są zdolne do tworzenia podwójnego wiązania przy węglu dalszym niż C-9 i dlatego w ich diecie muszą znajdować się wielonienasycone kwasy: linolowy oraz α - i γ -linolenowe (tzw. witamina F, zapotrzebowanie dzienne 600mg), które są syntetyzowane w organizmach roślinnych w warunkach tlenowych przy udziale desaturaz powiązanych z błonami cytoplazmatycznymi (Rys.5).



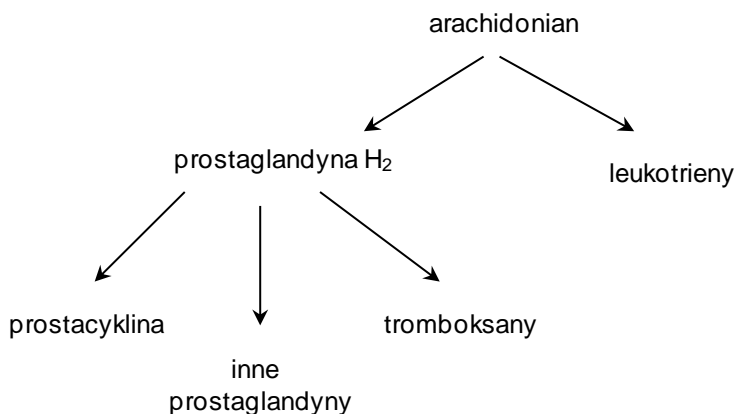
Rys. 5. Struktury wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: oleinowego (a), linolowy (b), α -linolenowego (c) i γ -linolenowego(d)

Kwasy tłuszczowe wchodzi w skład triacylogliceroli (tzw. tłuszcze obojętne lub triglicerydy), w których są powiązane wiązaniem estrowym z glicerolem. Dla człowieka są głównym magazynem energii, gdyż całkowite utlenienie kwasów tłuszczowych wynosi ok. 39 kJxg^{-1} , podczas gdy białek i węglowodanów tylko ok. 13 kJxg^{-1} . Powstają one z acylo-CoA i 3-fosfoglicerolu pochodzącego z fosfodihydroksyacetonu (glikoliza). W pierwszej reakcji acylacji powstaje kwas lizofosfatydowy, w drugiej - kwas fosfatydowy, a po usunięciu grupy fosforanowej - diacyloglicerol (DAG). Nierozpuszczalne w wodzie są one transportowane w płynach ustrojowych w postaci lipidowo-białkowych cząsteczek zwanych lipoproteinami. Nagromadzają się w komórkach tłuszczowych (adipocyty).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) odgrywają ważną rolę w budowie błon mitochondrialnych i mikrosomalnych, a ich brak w organizmie wywołuje niepożądane objawy, takie jak zmiany skórne, kruchość naczyń, zaburzenia krążenia oraz zwiększone ryzyko rozwoju miażdżycy naczyń i niedokrwienia mięśnia sercowego. Dodatkowo brak kwasu γ -linolenowego wywołuje zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego.

Bogatym źródłem WNKT są oleje roślinne stosowane stale w farmacji, takie jak olej słonecznikowy (*Oleum Helianthi* – wit. F, diety miażdżycowe, wątrobowe, rozpuszczalnik substancji lipofilnych), migdałowy (*Oleum Amygdalarum* – glicerydy kwasu linolowego i olejowego - rozpuszczalnik substancji lipofilnych do iniekcji), lniany (*Oleum Lini* - glicerydy kwasu linolowego i α -linolenowego, stosowany do mazidła przeciw oparzeniom), sojowy (*Oleum Sojae* - glicerydy kwasu linolowego, lecytyna), wiesiołkowy (*Oleum Oenotherae* – glicerydy kwasu linolowego i γ -linolenowego, stosowany w miażdżycy, alergiach, chorobach skórnych, autoimmunizacyjnych, stwardnieniu rozsianym).

Kwas arachidowy oraz inne wielonienasycone 20-węglowe kwasy tłuszczowe (arachidoniany) są prekursorami eikozanoidów tj. prostaglandyn, prostacyklin, leukotrienów i tromboksanów (Rys. 6). Hormony te działają w pobliżu miejsca ich biosyntezy.



Rys. 6. Schemat powstawania eikozanoidów

Prostaglandyny stymulują stany zapalne, modulują synaptyczne przekazywanie impulsów między komórkami nerwowymi, wywołują sen. Poznano ich działanie farmakologiczne na krążenie, mięśnie gładkie, układ nerwowy, metabolizm tłuszczu. Z kolei prostacykliny hamują agregację płytek krwi oraz rozszerzają naczynia wieńcowe serca, a tromboksany mają przeciwstawne działanie i ich przewaga prowadzi do zmian miażdżycowych. Wydaje się, iż prostacykliny mogłyby być zastosowane w leczeniu miażdżycy, zwłaszcza kończyn.

Ostatnio prowadzone są intensywne badania nad możliwością zastosowania eikozanoidów w lecznictwie.

Aspiryna (kwas acetylosalicylowy) jest nieodwracalnym inhibitorem syntazy prostaglandynowej i w ten sposób działa przeciwzapalnie, przeciwbólowo i przeciwgorączkowo.

I.2.1. Metabolity pierwotne o znaczeniu medycznym

Aminokwasy, peptydy, białka

20 standardowych aminokwasów o ogólnym wzorze $R-CH(NH_2)COOH$ różniące się tylko budową łańcucha bocznego (R) mają niepodważalne znaczenie jako jednostki budulcowe wszystkich białek. Człowiek nie ma zdolności syntezy fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu, waliny, leucyny, izoleucyny, lizyny, metioniny oraz treoniny i dlatego musi je pobierać z pożywienia. Z oczywistych względów w niniejszym opracowaniu zostaną omówione jedynie aminokwasy wykorzystywane w lecznictwie.

Glicyna – środek tonizujący układ mięśniowy w stanach zmęczenia. Metionina – środek chroniący wątrobę przed otłuszczeniem i innymi zmianami. Kwasy glutaminowy – lek tonizujący psychicznie (nieodzowny składnik protoplazmy komórek

nerwowych). *K w a s a s p a r a g i n o w y* - lek tonizujący układ nerwowy w stanach zmęczenia psychicznego i fizycznego oraz w chorobach serca, wieku starczego i in. (*Aspargin*). *T r y p t o f a n* – lek nasenny wywołujący fizjologicznie sen. *A r g i n i n a* – lek stosowany w chorobach metabolicznych wątroby, a jako antagonist a m o n i a k u zmniejsza jego stężenie w surowicy. Hydrolizaty białkowe zawierające aminokwasy standardowe są stosowane jako odżywcze wlewki dożyłne po zabiegach chirurgicznych (*Polfamin*, *Terapin*).

Wśród znanych roślinnych peptydów ze względów farmakognostycznych na uwagę zasługuje *g l u t a t i o n* – tripeptyd zbudowany z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny z wolną grupą –SH łatwo ulegający odwracalnym procesom oksydacyjno-redukcyjnym. Generalnie chroni on przed utlenieniem grupy –SH w centrach aktywnych enzymów, a jako lek jest stosowany w anemii hemolitycznej. Z kolei *c y k l o s p o r y n a A* (9 aminokwasów) izolowana z grzybów *Tolypocladium inflatum* Gams i *Cylin drocarponlucidum* Booth jest stosowana jako lek immunosupresyjny zapobiegający odrzutom przeszczepów organów. Ponieważ nie jest toksyczna dla komórek rdzenia kręgowego i limfocytów, to dzięki temu zachowana jest odporność organizmów na bakterie i inne mikroorganizmy.

Do peptydów należą niektóre hormony zwierzęce stosowane w leczeniu. Izolowana z trzustki zwierzęcej *i n s u l i n a* zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych: A (21 aminokwasów) i B (30 aminokwasów) połączonych 2 mostkami dwusiarczkowymi jest lekiem przeciwcukrzycowym. Ponieważ działa krótko (do 8 godzin) stosuje się ją tylko w nagłych przypadkach śpiączki, wstrząsu itp. Najczęściej stosuje się insulinę połączoną z protaminą, co przedłuża jej działanie do 24 godzin (*Depot-insulina*). Izolowany również z trzustki zwierzęcej *g l u k a g o n* (29 aminokwasów) jest stosowany w śpiączce cukrzycowej. *T y r e o t r o p i n a*, wpływająca na wydzielanie hormonów tarczycy i gromadzenie jodu, jest izolowana z przedniego płata przysadki i stosowana w niedoczynności tarczycy oraz otyłości. *K o r t y k o t r o p i n a* (39 aminokwasów) jest stosowana w niedoczynności nadnerczy, reumatyzmie i astmie oskrzelowej. *W a z o p r e s y n a* (9 aminokwasów), izolowana z tylnego płata przysadki, działa antydiuretycznie, pobudza pracę jelit, podnosi ciśnienie krwi, zmniejsza wydalanie wody z organizmu. *A n g i o t e n s y n a* (8 aminokwasów) wytwarzana w tkankach jest stosowana jako najsilniejszy lek podnoszący ciśnienie krwi.

Białka nie mają dużego znaczenia w farmakognozji, ale niektóre z nich są wykorzystywane w leczeniu. I tak, *ż e l a t y n a* (*Gelatina*) powstająca w wyniku częściowej hydrolizy kolagenu, podstawowego białka skóry, tkanki łącznej, chrząstek i kości, jest używana do wyrobu kapsulek, a także środka przeciwkrwotocznego tzw. gąbki żelatynowej dobrze przyswajanej przez ustrój. *K a t g u t* otrzymywany z jelit cienkich jest niemal czystym kolagenem służącym jako resorbujące nici chirurgiczne. *J e d w a b n a t u r a l n y* składający się z dwóch białek: seryny i fibroiny wytwarzany przez jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) jest stosowany w chirurgii jako nici nieresorbuje. Duże nadzieje pokłada się w *l e k t y n a c h*, białkach należących do glikoprotein występujących w nasionach pewnych roślin, które mają zdolność do aglutynacji komórek nowotworowych i dlatego prowadzone są próby zastosowania ich w chorobach nowotworowych. Innymi białkami, potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi są: *r y c y n a* izolowana z nasion rącznika (*Ricinus communis*,) oraz *a b r y n a* izolowana z nasion modligroszka (*Abrus precatorius*).

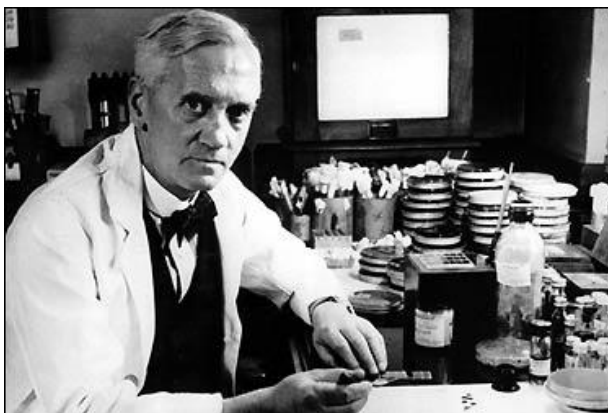
Również niektóre białka enzymatyczne są stosowane w lecznictwie. P e p s y n a - proteaza otrzymywana z błony śluzowej żołądka świni jest stosowana w terapii zastępczej w niedokrwistości i zaburzeniach trawienia. T r o m b i n a (enzym proteolityczny) jest używana miejscowo do tamowania krwotoków. P a p a i n a (enzym proteolityczny) izolowana z owoców *Carica papaya* jest stosowana w leczeniu niestrawności, robaczym oraz zewnętrznie w chorobach przyzębia i usuwaniu nekrotycznych zmian na skórze. Podobne aktywności i zastosowanie mają f i c y n a izolowana z soku mlecznego kilku gatunków fikusa (*Moraceae*) oraz b r o m e l i n a otrzymywana z owoców i liści ananasa (*Ananas comosus*). Z kolei s t r e p t o d o r n a z a i s t r e p t o k i n a z a izolowane z *Streptococcus heamoliticus* są niekiedy stosowane dożylnie w zakrzepach i stanach zawałowych mięśnia sercowego.

I.2.2 Metabolity wtórne o znaczeniu medycznym

Do tej pory wykryto ponad 120.000 metabolitów wtórnych. Wiele z nich wykazuje różnego typu aktywności biologiczne, które są lub mogą być w niedalekiej przyszłości wykorzystywane przez człowieka w lecznictwie. W niniejszym opracowaniu zostaną omówione antybiotyki, a następnie substancje naturalne zgrupowane według szlaków na których powstają.

Antybiotyki

Antybiotyki są to substancje o różnym charakterze chemicznym mające zdolność do hamowania rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych wytwarzane przez drobnoustroje - bakterie, promieniowce i grzyby. Dzięki badaniom Fleminga (Fot. 6) pierwszym odkrytym w 1929 roku antybiotykiem była p e n i c y l i n a syntetyzowana przez grzyby pleśniowe *Penicillium notatum* i *Penicillium chrysogenum*. Natomiast nazwę „antybiotyki” wprowadził Waksman, odkrywca s t r e p t o m y c y n y, dopiero w 1945 roku. Obecnie znanych jest ponad 3.000 związków naturalnych o właściwościach antybiotycznych, w tym także syntetyzowanych przez rośliny wyższe, ale tylko ok. 50 z nich ma szersze zastosowanie w lecznictwie. Powstają one na różnych szlakach, a szczegóły ich biosyntezy w wielu przypadkach nie są jeszcze dokładnie poznane.



Fot. 6. Alexander Fleming (1881-1955)

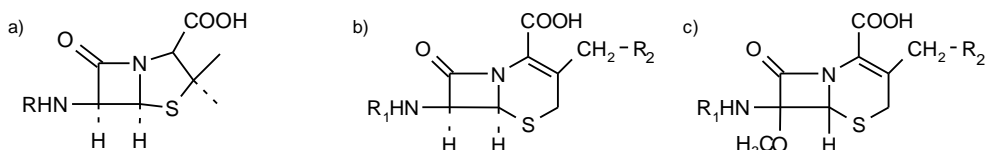
Biorąc pod uwagę budowę chemiczną najważniejsze antybiotyki podzielono na następujące klasy :

1. antybiotyki β -laktamowe,
2. antybiotyki polipeptydowe,
3. tetracykliny,
4. makrolidy,
5. antybiotyki polienowe.

Wykazano, iż antybiotyki działają na mikroorganizmy chorobotwórcze poprzez:

- a) zahamowanie biosyntezy istotnych składników ściany komórkowej, głównie mureiny (np. β -laktaminy),
- b) zakłócenie funkcji błon cytoplazmatycznych (np. makrolidy, antybiotyki polienowe),
- c) zablokowanie biosyntezy kwasów nukleinowych lub białek (np. tetracykliny, makrolidy).

Antybiotyki β -laktamowe (β -laktaminy) są drobnocząsteczkowymi związkami z pierścieniem β -laktamowym. Do klasy tej należą penicyliny, cefalosporyny i cefamycyny (Rys. 7).

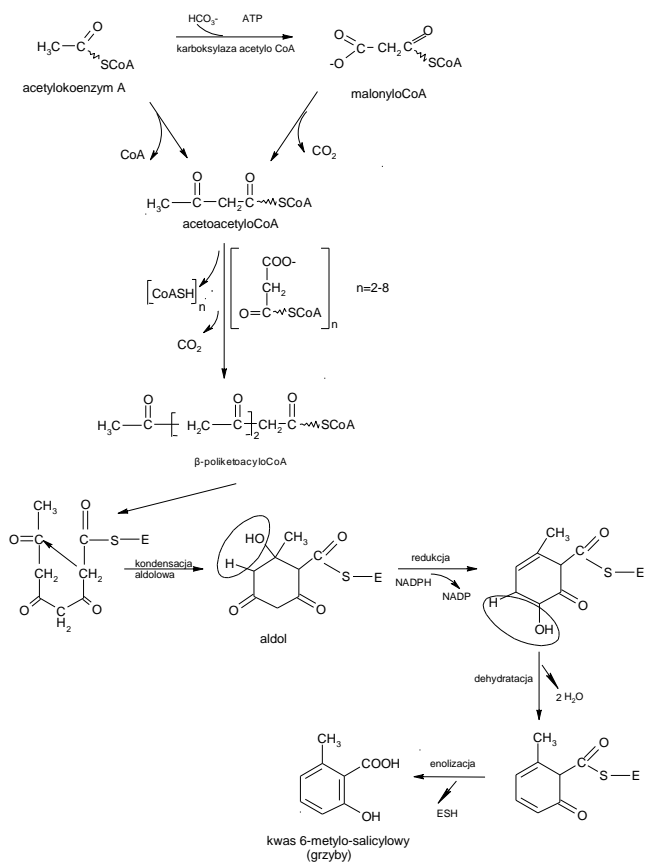


Rys. 7. Antybiotyki β -laktamowe: typ penicylin (a), cefalosporyn (b) i cefamycyn (c)

Penicyliny są syntetyzowane przez pleśniowe grzyby workowce z rodziny *Aspergillaceae*, głównie gatunki *Penicillium*, rzadko gatunki *Aspergillus*. Powstają z kwasu L-aminoadypinowego, L-seryny i L-waliny, poprzez di- oraz tripeptydy i posiadają pierścień tiazolidynowy z azotem i siarką oraz pierścień β -laktamowy. Poszczególne penicyliny różnią się budową rodnika R. Penicylina G ($\text{R}=\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CO-}$) bardzo silnie hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich (gronkowców, paciorkowców), niektórych Gram-ujemnych (pseudo- i meningokoków), bakterii beztlenowych (laseczek tężca), krętków kiły. Jest mało toksyczna, ale wiele bakterii chorobotwórczych nabywa oporność polegającą na wydzielaniu penicylinazy (β -laktamaza) rozkładającej ten antybiotyk. Cefalosporyny i cefamycyny wytwarzane przez szczepy *Cephalosporium sp.* i *Emericellopsis sp.* są mało toksyczne i odporne na działanie penicylinazy, ale silnie alergizujące. Cefalometryn A syntetyzowana przez *Streptomyces clavigerus* i *S. lactamodurans* ma podobne działanie jak penicyliny. Ponadto jest stosowana w zakażeniach spowodowanych bakteriami penicyliinoopornymi.

Antybiotyki polipeptydowe są syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Bacillus*. Ich masa cząsteczkowa wynosi 1.000-2.000. Generalnie nie są one wchłaniane w jelitach ani rozkładane przez peptydazę jelitową, dlatego są podawane doustnie do leczenia zakażeń jelitowych. Przykładowym antybiotykiem tej klasy jest klastyna wytwarzana przez *Bacillus colistinus*, a działająca głównie na bakterie Gram-ujemne (*Escherichia coli*).

Pozostałe trzy klasy antybiotyków to poliketydy powstające na szlaku poliketydowym zachodzącym głównie w roślinach niższych, grzybach i mikroorganizmach, a bardzo rzadko w roślinach wyższych. Rozpoczyna go acetylokoenzym A (Rys. 8). Pierwsze reakcje prowadzące poprzez malonylo-CoA do acetoacetylo-CoA są wspólne z ze szlakiem biosyntezy kwasów tłuszczowych. Po kondensacji, w tym szlaku, nie następuje redukcja grup ketonowych, jak ma to miejsce podczas biosyntezy kwasów tłuszczowych, ale przyłączenie kolejnej jednostki dwu-



Rys. 8. Schemat biosyntezy kwasu 6-metylosalicylowego na szlaku poliketydowym

węglowej z malonylo-CoA. Kondensacja taka obejmuje od 4 do 10 jednostek dając w efekcie końcowym β -poliketokwas połączony z białkowym nośnikiem acylowym (ACP). Wolne poliketokwasy nie występują w komórce, ponieważ są nietrwałe. W czasie odłączania od białka następuje ich stabilizacja poprzez pojedynczą lub wielokrotną cyklizację.

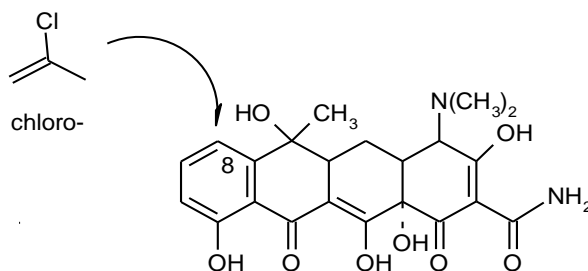
Przebieg tego szlaku wyraźnie wskazuje, że jest on starszym szlakiem niż szlak kwasów tłuszczowych.

Najprostsze poliketydy zbudowane z 8 atomów węgla mogą ulegać przekształceniu do związku aromatycznego. I tak np. w wyniku kondensacji aldolowej zachodzącej gdy poliketyd jest jeszcze połączony z kompleksem enzymatycznym,

powstaje wiązanie między węglem drugim i siódmym z jednoczesną redukcją grupy ketonowej. Następnie zachodzi redukcja grupy ketonowej przy węglu C-5, odłączenie od enzymu powodujące cyklizację do sześciowęglowego pierścienia i podwójna dehydratacja prowadząca do powstania 2 wiązań nienasyconych w pierścieniu. W wyniku enolizacji tj. wewnątrzcząsteczkowego przesunięcia wiązania podwójnego, powstaje aromatyczny kwas 6-metylosalicylowy. Jest rzeczą ciekawą, iż w roślinach wyższych kwas salicylowy powstaje na zupełnie innym szlaku - na szlaku kwasu szikimowego.

Na szlaku poliketydowym powstają 3 klasy antybiotyków wytwarzane przez promieniowce (*Streptomyces sp.*) - tetracykliny, makrolidy i antybiotyki polienowe.

Tetracykliny są zbudowane z czterech skondensowanych pierścieni sześcioczłonowych z grupami ketonowymi, hydroksylowymi, dimetyloaminową czy iminową. Najbardziej znane to tetracyklina czy chlorotetracyklina



Rys. 9. Struktura tetracykliny

(Rys.9) (Aureomycyna). Tetracykliny, podawane doustnie i w iniekcjach, mają szeroki zakres aktywności, bowiem działają zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne oraz na niektóre wirusy hamując rybosomalną biosyntezę białek. Przy dłuższym stosowaniu niszczą florę bakteryjną jelit, ale nie wykazują działania alergizującego.

Makrolidy są zbudowane z 12 – 16-członowego pierścienia laktonowego połączonego wiązaniem O-glikozydowym z pojedynczą cząsteczką deoksycukru lub aminocukru. Najważniejszym przedstawicielem tej klasy jest erytromycyna (Rys.10) wytwarzana przez *Streptomyces erythreus*. Zawiera dwa cukry kladinozę i dezozaminę. Jest inhibitorem biosyntezy białka, a działa głównie na bakterie Gram-dodatnie. Podawana doustnie w postaci stearynianu czy glukoheptonianu wchłania się powoli dopiero w jelitach.

który w wyniku działania reduktazy HMG-CoA w dwustopniowej reakcji przekształca się w mewalonian – związek występujący tylko w tym szlaku, co spowodowało, iż szlak ten nazwano szlakiem kwasu mewalonowego (MVA).

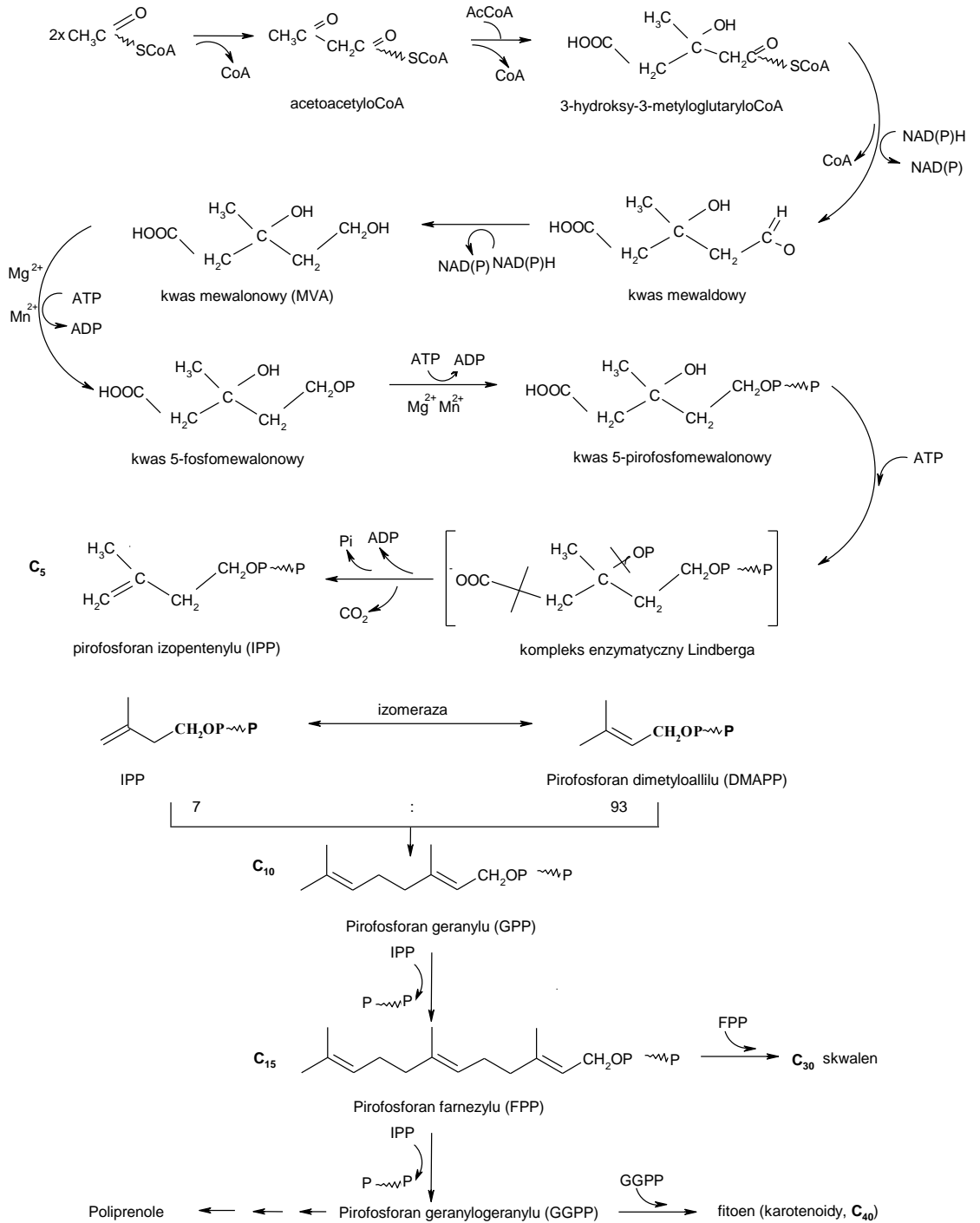
Kwas mewalonowy pod wpływem działania dwóch kinaz i enzymatycznego kompleksu Lindberga przekształca się w pięciowęglowy (C_5) pirofosforan izopentenyłu (IPP) i jego izomer pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP). Oba powstałe izomery są „cegiełkami” budującymi wszystkie isoprenoidy (terpenoidy). Łącząc się ze sobą (kondensacja typu „ogon-głowa”) przekształcają się w dziesięciowęglowy pirofosforan geranylu (GPP), który kondensując, według tego samego mechanizmu, z kolejną cząsteczką pirofosforan izopentenyłu tworzy piętnastowęglowy pirofosforan farnezyłu (FPP), ten zaś, po przyłączeniu następnej cząsteczki pirofosforan izopentenyłu przekształca się w dwudziestowęglowy pirofosforan geranylogeranylu (GGPP).

Kolejne kondensacje z pirofosforan izopentenyłu prowadzą do powstawania dłuższych o 5 atomów węgla łańcuchowych związków terpenowych. W ten sposób powstają kolejno: monoterpeny (C_{10}), seskwiterpeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}), sestraterpeny (C_{25}), triterpeny (C_{30}), tetraterpeny (C_{40}) i politerpeny (C_{45} , C_{50} , C_{55} , C_{60} , itd. itd. itd.). W każdej z tych grup obok związków o budowie łańcuchowej występują związki cykliczne. Pierścienie skondensowane lub nieskondensowane mogą być zbudowane z różnej liczby atomów węgla. Ponadto terpeny zarówno łańcuchowe jak i cykliczne bardzo często zawierają różnego typu tlenowe grupy funkcyjne - wolne lub związane.

Na szlaku biosyntezy izoprenoidów zachodzi jeszcze jeden typ kondensacji zwany kondensacją typu „ogon-ogon”, kiedy to dwie identyczne cząsteczki np. pirofosforanu farnezyłu czy pirofosforanu geranylogeranylu łączą się ze sobą tworząc odpowiednio trzydziestowęglowy skwalen (C_{30}) lub czterdziestowęglowy fitoien (C_{40}).

Skwalen ulega przekształceniu do 2,3-oksydoskwalenu w reakcji wymagającej udziału O_2 i NADPH, a następnie, w roślinach ulega cyklizacji w zależności od enzymu, do teracyklicznych lub pencyklicznych triterpenów różnego typu.

Praktycznie w każdej grupie terpenów znajdują się związki posiadające właściwości farmakologiczne i lecznicze. Zostaną one pokrótce omówione w kolejności wzrastającej liczby atomów węgla.



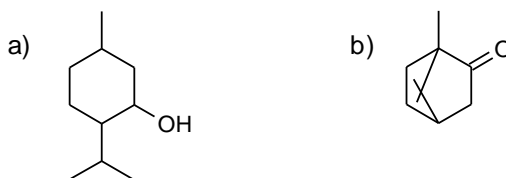
Rys. 12. Schemat szlaku biosyntezy izoprenoidów

Monoterpeny

Monoterpeny wywodzą się z pirofosforanu geranylu i mogą być acykliczne albo mono-, di-, a nawet tri cykliczne oraz posiadać różne tlenowe grupy funkcyjne (hydroksylowe, aldehydowe, ketonowe). Jako substancje lotne występują głównie w olejkach eterycznych w rodzinach *Pinaceae*, *Apiaceae*, *Lauraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae* i in., wydzielanych z surowców przez destylację z parą wodną.

Olejki eteryczne zawierające głównie monoterpeny to olejek terpentynowy, sosnowy, kosodrzewinowy, jodłowy, miętowy, rozmarynowy, lawendowy, kminkowy, kolendrowy, jałowcowy, eukaliptusowy, różany, cytrynowy. Mają one działanie drażniące błony śluzowe i skórę, są stosowane zewnętrznie w postaci mazideł, maści i plastrów rozgrzewających, do inhalacji dróg oddechowych jako środki wykrztuśne oraz wewnętrznie jako środki moczopędne, żółciopędne oraz leki przeciwskurczowe.

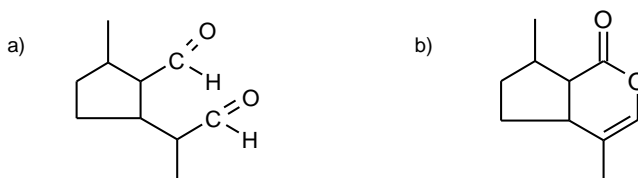
Najczęstsze zastosowanie w postaci czystych związków w preparatach recepturowych mają mentol i kamfora (Rys. 13).



Rys. 13. Struktury mentolu (a) i kamfory (b)

M e n t o l - monoalkohol o chłodzącym smaku jest izolowany z olejku mięty pieprzowej *Mentha piperita* lub *M. arvensis* i stosowany w roztworach, płynnych pudrach oraz maściach jako środek przeciwświądowy, a wewnętrznie w preparatach żółciopędnych i dezynfekujących drogi żółciowe. Wraz z innymi monoterpenami wchodzi w skład Terpicholu, Rawacholu, Terpinexu, Rowatinexu. **K a m f o r a** jest ketonem dicyklicznym otrzymywanym głównie z olejku *Cinnamomum camphora* i liści rozmarynu, a stosowanym zewnętrznie do nacierania w bólach reumatycznych, neuralgicznych itp.

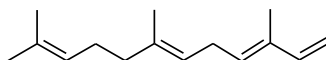
Ciekawą grupą są monoterpeny metylocyklopentanowe, zwane **i r y d o d a m i**, występujące w znacznych ilościach w roślinach z rodziny *Mentha* i różnych gatunkach *Nepeta*. Pełnią one rolę broni chemicznej rośliny oraz feromonów wabiących niektóre gatunki owadów. Związki te mają właściwości antybiotyczne, przeciwbakteryjne i grzybobójcze. W kocimiętce występują m.in. monocykliczny **i r y d o d i a l** i powstały z niego w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji lakton – **n e p e t a l a k t o n** (Rys. 14).



Rys. 14. Struktury irydodialu (a) i nepetalaktonu (b)

Seskwiterpeny

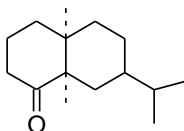
Seskwiterpeny, zarówno węglowodory jak i ich tlenowe pochodne, wywodzące się z pirofosforanu farnezyli, mają strukturę łańcuchową albo mono-, di-, tri- lub tetracykliczną. Występują w olejkach eterycznych i żywicach o właściwościach lotnych, szczególnie często u Nagozalążkowych oraz rodzinie *Asteraceae* (Okrytozalążkowe) towarzysząc monoterpenom. Przykładowe seskwiterpeny o znaczeniu farmakognostycznym to m. in. f a r n e z e n (Rys. 15) występujący w olejku rumianku pospolitego mający właściwości przeciwzapalne i jego pochodna tlenowa - f a r n e z o l,



Rys. 15. Struktura farnezeny

występująca w olejku eterycznym kwiatostanu lipy oraz olejku pomarańczowym o właściwościach uspakajających i rozkurczowych, a także potęgujących działanie leków psychotropowych.

Z kolei w a l e r a n o n (Rys. 16) występujący w gatunkach *Nordostachys jatamans* i *Valeriana officinalis* jest związkiem mało toksycznym mającym działanie

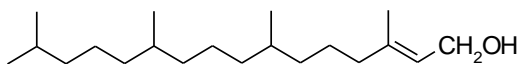


Rys. 16. Struktura waleranonu

hipotensyjne i uspakajające (*Tinctura Valerianae*).

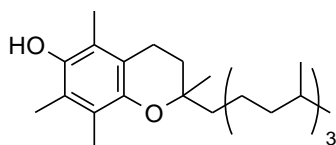
Diterpeny

Diterpeny mają budowę łańcuchową albo mono-, lub wielocykliczną i są węglowodorami lub ich tlenowymi pochodnymi. Najbardziej rozpowszechnionym, bo występującym we wszystkich roślinach zielonych w każdej cząsteczce chlorofilu, jest



Rys. 17. Struktura fitolu

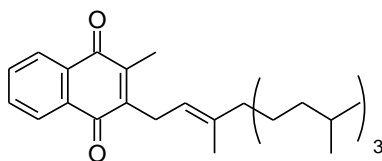
f i t o l (Rys. 17). Alkohol ten wchodzi także w skład heterozwiązków m.in. dwóch witamin tj. w i t a m i n y E (tokoferole) i w i t a m i n y K₁ (filochinon) i dlatego jest wykorzystywany do półsyntezy α -tokoferolu i filochinonu. W roślinach t o k o f e r o l e powstają w wyniku kondensacji aromatycznego kwasu homogentyzynowego i pirofosforanu fitylu, a następnie cyklizacji heteropierścienia. Dodatkowe grupy metylowe w pierścieniu aromatycznym są kolejno dołączane z S-adenozylometioniny. Największą aktywność biologiczną w organizmie człowieka wykazuje α - tokoferol (Rys. 18).



Rys. 18. Struktura α -tokoferolu

Objawami niedoboru witaminy E są zaburzenia w układzie nerwowym i mięśniowym (rozmiękczenie tkanki mózgowej, zanik mięśni szkieletowych), osłabienie spermatogenezy, zanik kanalików nasiennych, resorpcja płodu, bezpłodność. Dawka dzienna wynosi 10-15 mg. Źródłem tokoferoli są oleje roślinne (olej sojowy – 92-280 mg/100g), warzywa - głównie zielone (szpinak – 50 mg/100g), kielki zbóż (kielki pszenicy - 290 mg/100g). Awitaminozę leczy się przede wszystkim odpowiednią dietą, ale także podawaniem witaminy doustnie (octan α -tokoferolu w oleju słonecznikowym).

F i l o c h i n o n (Rys. 19) powstaje w roślinach w wyniku kondensacji naftochinolu z pirofosforanem fitylu. Objawem niedoboru witaminy K jest skaza krwotoczna (niemowlęta) i zmniejszenie krzepliwości krwi wynikające z obniżonego

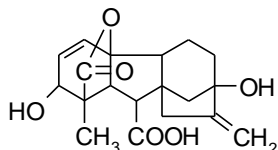


Rys. 19. Struktura filochinonu

poziomu protrombiny oraz niektórych innych czynników krzepnięcia krwi, bowiem do ich biosyntezy niezbędna jest ta witamina.

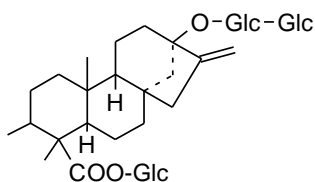
Dawka dzienna witaminy K_1 dla dorosłego człowieka wynosi 50-85 μ g. Głównym jej źródłem są warzywa zielone: jarmuż – 500 μ g/100 g, szpinak – 350 μ g/100 g, brukselka - 230 μ g/100 g, sałata 200 μ g/100 g. Awitaminozę leczy się przede wszystkim odpowiednią dietą, ale także podawaniem witaminy doustnie lub drogą pozajelitową.

Z kolei g i b e r e l i n y, diterpeny o szkielecie gibanu, (Rys. 20, np. GA_3) jedne z najważniejszych hormonów wzrostowych roślin wyższych, są stosowane w agrotechnice



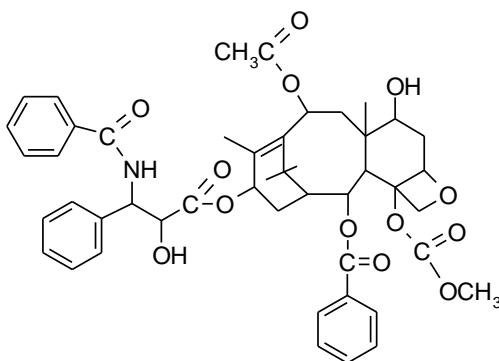
Rys. 20. Struktura kwasu giberelinowego (GA_3)

oraz w hodowlach tkankowych i zawiesinowych roślin leczniczych. Pokrewny glikozyd – s t e w i o z y d o szkielecie kaurenu (Rys. 21) izolowany z liści *Stevia rebaudiana* jest stosowany powszechnie w cukrzyicy jako namiastka cukru.



Rys. 21. Struktura stewiozydu

Jednym z najważniejszych osiągnięć fitochemii farmaceutycznej ostatnich lat jest wyizolowanie z kory drzewa *Taxus brevifolia* diterpenoidu o skomplikowanej budowie – p a k l i t a k s e l u (taksol) (Rys. 22), który okazał się być jednym z najbardziej efektywnych leków przeciwnowotworowych. Jest stosowany w nowotworach jajników,



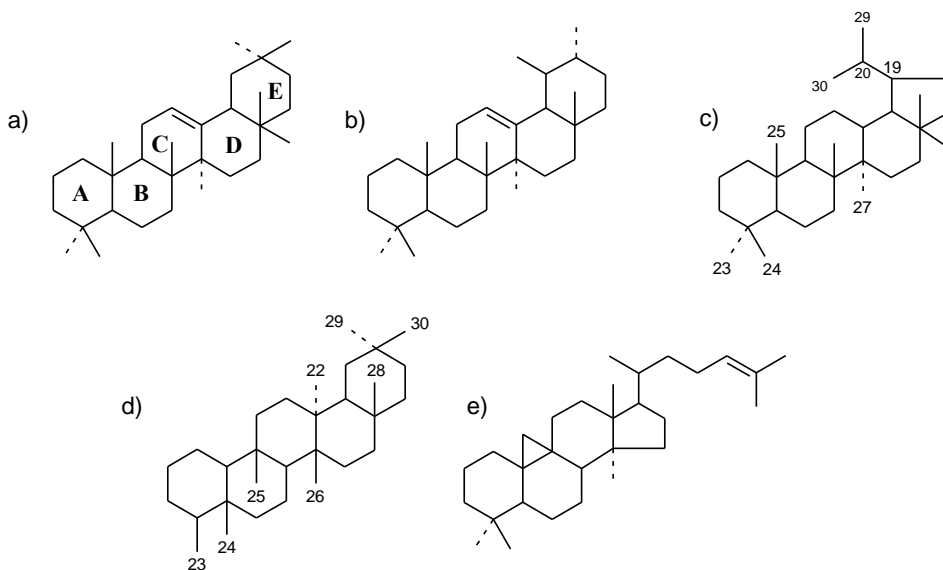
Rys. 22. Struktura paklitakselu

gruczołu krokowego oraz płuc, powodując całkowite lub częściowe remisje. Mechanizm jego działania polega na stabilizacji mikrotubuli i hamowaniu ich wtórnej depolimeryzacji do tubuliny - białka związanego z podziałami komórkowymi.

Obecnie paklitaxel jest pozyskiwany głównie z kultur *in vitro*.

Triterpeny cykliczne

Jedną z najliczniejszych grup roślinnych metabolitów wtórnych są cykliczne triterpenoidy. Powstają one ze skwalenu, który po utlenieniu do 2,3-oksydoskwalenu cyklizuje do układów penta- i znacznie rzadziej występujących - tetracyklicznych. W wyniku działania specyficznych cyklaz w organizmach roślinnych powstaje ponad dwadzieścia typów budowy triterpenów cyklicznych, spośród których najczęściej spotykane i najważniejsze pod względem farmakognostycznym przedstawiono na Rys. 23.



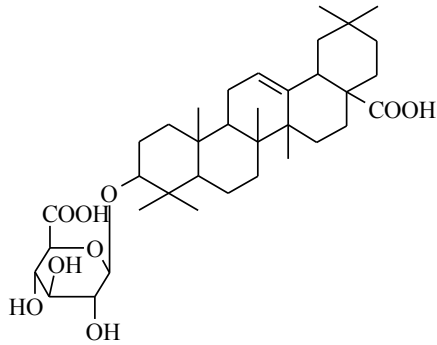
Rys. 23. Struktury triterpenów cyklicznych: oleananu (a), ursanu (b), lupanu (c), frydelanu (d), cykloartanu (e)

Poszczególne triterpeny cykliczne danego typu różnią się między sobą obecnością i położeniem wiązania podwójnego, grup metylenowych, liczbą i miejscem przyłączenia tlenowych grup funkcyjnych: -OH, -COH, =CO, -COOH i metoksylowych. Znaczna ich część jest aglikonem (sapogeniną) glikozydów zwanych saponinami lub saponozydami. Najczęściej występującymi cukrami w saponinach to glukoza, galaktoza, ramnoza, ksyloza, arabinoza, fukoza, kwas glukuronowy i galakturonowy. Czasami są one zmetylowane, zacetylowane, lub połączone z unikatowymi podstawnikami. Cukry te mogą być przyłączone jako pojedyncze cząsteczki lub jako proste albo rozgałęzione łańcuchy cukrowe do grupy hydroksylowej sapogenyiny tworząc glikozydy lub/i do grupy karboksylowej tworząc glikozydoestry.

Związki z jednym łańcuchem cukrowym noszą nazwę monodesmozydu, z dwoma – bisdesmozydu i bardzo rzadko występujące z trzema łańcuchami – tridesmozydu.

Najważniejszą charakterystyczną właściwością saponin jest zmniejszanie napięcia powierzchniowego, co ułatwia tworzenie się roztworów koloidalnych, zwiększanie rozpuszczalności w wodzie niektórych związków (małopolarnych), jednocześnie umożliwiając ich resorpcję przez błony śluzowe i błony komórkowe. Dlatego też, w praktyce farmaceutycznej są one powszechnie stosowane jako emulgatory. Ponadto mają zdolność do hemolizowania erytrocytów z różną efektywnością w zależności od ich budowy.

Największą aktywność hemolityczną wykazują glikozydy kwasu oleanolowego z wolną grupą -COOH w pozycji C-17 aglikonu. (Rys. 24).



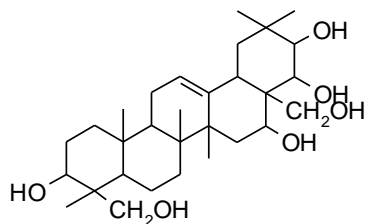
Rys. 24. Struktura 3-O-monoglukuronozydu kwasu oleanolowego

Kolejną charakterystyczną cechą saponin jest zdolność wiązania cholesterolu w płynach ustrojowych oraz steroli w ścianach drożdży i niektórych patogennych grzybów. Ponadto, są silnie toksyczne dla zwierząt zimnokrwistych, a dla ciepłokrwistych są toksyczne jedynie przy podaniu poza jelitowym. Przy podaniu doustnym toksyczność saponin w zależności od ich budowy wynosi ok. 50 – 100 mg/kg m.c.

Saponiny triterpenowe pentacykliczne występują szczególnie często w roślinach dwuliściennych w przeciwieństwie do saponin steroidowych, które występują głównie w roślinach jednoliściennych. Szczególnie duże ilości tych związków występują w wielu gatunkach rodzin: *Caryophyllaceae*, *Hippocatanaceae*, *Polygalaceae*, *Primulaceae*, *Araliaceae*. Liczne surowce farmakopealne stosowane w lecznictwie nawet od tysiącleci, takie jak korzeń lukrecji, pierwiosnka, mydlnicy, krzyżownicy, żeń-szenia, kwiat nagietka, dziewanny, ziele nawłoci, fiołka trójbarwnego, nasiona kasztanowca, liść bluszczu, kora kwilai zawierają saponiny triterpenowe jako główne składniki czynne.

Najczęstsze zastosowanie w postaci czystych związków w preparatach recepturowych mają:

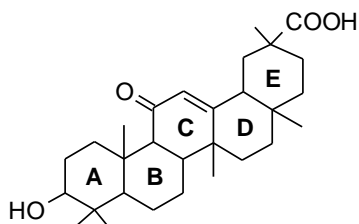
E s c y n a - główna saponina nasion kasztanowca (*Aesculus hippocastanum*) (ok. 13% s.m.) jest bidesmozydem protoescygeniny (Rys. 25) zawierającym cząsteczki



Rys. 25. Struktura protoescygeniny

glukozy, kwasu glukuronowego, ksylozy i/lub galaktozy. Jest stosowana w leczeniu żyłaków kończyn dolnych, hemoroidów, stanów wysiękowych oraz zapalenia żył w postaci preparatów doustnych (Neoparil), dożylnych (Reparil) i zewnętrznych (Venescin).

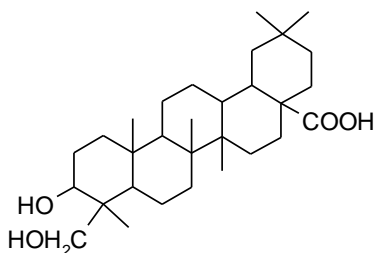
Gliceryzyna - saponina korzeni lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*) o bardzo słodkim smaku jest glikozydem kwasu glicyretynowego (Rys. 26) zawierającym 2 cząsteczki kwasu glukuronowego. Znalazła zastosowanie jako środek przeciwzapalny w



Rys. 26. Struktura kwasu glicyretynowego

chorobie wrzodowej żołądka, podobnie jak zateżony wyciąg wodny z korzeni (*Succus Liquiritiae*) oraz jako środek działający wykrztuśnie, spazmolitycznie i przeciwalergicznie. Ostatnio wykazano jej aktywność przeciwwirusową, polegającą na hamowaniu adsorpcji, m.in. wirusa HIV na powierzchni komórki oraz wnikania wirionu. Gliceryzyna wchodzi w skład licznych preparatów galenowych i fabrycznych.

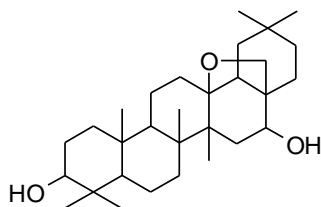
Hedersaponina C - saponina liści bluszczu (*Hedera helix*) (ok. 5% s.m.) jest bisdesmozydem hederageniny (Rys. 27) zawierającym 2 cząsteczki glukozy, ramnozy



Rys. 27. Struktura hederageniny

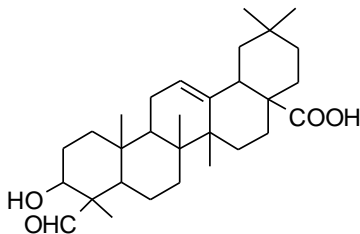
i arabinozy. Działa wykrztuśnie i spazmolitycznie wchodzi więc w skład niektórych preparatów przeciwkaszlowych stosowanych również w kokluszu (Bronchopect).

Prymulosaponina A - saponina występująca w korzeniach pierwiosnków (*Primula officinalis* i *Primula elatior*) jest glikozydem protoprymulageniny A (Rys. 28) zawierającym glukozę, galaktozę, ramnozę, arabinozę i kwas glukuronowy. Działa wykrztuśnie. Wchodzi w skład preparatu Tussipect.



Rys. 28. Struktura protoprymulageniny

Podobne działanie ma saponina z *Saponaria officinalis* - główna saponina korzeni mydlnicy (*Saponaria officinalis*) będąca glikozydem gypsogeniny (Rys. 29) zawierającym glukozę, galaktozę, ksylozę, ramnozę, fukozę i arabinozę. Wchodzi w skład preparatu Pectosol. Ponadto jest wykorzystywana jako środek pianotwórczy w produkcji szamponów i środków piorących.



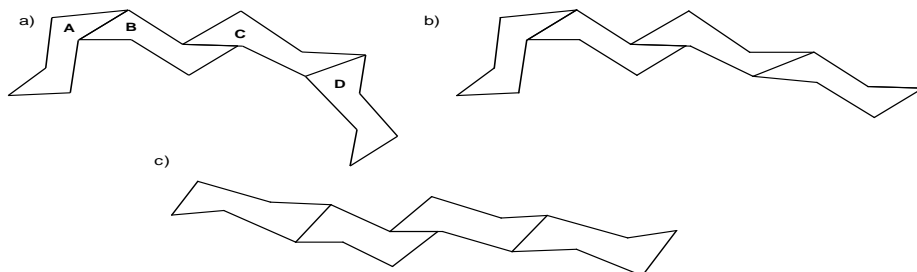
Rys. 29. Struktura gypsogeniny

Saponiny korzenia żeń-szenia, będące mieszaniną glikozydów kwasu oleanolowego oraz protopanaksydliu i protopanaksytriolu, są stosowane w geriatricy oraz stanach osłabienia fizycznego i psychicznego. Dostępne są liczne preparaty ze standaryzowaną ilością tych saponin takie jak Geriavit-Pharmaton czy Ginsana.

Triterpeny pentacykliczne oraz ich pochodne budzą duże zainteresowanie, gdyż ostatnio coraz częściej wykazywane jest ich działanie wiruso-, bakterio-, grzybo- i pierwotniakobójcze, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, przeciwnowotworowe, a także regulujące pracę serca i układu immunologicznego. Wyniki uzyskiwane w różnych laboratoriach pozwalają sądzić, że w przyszłości triterpenoidy pentacykliczne staną się ważną grupą leków w różnych schorzeniach.

Triterpeny steroidowe

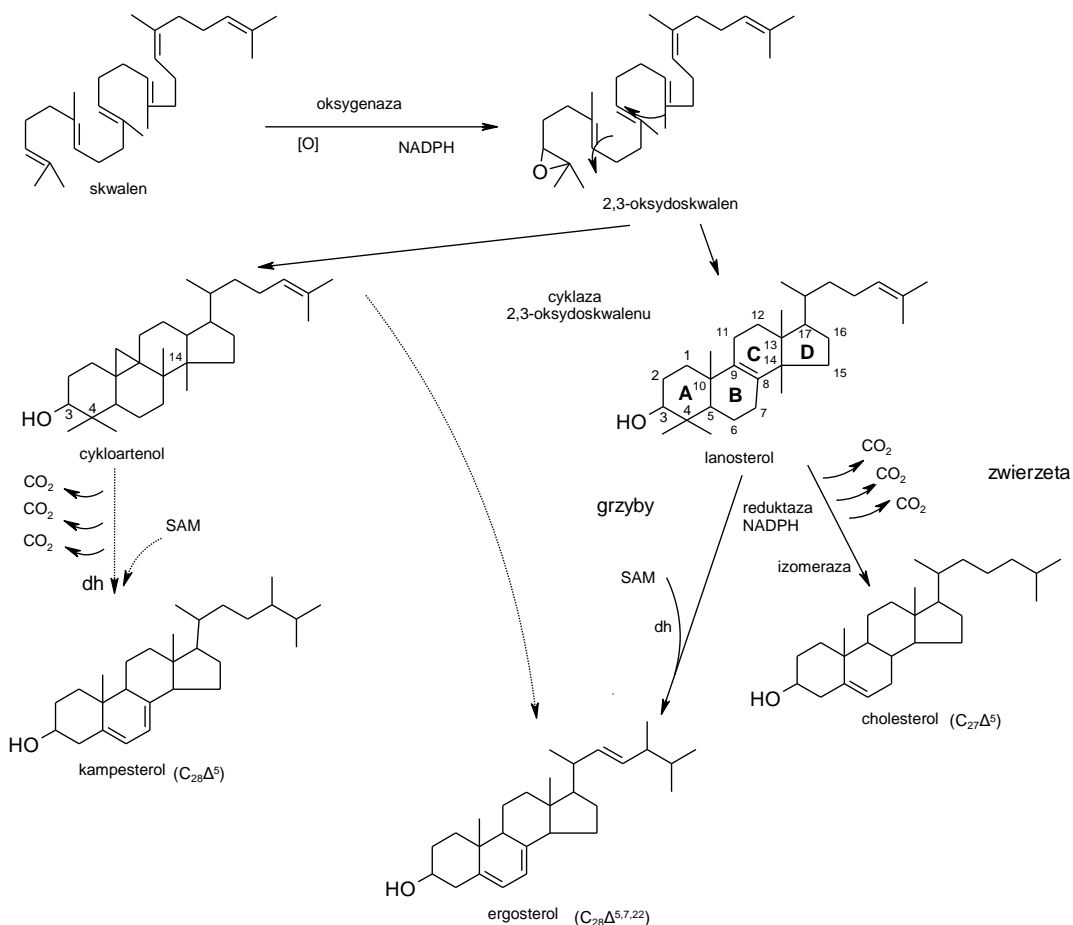
Steroidy roślinne posiadają cztery pierścienie sprzężone ze sobą, z czego trzy (A, B, C) są sześciowęglowe a jeden (D) - pięciowęglowy i różnią się stereochemią w zależności od układu pierścieni: steroidy o układzie *trans-trans-trans* (sterole), o układzie *cis-trans-trans* (kwasy żółciowe) i *cis-trans-cis* (kardenolidy) (Rys. 30).



Rys. 30. Układ pierścieni w szkieletach steroidowych: układ *cis-trans-cis* (a), układ *cis-trans-trans* (b), układ *trans-trans-trans* (c)

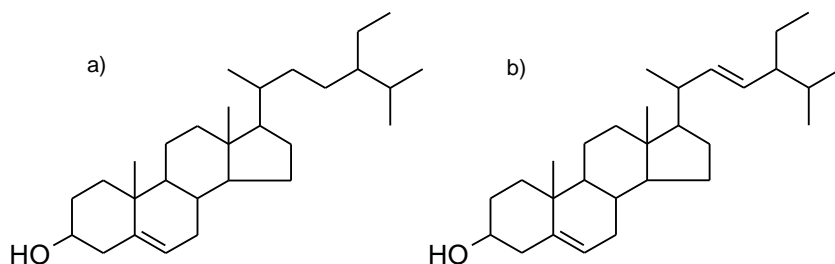
Sterole

Biosynteza cholesterolu (sterol zwierzęcy), ergosterolu (sterol grzybowy) oraz steroli roślinnych została dobrze poznana dzięki zastosowaniu izotopów promieniotwórczych takich jak ^{14}C i ^3H (Rys. 31). Powstają one ze skwalenu, który



Rys. 31. Schemat biosyntezy steroli

po utlenieniu do 2,3-oksydoskwalenu cykliczuje w roślinach do cykloartenolu, a u zwierząt i grzybów do lanosterolu. Z obu tych triterpenów są usuwane 3 grupy metylowe z pozycji C-4 i C-14 w postaci CO₂, po wcześniejszym stopniowym ich utlenieniu do grup karboksylowych. Chociaż mechanizm niezależnie od organizmu jest ten sam, to kolejność odłączania tych grup jest różna: u zwierząt i grzybów najpierw jest usuwana grupa metylowa z pozycji C-14, później C-4 α i C-4 β , a u roślin kolejno z C-4 α , C-14 i C-4 β . W wyniku tych reakcji powstają związki C₂₇. Późniejsze badania wykazały, że rośliny syntetyzują także ergosterol oraz cholesterol, z którego powstają różne roślinne związki steroidowe. Sterolami roślinnymi występującymi powszechnie w największych ilościach są stigmasterol i β -sitosterol - związki C₂₉ (Rys. 32). Dodatkowe atomy węgla w łańcuchu

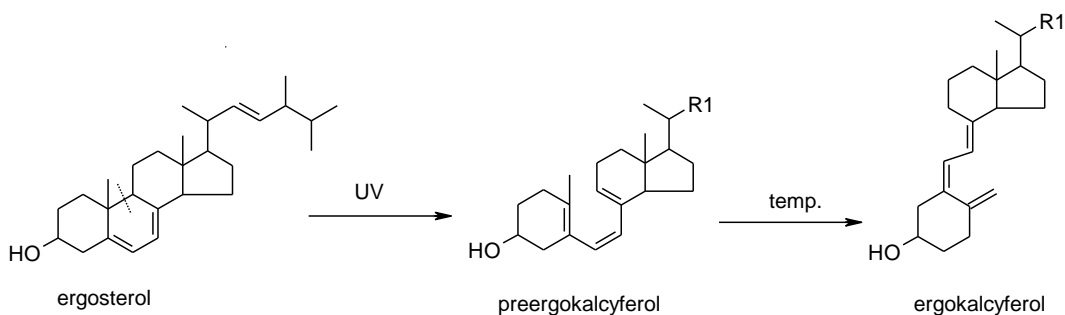


Rys. 32. Struktura sitosterolu ($C_{29}\Delta^5$) (a) i stigmasterolu (b) ($C_{29}\Delta^{5,22}$)

bocznym są kolejno dołączane z S-adenozylometioniny w ostatnich etapach biosyntezy. Sterole te występują obficie w oleju sojowym, w kiełkach zbóż i w wielu warzywach (burak, seler) i mają istotne znaczenie jako leki obniżające stężenia cholesterolu we krwi. Ponadto, wykazują działanie przeciwzapalne i przeciwgorączkowe, a β -sitosterol i jego glikozyd są czynnymi składnikami surowców roślinnych stosowanych w chorobach gruczołu krokowego (*Radix Urticae*, *Semen Cucurbitae*, Peposterol, Prosterol).

W i t a m i n a D

Wszystkie sterole zawierające dwa sprzężone podwójne wiązania przy C-5 i C-7 ($\Delta^{5,7}$ sterole) są prekursorami witaminy D. Dolny indeks przy literze D skazuje z jakiego sterolu powstała ta witamina. I tak, z ergosterolu powstaje witamina D_2 (ergokalciferol). W wyniku działania promieni UV o długości fali 275-300 nm następuje rozerwanie wiązania między C-9 i C-10 w pierścieniu B, a pod wpływem podwyższonej temperatury – izomeryzacja pierścienia A do ergokalciferolu (Rys. 33).



Rys. 33. Schemat powstawania witaminy D_2

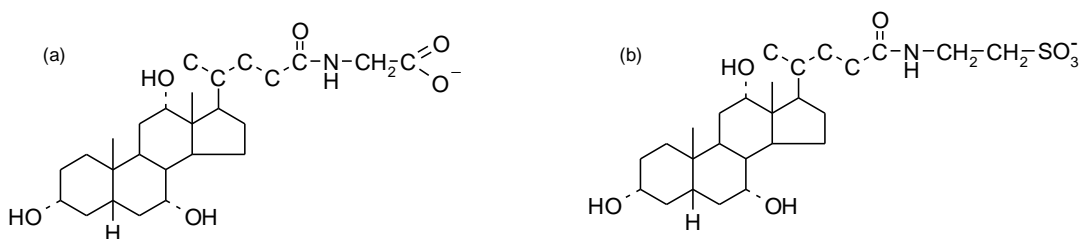
W ten sam sposób powstaje witamina D_3 (cholekalcyferol) z 7-dehydrocholesterolu w zewnętrznych warstwach skóry człowieka, jednak nie zawsze jej ilość jest wystarczająca, szczególnie w okresie ciąży i laktacji.

Witamina D przyspiesza wchłanianie jonów Ca^{++} w jelicie cienkim i reguluje proces mineralizacji organicznej tkanki kostnej, a jej niedobór prowadzi do krzywicy. Z kolei, nadmiar powoduje demineralizację kości, zwiększenie stężenia wapnia i fosforu w osoczu oraz nieodwracalne zwapnienie nerek i naczyń krwionośnych. Zapotrzebowanie

dzienne dorosłego człowieka wynosi ok. 600 j. m. czyli 15 μg , gdyż za jednostkę międzynarodową przyjęto 0,025 μg krystalicznej witaminy D₂. Najlepszym źródłem są: tran (1.500 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), ryby morskie (2 – 8,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), wątroba zwierząt (0,5 μg – 1,5 /100 g), żółtko jaja (0,67 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), masło (0,88 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). Surowcem farmakognostycznym jest olej wątluszczowy (*Oleum Jecoris Aselli*), oraz preparaty handlowe witaminy D uzyskanej z naświetlanego promieniami UV ergosterolu lub 7-dehydrocholesterolu.

Kwasy żółciowe

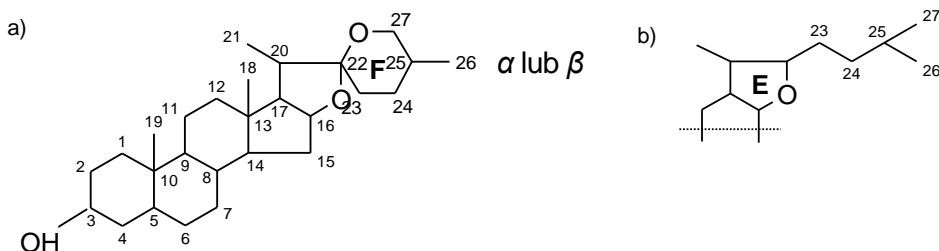
Kwasy żółciowe (Rys. 34) są steroidami C₂₄ o skróconym łańcuchu bocznym, występującymi w żółci zwierzęcej. W wątrobie z cholesterolu poprzez wprowadzanie grup hydroksylowych, redukcję pierścienia B, zmianę konfiguracji pierścienia A z *trans* w *cis* oraz skrócenie łańcucha bocznego powstają k w a s y: c h o l o w y, d e z o k s y c h o l o w y, c h e n o d e o k s y c h o l o w y, u r s o d e o k s y c h o l o w y. Łączą się one z grupą aminową glicyny lub tauryny tworząc sole kwasów żółciowych - glikocholany czy taurocholany, które posiadając zarówno polarne jak i nie polarne rejony (cząsteczki amfipatyczne) są detergentami emulgującymi lipidy pokarmowe, a co za tym idzie ułatwiający wchłanianie także witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K). Do celów terapeutycznych kwasy żółciowe i ich sole uzyskuje się z żółci wołowej i stosuje z dobrym efektem w kamicy żółciowej. Preparaty zawierające dodatkowo lecytynę działają żółciopędnie.



Rys. 34. Struktury soli kwasów żółciowych: glikocholanu (a) i taurylocholanu (b)

Saponiny steroidowe

Sapogeniny saponin steroidowych najczęściej mają szkielet spirostanu, rzadziej furostanu (Rys. 35) i występują głównie u roślin jednoliściennych w rodzinach *Dioscoreaceae*, *Liliaceae* *Agavaceae*, *Palmae*, *Poaceae* oraz rzadko u dwuliściennych



Rys. 35. Struktury saponin steroidowych: szkielet spirostanu (a) i furostanu (b)

w rodzinach *Scrophulariaceae*, *Fabiaceae*, *Solanaceae*.

Poszczególne saponogeniny różnią się między sobą liczbą i pozycją grup tlenowych oraz obecnością lub brakiem wiązania podwójnego w pierścieniach, a także izomerią.

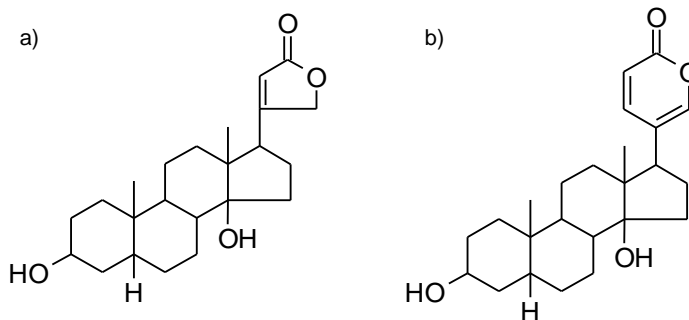
Saponiny o szkielecie spirostanu zawierają cząsteczkę cukru albo łańcuch cukrowy połączone wiązaniem glikozydowym z grupą -OH przy C-3, natomiast saponiny o szkielecie furostanu - z grupami -OH przy C-3 i C-26. Saponiny steroidowe mają właściwości hemolityczne, przeciwgrzybiczne i hipocholesteremiczne istotne w zapobieganiu miażdżycy. Podawane są także inne właściwości farmakologiczne niektórych saponin takie jak bakteriobójcze czy cytotoksyczne, ale nie mają one jeszcze praktycznego zastosowanie z wyjątkiem ruskogeniny (szkielet spirostanu) występującej w *Ruscus aculeatus*, która działa przeciwzapalnie, przeciwwysiękowo i uszczelniająco naczynia kapilarne.

Z kolei, saponogeniny takie jak diosgenina z *Dioscorea tocoro*, czy sarsapogenina i smilagenina z *Yucca sp.* są wykorzystywane jako półprodukty do syntezy hormonów sterydowych.

Surowcami o znaczeniu przemysłowym są pędy *Agave sisalana*, bulwy różnych gatunków *Dioscorea sp.* oraz niektóre gatunki rodzaju *Solanum*.

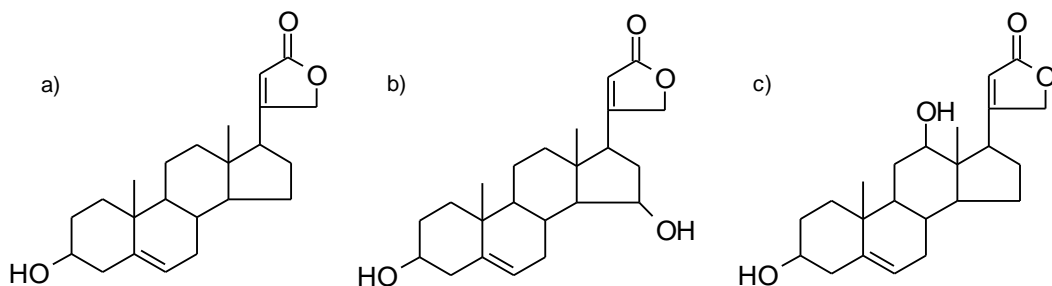
Kardenolidy i bufadienolidy

Kardenolidy i bufadienolidy (Rys. 36) są odpowiednio C_{23} i C_{24} steroidami o konfiguracji pierścieni A/B *cis*, pierścieni B/C *tran*, a C/D *cis* z dodatkowym pięcio- lub sześcioczłonowym nienasyconym pierścieniem laktonowym przy węglu C-17. Powstają z



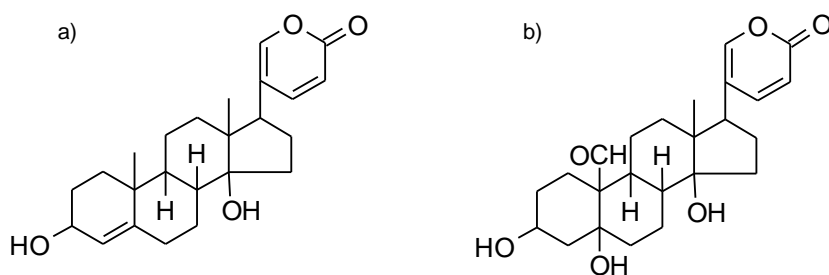
Rys. 36. Struktura kardenolidów (a) i bufadienolidów (b)

cholesterolu, którego łańcuch boczny ulega skróceniu, co prowadzi do powstania jednostki C_{21} – pregnenolonu. Związek ten w przypadku kardenolidów ulega kondensacji z jednostką C_2 , pochodzącą z acetylo-CoA, a następnie dehydratacji i wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji przekształcając się w digitoksygeninę, gitoksygeninę, digoksygeninę i in. (Rys. 37), a w przypadku bufadienolidów z jednostką C_3 pochodzącą



Rys. 37. Struktura digitoksygeniny (a), gitoksygeniny (b) i digoksygeniny (c)

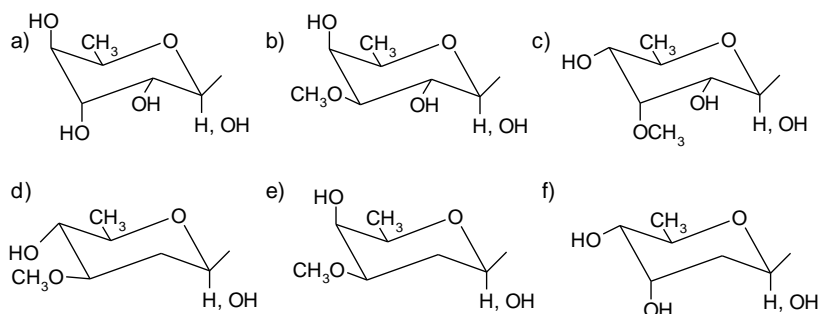
z propionyl-CoA przekształcając się w scylareninę, helebrygeninę i in. (Rys. 38).



Rys. 38. Struktura scylareniny (a) i helebrygeniny (b)

Poszczególne kardenolidy i bufadienolidy różnią się liczbą i miejscem przyłączenia grupy hydroksylowej, obecnością grupy metoksyłowej, aldehydowej czy ketonowej. Występują one zarówno w roślinach jedno- jak i dwuliściennych, przy czym nigdy nie występują razem. Wszystkie są glikozydami zawierającymi od jednej do pięciu reszt cukrowych w cząsteczce (głównie 6- lub 2,6-deoksycukry) (Rys. 39).

Podstawowym źródłem glikozydów kardenolidowych, zwanych glikozydami nasercowymi, są różne gatunki *Digitalis sp.*, *Convallaria majalis*, *Adonis vernalis*, *Nerum oleander*, a glikozydów bufadienolidowych głównie *Bullbus scillae*.



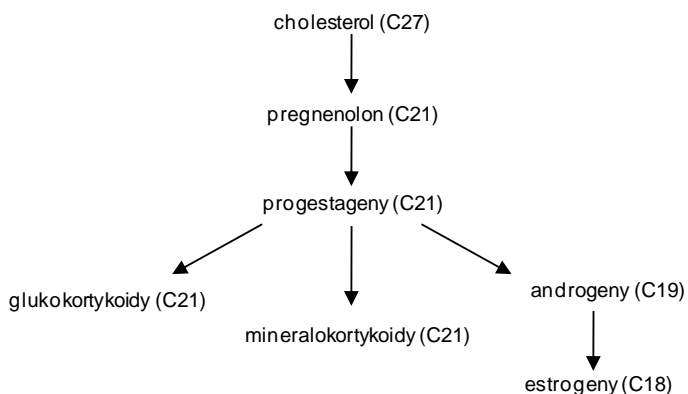
Rys. 39. Cukry występujące w glikozydach nasercowych: L-ramnoza (a), D-digitaloza (b), D-cymaroz (c), D-oleandroza (d), D-diginoz (e), D-digitoksoza (f)

Glikozydy nasercowe mają wybitne znaczenie farmakologiczne, gdyż są ciągle najcenniejszymi lekami w niewydolności mięśnia sercowego. Warunkiem

kardiotonicznego działania glikozydów jest obecność nienasyconego pierścienia laktonowego przy węglu C-17 w położeniu β oraz co najmniej dwóch grup OH położeniu β przy węglu C-3 i C-14. Budowa części cukrowej oraz różnice w budowie aglikonu wpływają jedynie na stopień wchłaniania z przewodu pokarmowego, zdolność wiązania z albuminami surowicy krwi, szybkość działania i wydalania oraz na akumulowanie. Skrajnymi przykładami są dobrze wchłaniana, powoli wydalana, długotrwale działająca, w znacznym stopniu kumulowana *digitekyna* i bardzo słabo wchłaniana, szybko działająca i szybko wydalana *strofantyna* G. Działanie glikozydów nasercowych polega na wzmacnianiu siły skurczu mięśnia sercowego, przedłużaniu fazy diastolicznej między skurczami, zwalnianiu tętna, a ich mechanizm działania jest związany z transportem wewnątrzkomorkowym jonów potasowych, sodowych i wapniowych. Kardenolidy są podawane doustnie lub dożylnie według ściśle ustalonego dawkowania, gdyż przedawkowanie prowadzi do zatrucia a nawet śmierci. W postaci izolowanych związków stosuje się glikozydy z *Digitalis purpurea* i *Digitalis lanata* - *digitekynę*, *acetyldigitekynę*, *lanatozyd C*, *strofantynę K* i kilka innych w licznych preparatach farmaceutycznych.

Hormony steroidowe

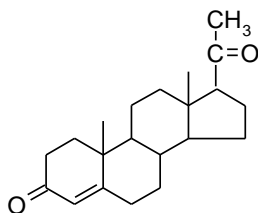
Cholesterol jest prekursorem pięciu klas hormonów steroidowych (Rys. 40). W pierwszym etapie zostaje usunięty sześciowęglowy łańcuch boczny, co prowadzi do powstania pregnenolonu, sterydu zbudowanego z 21 atomów węgla, z którego powstają progestageny (C₂₁), a z nich hormony kory nadnerczy (C₂₁) (glukokortykoidy i mineralokortykoidy), oraz w wyniku dalszego skracania łańcucha bocznego, hormony płciowe – androgeny (C₁₉) i estrogeny (C₁₈).



Rys. 40. Schemat powstawania hormonów steroidowych

Prostageny

Progesteron (Rys. 41), zwany także hormonem ciążowym, przygotowuje błonę śluzową macicy do implantacji zapłodnionego jaja i jest niezbędny do utrzymania ciąży. Syntetyzowany jest w drugiej połowie cyklu, natomiast podany wcześniej hamuje owulację i dlatego jest stosowany, podobnie



Rys. 41. Struktura progesteronu

jak pochodne syntetyki, jako środek antykoncepcyjny. Musi być podawany drogą pozajelitową, gdyż w wątrobie ulega redukcji do nieczynnego pregnan-3,20-diolu.

Hormony kory nadnerczy

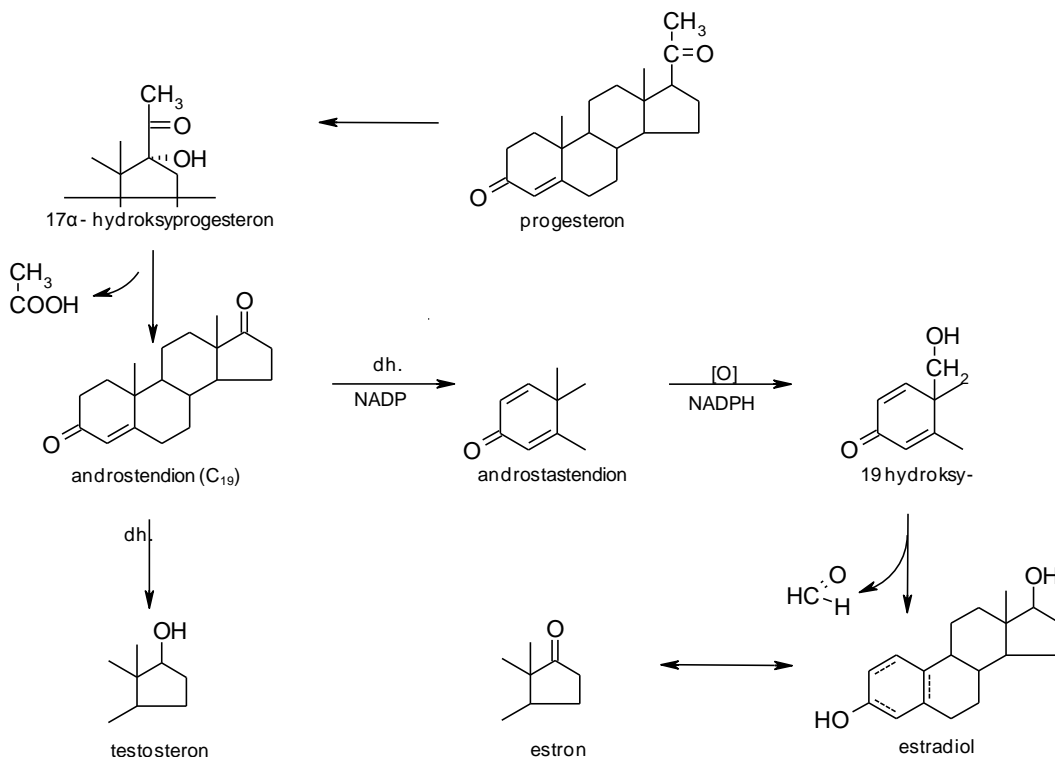
Kortykoidy powstają z progesteronu w komórkach kory nadnerczy i pełnią istotną funkcję w regulacji metabolizmu ustroju. Glukokortykoidy pobudzają glukoneogenezę i tworzenie glikogenu oraz zwiększają rozkład tłuszczu i białek, natomiast mineralokortykoidy zwiększają resorpcję Na^+ i wydzielanie K^+ i H^+ przez kanaliki nerkowe. Nadczynność kory nadnerczy prowadzi do nadmiernego wydzielania kortyzolu i aldosteronu czemu towarzyszy uderzająca utrata białka, hiperglikemia i glikozuria oraz zatrzymanie wody (obrzęki), osłabienie mięśni (wyciek potasu), nerwowość i zaburzenia psychiczne. Z kolei niedobór kortykoidów prowadzi do utraty Na^+ , Cl^- i wody, co wpływa na zwiększenie lepkości krwi, zmniejszenie rzutu serca, obniżenie ciśnienia krwi, zwiększenie pobudliwości układu nerwowego.

Glukokortykoidy są stosowane jako leki przeciwzapalne (gościec, artretyzm) i przeciwalergiczne wywołujące jednak niepożądane skutki uboczne.

Hormony płciowe

Androgeny (hormony płciowe męskie) powstające głównie w jądrach, ale także w korze nadnerczy i wpływają na rozwój drugorzędowych męskich cech płciowych takich jak owłosienie płciowe, rozwój masy mięśniowej, mutacja, rozwój kanalików nasiennych i prostaty. Testosteron okazał się być niezbędnym do dojrzewania plemników. Łagodzi dolegliwości fizyczne i mentalne związane z jesienią życia mężczyzn oraz okresu przekwitania kobiet, służy jako pomocniczy lek raka sutka, raka mięśniówki macicy.

Estrogeny są syntetyzowane głównie w jajnikach, ale także w korze nadnerczy i jądrach. Są one jedynymi związkami aromatycznymi syntetyzowanymi w organizmach zwierzęcych i ludzkim (Rys. 42). Aromatyzacji ulega pierścień A progesteronu, co jest związane z utratą węgla C-19. Estrogeny są odpowiedzialne za rozwój drugorzędowych żeńskich cech płciowych takich jak owłosienie płciowe, ukształtowanie sylwetki, powiększenie macicy, rozwój sutków i przewodów mlecznych, a także za prawidłowy przebieg cyklu menstruacyjnego. Wpływają na metabolizm lipidów i mineralizację tkanki kostnej. Łagodzi dolegliwości związane z okresem przekwitania kobiet (Estraderm TTS).

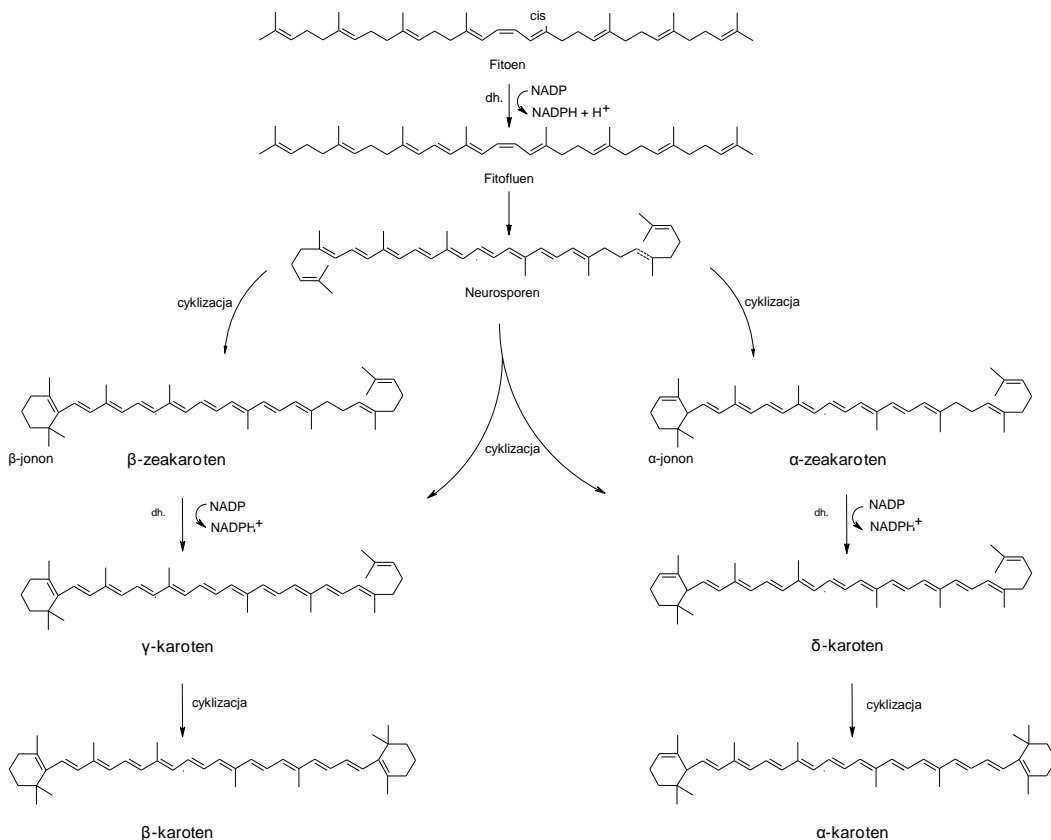


Rys. 42. Biosynteza hormonów płciowych

Tetraterpeny

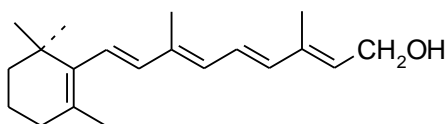
Do tej grupy izoprenoidów należą czterdziestowęglowe żółte, pomarańczowe, a nawet czerwone barwniki roślinne zwane karotenoidami występujące w chromoplastach i nadające barwę kwiatom, owocom, a czasami korzeniom. Występują także w chloroplastach towarzysząc chlorofilowi w kompleksach antenowych pochłaniających światło o innej długości fali. W skład karotenoidów wchodzi węglowodory - k a r o t e n y oraz ich tlenowe pochodne – k s a n t o f i l e. Biosynteza karotenoidów zachodzi w plastydach, w których jednostka pięciowęglowa powstaje na szlaku Rohmera. Kolejne przyłączenie IPP prowadzi do powstania GGPP, który łącząc się z symetryczną jednostką GGPP (kondensacja typu „ogon-ogon”) przekształca się w f i t o e n – pierwszy karoten, z którego w wyniku stopniowego wprowadzania podwójnych wiązań powstają kolejne karoteny (Rys. 43). Niektóre karoteny łańcuchowe cyklizują na jednym lub obu końcach cząsteczki, tworząc pierścień sześciowęglowy z jednym wiązaniem podwójnym sprzężonym (pierścień β-jononu) lub niesprzężonym (pierścień α-jononu) z wiązaniami nienasyconymi w łańcuchu.

W medycynie wykorzystywany jest głównie β - k a r o t e n w leczeniu niektórych fotodermataz jako czynnik ochraniający skórę. Ostatnio wykryto jego właściwości antykancerogenne i są zalecane diety zawierające duże ilości tego karotenu (marchew, jarzyny zielone) w prewencji nowotworowej. Dla człowieka β-karoten z dwoma pierścieniami β-jononu, a także inne karoteny zawierające jeden pierścień



Rys. 43. Schemat powstawania karotenoidów

β-jononu (α-karoten, γ-karoten), mają istotne znaczenie, gdyż są prowitaminami A. W wątrobie człowieka centralne wiązanie podwójne tych związków ulega oksydacyjnemu rozszczepieniu i powstają dwie albo jedna cząsteczka retinolu (witamina A) (Rys. 44).



Rys. 44. Struktura retinolu

Niedobór witaminy A hamuje wzrost, wywołuje brak odporności na infekcje, rogowacenie naskórka, porażenie śluzówki górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i układu moczowego oraz tzw. kurzą ślepotę (hemeralopia), kiedy to pręciki siatkówki tracą normalną wrażliwość na światło o niskim natężeniu.

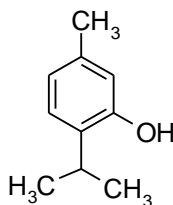
Bogatym źródłem witaminy A są produkty zwierzęce tj. mleko (130 g/100 g), masło (590 μg/100 g), wątroba (3.500 μg/100 g), tran (25.000 μg/100 g). Dzielne zapotrzebowanie dorosłego człowieka wynosi ok. 5.000 j.m. (1 j.m.= 0,3μg), a

przedawkowanie prowadzi do powiększenia wątroby, nadmiernej pobudliwości, osłabienia. Przy awitaminozie stosuje się dietę bogatą w β -karoten lub witaminę A albo podaje się preparaty z β -karotenem (Difrel) bądź z witaminą A (*Oleum Jecoris Aselli*).

Związki aromatyczne

Fenole

Fenole, określane w uproszczeniu jako związki C_6 , są pochodnymi mono-, di- czy trihydroksylowymi węglowodorów aromatycznych i często występują w olejkach eterycznych. Powstają na szlaku kwasu szikimowego bądź poliketydowego. Równie rozpowszechnione są ich glikozydowe pochodne, szczególnie w rodzinach *Salicaceae*, *Ericaceae*. Związki fenolowe wolne lub związane są substancjami czynnymi o właściwościach bakteriobójczych i dezynfekujących występującymi w wielu surowcach roślinnych stosowanych w lecznictwie (kora wierzby, liść mącznicy, brusznicy, ziele tymianku, macierzanki, kwiat tawuły, wrzосу, arniki). Tymol (Rys. 45), którego głównym źródłem jest *Trachyspermum copticum*, rzadziej tymianek, jest stosowany w stomatologii, kosmetyce, a także do leczenia grzybic skóry.



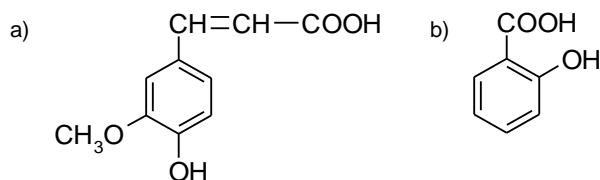
Rys. 45. Struktura tymolu

Z kolei gwajakol o właściwościach dezynfekujących i wykrztuśnych jest stosowany w preparatach przeciwkaszlowych (*Spirupus Guajacoli Comp.*).

Jednym z ważniejszych glikozydów fenolowych jest arbutyna (β -glukozyd hydrochinonu) występująca m.in. w liściach gruszy, ziele majeranku i lebiodki, która jest stosowana jako środek dezynfekujący drogi moczowe.

Kwasy aromatyczne i ich pochodne

Największe znaczenie mają kwasy benzoesowy (C_6) i cynamonowy (C_6-C_3) powstający z fenyloalaniny, gdyż są prekursorami hydroksykwasów będących czynnymi składnikami wielu surowców roślinnych. Mają właściwości cholerecyjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, immunotropowe oraz działają jako „wymiatacze” wolnych rodników ponadtlennokowych. Najbardziej znanym jest kwas salicylowy (*o*-hydroksybenzoesowy) (Rys. 46a), którego pochodny kwas acetylosalicylowy to aspiryna, powszechnie stosowany jako lek przeciwgorączkowy, przeciwbólowy, przeciwzapalny. Z kolei kwas ferulowy (hydroksymetoksycynamonowy) (Rys. 46b), występujący m.in. w żywiochach roślin z rodziny *Apiaceae* ma właściwości

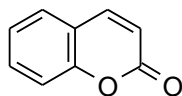


Rys. 46. Struktury kwasów aromatycznych: ferulowego (a) i salicylowego (b)

przeciwbakteryjne, ochronne dla wątroby i hamujące agregację płytek krwi.

Dimeryczna pochodna kwasu ferulowego – k u r k u m i n a występująca w korzeniach *Curcuma longa* wchodzi w skład preparatów stosowanych w chorobach wątroby i pęcherzyka żółciowego, ponieważ działa przeciwzapalnie i żółciopędnie (Solaren).

Kwas cynamonowy jest prekursorem k u m a r y n y (Rys. 47), wonnej substancji powstającej w zranionych tkankach podczas suszenia. W roślinach występują jej



Rys. 47. Struktura kumaryny

hydroksylowe, metoksyłowe i bardziej złożone pochodne oraz ich glikozydy. W lecznictwie mają zastosowanie jako leki rozszerzające naczynia wieńcowe (preparaty z aminka egipskiego), pobudzające repigmentację skóry, a także w łuszczycy (preparaty z aminka większego, Metoxalen).

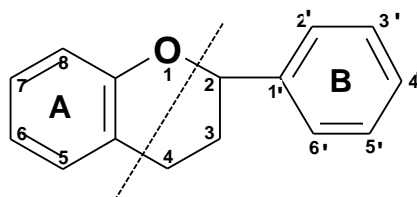
Niektóre z tych związków, jak chociażby kumaryna, są toksyczne, ale ciągle są stosowane w niewielkich stężeniach jako środki aromatyzujące.

Wśród związków polifenolowych ciekawą grupą są g a r b n i k i o dużej masie cząsteczkowej (500 – 3000) z licznymi grupami hydroksylowymi i o wyraźnie zróżnicowanej budowie. Na powierzchni błon śluzowych łączą się one trwale z białkami tworząc powłoki skoagulowanego białka i stąd wynikają ich właściwości ściągające i przeciwzapalne. Garbniki znalazły zastosowanie w stanach zapalnych błon śluzowych skóry, drobnych krwawieniach, obrzękach, oparzeniach, odmrożeniach, a wewnątrz - w biegunkach. Stanowią one również odtrutkę na alkaloidy tworząc z nimi nieodwracalne kompleksy.

Garbniki występują w znacznych ilościach w następujących surowcach farmakognostycznych: korze dębu, kłęczach pięciornika i dębianki, owocu borówki czernicy, liściu jeżyny. W stanie czystym stosowana jest t a n i n a, natomiast z surowców farmakopealnych otrzymuje się preparaty (Tormentiol, Hemorol) lub przygotowuje się napary do picia, okładów bądź kąpiele.

Flawonoidy

Flawonoidy są związkami o charakterze barwników szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym, o podstawowym szkielecie zbudowanym z dwóch pierścieni aromatycznych i łączącego je trójwęglowego fragmentu (C₆-C₃-C₆) (Rys. 48).



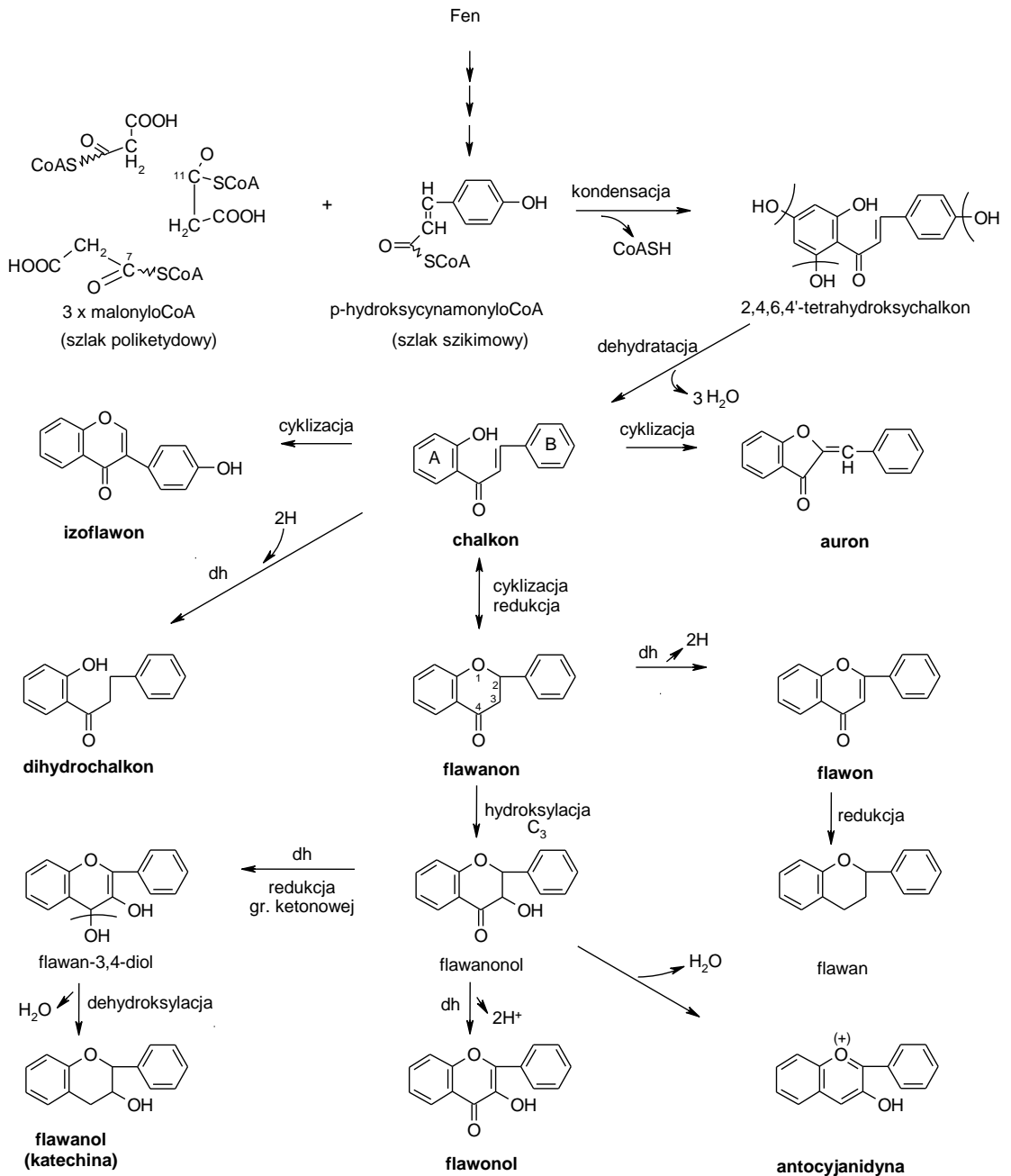
Rys. 48. Ogólny wzór flawonoidów

Pierścień A powstaje na szlaku poliketydowym, natomiast pierścień B wraz z trójwęglowym fragmentem z fenyloalaniny powstaje na szlaku kwasu szikimowego. Flawonoidy tworzą 12 klas różniących się budową fragmentu C₃, który może występować w postaci łańcucha lub heteropierścienia z atomem tlenu, sprzężonego z aromatycznym pierścieniem A.

Jako pierwszy powstaje chalcon, który jest prekursorem pozostałych klas flawonoidów (Rys. 49). Z kolei w każdej z klas poszczególne flawonoidy różnią się między sobą liczbą i miejscem występowania grup hydroksylowych w obu pierścieniach aromatycznych, do których bardzo często są dołączone cząsteczki cukrów prostych (1 - 5), rzadziej kwasów organicznych. Flawonoidy bardzo rzadko występują w glonach, porostach i mszakach. U jednoliściennych szczególnie często występują w rodzinie *Liliaceae*, zaś u dwuliściennych są bardzo rozpowszechnione, a zwłaszcza w rodzinach *Betulaceae*, *Polygonaceae*, *Ranunculaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Violaceae*, *Apiaceae*, *Primulaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*. Występują w wakuolach, chromo- i chloroplastach kwiatów, liści, rzadziej owocach, korze i tylko niekiedy w nasionach. Flawonoidy wszystkich klas oraz ich pochodne glikozydowe są bezbarwne lub żółte, za wyjątkiem antocyjanów, które są czerwone, fioletowe lub niebieskie. Wszystkie mają charakterystyczne widma UV/VIS, co jest wykorzystywane do ich identyfikacji.

Działanie farmakologiczne flawonoidów jest następujące: uszczelniające i wzmacniające ściany naczyń kapilarnych, przeciwwagragacyjne, diuretyczne, spazmolityczne, przeciwzapalne, przeciwwrzdowe, przeciwalergiczne, chroniące wątrobę, „wymiatające” wolne rodniki, odtruwające poprzez wiązanie się z metalami m.in. z miedzią.

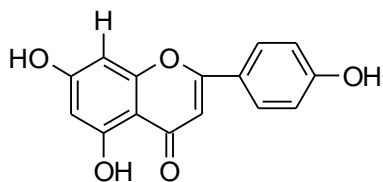
Surowcem farmakognostycznym wykorzystywanym ze względu na obecność flawonoidów w postaci naparów, wyciągów czy preparatów złożonych są: kwiatostan i owoc głogu (łagodne leki nasercowe zwiększające przepływ krwi w naczyniach wieńcowych), kwiatostan kocanki (kamica wątroby, choroby pęcherzyka żółciowego, np. Cholagoga II), kwiatostan lipy (przeziębienia, choroby przewodu pokarmowego i wątroby), liść brzozy (schorzenia pęcherza i nerek), ziele skrzypu polnego (schorzenia pęcherza i nerek, pomocniczo w terapii gruźliczej, w niedoborach krzemu, np. Cholesol, Fitolizyna), ziele fiołka trójbarwnego (egzema, trądzik, dna), ziele nawłoci (choroby dróg moczowych, kamica nerkowa, obrzęki pochodzenia nerkowego), koszyczki rumianku pospolitego (stany zapalne przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, błony śluzowej i skóry, np. Azulan), owoc bzu czarnego (stany zapalne żołądka i jelit, przeziębienia).



Rys. 49. Biosynteza flawonoidów

Przykłady flawonoidów najważniejszych pod względem farmakognostycznym:

a p i g e n i n a (5,7,4'-trihydroksyflawon) (Rys. 50) i jej 7-glikozyd występują w



Rys. 50. Struktura apigeniny

koszyczkach rumianku pospolitego i rzymskiego, kwiatach dalii i wykazują działanie spazmolityczne, przeciwalergiczne, ochronne dla wątroby;

k w e r c e t y n a (5,7,3',4'-tetrahydroksyflawonol) występuje w kwiatach głogu, kasztanowca, wykazuje działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwagregacyjne, hipoglikemiczne i zmniejszające stężenie lipidów w surowicy krwi;

k w e r c y t r y n a – 3-ramnozyd kwercetyny występująca w liściach borówki czernicy, kasztanowca, herbaty ma działanie takie jak kwercetyna oraz moczopędne;

r u t y n a z dodatkową cząsteczką glukozy dołączoną do ramnozy kwercytriny, występująca w dużych ilościach w ziele fiołka trójbarwnego, kwiatach czarnego bzu, jest często stosowana w leczeniu, gdyż uszczelnia naczynia kapilarne i ma właściwości oksydo-redukcyjne (Rutinoscorbin, Venoruton);

n a r y n g e n i n a (5,7,4'-trihydroksyflawanon), podobnie jak jej glikozydy rozpowszechniona w rodzaju *Prunus*, ma właściwości czynnika kapilarnego P, promieniochronne i przeciwalergiczne;

p i n o b a n k s y n a (5,7-dihydroksyflawanon) występująca w gatunku *Pinus banksiana* ma właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne;

g e n i s t e i n a (5,7,4'-trihydroksyizoflawon) występująca w rodzaju *Genista*, nasionach soi, różnych gatunkach kończyny ma silne właściwości estrogenie (podobnie jak inne izoflawony) oraz przeciwnowotworowe;

p e l a r g o n i d y n a (5,7,4'-trihydroksyantocjanidyna) oraz jej 3-glukozyd i 3-galaktozyd występujące w wielu roślinach hodowlanych oraz w owocach borówki czernicy są stosowane jako składniki kompleksów, w zaburzeniach wzroku spowodowanych retinopatią i zmianami cukrzycowymi (Myrcocyjan, Difrael).

Niedawno wyizolowano z owoców i nasion ostropestu (*Silybum marianum*) heterozwiązki zwane flawonolignanami, ponieważ powstają w wyniku kondensacji taksyfoliny (flawon) i kwasu koniferylowego. Sylimaryny wykazują działanie antyhepatotoksyczne oraz regenerujące uszkodzone komórki wątroby poprzez stymulację jądrowej polimerazy I. Znajdują się one w preparatach stosowanych w stanach zapalnych wątroby oraz jej uszkodzeniach wywołanych alkoholem, lekami lub substancjami toksycznymi (Sylimarol 70, Sylivit, Sylicynar).

Alkaloidy

Alkaloidy zajmują czołowe miejsce wśród roślinnych metabolitów wtórnych mających działanie fizjologiczne i dlatego w tej grupie znajduje się najwięcej związków stosowanych w leczeniu. Są one zasadami azotowymi o różnorodnej budowie zawierającymi atom azotu zwykle w układzie heterocyklicznym i wykazującymi słabsze lub silniejsze działanie fizjologiczne. Wyłącza się z nich zasady pirymidynowe i purynowe

za wyjątkiem kofeiny, która wywołuje działanie fizjologiczne u ludzi i zwierząt. Dzięki działaniu farmakologicznemu do tej pory wyizolowano i ustalono strukturę ponad 9.000 alkaloidów. Występują one rzadko u grzybów (*Claviceps purpurea*, rodzaje *Amanita*, *Inocybe*), paprotników (rodzaj *Licopodium*) i nagozależkowych (rodzaj *Taxus*, *Ephedra*), natomiast bardzo często u okrytozależkowych. Głównie występują u dwuliściennych, w tym w największych ilościach u jaskrowatych, makowatych, motylkowatych, magnoliowcach i rutowatych, natomiast u jednoliściennych występują zdecydowanie rzadziej (rodzina *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*).

Alkaloidy gromadzą się w częściach nadziemnych, ale bardzo często są syntetyzowane w częściach podziemnych i transportowane do liści, np. nikotyna. Występują głównie w 4 typach tkanek: intensywnie rosnącej tkance merystematycznej, komórkach epidermy i hipodermi, wiązkach przewodzących i systemach mlecznych. Na terenie komórki występują jedynie w wakuolach. Bardzo rzadko występują w tkankach martwych.

Nomenklatura alkaloidów nie jest jednoznaczna i dokładna, ale obecnie uważa się, że alkaloidy będące produktami przemian aminokwasów (lub odpowiedniej aminy) i zawierające przynajmniej 1 pierścień heterocykliczny z atomem azotu są **alkaloidami właściwymi**, a te bez takiego pierścienia - **protoalkaloidami**. Z kolei alkaloidy, zarówno z pierścieniem heterocyklicznym jak i bez, nie pochodzące od aminokwasów noszą nazwę **pseudoalkaloidów**. **Alkaloidy właściwe i protoalkaloidy** są klasyfikowane od aminokwasu z którego pochodzą i tak wyróżniono 8 klas:

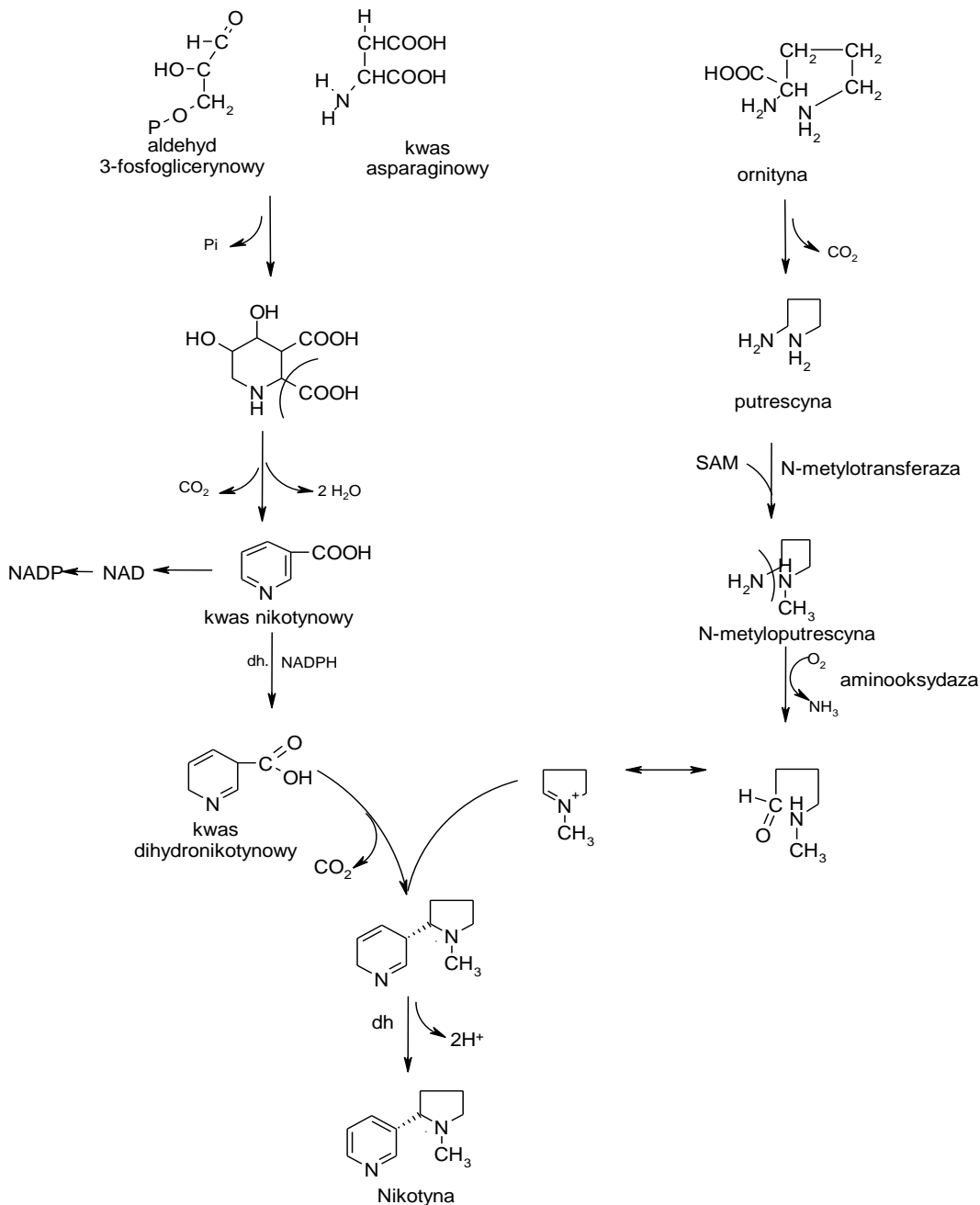
- 1- alkaloidy pochodne ornityny
- 2- alkaloidy pochodne lizyny
- 3- alkaloidy pochodne L-asparaginy
- 4- alkaloidy pochodne fenyloalaniny
- 5- alkaloidy pochodne tyrozyny
- 6- alkaloidy pochodne tryptofanu
- 7- alkaloidy pochodne L-histydyny
- 8- alkaloidy pochodne kwasu antranilowego.

W każdej klasie alkaloidów są one klasyfikowane ze względu na strukturę heteropierścienia, i tak mogą to być alkaloidy pirolidynowe, pirolowe, piperydynowe, pirydynowe, indolowe, chinolizydynowe, tropanowe.

Z kolei pseudoalkaloidy to praktycznie alkaloidy izoprenoidowe, które dzieli się w zależności od pochodzenia na monoterpenowe, diterpenowe, triterpenowe i sterydowe.

Biosynteza alkaloidów właściwych i protoalkaloidów, dzięki zastosowaniu znakowanych węglem ^{14}C lub wodorem ^3H (tryt) prekursorów, została dość dobrze poznana, ale ciągle nie do końca. Zauważono, iż bardzo często na różnych szlakach biosyntetycznych występują trzy reakcje: oksydacyjne łączenie fenoli, reakcja Mannicha i tworzenie zasady Schiffa.

Jednym z najbardziej znanych alkaloidów należących do alkaloidów pochodnych ornityny jest nikotyna syntetyzowana w korzeniach tytoniu (rodzaj *Nicotiana*) skąd



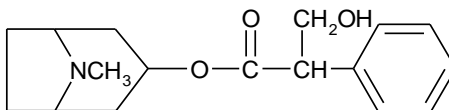
Rys. 51. Biosynteza nikotyny

jest transportowana do liści, w których nagromadza się w dużych ilościach tj. do 10% s. m. Jest ona zbudowana z dwóch heteropierścieni: pirydynowego, powstającego z glicerolu oraz kwasu asparaginowego i piriolidinowego powstającego z ornityny (Rys. 51).

Nikotyna jest silnie toksyczna (dawka śmiertelna 50-100 mg), poraża receptory cholinergiczne N w zwojach autonomicznych, a dostarczana stale podczas palenia

papierosów sprzyja powstawaniu nowotworów płuc i żołądka. Ma znaczenie wyłącznie toksykologiczne. Liście tytoniu są używane do wyrobu preparatów owadobójczych, kwasu nikotynowego i jego amidu.

Do tej samej klasy należą alkaloidy tropanowe, typowe dla rodziny *Solanaceae*, które są estrami tropiny o charakterystycznym układzie dwóch skondensowanych pierścieni - piperolidinowego i piperidynowego. H i o s c y j a m i n a (Rys 52) jest estrem



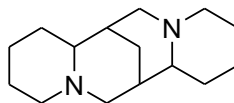
Rys. 52. Struktura hioscyjminy

tropiny i kwasu tropowego. Ze względu na asymetryczny węgiel w cząsteczce może występować jako prawo- lub lewoskrętna hioscyjamina. Jej racemiczną odmianą jest stosowana powszechnie w lecznictwie a t r o p i n a. Jest ona lekiem porażającym układ przywspółczulny (antagonista acetylocholino), działającym wielokierunkowo: hamuje wydzielanie potu, śluzu, soku żołądkowego, rozszerza źrenice oka, przyspiesza czynność serca, zmniejsza tonus mięśni gładkich jelit, pęcherzyka żółciowego i pęcherza moczowego. W większych dawkach działa pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy – nawet halucynogennie. Stosowana głównie w oftalmologii oraz jako środek przeciwnadciśnieniowy.

Surowcem farmakopealnym są liście i korzenie pokrzyki (*Folium i Radix Belladonnae*) stosowanym do wyrobu wielu specyfików (Bellacorn, Bellerger, Bellapan).

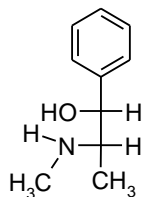
Alkaloidem tropanowym jest także k o k a i n a izolowana z liści krzewu kokainowego (*Erythroxylon coca*). Jest ona narkotykiem pobudzającym układ współczulny i ośrodkowy układ nerwowy. W lecznictwie stosowana w postaci chlorowodoru do znieczulania miejscowego przed zabiegami operacyjnymi w laryngologii.

Jednym z alkaloidów pochodnych lizyny jest s p a r t e i n a (Rys. 53) z podwójnym pierścieniem chinolizydynowym, wyodrębniana z żarnowca miotlastego (*Sarothamnus scoparius*). Alkaloid ten jest stosowany doustnie w postaci siarczynu jako środek przeciwnadciśnieniowy (substancja synapsotropowa).



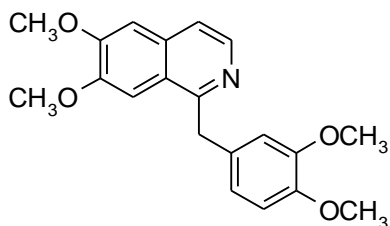
Rys. 53. Struktura sparteiny

Do alkaloidów pochodnych fenylealaniny należy L - e f e d r y n a (Rys. 54) występująca głównie w rodzaju *Ephedra*, która pobudza układ współczulny, zwęża naczynia krwionośne, podnosi ciśnienie krwi, rozkurcza mięśnie oskrzeli. Stosowana jest przede wszystkim w astmie oskrzelowej i jako lek podnoszący ciśnienie. Jest nadużywana jako niedozwolony środek dopingujący, który przy dłuższym stosowaniu wywołuje przyzwyczajenie.



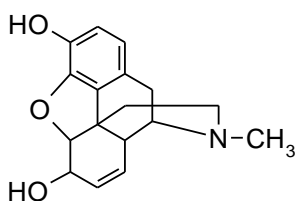
Rys. 54. Struktura L-efedryny

Do alkaloidów pochodnych tyrozyny należą alkaloidy maku (opium) z izochinolinowym heteropierścieniem. W opium występuje *p a p a w e r y n a* (Rys. 55), silny spazmolityk stosowany doustnie w skurczach mięśni gładkich jamy brzusznej, w astmie oskrzelowej.



Rys. 55. Struktura papaweryny

Głównym alkaloidem opium jest *m o r f i n a* (Rys. 56) stosowana w postaci chlorowodoru doustnie lub pozajelitowo jako silny lek przeciwbólowy. Jej nadużycie łatwo prowadzi do nałogu (morfinizmu), wyniszczającego organizm. Obok morfiny w małych ilościach występuje jej ester metylowy - *k o d e i n a*, która trudniej wywołuje uzależnienie. Jest stosowana jako lek przeciwkaszlowy i słabszy lek przeciwbólowy.

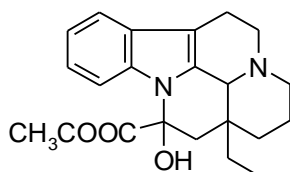


Rys. 56. Struktura morfiny

Surowcem farmakopealnym alkaloidów maku jest stężyły sok mleczny maku lekarskiego (*Papaver somniferum*) stosowany głównie w postaci nalewki, wyciągu, a czasami proszku jako lek przeciwbólowy, spazmolityczny, przeciwkaszlowy i zapierający.

Alkaloidy pochodne tryptofanu często zawierają pierścień indolowy. Do nich należy *w i n k a m i n a* (Rys. 57) występująca w barwinku pospolitym (*Vinca minor*). Wykazuje działanie hipotensyjne i charakteryzuje się małą toksycznością. Wpływa na

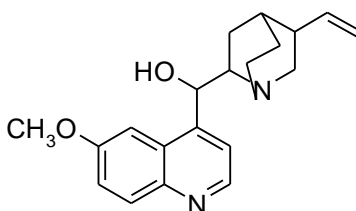
lepsze ukrwienie, a co za tym idzie utlenienie mózgu, jest więc stosowana w zaburzeniach mózgowo-naczyniowych i nadciśnieniu (Devincan).



Rys. 57. Struktura winkaminy

Z kolei *w i n b l a s t y n a* najważniejszy dimeryczny alkaloid indolowy *Catharanthus roseus* (syn. *Vinca roseus*) jest cytotatykiem hamującym mitozę w metafazie. Stosowana jest w postaci siarczanu m.in. w chorobie Hodgkina czy ziarnicy złośliwej (Velban, Vincalucoblastin). Podobnie towarzysząca jej *w i n k r y s t y n a*, mająca przy azocie grupę formylową zamiast metylowej, jest również cytotatykiem stosowanym pozajelitowo przede wszystkim w ostrych białaczkach u dzieci (Oncovin).

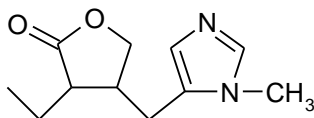
W tej klasie są także alkaloidy z pierścieniem chinolinowym jak np. *c h i n i n a* (Rys. 58) występująca w znacznych ilościach (do 13%) w korze drzewa chinowego



Rys. 58. Struktura chininy

(*Cinchona succirubra*), znana już od 1639 r. jako środek przeciwmalaryczny. Obecnie chinina wchodzi w skład preparatów przeciwgorączkowych i przeciwgrypowych.

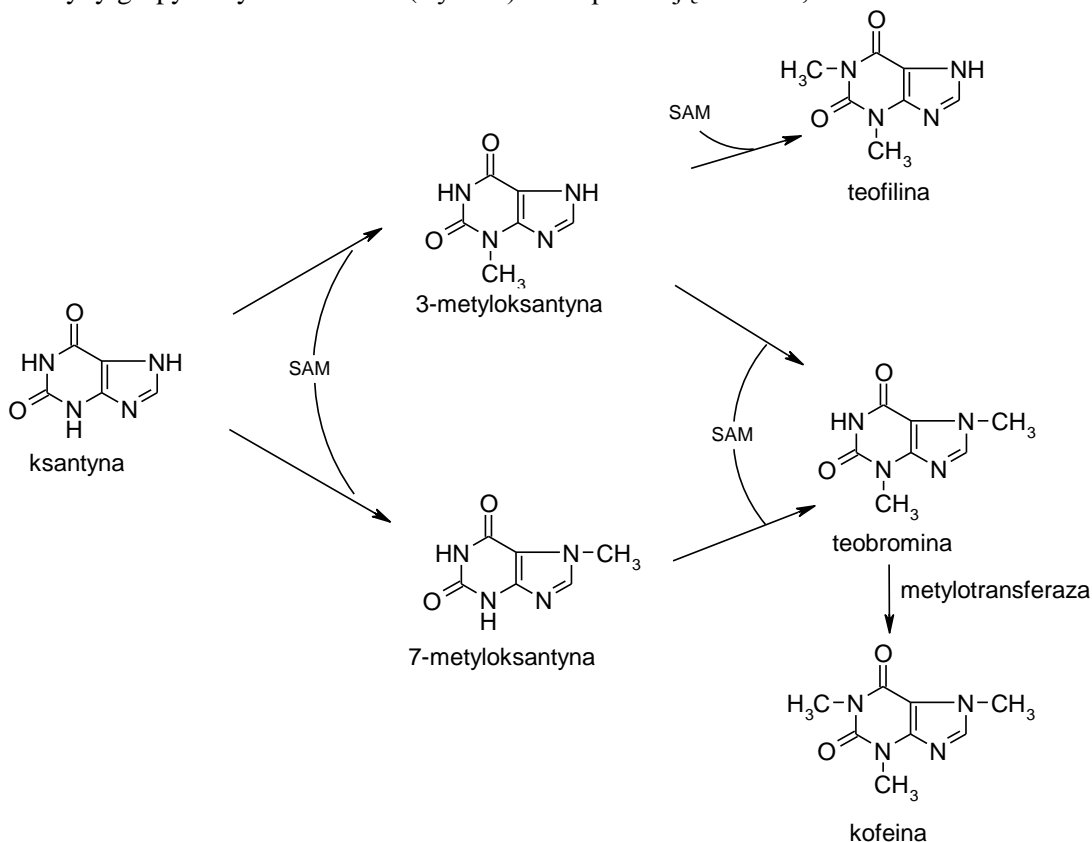
Alkaloidy pochodne histydyny z pierścieniem imidazolowym występują w rodzinie *Rutceae*. Głównym alkaloidem jest pozyskiwana z liści drzew rosnących w krajach subtropikalnych (głównie Brazylii) *p i l o k a r p i n a* (Rys. 59), która zawiera dodatkowo pięcioczłonowy pierścień laktonowy. Jest ona farmakologicznym antagonistą atropiny stosowanym w jaskrze oraz jako lek silnie napotny, a także jako odtrutka przy zatruciu atropiną.



Rys. 59. Struktura pilokarpiny

Alkaloidy pochodne kwasu antranilowego to najczęściej protoalkaloidy, chociaż bardzo rzadko mogą zawierać azot w pierścieniu np. chinolinowym. Do tej pory nie znalazły zastosowania leczniczego.

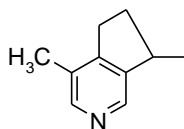
Jedynie zasady purynowe zaliczane do alkaloidów to pochodne ksantyny. W wyniku działania specyficznych metylotransferaz kolejno są przyłączane do atomów azotu ksantyny grupy metylowe z SAM (Rys. 60). I tak powstają teofilina, teobromina i kofeina.



Rys. 60. Biosynteza kofeiny

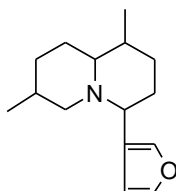
T e o b r o m i n a (3,7-dimetyloksantyna) jest głównym alkaloidem nasion kakaowca (*Theobroma cacao*) i często towarzyszy kofeinie w liściach herbaty, orzeszkach cola. Działa silnie diuretycznie i spazmolitycznie. **T e o f i l i n a** (1,3-dimetyloksantyna) występująca w liściach herbaty (*Camelia sinensis*, *Theaceae*) ma te same właściwości i jest stosowana w astmie oskrzelowej, chorobie wieńcowej i nadciśnieniu. **K o f e i n a** (1,3,7-trimetyloksantyna) jest głównym alkaloidem krzewu kawowego (*Coffea arabica*, *Coffea liberica* i in.). Występuje także w rodzinie *Theaceae*, *Sapindaceae*, *Aquifoliaceae* i in. Kofeina pobudza ośrodkowy układ nerwowy, rozszerza naczynia mózgowie i wieńcowe, pobudza diurezę, przyspiesza procesy myślenia i odbioru wrażeń. Spożywana w nadmiarze wywołuje podniecenie, bicie serca, a nawet skurcze tętna. Jest stosowana w celu wzmocnienia akcji serca, w migrenach, stanach zmęczenia, a także w stanach zatrucia narkotykami i alkoholem. Surowcem farmakopealnym są zarodki nasion i liście drzew z rodzaju *Cola*, z których otrzymuje się nalewki i ekstrakty służące jako środki pobudzające i do produkcji płynów orzeźwiających (Coca-Cola, Pepsi-Cola). Nasiona kawy są stosowane powszechnie do przygotowywania pobudzającej używki oraz do otrzymywania czystej kofeiny. Z kolei z nasion kakaowca otrzymuje się masło kakaowe będące podstawą do produkcji czopków, a z lupin - teobrominę.

Pseudoalkaloidy to alkaloidy izoprenoidowe powstające na szlaku kwasu mewalonowego. Przykładem alkaloidu monoterpenu (C_{10}) jest **aktynidyna** (Rys. 61) izolowana z gatunku *Actinidia polygama*. Występuje ona także w korzeniu kozłka lekarskiego (*Radix Valerianae*) jako jeden ze składników o działaniu uspakajającym (*Tinctura Valerianae*).



Rys. 61. Struktura aktynidyny

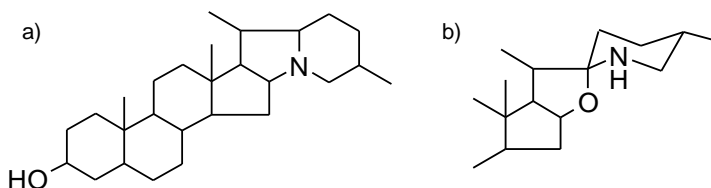
Alkaloidy seskwiterpenowe (C_{15}) występują rzadko w świecie roślin. Jednym z nich jest **deoksynufarydyna** (Rys. 62) wyizolowana z kłączy grzybienia (*Nuphar luteum rhizoma*) o działaniu uspakajającym, rozkurczowymi obniżającym ciśnienie krwi.



Rys.62. Struktura deoksynufarydyny

Alkaloidy diterpenowe występują w rodzinie *Ranunculaceae*, *Cornaceae* i *Asteraceae*, bardzo często są toksyczne i praktycznie nie używane w lecznictwie jak np. akonityna, mekonina, hypakonina czy delfinina.

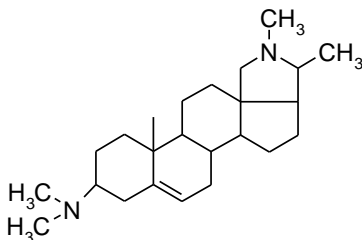
Bardziej interesującą grupą są alkaloidy steroidowe (związki C_{27}) zawierające azot poza typowym sterydowym układem czterech pierścieni, występujące w rodzajach *Solanum* i *Veratrum* często w postaci glikozydów (glikoalkaloidy) lub estrów. Najbardziej znane powstające z cholesterolu to **solanidyna** i **tomatydyna** (Rys. 63), które występują głównie jako 3-O-glikozydy. Glikozydowe pochodne solanidyny to: α -solanina z trisacharydem - solatriozą, β -solanina z disacharydem - solabiozą i γ -solanina z cząsteczką galaktozy występujące obficie w zielonych częściach ziemniaka, a tomatydyna – tomatyna, zawierająca 2 cząsteczki glukozy, galaktozę i ksylozę, występująca w zielonych częściach pomidora.



Rys. 63. Struktury solanidyny (a) i tomatydy (b)

Glikoalkaloidy mają właściwości toksyczne i dlatego, chociaż działają silnie hipotensyjnie (obniżenie ciśnienia krwi), rzadko są stosowane w leczeniu. Natomiast mają znaczenie przemysłowe, gdyż służą jako materiał wyjściowy do półsyntezy hormonów płciowych i kortykosteroidów szeroko stosowanych w leczeniu.

Stosunkowo niedawno wyizolowano z afrykańskich gatunków rodzaju *Funtumia* i *Holarrhena* alkaloidy steroidowe o mniejszej liczbie atomów węgla (C_{21-23}), pochodne pregnanu jak np. *k o n e s c y n a* (Rys. 64) o właściwościach amebobójczych.

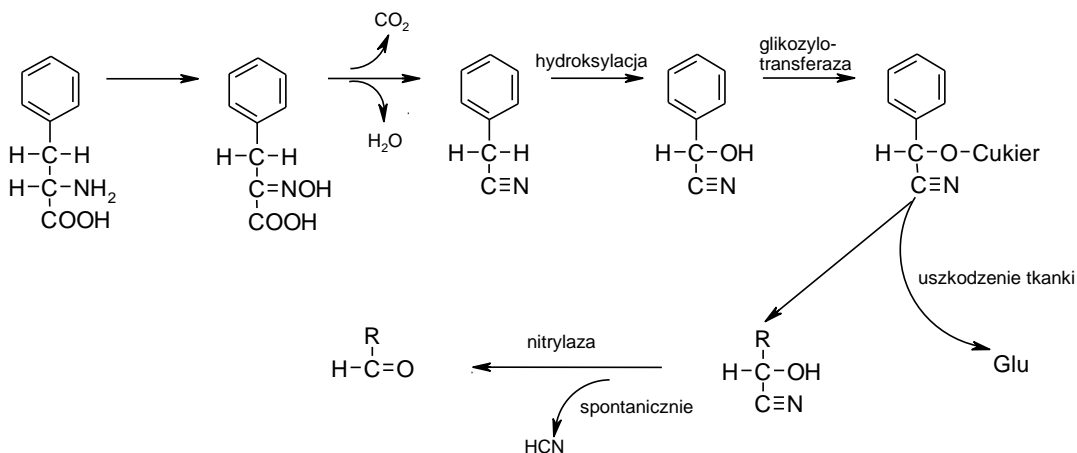


Rys. 64. Struktura konescyny

Wydaje się, że i one będą mogły stać się materiałem wyjściowym do półsyntezy hormonów płciowych typu progesteronu.

Glikozydy cyjanogenne

Wytwarzanie cyjanowodoru ze związków bardziej złożonych jest zjawiskiem występującym u przedstawicieli ponad 90 rodzin botanicznych. Najważniejszą grupą związków cyjanogennych są glikozydy cyjanogenne rozpowszechnione w rodzinach *Rosaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*. Powstają one z aminokwasu poprzez oksym α -ketokwasu, nityl i cyjanohydrynę, do której dołączana jest reszta cukrowa (najczęściej glukoza) dając odpowiedni glikozyd cyjanogeny. Po uszkodzeniu tkanki β -glukozydaza hydrolizuje wiązanie glikozydowe, a nitylaza uwalnia cyjanowodor, który w środowisku wodnym przechodzi w kwas pruski (Rys. 65).



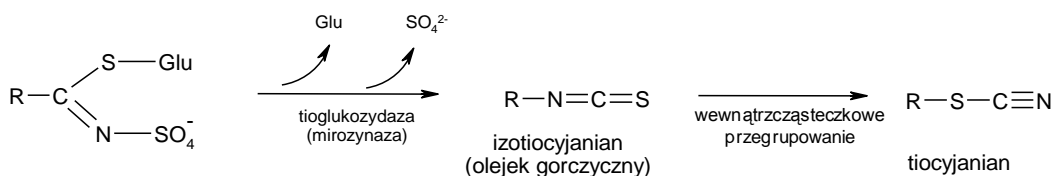
Rys. 65. Biosynteza i rozpad glikozydów cyjanogennych

Cyjanowodór jest wysoce toksyczny (dawka śmiertelna dla człowieka wynosi ok. 50 mg), ponieważ tworząc kompleksy z cytochromami i hemoglobina prowadzi bardzo szybko do głodu tlenowego i śmierci komórki. Jednym z ważniejszych glikozydów cyjanogennych jest amygdalina występująca w wielu gatunkach różowatych, zawierająca disacharyd – gencjiozę. Drugim produktem jej rozpadu uzyskiwanym w destylacji wodnym nasion migdała gorzkiego jest benzaldehid o zapachu migdałowym wykorzystywany niekiedy do poprawy smaku i zapachu leków przeciwkaszlowych. W niektórych krajach amygdalina jest wykorzystywana jako lek przeciwnowotworowy.

Surowcami farmakognostycznymi zawierającymi glikozydy cyjanogenne są nasiona gorzkiego migdała, liście wawrzynowiśni, kwiaty bzu czarnego i nasiona lnu.

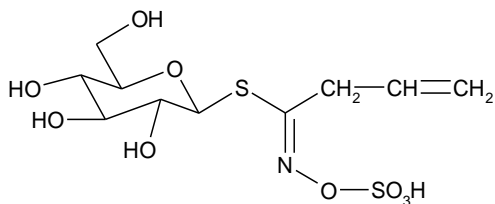
Glukozynolany

Związkami blisko spokrewnionymi biosyntetycznie z glikozydami cyjanogennymi są związki siarkowe - S-glukozydy olejków gorzycznych pochodzących od aminokwasów (alanina, walina, tyrozyna). Występują w rodzinach *Brassicaceae*, *Capparaceae*, *Moringiaceae*, *Resedaceae*. Głównym miejscem ich nagromadzenia są tkanki mięsiste liści, miąższ spichrzowy korzeni, a u roślin krzyżowych, w których występują najobficiej, także w warstwie powlekającej powierzchnię liści. W komórce powstają w cytoplazmie, lokują się w wakuolach, a enzym je hydrolizujący - mirozynaza (tioglukozydaza), według ostatnich przekonań, występuje w cytozolu przylegając do błony komórkowej. Naruszenie struktury komórki umożliwia bezpośredni kontakt enzymu z glukozynolanem i uwolnienie glukozy oraz olejku gorzycznego w postaci izotiocyjanianu (Rys. 66), który silnie drażni skórę i błonę śluzową wywołując przekrwienie.



Rys. 66. Schemat rozpadu glukozynolanów

Do ważniejszych glukozynolanów należy syngryna (Rys. 67) występująca (do 5% s. m.) w nasionach gorczycy czarnej. Po hydrolizie w środowisku wodnym



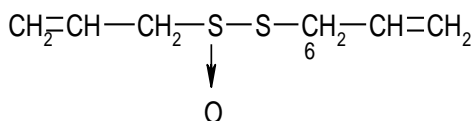
Rys. 67. Struktura syngryny

powstaje izosiarkocyanian allilu stosowany do nacierań rozgrzewających.

Z kolei glukotropolina składnik nasturcji ulega hydrolizie do izotiocyjanianu benzylu stosowanym doustnie w zakażeniach dróg oddechowych i moczowych. Ponadto, w ostatnich latach stwierdzono, że niektóre glukozynolany działają na bakterie efektywniej niż antybiotyki.

Olejki czosnkowe

Olejki czosnkowe występujące głównie w rodzaju *Allium* z rodziny *Liliaceae* mają większe znaczenie farmakognostyczne niż glukozynolany. Powstają z aminokwasów siarkowych i są lotnymi o ostrym zapachu siarczkami, disiarczkami lub sulfotlenkami alkilowymi. Olejki czosnkowe mają właściwości antybiotyczne, pobudzające trawienie, uspakajające, obniżające poziom cholesterolu, a takżei przeciwrobacze. Głównym surowcem farmakopealnym są cebula i główka czosnku. Ta ostatnia ma szczególne znaczenia jako *panaceum*, zwłaszcza dla ludzi starszych, a jest to związane z obecnością allicyny (Rys. 68) – olejku o silnym, nieprzyjemnym zapachu i właściwościach bakteriobójczych, hipoglikemicznych, hipotencyjnych, żółciopędnych, hamujących



Rys. 68. Struktura allicyny

biosyntezę i akumulację cholesterolu (frakcji LDL), a więc zapobiegających powstawaniu i rozwojowi miażdżycy, choroby nadciśnieniowej, dusznicy bolesnej. Znane są i powszechnie stosowane preparaty kapsułkowane lub liofilizowane z czosnku (Alliofil), a także do leczenia ran oparzeniowych i odmrożeniowych (Alliogel).

II. CZĘŚĆ PRAKTYCZNA (przepisy do ćwiczeń)

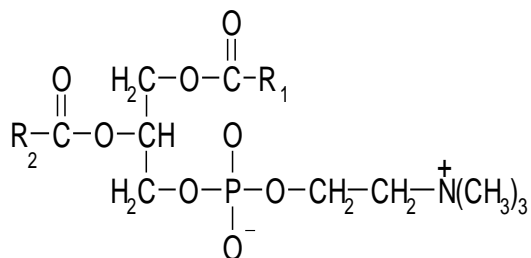
Ćwiczenie 1

Izolowanie fosfatydylocholiny z żółtek jaj kurzych

Fosfatydylocholina (lecytyna) zawierająca zasadę azotową – cholinę jest głównym glicerofosfolipidem występującym powszechnie w błonach komórkowych.

Bogatym źródłem lecytyn są żółtka jaj i niektóre nasiona np. soi (*Glycine soja*). Dzięki zawartości fosforu mają właściwości ogólnie tonizujące. Ponadto zapobiegają w odkładaniu się tłuszczów w wątrobie i dlatego są stosowane w leczeniu pewnych schorzeniach tego organu. W praktyce farmaceutycznej są wykorzystywane jako emulgatory.

Zastosowana metoda otrzymywania fosfatydylocholiny polega na ekstrakcji żółtek bezwodnym acetonem, w którym rozpuszczają się karotenoidy oraz lipidy obojętne, a następnie ekstrakcji mieszaniną chloroformu i metanolu. Surową frakcję fosfolipidów rozdziela się stosując adsorpcyjną chromatografię kolumnową i cienkowarstwową.



Fosfatydylocholina

Materiały i odczynniki

1. Jaja kurze – 3 szt.
2. Aceton
3. Eter etylowy
4. Metanol
5. Chloroform
6. Heksan
7. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej (obojętny)
8. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
9. Wodorotlenek sodu

10. 50% H₂SO₄

11. Odczynnik Dragendorffa:

Roztwór A zawiera 1,7 g zasadowego azotanu bizmutu w 100 ml 20% kwasu octowego

Roztwór B zawiera 10 g jodku potasu w 25 ml wody

Bezpośrednio przed użyciem zmieszać 20 ml roztworu A z 5 ml roztworu B i dodać 70 ml wody.

Materiały pomocnicze i aparatura

Homogenizator; lejek Büchnera; butla z korkiem szlifowym 1000 ml; kolba ssawkowa 1000 ml; zestaw do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną; rozdzielacz 250 ml; lejek Schotta G3; wytrząsarka; wyparka obrotowa; kamera i płytki do chromatografii cienkowarstwowej; spryskiwacz.

Wykonanie

a. Otrzymywanie preparatu fosfatydylocholiny

Żółtka z 3 świeżych jaj przenieść do homogenizatora nożowego, dodać 90 ml acetonu o temperaturze -15°C i homogenizować w ciągu 30 sek. Mieszaninę przesączyć na lejku Büchnera, a osad przenieść do homogenizatora i ponownie homogenizować z nową porcją acetonu o temperaturze -15°C i przesączyć. Homogenizację i sączenie powtórzyć jeszcze trzykrotnie (w sumie 5 razy). Uzyskany biały osad, ok. 30 g, przenieść do butli z korkiem szlifowym o pojemności 1 l, dodać 200 ml mieszaniny chloroform : metanol (1:5 v/v) i wytrząsać w ciągu godziny. Zawiesinę odsączyć na lejku Büchnera, zachować przesącz, a osad wytrząsać jeszcze dwa razy w 100 ml tej samej mieszaniny. Połączone ekstrakty chloroformowo-metanolowe odparować do sucha na wyparce obrotowej w temp. 40°C. Otrzymany osad rozpuścić w 10 ml bezwodnego, zimnego eteru etylowego, a następnie przesączyć na lejku Schotta G3. Klarowny przesącz przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml, oziębic do temp. -5°C, dodać 100 ml oziębionego do temp. -5°C acetonu, pozostawić w temp. -5°C na 1 godzinę, a następnie szybko przesączyć na lejku Schotta G3. Otrzymany surowy preparat fosfatydylocholiny wysuszyć w eksykatorze i zważyć. Wydajność ok. 1,8 g.

b. Chromatografia kolumnowa

Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej (ok. 20 g) zawiesić w mieszaninie chloroform : metanol (98:2 v/v) i wlewać do kolumny umocowanej pionowo na statywie, jednocześnie usuwając nadmiar rozpuszczalnika przez otwarcie wylotu kolumny. Należy pamiętać, aby zawsze nad słupem adsorbenta znajdowała się kilkumilimetrowa warstwa rozpuszczalnika!!! Po przygotowaniu kolumnę zamknąć pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

0,2 g preparatu fosfatydylocholiny rozpuścić w 5ml mieszaniny chloroform : metanol (98:2 v/v) i nałożyć na kolumnę. Po całkowitym wsiąknięciu roztworu kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

I. chloroform : metanol (98:2 v/v) – 100 ml,

II. chloroform : metanol (1:1 v/v) – 100 ml,
zbierając 50 ml frakcje do zważonych kolb okrągłodennych. Rozpuszczalnik oddestylować na wyparce do sucha i kolby ponownie zważyć. Zanotować masę wszystkich frakcji zebranych z kolumny.

c. Chromatografia cienkowarstwowa

Dwie płytki szklane (20x20 cm) dokładnie odłuszczyć wycierając watą zwilżoną chloroformem, 18 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej dokładnie wymieszać z 40 ml wody destylowanej, zawiesinę wylać na płytki i rozprowadzić ją równomiernie bagietką. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej w ciągu godziny, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Na obie płytki nanieść wąskimi pasmami surowy preparat fosfatydylocholiny rozpuszczony w chloroformie oraz cztery frakcje otrzymane z kolumny. Płytki rozwinąć w układzie chloroform; metanol : woda (65:25:4 v/v). Po wyschnięciu jedną wywołać spryskując odczynnikami Dragendorffa, drugą - 50% H₂SO₄ i ogrzaniem w temp. 120°.

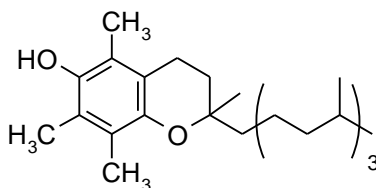
Opracowanie wyników

1. Podać wydajność preparatyki.
2. Narysować wykres ilustrujący wynik chromatografii kolumnowej (na osi rzędnych - numer frakcji, a na osi odciętych – masa związków).
3. Narysować i porównać schematy chromatogramów.
4. Wyliczyć wartość R_f dla fosfatydylocholiny.

Ćwiczenie 2

Izolowanie witaminy E z liści roślin dwuliściennych

α-Tokoferol (α-T) występuje u wszystkich roślin w chloroplastach, w których z jednej strony bierze udział w transporcie elektronów w reakcji świetlnej fotosyntezy, a z drugiej usuwa wolne rodniki tlenowe niszczące błony komórkowe.



α-Tokoferol

Jako witamina E również usuwa wolne rodniki tlenowe w organizmie człowieka, a ponadto działa przeciwnowotworowo, zapobiega zaburzeniom w układzie nerwowym i mięśniowym oraz resorpcji płodu. Bogatym źródłem witaminy E są rośliny zielone oraz kielki zbóż.

Opisana metoda otrzymywania α -tokoferolu polega na jego ekstrakcji acetonem ze świeżego materiału roślinnego, a następnie oddzielaniu od innych związków i oczyszczeniu techniką chromatografii kolumnowej oraz cienkowarstwowej. Ilość α -T oznacza się spektrofotometrycznie po przeprowadzeniu reakcji barwnej.

Materiał i odczynniki

1. Świeże liście - 8 g
2. Aceton
3. Heksan
4. Benzen
5. Eter etylowy bez nadtlenków. 200 ml eteru etylowego wytrząsać w rozdzielaczu dwukrotnie po 5 minut z 100 ml porcjami nasyconego roztworu siarczanu (IV) sodu. Następnie eter przelać do kolby stożkowej, dodać 10 g bezwodnego siarczanu (VI) sodu i pozostawić na 15 godzin. Wyszuszony eter przedestylować.
6. Chloroform
7. 0,625% etanolowy roztwór 2,2'-bipirydyli
8. 0,25% etanolowy roztwór chlorku żelaza (II)
9. Etanol spektralnie czysty
10. 0,1% roztwór rodaminu G 6
11. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej /aktywność I według skali Brockmana/
12. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
13. Siarczan (VI) magnezu bezwodny
14. Wzorzec α -T.

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolba ssawkowa 250 ml; kolby stożkowe: 250 ml, 100 ml; rozdzielacze: 250 ml, 500 ml; cylindry miarowe: 100 ml, 50 ml; lejek Schotta G3 \varnothing 4 cm; lejek szklany \varnothing 10 cm; kolumny szklane o wymiarach: 1,5 x 15 cm, 1 x 10 cm; kolby okrągłodenne ze szlifem \varnothing 29: 500 ml, 250 ml; zestaw do destylacji; kamera i płytki szklane o wymiarach 20 x 20 cm do chromatografii cienkowarstwowej; homogenizator Unipan typ 302; łaźnia wodna; wyparka obrotowa; spektrofotometr; lampa UV płytki.

Wykonanie

Uwaga: W czasie wydzielenia chronić związki przed światłem, wysoką temperaturą i czynnikami utleniającymi.

a. Ekstrakcja

Pocięte świeże liście (8 g) homogenizować w acetonie w ciągu 1 minuty. Następnie homogenat przesączyć przez lejek Schotta. Pozostałe na lejku fragmenty

liści przenieść do homogenizatora, zalać acetonem i zhomogenizować jeszcze raz. Homogenizację i sączenie powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Zmierzyć objętość połączonych przesączy, dodać równą objętość heksanu, przenieść do rozdzielacza i ekstrahować kilkakrotnie wodą w celu usunięcia acetonu. Do ekstraktu heksanowego dodać około 5 g bezwodnego siarczanu magnezu, pozostawić na 20 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sączonek do kolby okrągłodennej i zatężyć na wyparce do około 0,5 ml.

a. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu

W suchej kolbie okrągłodennej (100 ml) z korkiem szlifowym odważyć 8 g tlenku glinu do chromatografii kolumnowej i dodać 0,4 ml wody destylowanej. Kolbę zamknąć korkiem i wytrząsać w ciągu 15 minut. Kolumnę umocować pionowo na statywie. Na dnie kolumny umieścić za pomocą bagietki niewielki kłębek waty, zamknąć wylot kolumny, wlać 10 ml heksanu i ostrożnie wsypać całą ilość przygotowanego adsorbenta. Aby spowodować równomierne ułożenie się tlenku glinu, podczas wsypywania adsorbenta uderzać w kolumnę z różnych stron kawałkiem gumowego węża. Po przygotowaniu kolumnę przemyć dodatkową 10 ml porcją heksanu, a następnie zamknąć kolumnę pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

b. Frakcjonowanie na kolumnie z tlenku glinu

Zatężony ekstrakt heksanowy (punkt a) nanieść ostrożnie za pomocą pipety na przygotowaną kolumnę chromatograficzną. Kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

- I. 1% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie,
- II. 3% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie,
- III. 8% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie.

Fracje zbierać w ilości 10 ml na 1 g adsorbenta, a następnie rozpuszczalniki oddestylować na wyparce do sucha.

c. Chromatografia cienkowarstwowa

Trzy płytki szklane dokładnie odtłuścić wycierając watą zwilżoną chloroformem, 15 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej dokładnie wymieszać z 30 ml 0,1% roztworu rodaminy, zawiesinę wylać na płytki i rozprowadzić ją równomiernie bagietką. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Fracje a, b i c (punkt c) rozpuścić w minimalnej ilości eteru etylowego. Frakcję II nanieść pasmowo na płytkę. Z boku płytki nakropić punktowo wzorzec α -T i tak samo frakcje I i III. Płytkę rozwijać w chloroformie, a następnie po wysuszeniu obejrzeć w świetle lampy UV i zaznaczyć kontury pasma leżącego na wysokości wzorca α -T. Pasma wyskrobać, żel przenieść do małej kolumnienki i eluować 20 ml 30% (v/v) roztworu eteru etylowego w heksanie do kolby okrągłodennej. Roztwór zatężyć do sucha na wyparce.

e. Oznaczanie ilościowe α -tokoferolu

Otrzymany α -T (punkt d) rozpuścić w 1 ml etanolu, przenieść do kuwety, dodać 0,5 ml 0,625% roztworu 2,2'-bipirydyli i 0,5 ml 0,25% roztworu chlorku żelaza (III). Do próby odniesienia zamiast roztworu α -T dodać 1 ml etanolu. Zawartość kuwet wymieszać i po 3 minutach zmierzyć absorpcję przy 520 nm.

Opracowanie wyników

1. Sporządzić rysunek chromatogramu. Obliczyć wartości R_f badanego związku.

2. Wyliczyć zawartość α -T w kuwecie ze wzoru:

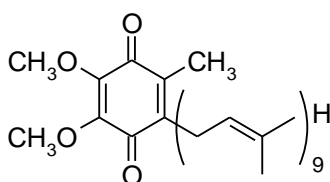
$\mu\text{g } \alpha\text{-T} = A \times 24$, gdzie: **A** - wartość absorbancji przy 520 nm.

Podać zawartość witaminy E w badanym materiale.

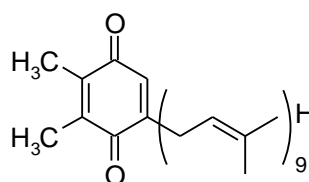
Ćwiczenie 3

Izolowanie chinonów poliprenylowych z liści roślin dwuliściennych

Najbardziej rozpowszechnionymi chinonami w przyrodzie są ubichinony i plastoquinony. Ubichinon (Q) występuje w mitochondriach, gdzie pełni rolę przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym, natomiast plastoquinon (PQ) występuje w chloroplastach i bierze udział w transporcie elektronów w reakcji świetlnej fotosyntezy. Ubichinon stosuje się jako substytut diety stanach zmęczenia fizycznego i umysłowego.



Ubichinon-9



Plastoquinon

Opisana metoda otrzymywania PQ i Q polega na ekstrakcji acetonem tych związków ze świeżego materiału roślinnego, a następnie ich rozdzielaniu oraz oczyszczeniu techniką chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej. Identyfikację oraz oznaczenia ilościowe poszczególnych chinonów przeprowadza się na podstawie ich widm absorpcyjnych

Materiał i odczynniki

15. Świeże liście - 8 g
16. Aceton
17. Heksan
18. Benzen
19. Eter etylowy bez nadtlenków. 200 ml eteru etylowego wytrząsać w rozdzielaczu dwukrotnie po 5 minut z 100 ml porcjami nasyconego roztworu siarczanu (IV) sodu. Następnie eter przelać do kolby stożkowej, dodać 10 g bezwodnego siarczanu (VI) sodu i pozostawić na 15 godzin. Wyszuszony eter przedestylować.
20. Chloroform
21. 0,625% etanolowy roztwór 2,2'-bipirydyli
22. 0,25% etanolowy roztwór chlorku żelaza (II)
23. Etanol spektralnie czysty
24. 0,1% roztwór rodaminu G6
25. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej /aktywność I według skali Brockmana/
26. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
27. Borowodorek sodu
28. Siarczan (VI) magnezu bezwodny
29. Wzorce PQ i Q.

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolba ssawkowa 250 ml; kolby stożkowe: 250 ml, 100 ml; rozdzielacze: 250 ml, 500 ml; cylindry miarowe: 100 ml, 50 ml; lejek Schotta G3 Ø 4 cm; lejek szklany Ø 10 cm; kolumny szklane o wymiarach: 1,5 x 15cm i 1 x 10 cm; kolby okrągłodenne ze szlifem Ø 29: 500 ml, 250 ml; zestaw do destylacji; kamera i płytki szklane o wymiarach 20 x 20 cm do chromatografii cienkowarstwowej; homogenizator Unipan typ 302; łaźnia wodna; wyparka obrotowa; spektrofotometr; lampa UV płytki.

Wykonanie

Uwaga: W czasie wydzielania chronić związki przed światłem, wysoką temperaturą i czynnikami utleniającymi.

a. Ekstrakcja

Pocięte świeże liście (8 g) homogenizować w acetonie w ciągu 1 minuty. Następnie homogenat przesączyć przez lejek Schotta G3 pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałe na lejku fragmenty liści przenieść do homogenizatora, zalać acetonem i zhomogenizować jeszcze raz. Homogenizację i sączenie powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Zmierzyć objętość połączonych przesączy, dodać równą objętość heksanu, przenieść do rozdzielacza i ekstrahować kilkakrotnie wodą w celu usunięcia acetonu. Do ekstraktu heksanowego dodać około 5 g bezwodnego siarczanu magnezu, pozostawić na 20 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sączek do kolby okrągłodennej i zateżyć na wyparce do około 0,5 ml.

b. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu

W suchej kolbie okrągłodennej (100 ml) z korkiem szlifowym odważyć 10 g tlenku glinu do chromatografii kolumnowej i dodać 0,5 ml wody destylowanej. Kolbę zamknąć korkiem i wytrząsać w ciągu 15 minut. Kolumnę umocować pionowo na statywie. Na dnie kolumny umieścić za pomocą bagietki niewielki kłębek waty, zamknąć wylot kolumny, wlać 10 ml heksanu i ostrożnie wsypać całą ilość przygotowanego adsorbenta. Aby spowodować równomierne ułożenie się tlenku glinu, podczas wsypywania adsorbenta uderzać w kolumnę z różnych stron kawałkiem gumowego węża. Po przygotowaniu kolumnę przemyć dodatkową 10 ml porcją heksanu, a następnie zamknąć kolumnę pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

c. Frakcjonowanie na kolumnie z tlenku glinu

Zatężony ekstrakt heksanowy (punkt a) nanieść ostrożnie za pomocą pipety na przygotowaną kolumnę chromatograficzną. Kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

- I. 0,25% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie,
- II. 1,00% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie,
- III. 3,00% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie,
- IV. 8,00% (v/v) roztwór eteru etylowego w heksanie.

Fracje zbierać w ilości 10 ml na 1 g adsorbenta, a następnie rozpuszczalniki oddestylować na wyparce do sucha.

d. Chromatografia cienkowarstwowa

Dwie płytki szklane dokładnie odłuszczyć wycierając watą zwilżoną chloroformem, 15 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej dokładnie wymieszać z 30 ml 0,1% roztworu rodaminy, zawiesinę wylać na płytki i rozprowadzić ją równomiernie bagietką. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Fracje II i IV (punkt c) rozpuścić w minimalnej ilości eteru etylowego i nanieść pasmowo na oddzielne płytki. Z boku płytek nakropić punktowo wzorce. Płytkę z frakcją II rozwijać w układzie eter etylowy : heksan (5:95 v/v), a płytkę z frakcją IV w toluenie. Po rozwinięciu i wysuszeniu płytki obejrzyć w świetle lampy UV i zaznaczyć kontury pasm leżących na wysokości wzorców. Pasma wyskrobać, żel przenieść do małych kolumienek i eluować 20 ml porcjami 30% roztworu eteru etylowego w heksanie do kolb okrągłodennych. Roztwory zatężyć do sucha na wyparce.

e. Wyznaczanie widm absorpcyjnych

Otrzymany PQ i Q (punkt d) rozpuścić w 1 ml etanolu i przenieść za pomocą pipety do dwóch kuwet kwarcowych. Kolby popłukać dodatkowymi 1 ml porcjami etanolu i również przenieść do kuwet. Zawartość kuwet wymieszać i zmierzyć wartości absorpcji w zakresie od 240 do 300 nm wobec etanolu jako próby odniesienia. Następnie do kuwet dodać kilka kryształków borowodorku sodu i wykonać pomiary absorpcji jeszcze raz w tym samym zakresie.

Opracowanie wyników

1. Sporządzić rysunki chromatogramów. Obliczyć wartości R_f dla badanych związków.
2. Wykreślić widma absorpcyjne formy utlenionej i zredukowanej chinonów poliprenylowych
3. Wyliczyć ilość otrzymanego chinonu korzystając ze wzoru:

$$\frac{A}{A_{1\%}^{1\text{ cm}}} \times 10 \times R = \text{mg związku}$$

gdzie: A - różnica wartości absorpcji formy utlenionej i zredukowanej dla PQ przy 255 nm wynosi 198, a dla Q przy 275 nm. $A_{1\%}^{1\text{ cm}}$ - 148, R - rozcieńczenie.

Podać zawartość chinonów w badanym materiale.

Ćwiczenie 4

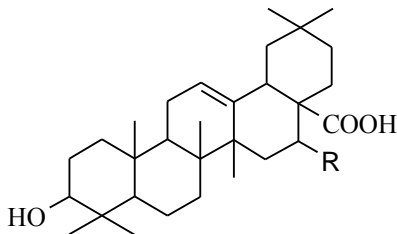
Izolowanie kwasów triterpenowych z liści borówki brusznicy albo kwiatów nagietka lub słonecznika

Triterpenowe pentacykliczne hydroksykwasy są związkami rozpowszechnionymi w roślinach wyższych – głównie dwuliściennych. Często w jednej roślinie występują dwa kwasy triterpenowe. Na przykład w kwiatach słonecznika (*Helianthus annuus*) znajdują się obok siebie kwasy: oleanolowy i echinocystowy, a w liściach borówki brusznicy (*Vitis idaeae*) kwas oleanolowy i ursolowy. W kwiatach nagietka (*Calendula officinalis*) występuje tylko kwas oleanolowy. Kwasy te występują najczęściej w postaci glikozydów tzw. saponin (nagietek, słonecznik), rzadziej jako związki wolne (borówka) lub estry.

Saponiny triterpenowe są wykorzystywane w praktyce farmaceutycznej jako emulgatory, gdyż zmniejszając napięcie powierzchniowe zwiększają rozpuszczalność oraz wchłanianie trudno rozpuszczalnych w wodzie substancji leczniczych. Większość z nich wywołują hemolizę erytrocytów, natomiast niektóre mają właściwości przeciwzapalne, cytolityczne, fungistatyczne. Wolny kwas oleanolowy czy ursolowy wykazują właściwości przeciwwirusowe, bakteriostatyczne, bakteriobójcze, cytotoksyczne, hamują proliferację i różnicowanie komórek zezłośliwionych.

Jeżeli w badanym materiale występują wolne kwasy triterpenowe pierwszym etapem na drodze do ich otrzymania jest ekstrakcja eterem etylowym, gdy zaś występują saponiny - ekstrakcja alkoholem metylowym lub etylowym. Z hydrolizatu kwasowego surowej frakcji glikozydów wydziela się kwasy

triterpenowe, wykorzystując ich charakterystyczną właściwość: wytwarzanie nierozpuszczalnych w wodzie i eterze etylowym soli sodowych lub potasowych.



R=H - kwas oleanolowy

R=OH - kwas echinocystowy

Materiały i odczynniki

1. Kwiaty nagietka lub słonecznika - 50 g
2. Eter etylowy
3. Metanol
4. Kwas solny stężony
5. Kwas siarkowy stężony
6. Chloroform
7. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
8. Wodorotlenek potasu
9. Chlorek wapnia do ekscykatorów

Materiały pomocnicze i aparatura

Aparat Soxhleta - 250 ml; łaźnia wodna; wyparka obrotowa; zestaw do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną; rozdzielacz - 250 ml; lejek Büchnera; lejek Schotta G2; kamera i płytki do chromatografii cienkowarstwowej.

Wykonanie

Wariant A

a. Ekstrakcja kwasów triterpenowych

25 g wysuszonych w temperaturze 40-60°C i rozdrobnionych liści borówki ekstrahować eterem etylowym (około 300 ml) w aparacie Soxhleta w ciągu 10 godzin. Wyciąg eterowy zagęścić na wyparce obrotowej do objętości około 60 ml.

b. Wydzielenie kwasów triterpenowych

Zagęszczony roztwór eterowy ekstrahować w rozdzielaczu 3 razy porcjami po 15 ml 2% wodnego roztworu KOH. Powstający na granicy faz osad soli kwasów triterpenowych oddzielić łącznie z fazą wodną. Jeżeli przy trzeciej ekstrakcji wydzieli się jeszcze znaczna ilość osadu, ekstrakcję powtórzyć po raz czwarty. Wodne wyciągi połączyć, wydzieloną sól potasową kwasów triterpenowych odsączyć na lejku Büchnera i przemyć na sączku najpierw niewielką ilością (3-5 ml) zimnej wody, a następnie eterem etylowym (5-10 ml). Pozostały na sączku osad rozpuścić w minimalnej ilości metanolu, zakwasić do pH

3-4 za pomocą 10% HCl i wlać, mieszając, do 10-krotnej objętości wody. Wytrącony osad kwasów triterpenowych odsączyć na lejku Schotta G2, przepłukać wodą aż do obojętnego odczynu popłuczki i wysuszyć w eksykatorze próżniowym nad chlorkiem wapnia.

c. Chromatograficzna kontrola czystości preparatu

Płytkę szklaną (10x20 cm) dokładnie odtłuścić wycierając watą zwilżoną chloroformem, 5 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowsarstwowej dokładnie wymieszać z 15 ml wody destylowanej, zawiesinę wylać na płytkę i rozprowadzić ją równomiernie bagietką. Płytkę wysuszyć w temperaturze pokojowej w ciągu godziny, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Otrzymany preparat rozpuścić w małej ilości eteru etylowego, nanieść za pomocą kapilarki kroplę na płytkę chromatograficzną z żelem krzemionkowym obok wzorców kwasów triterpenowych i rozwinąć w układzie chloroform: metanol (95 : 5 v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogram wywołać przez spryskanie 50% kwasem siarkowym i ogrzewanie w suszarce o temperaturze 120°C w ciągu 5 minut.

Wariant B

a. Ekstrakcja glikozydów triterpenowych

25 g wysuszonych w temperaturze 40-60°C i rozdrobnionych kwiatów nagietka lub słonecznika ekstrahować eterem etylowym (około 300 ml) w aparacie Soxhleta w ciągu 6 godzin. Wyciąg eterowy odrzucić, a pozostałość po wysuszeniu ekstrahować w aparacie Soxhleta metanolem (około 300 ml) w ciągu dalszych 6 godzin. Wyciąg metanolowy zagęścić na wyparce obrotowej do objętości około 100 ml.

b. Hydroliza kwasowa

Do zagęszczonego wyciągu metanolowego dodać taką ilość stężonego kwasu solnego, aby otrzymać roztwór zawierający 7% HCl. Ogrzewać pod chłodnicą zwrotną do wrzenia w ciągu 3 godzin. Następnie dodać do hydrolizatu równą objętość wody i oddestylować metanol.

c. Wydzielenie kwasów triterpenowych

Otrzymaną pozostałość wodną ekstrahować w rozdzielaczu 3 razy porcjami po 50 ml eteru etylowego. Połączone wyciągi eterowe przepłukać wodą destylowaną do pH obojętnej fazy wodnej. Przepłukany roztwór eterowy ekstrahować w rozdzielaczu 3 razy porcjami po 10 ml 2% wodnego roztworu KOH. Powstający na granicy faz osad soli kwasów triterpenowych oddzielić łącznie z fazą wodną. Jeżeli przy trzeciej ekstrakcji wydzieli się jeszcze znaczna ilość osadu, ekstrakcję powtórzyć po raz czwarty. Wodne wyciągi połączyć, wydzieloną sól potasową kwasów triterpenowych odsączyć na lejku Büchnera i przemyć na sączku najpierw niewielką ilością (3-5 ml) zimnej wody, a następnie eterem etylowym (5-10 ml). Pozostały na sączku osad rozpuścić w minimalnej ilości metanolu, zakwasić do pH 3-4 za pomocą 10% HCl i wlać, mieszając, do 10-

krotnej objętości wody. Wytrącony osad kwasów triterpenowych odsączyć na lejku Schotta G2, przepłukać wodą aż do obojętnego odczynu popłuczki i wysuszyć w eksykatorze próżniowym nad chlorkiem wapnia.

Wydajność: kwas oleanolowy z kwiatów nagietka około 0,6 g, mieszanina kwasów oleanolowego i echinocystowego z kwiatów słonecznika około 0,4 g.

d. Krystalizacja

Jeżeli otrzymano kwas oleanolowy z nagietka, należy surowy produkt przekrystalizować z metanolu. W tym celu do surowego kwasu oleanolowego (0,6 g) dodać 50 ml metanolu i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną do całkowitego rozpuszczenia. Przesączyć szybko przez sączonek fałdowany, zagęścić przesącz przez oddestylowanie części rozpuszczalnika do objętości 10-15 ml i pozostawić do krystalizacji. Wydajność około 80 %.

e. Chromatograficzna kontrola czystości preparatu

Płytkę szklaną (10x20 cm) dokładnie odtłuścić wycierając watą zwilżoną chloroformem, 5 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej dokładnie wymieszać z 15 ml wody destylowanej, zawiesinę wylać na płytkę i rozprowadzić ją równomiernie bagietką. Płytkę wysuszyć w temperaturze pokojowej w ciągu godziny, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut.

Otrzymany preparat rozpuścić w małej ilości eteru etylowego, nanieść za pomocą kapilarki kroplę na płytkę chromatograficzną z żelem krzemionkowym obok wzorców kwasów triterpenowych i rozwinąć w układzie chloroform: metanol (95 : 5 v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogram wywołać przez spryskanie 50% kwasem siarkowym i ogrzewanie w suszarce o temperaturze 120°C w ciągu 5 minut.

Opracowanie wyników

1. Podać wydajność preparatyki.
2. Narysować schemat chromatogramu i obliczyć wartości R_f dla badanych związków.

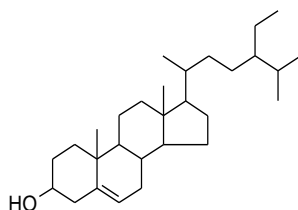
Ćwiczenie 5

Izolowanie steroli roślinnych

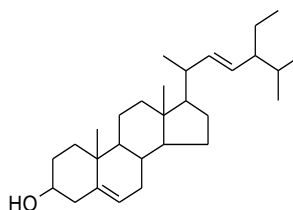
Sterole są ważnymi składnikami błon komórkowych wpływającymi na ich płynność i przepuszczalność. W odróżnieniu od organizmów zwierzęcych oraz człowieka, w których występuje jedynie cholesterol, w tkankach roślinnych występuje kilka lub kilkanaście różnych steroli, przy czym w największych ilościach obecne są zazwyczaj sitosterol (C_{29}) i stigmasterol (C_{29}). W roślinach sterole występują w postaci wolnej, a także jako estry, glikozydy i acyloglikozydy.

Sterole roślinne są stosowane powszechnie w celu obniżenia poziomu cholesterolu we krwi.

Opisana metoda pozwala na wyizolowanie z materiału roślinnego czystej frakcji steroli. Uzyskaną w wyniku ekstrakcji eterem etylowym frakcję lipidową poddaje się hydrolizie zasadowej, a następnie wytrąca się sterole wykorzystując ich charakterystyczną właściwość tworzenia kompleksu z digitoniną.



Sitosterol



Stigmasterol

Materiał i odczynniki

1. Kwiaty nagietka lub liście pokrzywy - 20 g
2. Eter etylowy
3. 10% roztwór KOH w 80% metanolu
4. 1% roztwór digitoniny w 90% etanolu
5. Kwas solny stężony
6. Siarczan sodowy bezwodny
7. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
8. Kwas octowy
9. Chlorek sodowy
10. Etanol
11. Heksan
12. Pirydyna
13. Roztwory wzorców: sitosterolu, octanu sitosterolu.

Materiały pomocnicze i aparatura

Aparat Soxhleta - 250 ml; łaźnia wodna; kolby okrągłodenne 50 ml, 100 ml, 250 ml; wyparka obrotowa; zestaw do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną; rozdzielacz - 250 ml; lejek Schotta G3; kolba ssawkowa; probówki wirówkowe - 50 ml; wirówka; eksykator próżniowy; kamera i płytki do chromatografii cienkowarstwowej; papierki wskaźnikowe.

Wykonanie

d. Ekstrakcja

20 g wysuszonych w temperaturze 40-60°C i rozdrobnionych kwiatów nagietka lub liście pokrzywy ekstrahować eterem etylowym w aparacie Soxhleta w ciągu 8 godzin. Do uzyskanego wyciągu eterowego dodać ok. 1 g bezwodnego siarczanu sodowego na każde 15 ml ekstraktu i pozostawić na godzinę w szczelnie

zamkniętej kolbie, po czym przesączyć przez sącdek karbowany do zważonej kolby okrągłodennej i eter oddestylować na wyparce obrotowej. Kolbę z pozostałością zważyć (frakcja lipidowa).

b. Hydroliza zasadowa

Do kolby z frakcją lipidową (punkt a) dodać 25 ml 10% roztworu KOH w 80% metanolu i ogrzewać w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 3 godzin. Następnie do hydrolizatu dodać 75 ml wody i wkraplając 10% kwas solny doprowadzić pH do 8-9 wobec papierka wskaźnikowego, a następnie przenieść do rozdzielacza. Ekstrahować 3 razy eterem etylowym. Pozostałość wodną odrzucić, a połączone wyciągi eterowe przepłukać w rozdzielaczu małymi porcjami wody aż do obojętnego odczynu wodnego popłucz. Ekstrakt eterowy umieścić w kolbie płaskodennej, dodać bezwodny siarczan sodowy, pozostawić na 30 min., a następnie przesączyć do zważonej 100 ml kolby okrągłodennej, oddestylować eter na wyparce obrotowej i zważyć (frakcja związków nie ulegających zmydleniu).

c. Wytrącanie steroli digitoniną

Otrzymaną w punkcie b frakcję rozpuścić na gorąco w 20 ml etanolu i po ostudzeniu pozostawić w lodówce na noc. Następnego dnia odsączyć pozostały osad węglowodorów na lejku Schotta G3 i przelać go 2 ml etanolu. Przesącz zebrać do zważonej probówki wirówkowej, umieścić w łaźni wodnej o temp. 70°C, dodać, mieszając, 12 ml 1% roztworu digitoniny w 90% etanolu, a następnie wstawić do lodówki na 3 godziny. Powstały osad digitonidów steroli odwirować przy 3.000xg w ciągu 10 min. Supernatant zostawić do analizy chromatograficznej, a osad umieścić w eksykatorze próżniowym, zostawić na kilkanaście godzin, a następnie zważyć.

d. Uwalnianie steroli z kompleksów

Wysuszony osad (punkt c) rozpuścić na gorąco w 1 ml pirydyny, dodać 5 ml eteru etylowego i wytrąconą digitoninę odwirować w warunkach jak opisano w punkcie c. Połączone supernatanty przelać do zważonej 50 ml kolby okrągłodennej i oddestylować rozpuszczalnik na wyparce. Kolbę z otrzymanymi sterolami wstawić na 24 godziny do eksykatora próżniowego, a następnie zważyć

e. Chromatografia cienkowarstwowa

Płytkę szklaną (10x20 cm) dokładnie odtłuścić wycierając watą zwilżoną chloroformem, 9 g żelu krzemionkowego do chromatografii cienkowarstwowej dokładnie wymieszać z 20 ml wody destylowanej, zawiesinę wylać na płytkę i rozprowadzić równomiernie bagietką. Płytkę wysuszyć w temperaturze pokojowej, a następnie zaktywować w suszarce w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut. Po wystygnięciu na płytkę nanieść małymi pasmami wzorce sitosterolu i octanu sitosterolu oraz część supernatantu (punkt c) i frakcji wyizolowanych steroli (punkt d). Płytkę rozwinąć w układzie: n-heksan : eter etylowy : kwas octowy (90:30:1 v/v). Po wysuszeniu spryskać 50% kwasem siarkowym i ogrzewać w temp. 120°C w ciągu 5 min.

Opracowanie wyników

1. Podać zawartość lipidów, związków nie ulegających zmydleniu oraz steroli.
2. Narysować schemat chromatogramu i obliczyć wartości R_f dla wolnych steroli.

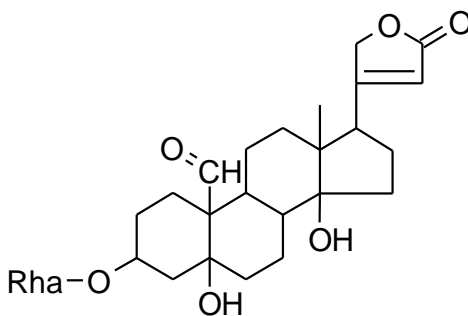
Ćwiczenie 6

Oznaczanie zawartości glikozydów nasercowych i konwalatoksyny w liściach konwalii za pomocą reakcji Baljeta

Glikozydy nasercowe są grupą substancji pochodzenia roślinnego o silnym działaniu fizjologicznym, dużym znaczeniu farmakologicznym. Niektóre z nich stanowią bardzo cenne leki naturalne w terapii niewydolności mięśnia sercowego. Związki te zostały po raz pierwszy wykryte w naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea*), a następnie stwierdzone w różnych organach roślin jednoliściennych i dwuliściennych.

Konwalia majowa (*Convallaria majalis*) jest byliną z podziemnym kłączem, występującą powszechnie w całej Europie, Ameryce Północnej i zachodniej Azji. W Polsce objęta jest częściową ochroną. W lasach polskich położonych na niżu występuje nieraz masowo i może być zbierana za specjalnym zezwoleniem. Surowcem jest kwiatostan wraz z dwoma otaczającymi go liśćmi bądź same liście konwalii, zbierane w czasie kwitnienia rośliny. Ziele konwalii (*Herba Convallariae*) jest surowcem zawierającym zespół nasercowych glikozydów nasercowych. Najważniejszym glikozydem w zespole jest konwalatoksyna. Jest związkiem bardzo aktywnym biologicznie i niezwykle silnie trującym. Ziele konwalii majowej stosuje się w przewlekłej niewydolności mięśnia sercowego.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie całkowitej zawartości glikozydów kardenolidowych w liściach konwalii, a następnie po rozdziale chromatograficznym oznaczenie zawartości konwalatoksyny.



Konwalatoksyna

Materiały i odczynniki

1. Suszone liście konwalii
2. Roztwór wzorcowy konwalatoksyna (10 mg konwalatoksyny w 10 ml metanolu)
3. Metanol
4. Etanol
5. Octan ołowiu(II)
6. Ortofosforan dwusodowy
7. Chloroform
8. Butanol
9. Na_2SO_4 (bezw.)
10. Odczynnik Baljeta: 5 cm³ 10% wodnego roztworu NaOH zmieszać z 95 cm³ 1% wodnego roztworu kwasu pikrynowego.
11. Chloroform
12. Dioksan
13. Aceton
14. Formamid
15. Odczynnik Carr-Proce'a (20g SbCl_3 w 80 g chloroformu)

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacz; bibuła chromatograficzna Whatman 3; kamera do chromatografii bibułowej; spektrofotometr.

Wykonanie

- a. Sporządzenie krzywej wzorcowej

Na kwadraty bibuły (3 x 3 cm) nanieść następujące ilości wzorcowego roztworu konwalatoksyny: 0,05; 0,1; 0,2, 0,4 i 0,5 cm³ (co odpowiada 50, 100, 200, 400 i 500 μg tego glikozydu). Po wysuszeniu naniesionego roztworu kwadraty bibuły pociąć na drobne skrawki, wrzucić do probówki, dodać 5 cm³ etanolu i pozostawić na 30 minut. Następnie dodać 2 cm³ wody i 3 cm³ odczynnika Baljeta. Po 20 minutach dokonać pomiaru absorpcji w 1 cm kuwetach przy długości fali 500 nm. Wykreślić krzywą wzorcową.

- b. Oznaczanie ogólnej zawartości glikozydów nasercowych w liściach konwalii

3,0 g wysuszonych i sproszkowanych liści konwalii zalać 30 cm³ gorącego 70% etanolu i ogrzewać w ciągu 20 minut na łaźni wodnej. Po ostudzeniu rozcieńczyć wyciąg 70 cm³ wody. W celu oczyszczenia dodać 20 cm³ 25% roztworu zasadowego octanu ołowiu. Zawartość kolby przesączyć i ro przesączu dodać 25 cm³ 10% roztworu Na_2HPO_4 . Po ponownym przesączeniu z roztworu wodnego ekstrahować glikozydy kardenolidowe trzykrotnie mieszaniną chloroform – butanol, 2:1. Połączone wyciągi organiczne osuszyć bezwodnym Na_2SO_4 , a następnie odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem (najlepiej poniżej 50°C). Suchą pozostałość rozpuścić w niewielkiej objętości etanolu, przenieść do kolby miarowej o pojemności 10 cm³ i uzupełnić etanolem do kreski. Na 3 kwadraty bibuły chromatograficznej (3 x 3 cm) nanieść po 0,2 cm³ przygotowanego wyciągu. Po wysuszeniu naniesionego roztworu kwadraty bibuły

pociąć na drobne skrawki, wrzucić do probówki, dodać 5 cm³ etanolu i pozostawić na 30 minut. Następnie dodać 2 cm³ wody i 3 cm³ odczynnika Baljeta. Po 20 minutach dokonać pomiaru absorpcji w 1 cm kuwetach przy długości fali 500 nm. Wyciągnąć średnią.

Korzystając z krzywej wzorcowej odczytać zawartość glikozydów nasercowych.

c. Oznaczanie zawartości konwalatoksyny

Wyciąg etanolowy użyty do oznaczania całkowitej ilości glikozydów nasercowych odparować do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 cm³ etanolu. Z bibuły chromatograficznej Whatman 3 wyciąć pas o wymiarach 55 na 15 cm i narysować ołówkiem tory o szerokości 3 cm. Bibułę zaimpregnować mieszaniną aceton : formamid – 3:1 przeciągając ją przez taką mieszaninę w kierunku spływu fazy ruchomej i susząc w temperaturze pokojowej w ciągu 15 minut, do usunięcia acetonu. Na pierwsze 4 tory nakropić odpowiednio: 0,05 cm³, 0,1 cm³, 0,2 cm³ i 0,3 cm³, a na tor piąty 0,1 cm³ roztworu wzorcowego konwalatoksyny. Chromatogramy rozwijać techniką spływową do osiągnięcia 45 cm drogi fazy ruchomej. Arkusz wysuszyć w ciągu 1 godziny na powietrzu, a następnie w ciągu 20 minut w suszarce o temp. 120°C. Odciąć pasek nr 5 z wzorcem i wywołać odczynnikami Carr-Proce’a spryskując chromatogram i ogrzewając go w temp. 100°C (bibułę obejrzyć w UV). Na pozostałych paskach zaznaczyć przypuszczalne położenie konwalatoksyny. Wyciąć zaznaczone miejsca z chromatogramów, pociąć na kawałki i macerować je w probówkach z etanolem. Powtórzyć dalszą procedurę z odczynnikami Baljeta i oznaczaniem spektrofotometrycznym analogicznie do oznaczania sumy glikozydów.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć zawartość glikozydów korzystając z wzoru:

$$X = f \cdot \frac{100}{a}$$

gdzie: X = procentowa zawartość glikozydów

f = ilość glikozydów w mg odczytana z krzywej wzorcowej dla konwalatoksyny

a = ilość surowca w mg odpowiadająca objętości roztworu użytego do oznaczenia (w przypadku ilości uwzględnionych w przepisie 10 cm³ końcowego roztworu odpowiada całości użytego surowca czyli 3000 mg, zatem 0,2 cm³ roztworu odpowiada 60 mg).

2. Obliczyć zawartość konwalatoksyny korzystając z tego samego wzoru, uwzględniając inną wartość współczynnika „a”.

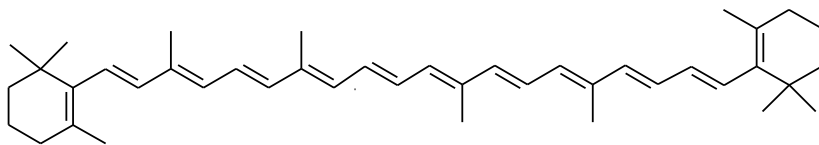
Ćwiczenie 7

Izolowanie prowitaminy A z korzeni marchwi

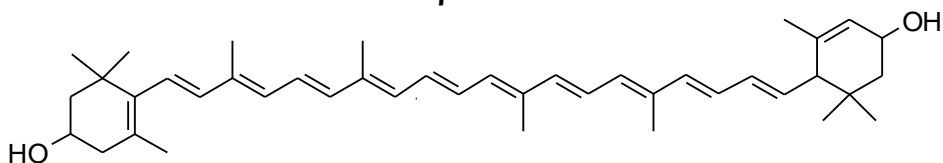
Prowitaminą A są wszystkie karoteny tj. tetraterpenowe węglowodory z co najmniej jednym pierścieniem β -jononu. Najwydajniejszym prekursorem witaminy A jest β -karoten zawierający dwa pierścienie β -jononu na obu końcach cząsteczki, z którego powstają w wątrobie w wyniku działania enzymu dwie cząsteczki witaminy. Natomiast z α - i γ -karotenu powstaje tylko jedna cząsteczka retinolu. β -Karoten występuje w chloroplastach wszystkich roślin, gdyż bierze udział w procesie fotosyntezy. Doskonałym źródłem tego pomarańczowego związku jest korzeń marchwi (*Daucus carota*).

Niedobór witaminy A powoduje zaburzenia wzroku (kurza ślepotą), zahamowanie wzrostu, zmiany na powierzchni błon śluzowych i naskórka.

W podanej metodzie prowitaminę A (β -karoten) ekstrahuje się z korzeni marchwi acetonem, a następnie, w celu usunięcia tłuszczów, otrzymany ekstrakt poddaje się hydrolizie zasadowej. Prowitaminę A otrzymuje się w wyniku rozdzielania na kolumnie z tlenkiem glinu i identyfikuje na podstawie widma absorpcyjnego.



β - karoten



luteina

Materiały i odczynniki

1. Świeży korzeń marchwi - 50 g
2. Aceton
3. Eter etylowy bezwodny, bez nadtlenczków.
4. Etanol spektralnie czysty
5. Heksan
6. Benzen
7. 60% roztwór wodorotlenku potasu
8. 0,01 M roztwór kwasu solnego
9. Siarczan (VI) magnezu bezwodny
10. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej (aktywność I wg skali Brockmanna)

11. Płytką pokrytą żelom krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 5 x 10 cm

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacze: 1000 ml, 500 ml, 100 ml; kolba ssawkowa 250 ml; kolby stożkowe: 500 ml, 250 ml; kolby okrągłodenne ze szlifem Ø 29: 250 ml, 100 ml, 50 ml; cylinder miarowy 250 ml; pipeta serologiczna 0,5 ml; pipeta z zagiętym końcem; kolumna szklana o wymiarach 1 x 20 cm; kapilary szklane; kamera i płytki szklane o do chromatografii cienkowarstwowej; lejek Schotta G2; homogenizator Unipan typ 302; wyparka obrotowa; spektrofotometr.

Wykonanie

Uwaga: W czasie wydzielania β -karoten chronić przed światłem, wysoką temperaturą i czynnikami utleniającymi.

a. Ekstrakcja

Korzeń marchwi (ok. 50 g) dokładnie umyć, drobno pokroić i homogenizować z acetonem w ciągu 2 minut w homogenizatorze nożowym. Następnie przesączyć przez lejek Schotta G2 pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałe na lejku fragmenty przenieść do homogenizatora, zalać acetonem i homogenizować jak poprzednio. Ekstrakcję powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Zmierzyć objętość połączonych ekstraktów acetonowych, dodać równą objętość heksanu, przenieść do rozdzielacza i ekstrahować kilkakrotnie wodą. Do ekstraktu heksanowego dodać około 15 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 20 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sącdek do kolby okrągłodennej i zateżyć na wyparce do sucha.

b. Otrzymywanie frakcji nie ulegającej zmydłaniu

Suchą pozostałość (punkt a) rozpuścić w 10 ml etanolu, dodać 1 ml 60% roztworu KOH, zamknąć kolbę i pozostawić w ciemności w temperaturze pokojowej na 15 godzin. Następnie do roztworu dodać 30 ml wody, przenieść mieszaninę do rozdzielacza i ekstrahować czterokrotnie 20 ml porcjami eteru etylowego. Połączone wyciągi eterowe przepłukać 0,01 N HCl, a następnie wodą aż do odczynu obojętnej fazy wodnej. Do ekstraktu eterowego dodać 3 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 30 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sącdek do 250 ml kolby okrągłodennej i oddestylować rozpuszczalnik na wyparce do sucha. Dodać do kolby 10 ml heksanu i ponownie oddestylować rozpuszczalnik do sucha.

c. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu

W suchej 50 ml kolbie okrągłodennej z korkiem szlifowym odważyć 6 g tlenku glinu do chromatografii kolumnowej, dodać 0,3 ml wody, kolbę zamknąć korkiem i wytrząsać w ciągu 15 minut. Kolumnę szklaną umieścić pionowo w statywie. Na dno kolumny włożyć za pomocą bagietki niewielki kłębek waty, zamknąć wylot kolumny, wlać 10 ml heksanu i ostrożnie wsypać całą ilość przygotowanego adsorbenta. Podczas wsypywania tlenku glinu uderzać w kolumnę z różnych stron kawałkiem gumowego węża. Po przygotowaniu kolumnę przemyc

10 ml porcją heksanu, a następnie zamknąć kolumnę pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

d. Frakcjonowanie barwników na kolumnie z tlenku glinu

Frakcję związków nie ulegających zmydleniu (punkt b) rozpuścić w 5 ml heksanu i całość nanieść ostrożnie za pomocą pipety na przygotowaną kolumnę chromatograficzną. Kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

I.2% roztwór eteru etylowego w heksanie,

II.20% roztwór eteru etylowego w heksanie.

Kolumnę eluować każdym z podanych układów rozpuszczalników aż do całkowitego wymycia wędrującego w tym układzie pomarańczowego prążka. Frakcje pomarańczowe zbierać do suchych kolb okrągłodennych, natomiast eluaty bezbarwne zbierać łącznie do jednej kolby stożkowej i odrzucić. Rozpuszczalnik z każdej pomarańczowej frakcji oddestylować na wyparce do sucha.

e. Chromatografia cienkowarstwowa

Otrzymane frakcje karotenów (punkt d) rozpuścić w 1 ml heksanu i nanieść punktowo za pomocą kapilar na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 5 x 10 cm i rozwinąć w układzie heksan:eter naftowy (98:2 v/v) Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramu zaznaczyć kontury barwnych plam.

f. Wyznaczanie widm absorpcyjnych

Pozostałą po nakropleniu na płytce część barwnej frakcji I rozcieńczyć heksanem tak, aby wartość absorpcji przy 400 nm wynosiła 0,3 - 0,5 i wykonać pomiary absorbancji w zakresie od 400 do 600 nm wobec heksanu jako próby odniesienia.

Opracowanie wyników.

1. Sporządzić rysunek chromatogramu. Obliczyć wartości R_f dla barwnych związków
2. Wykreślić widmo absorpcyjne β -karotenu. Porównać z danymi literaturowymi (Goodwin T.W. (1955) Carotenoids, w: Modern Methods of Plant Analysis (Peach K., Tracey M.V., eds) 3, Springer-Verlag, Berlin, s. 294).

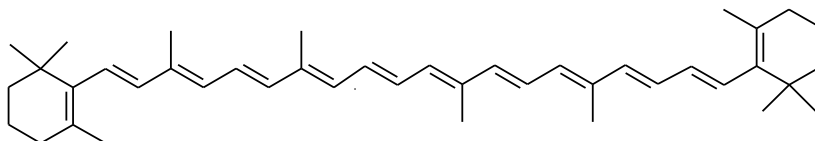
Ćwiczenie 8

Izolowanie likopenu z owoców pomidora

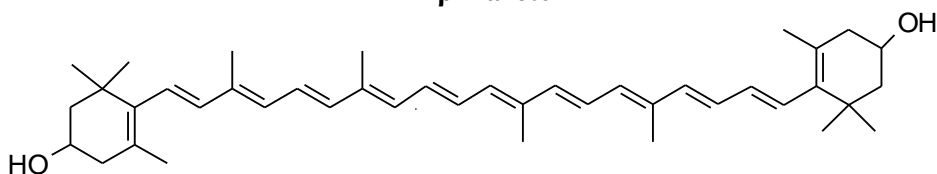
Likopen jest łańcuchowym karotenem (tetraterpenem), o barwie czerwonej, występującym w znacznych ilościach w owocach pomidora (*Lycopersicum*

esculentum). Jest istotnym składnikiem diety człowieka, gdyż działa jako silny przeciwutleniacz usuwający szkodliwe rodniki.

W podanej metodzie likopen ekstrahuje się z owoców pomidora acetonem, a następnie, w celu usunięcia tłuszczów, otrzymany ekstrakt poddaje się hydrolizie zasadowej. Likopen otrzymuje się w wyniku rozdzielania na kolumnie z tlenkiem glinu i identyfikuje na podstawie widma absorpcyjnego.



β - karoten



luteina

Materiały i odczynniki

1. Przecier pomidorowy - 50 g
2. Aceton
3. Eter etylowy bezwodny, bez nadtlenków.
4. Etanol spektralnie czysty
5. Heksan
6. Benzen
7. 60% roztwór wodorotlenku potasu
8. 0,01 M roztwór kwasu solnego
9. Siarczan (VI) magnezu bezwodny
10. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej (aktywność I wg skali Brockmanna)
11. Plastikowa płytką pokryta żelom krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 5 x 10 cm

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacze: 1000 ml, 500 ml, 100 ml; kolba ssawkowa 250 ml; kolby stożkowe: 500 ml, 250 ml; kolby okrągłodenne ze szlifem \varnothing 29: 250 ml, 100 ml, 50 ml; cylinder miarowy 250 ml; pipeta serologiczna 0,5 ml; pipeta z zagiętym końcem; kolumna szklana o wymiarach 1 x 20 cm; kapilary szklane; kamera i płytki szklane o do chromatografii cienkowarstwowej; lejek Büchnera; wyparka obrotowa; spektrofotometr.

Wykonanie

Uwaga: W czasie wydzielenia likopen chronić przed światłem, wysoką temperaturą i czynnikami utleniającymi.

a. Ekstrakcja

Przecier pomidorowy (ok. 50 g) zawiesić w 70 ml acetonu, następnie przenieść na lejek Büchnera, przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość na lejku zawiesić w 40 ml acetonu, ponownie przesączyć na lejku Büchnera, a następnie przemyć 5 razy porcjami heksanu po 25 ml. Ekstrakt acetonowo-heksanowy przenieść do rozdzielacza dodać taką samą objętość wody i wymieszać wprowadzając roztwór w ruch obrotowy, nie wstrząsać. W celu usunięcia acetonu warstwę organiczną ekstrahować wodą jeszcze trzykrotnie. Do ekstraktu heksanowego dodać około 10 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 20 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sącdek do kolby okrągłodennej i zateżyć na wyparce do sucha.

b. Otrzymywanie frakcji nie ulegającej zmydleniu

Suchą pozostałość (punkt a) rozpuścić w 10 ml etanolu, dodać 1 ml 60% roztworu KOH, zamknąć kolbę i pozostawić w ciemności w temperaturze pokojowej na 15 godzin. Następnie do roztworu dodać 30 ml wody, przenieść mieszaninę do rozdzielacza i ekstrahować czterokrotnie 20 ml porcjami eteru etylowego. Połączone wyciągi eterowe przepłukać 0,01 N HCl, a następnie wodą aż do odczynu obojętnego fazy wodnej. Do ekstraktu eterowego dodać ok. 3 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 30 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sącdek do 250 ml kolby okrągłodennej i oddestylować rozpuszczalnik na wyparce do sucha. Dodać do kolby 10 ml heksanu i ponownie oddestylować rozpuszczalnik do sucha.

c. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu

W suchej 50 ml kolbie okrągłodennej z korkiem szlifowym odważyć 6 g tlenku glinu do chromatografii kolumnowej, dodać 0,3 ml wody, kolbę zamknąć korkiem i wytrząsać w ciągu 15 minut. Kolumnę szklaną umieścić pionowo w statywie. Na dno kolumny włożyć za pomocą bagietki niewielki kłębek waty, zamknąć wylot kolumny, wlać 10 ml heksanu i ostrożnie wsypać całą ilość przygotowanego adsorbenta. Podczas wsypywania tlenku glinu uderzać w kolumnę z różnych stron kawałkiem gumowego węża. Po przygotowaniu kolumnę przemyć 10 ml porcją heksanu, a następnie zamknąć kolumnę pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

d. Frakcjonowanie barwników na kolumnie z tlenku glinu

Frację związków nie ulegających zmydleniu (punkt b) rozpuścić w 5 ml heksanu i całość nanieść ostrożnie za pomocą pipety na przygotowaną kolumnę chromatograficzną. Kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

- I. 2% roztwór eteru etylowego w heksanie,
- II. 6% roztwór eteru etylowego w heksanie,
- III. 20% roztwór eteru etylowego w heksanie.

Kolumnę eluować każdym z podanych układów rozpuszczalników aż do całkowitego wymycia wędrującego w tym układzie czerwonego prążka. Frakcje te zbierać do suchych kolb okrągłodennych, pozostałe eluaty zbierać łącznie do jednej

kolby stożkowej i odrzucić. Rozpuszczalnik z każdej czerwonej frakcji oddestylować na wyparce do sucha.

e. Chromatografia cienkowarstwowa

Otrzymaną frakcję likopenu (punkt d) rozpuścić w 1 ml heksanu i nanieść punktowo za pomocą kapilar na plastikową płytkę pokrytą żelem krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 5 x 10 cm i rozwinąć w układzie heksan : eter naftowy (98:2 v/v) Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramu zaznaczyć kontury barwnych plam.

f. Wyznaczanie widm absorpcyjnych

Pozostałą po nakropieniu na płytce część czerwonej frakcji II rozcieńczyć heksanem tak, aby wartość absorpcji przy 400 nm wynosiła 0,3 - 0,5 i wykonać pomiary absorbancji w zakresie od 400 do 600 nm wobec heksanu jako próby odniesienia.

Opracowanie wyników.

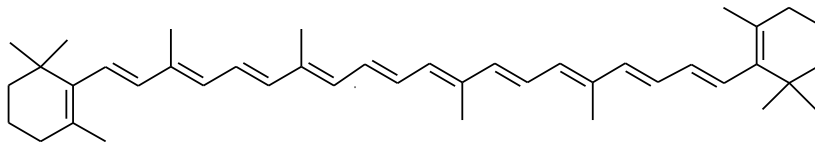
1. Sporządzić rysunek chromatogramu. Obliczyć wartości R_f dla barwnych związków
2. Wykreślić widmo absorpcyjne likopenu i porównać z danymi literaturowymi (Goodwin T.W. (1955) Carotenoids, w: Modern Methods of Plant Analysis (Peach K., Tracey M.V., eds) 3, Springer-Verlag, Berlin, s. 294).

Ćwiczenie 9

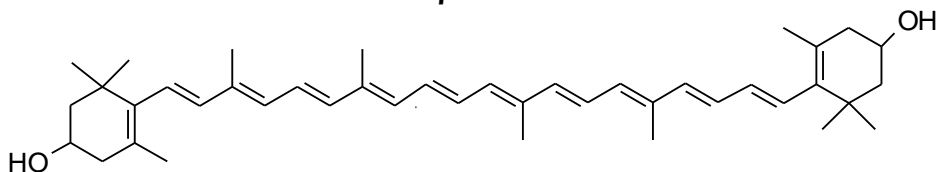
Otrzymywanie karotenoidów z liści

Karotenoidy, związki należące do tetraterpenów, są barwnikami występującymi we wszystkich roślinach. W zależności od ilości sprzężonych wiązań podwójnych związki te mają zabarwienie od jasnożółtego do purpurowego. W skład karotenoidów wchodzi karoteny, będące nienasyconymi węglowodorami, i ksantofile zawierające w cząsteczce tlen. W komórce karotenoidy występują w chloroplastach i chromoplastach. Są ważnymi składnikami diety człowieka, gdyż dostarczają prowitaminę A oraz przeciwutleniaczy.

W podanej metodzie karotenoidy ekstrahuje się z liści acetonem, a następnie, w celu usunięcia tłuszczów i chlorofili, otrzymany ekstrakt poddaje się hydrolizie zasadowej. Poszczególne barwniki otrzymuje się w wyniku rozdzielania na kolumnie z tlenkiem glinu i identyfikuje na podstawie ich widma absorpcyjnego.



β - karoten



luteina

Materiały i odczynniki

12. Świeże liście - 25 g
13. Aceton
14. Eter etylowy bezwodny, bez nadtlenków. 400 ml eteru etylowego wytrząsać w rozdzielaczu dwukrotnie po 5 minut z 200 ml porcjami nasyconego roztworu siarczanu (IV) sodu. Następnie eter przelać do kolby stożkowej, dodać 20 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu i pozostawić na 2 godziny. Wysuszony eter przedestylować, dodać kilka skrawków sodu metalicznego i pozostawić na noc. Następnego dnia eter przedestylować.
15. Etanol spektralnie czysty
16. Heksan
17. Benzen
18. 60% roztwór wodorotlenku potasu
19. 0,01 M roztwór kwasu solnego
20. Siarczan (VI) magnezu bezwodny
21. Sód metaliczny
22. Tlenek glinu do chromatografii kolumnowej (aktywność I wg skali Brockmanna)
23. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacze: 1000 ml, 500 ml, 100 ml; kolba ssawkowa 250 ml; kolby stożkowe: 500 ml, 250 ml; kolby okrągłodenne ze szlifem \varnothing 29: 250 ml, 100 ml, 50 ml; cylinder miarowy 250 ml; pipeta serologiczna 0,5 ml; pipeta z zagiętym końcem; kolumna szklana o wymiarach 1 x 20 cm; kapilary szklane; kamera i płytki szklane o wymiarach 6 x 11 cm do chromatografii cienkowarstwowej; lejek Schotta G2; homogenizator Unipan typ 302; wyparka obrotowa; spektrofotometr.

Wykonanie

Uwaga: W czasie wydzielania karotenoidy chronić przed światłem, wysoką temperaturą i czynnikami utleniającymi.

a. Ekstrakcja

Świeże liście homogenizować z acetonem w ciągu 2 minut, następnie przesączyć przez lejek Schotta, Pozostałe na lejku fragmenty liści przenieść do homogenizatora, zalać acetonem i homogenizować jak poprzednio. Ekstrakcję powtórzyć jeszcze dwukrotnie. Zmierzyć objętość połączonych ekstraktów acetonowych, dodać równą objętość heksanu, przenieść do rozdzielacza i ekstrahować kilkakrotnie wodą. Do ekstraktu heksanowego dodać około 15 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 20 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sączek do kolby okrągłodennej i zatężyć na wyparce do sucha.

b. Otrzymywanie frakcji nie ulegającej zmydleniu

Pozostałość po oddestylowaniu heksanu rozpuścić w 10 ml etanolu, dodać 1 ml 60% roztworu KOH, zamknąć kolbę i pozostawić w ciemności w temperaturze pokojowej na 15 godzin. Następnie do roztworu dodać 30 ml wody, przenieść mieszaninę do rozdzielacza i ekstrahować pięciokrotnie 20 ml porcjami eteru etylowego. Połączone wyciągi eterowe przepłukać 0,01 N HCl, a następnie wodą aż do odczynu obojętnej fazy wodnej. Do ekstraktu eterowego dodać 5 g bezwodnego siarczanu (VI) magnezu, pozostawić na 30 minut, a następnie przesączyć przez fałdowany sączek do 250 ml kolby okrągłodennej i oddestylować rozpuszczalnik na wyparce do sucha. Dodać do kolby 10 ml heksanu i ponownie oddestylować rozpuszczalnik do sucha.

c. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu

W suchej 50 ml kolbie okrągłodennej z korkiem szlifowym odważyć 8 g tlenku glinu do chromatografii kolumnowej, dodać 0,4 ml wody, kolbę zamknąć korkiem i wytrząsać w ciągu 15 minut. Kolumnę szklaną umieścić pionowo w statywie. Na dno kolumny włożyć za pomocą bagietki niewielki kłębek waty, zamknąć wylot kolumny, wlać 10 ml heksanu i ostrożnie wsypać całą ilość przygotowanego adsorbenta. Podczas wsypywania tlenku glinu uderzać w kolumnę z różnych stron kawałkiem gumowego węża. Po przygotowaniu kolumnę przemyć 10 ml porcją heksanu, a następnie zamknąć kolumnę pozostawiając nad powierzchnią adsorbenta 5 mm warstwę rozpuszczalnika.

d. Frakcjonowanie barwników na kolumnie z tlenku glinu

Frakcję związków nie ulegających zmydleniu (punkt b) rozpuścić w 5 ml heksanu i całość nanieść ostrożnie za pomocą pipety na przygotowaną kolumnę chromatograficzną. Kolumnę eluować kolejno następującymi układami rozpuszczalników:

- I. 2% roztwór eteru etylowego w heksanie,
- II. 6% roztwór eteru etylowego w heksanie,
- III. 20% roztwór eteru etylowego w heksanie,
- IV. eter etylowy.

Kolumnę eluować każdym z podanych układów rozpuszczalników aż do całkowitego wymycia wędrującego w tym układzie barwnego prążka. Frakcje

barwne zbierać do suchych kolb okrągłodennych, natomiast eluaty bezbarwne zbierać łącznie do jednej kolby stożkowej i odrzucić. Rozpuszczalnik z każdej barwnej frakcji oddestylować na wyparce do sucha.

e. Chromatografia cienkowarstwowa

Dwie płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej zaktywować w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut. Każdą z otrzymanych frakcji karotenoidów (punkt d) rozpuścić w 1 ml heksanu i nanieść punktowo, za pomocą kapilar, na obie płytki. Jedną z płytek rozwinąć w układzie toluen : eter naftowy (1:1; v/v), drugą w układzie heksan : aceton (8:2; v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramów zaznaczyć kontury barwnych plam.

f. Wyznaczanie widm absorpcyjnych

Pozostałą po nakropleniu na płytki część każdej barwnej frakcji rozcieńczyć heksanem tak, aby wartość absorpcji przy 400 nm wynosiła 0,3 - 0,5. Dla wszystkich frakcji wykonać pomiary absorpcji w zakresie od 400 do 600 nm wobec heksanu jako próby odniesienia.

Opracowanie wyników

1. Sporządzić rysunki chromatogramów. Obliczyć wartości R_f dla barwnych związków.
2. Wykreślić widma absorpcyjne badanych związków. Porównać położenie maksimum absorpcji badanych związków z danymi literaturowymi (Goodwin T.W. (1955) Carotenoids, w: Modern Methods of Plant Analysis (Peach K., Tracey M.V., eds) 3, Springer-Verlag, Berlin, s. 294).
3. Uzyskane wyniki zestawić w tabeli:

Fracja nr	Wartość R_f		Maksimum absorpcji (nm)	Zidentyfikowany karotenoid
	Układ I	Układ II		

Ćwiczenie 10

Wykrywanie różnic w składzie glikozydów fenolowych w surowcach farmakognostycznych

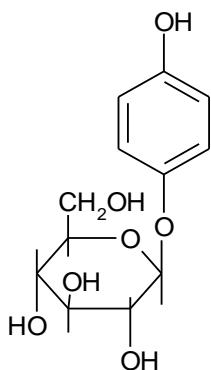
Glikozydy fenolowe są związkami bardzo rozpowszechnionymi w świecie roślin kwiatowych, szczególnie w rodzinach *Salicaceae* i *Ericaceae*. Aglikonami w tej grupie związków są proste pochodne fenolowe (zawierające 1, 2 lub 3 grupy hydroksylowe), natomiast część cukrową stanowi najczęściej glukoza lub jej pochodna. Związki fenolowe mają właściwości bakteriobójcze, dezynfekujące i

przeciwzapalne. Do najważniejszych przedstawicieli glikozydów fenolowych należą: arbutyna i pirozyd, czyli 6'acetyloarbutyna.

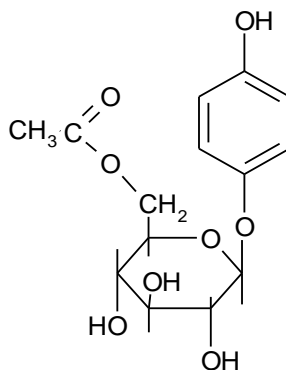
Podstawowymi surowcami farmakognostycznymi zawierającymi jako substancje czynne glikozydy fenolowe są: liść mącznicy (*Folium Uvae ursi*), liść borówki brusznicy (*Folium Vitis idae*), kora wierzby (*Cortex Salicis*) i kwiat tawuły (*Flos Spireae*).

Niektóre surowce farmakognostyczne są podobne do siebie w wysokim stopniu, a w przypadku dużego rozdrobnienia (surowiec zielarski) – praktycznie nierozróżnialne. Taka sytuacja występuje w przypadku liści borówki brusznicy i liści mącznicy lekarskiej. Podobnie morfologicznie surowce wykazują jednak istotne różnice w składzie glikozydów fenolowych. W liściach mącznicy lekarskiej występuje arbutyna, w liściach borówki brusznicy obok arbutyny pojawia się pirozyd.

Celem ćwiczenia jest analiza chromatograficzna pozwalająca na rozróżnienie bardzo podobnych morfologicznie surowców.



Arbutyna



Pirozyd

Materiały i odczynniki

1. Sproszkowane liście mącznicy lekarskiej
2. Sproszkowane liście borówki brusznicy
3. Octan ołowiu
4. Siarczek sodu
5. Żel krzemionkowy do chromatografii cienkowarstwowej
6. Chloroform
7. Metanol
8. Etanol
9. Kwas solny
10. Kwas sulfanilowy
11. azotan(III) sodu
12. octan sodu

Materiały pomocnicze i aparatura

Płytki chromatograficzne, kamera do chromatografii cienkowarstwowej, spryskiwacze do wywoływania chromatografów, lejek, bibuła filtracyjna, lejek Schotta G2.

Wykonanie

a) ekstrakcja surowców

100 g każdego z surowców (liście mącznicy lekarskiej i borówki brusznicy) umieścić w kolbie okrągłodennej o pojemności 1000 ml, dodać 500 ml wody i gotować 2 godziny pod chłodnicą zwrotną. Gorącą zawartość kolby przesączyć na sączku karbowanym (wygotowane liście odrzucić). Do ciepłego przesączu wlewać wolno przy ciągłym mieszaniu 10% roztwór octanu ołowiu, do momentu zakończenia wypadania osadu. Osad odsączyć, a do klarownego przesączu dodać kilka kropli nasyconego Na_2S . Roztwór ogrzać do 80°C i ponownie przesączyć. Pozbawiony ołowiu, klarowny roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości ok. 100 ml i odstawić do krystalizacji. Wydzielone kryształy arbutyny lub mieszaniny arbutyny i pirozydu przesączyć przez lejek Schotta G2, przemyć małą ilością etanolu zebrać i wysuszyć na powietrzu.

b) chromatografia cienkowsarstwowa

Z obu próbek wykonać chromatogramy cienkowsarstwowe na żelu krzemionkowym w układzie chloroform : metanol (4:1 v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu płytek, chromatogramy spryskać roztworem A, a po wyschnięciu roztworem B.

Roztwór A. 0,5 g kwasu sulfanilowego rozpuścić w 70 ml wody, dodać 6 ml 6 molowego HCl, uzupełnić wodą do objętości 100 ml. Tuż przed spryskaniem zmieszać otrzymany roztwór z 5% wodnym roztworem azotanu(III) sodu w stosunku objętościowym 1:1.

Roztwór B. 20% wodny roztwór octanu sodu.

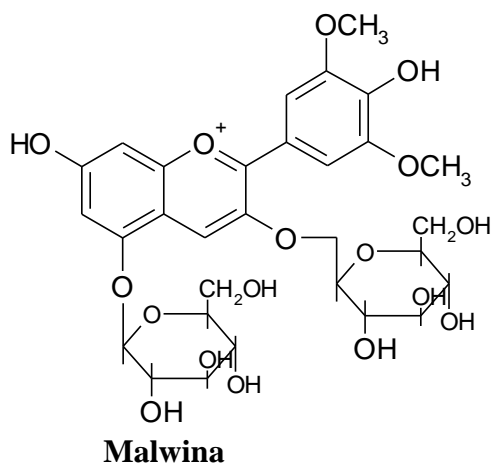
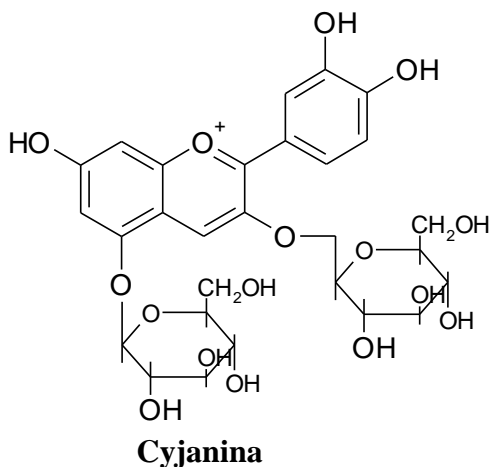
Opracowanie wyników

Narysować chromatogramy i na ich podstawie zidentyfikować surowce.

Ćwiczenie 11

Izolowanie barwników antocyjanowych z kwiatów bławatka lub czarnej malwy

Podstawowym antocyjanem kwiatów bławatka (*Centaurea cyanus flos*) jest cyjanina (3,5-diglukozyd cyjanidyny), a kwiatów czarnej malwy (*Malva arborea flos*) - malwina (3,5-diglukozyd malwidyny). Napary z kwiatów bławatka stosuje się wewnętrznie w obrzękach i niewydolności krążenia, a zewnętrznie w stanach zapalnych oczów, nadwrażliwości na promienie słoneczne i promieniowanie odbiorników telewizyjnych. Wywary z kwiatów czarnej malwy stosuje się w niezżytach górnych dróg oddechowych, chrypce, skąpych miesiączkach.



Metoda wyodrębniania antocyjanów polega na ich ekstrakcji z płatków kwiatowych zakwaszonym metanolem i oczyszczeniu przez wytrącenie w postaci soli ołowiu (II). Wolne związki otrzymane w wyniku rozkładu soli rozcieńczonym kwasem solnym poddaje się krystalizacji w celu dalszego oczyszczenia.

Materiały i odczynniki

1. Płatki kwiatów bławatka, czarnej malwy lub czerwonej peonii - 20g
2. Metanol bezwodny
3. Eter etylowy (wolny od nadtlenuków, bezwodny)
4. Stężony kwas azotowy
5. Octan ołowiu (II)
6. Etanol 96%
7. n-Butanol
8. Alkohol amyłowy
9. Kwas octowy lodowaty
10. Chlorek wapnia do eksykatorów
11. Roztwory wzorcowe glukozy, arabinozy, ramnozy w 10% izopropanolu (1 mg/ml)
12. Ftalan aniliny (1,66 g kwasu o-ftalowego i 0,93 g aniliny rozpuścić w 100 ml n-butanolu nasyconego wodą)
13. Stężony kwas siarkowy
14. Chlorek sodu

Materiały pomocnicze i aparatura

Słój 1000 ml; kolba ssawkowa 1000 ml; lejek Büchnera Ø 12 cm; lejek szklany Ø 6 cm; wyparka próżniowa; aparat Kippa; zestaw do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną; kamera do chromatografii bibułowej; bibuła filtracyjna; płytki pokryte celulozą; spektrofotometr.

Wykonanie

- a. Ekstrakcja barwników

Płatki kwiatowe bławatka, czarnej malwy lub czerwonej peonii (20 g), wysuszone w temperaturze nie przekraczającej 60°C, rozdrobnić i przenieść porcjami (po ok. 4 g) do słoja o pojemności 0,5 l, zalewając każdą porcję 10 ml bezwodnego metanolu zawierającego 1 % (wagowo) chlorowodoru. Zawartość słoja po dodaniu każdej porcji należy dokładnie wymieszać bagietką. Najczęściej wystarcza około 50 ml zakwaszonego metanolu; gdyby jednak część materiału znajdowała się powyżej poziomu rozpuszczalnika, należy dolać zakwaszonego metanolu aż do całkowitego przykrycia płatków. Pozostawić na noc w ciemnym miejscu. Następnego dnia zawartość słoja odsączyć na lejku Büchnera, dokładnie odcisnąć materiał na lejku za pomocą szklanego korka, po czym przemyć dwukrotnie porcjami po około 10 ml metanolu zawierającego 1% (wagowo) chlorowodoru. Połączone przesącze zatężyć przez oddestylowanie części rozpuszczalnika na wyparce obrotowej w temperaturze nie przekraczającej 45°C do objętości około 10 ml.

Otrzymany roztwór wkroplić, przy ciągłym mieszaniu, do 60 ml bezwodnego eteru etylowego i pozostawić do odstania na 1 godzinę. Zdekantować roztwór eterowy znad silnie zabarwionej oleistej substancji znajdującej się na dnie naczynia. Oleistą pozostałość rozpuścić w 10 ml wody i przesączyć przez fałdowany sączek.

b. Oczyszczanie barwników przez wytrącanie soli ołowiu (II)

Do otrzymanego klarownego przesącza wkraplać, dokładnie mieszając, 10% roztwór octanu ołowiu (II) aż do chwili, gdy czerwona początkowo barwa roztworu zmieni się na niebieskofioletową. Ilość użytego roztworu octanu ołowiu (II) zależy w znacznej mierze od rodzaju badanego materiału, zwykle jednak nie przekracza 10 ml. Płyn wraz z wytrąconymi solami ołowiu (II) barwników pozostawić na noc, po czym odsączyć na lejku Büchnera. Osad przenieść do okrągłodennej kolby o pojemności 50 ml, dodać 10 ml bezwodnego metanolu i ogrzewać do wrzenia na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w ciągu 30 min. Zawartość kolby przesączyć na lejku Büchnera. Osad na sączku przemyć 5 ml metanolu i wysuszyć w ekzykatorze nad bezwodnym chlorkiem wapnia. Wysuszony osad soli ołowiu (II) rozetrzeć dokładnie w moździerzu z 10 ml 1% roztworu chlorowodoru w bezwodnym metanolu. Roztwór barwników odsączyć na lejku Büchnera od wytrąconego chlorku ołowiu (II), osad przemyć 5 ml metanolu i połączone przesącze zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem (w temperaturze nie przekraczającej 45°C) do konsystencji gęstego syropu.

c. Krystalizacja

Otrzymany syrop rozpuścić na gorąco w możliwie najmniejszej ilości etanolu (poniżej 1 ml). Do ciepłego roztworu dodać równą objętość stężonego kwasu solnego i odstawić do krystalizacji, początkowo w temperaturze pokojowej, a gdy roztwór ochłodzi się - w lodówce. Po kilku dniach odsączyć kryształy, przepłukać minimalną ilością zimnego etanolu i wysuszyć w ekzykatorze próżniowym nad bezwodnym chlorkiem wapnia.

Wydajność cyjaniny z kwiatów bławatka i peoniny z czerwonej peonii wynosi orientacyjnie ok. 0,04 g, a malwiny z kwiatów czarnej malwy ok. 0,06 g.

d. Spektralna charakterystyka otrzymanego produktu

Wyznaczyć za pomocą spektrofotometru krzywą absorpcji otrzymanego glikozydu w zakresie 400-600 nm. W tym celu rozpuścić barwnik w etanolu zawierającym 0,1 % stężonego kwasu solnego. Stężenie barwnika w roztworze powinno być tak dobrane (obliczyć na podstawie podanych niżej danych) aby ekstynkcja w maksimum pochłaniania światła wynosiła 0,7-0,9.

Barwnik	λ_{\max}	ϵ_{\max}
Cyjanina	551 nm	$4,4 \times 10^4$
Malwina	559 nm	$3,7 \times 10^4$

e. Chromatografia glikozydów i produktów ich hydrolizy

Niewielką próbkę otrzymanego glikozydu (około 3 mg) umieścić w małej probówce, dodać 1 ml 6 M kwasu solnego i ogrzewać do wrzenia w ciągu 3 minut. Po ochłodzeniu dodać do próbki 1 ml alkoholu amyłowego, dokładnie wymieszać i gdy warstwa alkoholowa oddzieli się - przenieść ją ostrożnie małą pipetką do innej próbki. Na gotową płytkę pokrytą celulozą nałożyć punktowo (po kilka kropli) następujące roztwory:

- 1 - roztwór metanolowy otrzymanego glikozydu,
- 2 - ekstrakt alkoholowy z hydrolizatu,
- 3 - wodną pozostałość po ekstrakcji hydrolizatu,
- 4- roztwór wzorcowy glukozy,
- 5 - roztwór wzorcowy ramnozy.

Rozwijać chromatogram w jednym z podanych w tabeli układów rozpuszczalników (po uzgodnieniu z asystentem). Po wyjęciu z kamery chromatograficznej zaznaczyć czoło rozpuszczalnika, chromatogram wysuszyć pod wyciągiem, a następnie zaznaczyć ołówkiem kontury barwnych plam. Po czym chromatogramy spryskać roztworem ftalanu aniliny (odczynnik 12) i ogrzewać w suszarce o temperaturze 105°C w ciągu 5 min. Zaznaczyć ołówkiem kontury powstałych plam. Obliczyć wartości R_f dla wszystkich zaznaczonych związków i porównać z podanymi w tabeli.

Związek	Układ	
	butanol : kwas octowy : woda (12:3:5 v/v)	kwas octowy : steżony kwas solny : woda (5:1:5 v/v)
Cyjanina	0,23	0,70
Malwina	0,30	0,84
Cyjanidyna		0,34
Malwidyna		0,22
Glukoza	0,18	
Arabinoza	0,25	
Ramnoza	0,36	

Opracowanie wyników

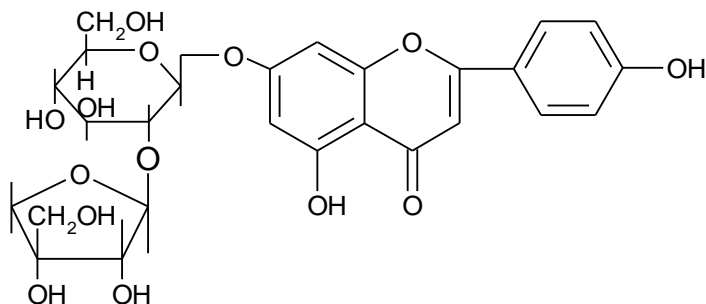
1. Podać wydajność preparatyki.
2. Obliczyć procentową zawartość barwnika w kwiatach.

Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych (posługując się podanymi w tabeli wartościami ϵ_{\max}) wyliczyć ilość domieszek w otrzymanym preparacie.

Ćwiczenie 12

Wydzielanie i charakterystyka apiiny z korzenia pietruszki

Apiina jest glikozydem apigeniny (5,7,4'-trihydroksyflawonu). Łańcuch cukrowy zbudowany z reszty apiozy i glukozy jest dołączony do grupy 7-OH aglikonu. Wykazuje ona działanie spazmolityczne, przeciwalergiczne i ochronne dla wątroby.



Apiina

Bogatym źródłem apiiny jest korzeń pietruszki (*Petroselinum sativum*). Wyciągi z korzenia wchodzi w skład preparatów o działaniu moczopędnym, odkazającym drogi moczowe i zapobiegającym powstawaniu kamieni moczowych.

Podany przepis oparty jest na powszechnie stosowanych metodach otrzymywania i charakterystyki flawonów. Apiinę ekstrahuje się metanolem z rozdrobnionego materiału, a otrzymaną surową frakcję odłuszcza się przez kolejne ekstrakcje eterem etylowym i acetonem. Następnie apiinę wydziela się w postaci soli ołowiu (II), którą rozkłada się rozcieńczonym kwasem solnym. Apiinę krystalizuje się z metanolu, a następnie identyfikuje na podstawie jej widma absorpcyjnego i chromatografii bibułowej.

Materiał i odczynniki

1. Korzenie pietruszki –250 g
2. Metanol
3. Eter etylowy
4. Aceton wysuszony. Do kolby stożkowej wlać 100 ml acetonu, wsypać 5 g bezwodnego siarczynu (VI) sodu, pozostawić na 15 godzin. Następnie aceton przesączyć przez fałdowany sącdek i przedestylować.
5. Etanol spektralnie czysty
6. 2% etanolowy roztwór chlorku glinu
7. 0,02 M roztwór etanolanu sodu. Do kolby stożkowej odmierzyć 50 ml etanolu, zważyć, wrzucić do niego około 0,5 g sodu metalicznego, poczekać do zakończenia reakcji i ponownie zważyć. Wyliczyć stężenie uzyskanego roztworu etanolanu sodu. Otrzymany roztwór rozcieńczyć etanolem do stężenia 0,02 M.
8. 0,1 M etanolowy roztwór octanu sodu
9. 10% roztwór octanu ołowiu (II)
10. 5% roztwór amoniaku
11. 18% kwas solny
12. Kwas solny stężony
13. *n*-Butanol
14. Kwas octowy lodowaty
15. 1% roztwór chlorku żelaza (III) w 96% etanolu
16. Roztwór ftalanu aniliny. 0,93 g aniliny i 1,66 g kwasu ftalowego rozpuścić w 100 ml *n*-butanolu nasyconego wodą.
17. Wzorcowe roztwory glukozy i apiozy (1 mg/ml w 10% izopropanolu)
18. Chlorek wapnia bezwodny do ekscyktorów

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolby stożkowe: 100 ml, 25 ml; kolby ssawkowe: 1000 ml, 250 ml; cylindry miarowe 250 ml, 100 ml; kolby okrągłodenne 2000 ml, 50 ml; chłodnica zwrotna; słój szklany z korkiem szlifowym 2000 ml; lejki Büchnera \varnothing 20 cm, 5 cm; lejek szklany \varnothing 10 cm; moździerz; kamera i płytki pokryte celulozą do chromatografii cienkowarstwowej; kapilary szklane; ekscyktor próżniowy; łaźnia wodna; wyparka obrotowa; aparat do oznaczania temperatury topnienia; homogenizator Unipan typ 302; lampa UV; spektrofotometr; nóż, tarka; papierki wskaźnikowe.

Wykonanie

a. Otrzymywanie surowego preparatu

Korzenie pietruszki (250 g) obrać i zetrzeć na tarce, a następnie homogenizować porcjami z metanolem (sumarycznie ok. 250 ml). Homogenat umieścić w słoju, zamknąć korkiem szlifowym i zostawić w ciemności na 15 godzin. Następnie przesączyć na lejku Büchnera. Przesącz zachować, a fragmenty tkanki przenieść do kolby okrągłodennej, zalać 150 ml metanolu, doprowadzić do wrzenia na łaźni wodnej, a następnie szybko przesączyć na lejku Büchnera. Otrzymany przesącz dołączyć do poprzedniego. Połączone wyciągi zagęszczać na wyparce do chwili, gdy zacznie wypadać osad. Kolbę z zawartością ostudzić i umieścić w lodówce na noc. Następnego dnia odsączyć na lejku Büchnera i otrzymany osad wysuszyć. Wysuszony osad rozetrzeć w moździerzu z 10 ml eteru etylowego, przenieść do 25 ml kolbki stożkowej z korkiem szlifowym i wytrząsać w ciągu 15 minut. Następnie odstawić na 20 min. Znad osadu ostrożnie zdekantować eterowy roztwór i odrzucić. Powtórzyć rozcieranie z eterem etylowym dwukrotnie, a następnie z wysuszonym i ochłodzonym do 2°C acetonem. Pozostały osad jest surową frakcją apiiny zawierającą niewielką domieszkę luteoliny.

b. Oczyszczanie apiiny

Surowy preparat apiiny przenieść do 50 ml kolby stożkowej i zawiesić w 25 ml gorącej wody. Kolbę umieścić na wrzącej łaźni wodnej i dodawać kroplami 10% roztwór octanu ołowiu (II) do chwili, gdy kolejne krople nie powodują dalszego wytrącania osadu. Zawartość kolby doprowadzić do wrzenia i przesączyć przez fałdowany sączek. Osad zawierający sól ołowiu (II) luteoliny odrzucić, a przesącz doprowadzić do pH 8,5-9 za pomocą 5% roztworu amoniaku. Gdy pojawiający się osad opadnie na dno, dodać kroplę roztworu octanu ołowiu (II). Jeżeli wytrąci się żółty osad, dodawać w dalszym ciągu kroplami roztwór octanu ołowiu (II), utrzymując pH w zakresie 8 - 9 za pomocą 5% roztworu amoniaku. Przerwać wkraplanie octanu ołowiu (II) w chwili, gdy rozpocznie się wytrącać bezbarwny osad. Mieszaninę zagotować, następnie ochłodzić i przesączyć na lejku Büchnera. Osad wysuszyć w eksykatorze próżniowym nad bezwodnym chlorkiem wapnia.

Otrzymany osad soli ołowiu (II) apiiny rozetrzeć dokładnie w moździerzu i dodawać, mieszając, roztwór kwasu solnego w metanolu (5 : 95; v/v) małymi porcjami, po około 0,5 ml. Po dodaniu każdej porcji zakwaszonego metanolu sprawdzić odczyn roztworu papierkiem wskaźnikowym. Następną porcję zakwaszonego metanolu dodać wówczas, gdy pH mieszaniny wzrośnie do wartości 5 - 6. W wyniku dodania 2 - 5 ml zakwaszonego metanolu otrzymuje się żółty, słabo kwaśny metanolowy roztwór apiiny oraz bezbarwny osad chlorku ołowiu (II). Zawartość moździerza przenieść do kolbki stożkowej i doprowadzić do wrzenia na łaźni wodnej. Po ochłodzeniu przesączyć przez fałdowany sączek do kolby okrągłodennej (50 ml).

c. Krystalizacja

Przesącz zagęszczać na wyparce do chwili, gdy zacznie wydzielać się osad. Roztwór pozostawić do ostygnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie wstawić do lodówki. Następnego dnia odsączyć na lejku Büchnera drobnokrystaliczny osad apiiny i ponownie przekrystalizować z niewielkiej ilości metanolu. Po wysuszeniu kryształy zważyć i oznaczyć temperaturę topnienia. Wydajność około 75 mg.

d. Chromatografia apiiny i produktów jej hydrolizy

Około 2 mg apiiny umieścić w probówce, dodać 2 ml 18% kwasu solnego, probówkę zatopić i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej w ciągu 30 minut. Następnie probówkę ochłodzić i otworzyć.

Na płytkę pokrytą celulozą nanieść punktowo:

1 - kilka kropli hydrolizatu,

2 - kilka kropli metanolowego roztworu otrzymanej apiiny,

3,4 - wzorce cukru.

5 - kilka kropli hydrolizatu,

6 - kilka kropli metanolowego roztworu otrzymanej apiiny.

Płytkę z naniesionymi związkami rozwinąć w układzie n-butanol : kwas octowy : woda (12:3:5; v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogram obejrzeć w świetle UV, zaznaczyć położenie fluoryzujących plam i spryskać fragment płytki (punkty 1-2) alkoholowym roztworem chlorku żelaza (III), a drugi fragment (punkty 3-6) ftalanem aniliny. Chromatogram ogrzewać w ciągu 5 minut w temperaturze 105°C. Obliczyć wartości R_f dla otrzymanych plam i porównać z podanymi niżej.

Związek	R_f
Apiina	0,51
Apigenina	0,91
Glukoza	0,18
Apioza	0,28

e. Wyznaczanie widma absorpcyjnego

Otrzymaną apiinę (ok. 0,3 mg) rozpuścić w takiej ilości etanolu, aby wartość absorpcji przy 255 nm wynosiła 0,3 - 0,5. Wykonać pomiary absorpcji w zakresie od 240 do 490 nm w kuwetach kwarcowych wobec etanolu jako próby odniesienia. Następnie do trzech kuwet kwarcowych A, B i C odpipetować po 2 ml etanolowego roztworu badanego związku o dobranym uprzednio stężeniu i dodać odpowiednio:

A - 0,1 ml 2% etanolowego roztworu chlorku glinu,

B - 0,2 ml 0,02 M roztworu etanolanu sodu,

C - 0,1 ml 0,1 M etanolowego roztworu octanu sodu.

Zawartość kuwet wymieszać i zmierzyć absorpcje, w zakresie od 240 do 490 nm, stosując jako próby odniesienia etanol zawierający dodatek odpowiedniego związku.

Opracowanie wyników

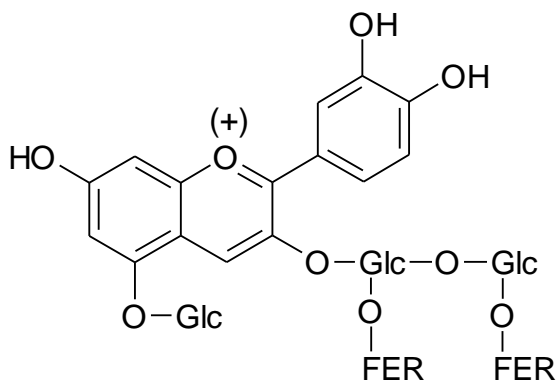
1. Podać ilość otrzymanego preparatu apiiny.
2. Sporządzić rysunki chromatogramów.

Wykreślić widmo absorpcyjne apiiny. Zaznaczyć zmiany w maksimach absorpcji wywołane dodatkiem różnych substancji w porównaniu z maksimami absorpcji badanego flawonoidu w etanolu. Porównać z danymi literaturowymi (Jurd L. (1962) Spectral properties of flavonoid compounds, w: The Chemistry of Flavonoid Compounds (Geissman T.A., red.) Pergamon Press, Oxford, s. 320-321).

Ćwiczenie 13

Otrzymywanie chlorku rubrobrassycyny z czerwonej kapusty

Rubrobrassycyna jest glikozydem rubrobrassyny. Celem ćwiczenia jest wyodrębnienie chlorku rubrobrassycyny z suszonych liści czerwonej kapusty (*Brassica oleracea*) i zbadanie jego punktu zmiany barwy. Antocyjany występują w licznych surowcach farmakopealnych stosowanych m.i. środki przeciwzapalne, moczopędne, przeciwwrzodowe, napotne itp.



FER – kwas ferulowy

Rubrobrassycyna

Ćwiczenie oparte jest na powszechnie stosowanych metodach otrzymywania flawonoidów. Rubrobrassycynę ekstrahuje się zakwaszonym metanolem, wytrąca eterem etylowym i oczyszcza przez wytrącenie w postaci soli

ołowiu (II). Po rozłożeniu soli ołowiu (II) rubrobrassycynę przeprowadza się w jej chlorek i oznacza punkt zmiany barwy.

Materiał i odczynniki

1. 100 g suszu liści czerwonej kapusty
2. Metanol
3. Gazowy chlorowódor
4. Eter etylowy
5. 33% roztwór octanu ołowiu (II)
6. 0,5 N NaOH

Materiały pomocnicze i aparatura

Zlewki: 100 ml, 500 ml, 1000 ml; aparat do wytwarzania chlorowodoru; kolby stożkowej 50 ml, 100 ml, 1000 ml; kolba ssawkowa 250 ml; lejek Büchnera \varnothing 10 cm; lejki szklane; bibuła filtracyjna; nóż; deska do krojenia; szkiełko zegarkowe; eksykator próżniowy; biureta; pH-metr.

Wykonanie

a. Ekstrakcja i wytrącanie surowego chlorku rubrobrassycyny

Główkę czerwonej kapusty poszatkować i wysuszyć. 50 g suszu zalać 125 ml metanolu zawierającego 2% chlorowodoru i pozostawić na 3 godz. Ekstrakt odsączyć i przemyć pozostały na sączku materiał 50 ml metanolu zawierającego 1% chlorowodoru. Połączone przesącze zatężyć do objętości 50 ml w temperaturze 45°C, dodać podwójną objętość eteru, a następnie zdekantować roztwór znad osadu.

b. Wytrącanie soli ołowiu (II)

Osad rozpuścić w 25 ml gorącego metanolu, oziębic i przesączyć. Do przesącza dodać 4-krotną objętość eteru i roztwór zdekantować. Wytrącony osad rozpuścić w 45 ml wody i wkraplać do niego, ciągle mieszając, 33% wodny roztwór octanu ołowiu (II) do momentu, gdy początkowa czerwono-fioletowa barwa roztworu zmieni się na niebiesko-fioletową. Mieszaninę pozostawić na 24 godziny, po czym odsączyć niebiesko zabarwioną sól ołowiu (II) barwnika, osad przemyć na sączku gorącym metanolem i suszyć na powietrzu.

c. Otrzymywanie chlorku rubrobrassycyny

Otrzymaną sól ołowiu (II) zawiesić w 25 ml 2% roztworu chlorowodoru w metanolu. Wytrącony chlorek ołowiu (II) odsączyć na lejku Büchnera i do klarownego przesącza dodać 10-krotną objętość eteru. Wytrącony osad chlorku rubrobrassycyny przesączyć, przepłukać eterem i wysuszyć w eksykatorze próżniowym.

d. Oznaczanie punktu zmiany barwy

2 mg chlorku rubrobrassycyny rozpuścić w 20 ml wody i miareczkować za pomocą 0,5 M NaOH mierząc jednocześnie wartość pH roztworu.

Opracowanie wyników

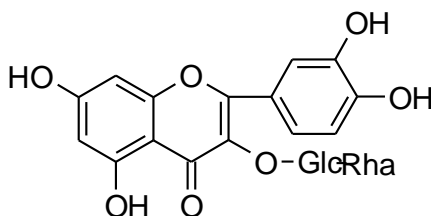
1. Obliczyć wydajność preparatyki.
Narysować krzywą miareczkowania i zaznaczyć punkt zmiany barwy.

Ćwiczenie 14

Wyodrębnianie rutozydu z kwitnących pędów gryki

Rutozyd (rutyna) jest glikozydem kwercetyny, wyizolowanym raz pierwszy w 1842 r z ziela ruty zwyczajnej (*Ruta graveolens*). Częścią cukrową rutozydu jest disacharyd (rutynoza), zbudowany z glukozy i ramnozy. Ten bardzo rozpowszechniony w świecie roślinnym glikozyd flawonoidowy jest czynnym składnikiem wielu surowców farmakognostycznych, np. kwiatów bzu czarnego (*Flos sambuci*) – surowiec działający napotnie, przeciwgorączkowo i przeciwzapalnie oraz ziela fiołka trójbarwnego (*Herba Violae tricoloris*) – surowiec o działaniu przeciwzapalnym, napotnym i wykrztuśnym. Rutozyd jest substancją często stosowaną w medycynie (Rtinoscobin), ze względu na działanie uszczelniające naczynia włosowate oraz właściwości oksydacyjno-redukcyjne. W warunkach polskich gryka (*Fagopyrum esculentum*) może stanowić przemysłowe źródło rutozydu.

Głównymi etapami izolowania rutozydu są: ekstrakcja surowca metanolem, wytrącanie surowego glikozydu i następnie jego oczyszczanie od wolnej kwercetyny i zanieczyszczeń lipidowych. Czystość wykrystalizowanego z etanolu rutozydu sprawdza się metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).



Rutozyd

Materiały i odczynniki

1. Wysuszone kwitnące pędy gryki
2. Metanol
3. Etanol
4. Toluen
5. Płytki do chromatografii cienkowarstwowej z poliamidem (10x20 cm)
6. Keton metyloowoetylowy
7. Acetyloaceton

8. Amoniak
9. Chlorek glinu

Materiały pomocnicze i aparatura

Zestaw do ogrzewania pod chłodnicą zwrotną; wyparka obrotowa; kolby okrągłodenne 1000 ml, 500ml; lejek szklany; lejek Buchnera; kamera i płytki chromatograficzne; spryskiwacz do chromatogramów.

Wykonanie

a. Ekstrakcja

100 g sproszkowanych, wysuszonych kwitnących pędów gryki umieścić w kolbie okrągłodennej, zalać 400 ml metanolu i ekstrahować pod chłodnicą zwrotną 60 minut. Metanol przesączyć do kolby okrągłodennej, a materiał rośliny ekstrahować ponownie w takich samych warunkach. Połączone wyciągi metanolowe zagęścić na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem prawie do sucha.

b. Otrzymywanie surowej frakcji rutozydu.

Do zagęszczonego wyciągu metanolowego dodać 250 ml wrzącej wody, następnie ogrzewać na łaźni wodnej w ciągu 15 minut i szybko przesączyć. Po ochłodzeniu z przesączu wypada surowy osad, który należy odsączyć, używając sączka z bibuły filtracyjnej. Przesącz zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/3 objętości, ochłodzić i odsączyć pozostałą porcję surowego osadu.

c. Oczyszczanie rutozydu

Otrzymany surowy produkt (punkt b) rozpuścić w 100 ml etanolu i dodając stopniowo wodę wytrącić rutozyd, odsączyć i wysuszyć na powietrzu. W celu oczyszczenia rutozydu od kwercetyny i zanieczyszczeń lipidowych należy do otrzymanego osadu dodać 100 ml toluenu i krótko ogrzewać na łaźni wodnej, a następnie osad rutozydu odsączyć na lejku Buchnera. Przesącz odrzucić. Powtórzyć krystalizację z etanolu. Uzyskane kryształy odsączyć, wysuszyć i zważyć.

d. Chromatografii cienkowsarstwowa

Kryształ otrzymanego rutozydu (punkt c) rozpuścić w acetonie, nanieść kapilarą punktowo na dwie gotowe płytki (10 x 20 cm) pokryte poliamidem i rozwijać kamerze z układem woda:etanol:keton metylowoetylowy:acetyloaceton (13:3:3:1 v/v). Po rozwinięciu chromatogramy wysuszyć w temperaturze pokojowej i jeden wywołać parami amoniaku, drugi - 2% roztworem chlorku glinowego.

Opracowanie wyników

1. Podać wydajność preparatyki.
2. Narysować schemat chromatogramu i obliczyć wartość R_f dla rutozydu.

Ćwiczenie 15

Porównanie zawartości flawonoidów w surowcach flawonoidowych metodą Christa-Müllera.

Flawonoidy są bardzo rozpowszechnionymi substancjami roślinnymi, szczególnie wśród roślin dwuliściennych. Szczególnie często flawonoidy są spotykane w następujących rodzinach: *Polygonaceae*, *Ranunculaceae*, *Cruciferae*, *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae*, *Ericaceae*, *Betulaceae* i *Compositae*. Flawonoidy są bardzo dużą grupą związków, jednak tylko niektóre z nich występują powszechnie i w dużych ilościach. Do takich związków należą przede wszystkim glikozydy kwercetyny, kemferolu i luteoliny.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości flawonoidów w trzech wybranych surowcach farmakognostycznych (w przeliczeniu na suchą masę). Pierwszym etapem ćwiczenia jest wykonanie krzywej wzorcowej, która będzie służyć do oceny zawartości flawonoidów. Flawonoidy z surowca roślinnego wyodrębniamy w trakcie ekstrakcji acetonem i oczyszczania octanem etylu. Oznaczenia ilościowego flawonoidów dokonujemy za pomocą reakcji barwnej z chlorkiem glinowym w środowisku kwaśnym. Wielkość absorpcji pozwala na określenie zawartości flawonoidów w badanym surowcu, po porównaniu z krzywą wzorcową.

Materiały i odczynniki

1. Sproszkowane liście brzozy, ziele dziurawca i kwiatostan głogu
2. Metanol
3. Urotropina
4. Chlorek glinu
5. Octan etylu

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolby stożkowe, chłodnice, lejki, kolby miarowe, rozdzielacz, spektrofotometr

Wykonanie

a. Krzywa wzorcowa

50 mg wzorcowej kwercetyny rozpuścić w 100 cm³ metanolu. 10 cm³ tego roztworu pobrać do kolby miarowej o poj. 100 cm³. Dodać 1 cm³ 0,5 % wodnego roztworu urotropiny i dopełnić metanolem do kreski. Z tak przygotowanego roztworu pobrać do kolb miarowych o poj. 25 cm³ następujące ilości: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; i 4,0 cm³, co daje odpowiednio 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175 i 0,200 mg substancji wzorcowej. Następnie dodać do kolb po 1 cm³ 2% roztworu chlorku glinowego (w mieszaninie kwas octowy : metanol – 5 : 95), 10 cm³ octanu etylu, 0,75 cm³ lodowatego kwasu octowego i uzupełnić metanolem do kreski. Po upływie 45 minut zmierzyć absorpcję tych roztworów (wobec próby

kontrolnej bez chlorku glinu) w 1 cm kuwetach, przy długości fali 425 nm. Wykreślić krzywą wzorcową na papierze milimetrowym.

b. wykonanie oznaczenia

0,5 g każdego z trzech surowców umieścić w kolbach okrągłodennych, dodać do każdej kolby po: 20 cm³ acetonu, 2 cm³ 25% kwasu solnego i 1 cm³ 0,5% roztworu urotropiny. Następnie zawartość kolby ogrzewać pod chłodnicą zwrotną w ciągu 35 minut. Otrzymany hydrolizat przesączyć do kolby miarowej o poj. 100 cm³. Surowiec w kolbach zalać 20 cm³ acetonu, gotować w ciągu 10 minut i przesączyć do kolby miarowej z pierwszą porcją hydrolizatu. Czynności te powtórzyć jeszcze raz. Połączone wyciągi w kolbie miarowej uzupełnić acetonem do kreski. 20 cm³ acetonowego hydrolizatu przenieść do rozdzielacza, dodać 20 cm³ wody i trzykrotnie ekstrahować 15 cm³ porcjami octanu etylu. Połączone fazy organiczne przemyć dwukrotnie 30 cm³ porcjami wody, przenieść do kolby miarowej (o poj. 50 cm³) i uzupełnić octanem etylu do kreski. Do trzech kolb stożkowych o poj. 25 cm³ odmierzyć po 10 cm³ tego roztworu. Do dwóch kolb dodać po 2 cm³ 2% roztworu chlorku glinu i uzupełnić wszystkie kolby do objętości 25 cm³ mieszaniną kwasu octowego z metanolem (5 : 95). Po upływie 45 minut zmierzyć absorpcję roztworów z AlCl₃ wobec próby kontrolnej bez roztworu chlorku glinu, w 1 cm kuwetach, przy długości fali 425 nm.

Opracowanie wyników

Korzystając z krzywej wzorcowej odczytać zawartość flawonoidów w próbach badanych i przeliczyć na zawartość tych związków w suchej masie każdego z surowców.

Ćwiczenie 16

Porównanie zawartości garbników w materiale roślinnym za pomocą wytrącania octanem miedzi(II)

Garbniki są związkami pochodzenia roślinnego o zróżnicowanym składzie chemicznym, charakteryzującymi się zdolnością do „garbowania”, czyli zmiany surowej skóry, w trwałą skórę, możliwą do zastosowania przemysłowego. Proces ten polega na wytwarzaniu ochronnej powłoki skoagulowanego białka. Garbniki są rozpowszechnione w świecie roślin, szczególnie w rodzinach *Salicaceae*, *Rosaceae*, *Fagaceae* i *Polygonaceae*. Nagromadzają się często w korze, korzeniach i kłęczach, rzadziej w liściach.

Garbniki mają właściwości ściągające i przeciwzapalne. Są stosowane wewnętrznie w biegunkach i zewnętrznie w stanach zapalnych błon śluzowych i skóry, a także w oparzeniach i odmrożeniach. Garbniki mogą tworzyć połączenia

kompleksowe z alkaloidami, dlatego są stosowane w przypadkach zatruc tą grupą roślinnych związków toksycznych.

W celu stwierdzenia obecności garbników, a także ich ilościowego oznaczenia używa się odczynników powodujących wytrącanie garbników w postaci trudno rozpuszczalnych osadów (garbnikanów). Jednym z takich związków jest octan miedzi(II). Celem ćwiczenia jest porównanie ilości garbników występujących w trzech surowcach. Do wyciągu otrzymanego z każdego z tych surowców dodaje się nadmiar octanu miedzi(II) a wytrącony osad oznacza metodą wagową. Z kolei nadmiar jonów miedzi(II) oznacza się w przesączu jodometrycznie. Zawartość garbników w surowcu oblicza się odejmując masę tlenku miedzi(II) związanego z garbnikami od masy garbnikanów.

Materiały i odczynniki

1. Surowce do badań: dębiana (*Galla*), kłącze wężownika (*Rhizoma bistortae*), kłącze pięciornika (*Rhizoma Tormentillae*), kora dębu (*Cortex Quercus*), liść orzecha włoskiego (*Folium Juglandis*)
2. Jodek potasu
3. Kwas siarkowy
4. Cyjanożelazian potasu
5. Octan miedzi(II)
6. Skrobia
7. Tiosiarczan sodu

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolby stożkowe, lejki, zlewki, waga analityczna, biureta

Wykonanie

- a. Przygotowanie ekstraktu surowca (wykonać dla trzech różnych surowców)

Do 2 g dokładnie odważonego i umieszczonego w kolbie stożkowej surowca dodać 100 ml wody i ogrzać powoli do wrzenia. Po zagotowaniu mieszaninę zostawić do ostygnięcia, a następnie przesączyć przez watę do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Do próbki surowca dodać 50 ml wody i gotować w ciągu 10 minut. Przesączyć i zebrać przesącz do tej samej kolby, a czynność gotowania i sączenia powtórzyć. Zawartość kolby uzupełnić wodą do kreski, a następnie przesączyć przez sączek z bibuły, odrzucając pierwsze 20 ml przesączu.

- b. Otrzymywanie garbnikanów miedzi.

Do zlewki o pojemności 150 ml odmierzyć dokładnie 50 ml wyciągu i dodać 25 ml 0,1 normalnego roztworu octanu miedzi(II). Po wymieszaniu odstawić zlewkę do następnego dnia. Osad garbnikanów miedzi odsączyć, sączek przemywać wodą do zaniku reakcji na miedź (brak brunatnego zabarwienia przesączu po dodaniu 5% roztworu cyjanożelazianu potasu).

- c. Oznaczanie ilościowe garbników.

Sączek z osadem wysuszyć w temp. 100°C do stałej masy. 25 ml otrzymanego przesączu, zawierającego niezwiązany octan miedzi(II) odmierzyć do kolby

stożkowej o pojemności 250 ml i zakwasić 10 ml 10% H_2SO_4 . Następnie dodać 5 ml wody, w której rozpuszczono 2 g jodku potasu i 2 ml wskaźnika skrobiowego. Tak przygotowany roztwór miareczkować 0,1 N roztworem tiosiarczanu sodu, określając punkt końcowy miareczkowania w momencie zaniku granatowego zabarwienia.

Opracowanie wyników

Obliczyć ilość garbników w 50 ml wyciągu każdego z surowców, biorąc pod uwagę, że 1 ml 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodu odpowiada 0,354 mg miedzi. Obliczenia dokonać za pomocą wzoru:

$X = A - B$ gdzie:

A jest ilością garbników miedzi

B jest ilością tlenu miedzi(II) związanego przez garbniki,

Przy czym $B = 1,2518 (p - q)$; współczynnik 1,2518 został obliczony ze stosunku mas tlenu miedzi(II) do miedzi (97,54/63,54).

p = ilość miedzi wziętej do oznaczenia

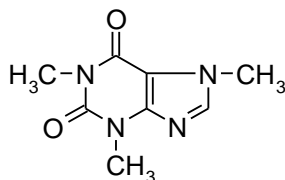
q = ilość miedzi nie związanej przez garbniki

Ćwiczenie 17

Otrzymywanie kofeiny z liści herbaty

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) jest alkaloidem purynowym występującym w liściach i ziarnach kawowych (ok. 1%), w liściach herbaty (do 5%) w orzechach kola (ok. 3%) i innych roślinach tropikalnych. Ma ona różnorakie działanie: pobudza ośrodkowy układ nerwowy, diurezę, rozszerza naczynia mózgowie i wieńcowe.

W materiale roślinnym kofeina, podobnie jak inne alkaloidy, występuje w formie soli kwasów organicznych i w tej postaci podczas ekstrakcji przechodzi do roztworu. Wolną kofeinę, otrzymaną w wyniku rozkładu soli tlenkiem magnezu na gorąco, poddaje się krystalizacji lub chromatografii cienkowarstwowej w celu dalszego oczyszczenia.



Kofeina

Materiały i odczynniki

1. Suche liście herbaty
2. Metanol
3. Tlenek magnezu
4. Chloroform
5. Wodorotlenek sodu
6. Kwas siarkowy

Materiały pomocnicze i aparatura

Aparat Soxhleta; kolby stożkowe: 50 ml, 100 ml, 200 ml; zlewka 500 ml; cylinder miarowy 100 ml; lejki szklane \varnothing 5 cm, \varnothing 10 cm; lejek Schotta G3; kolba ssawkowa 300 ml; rozdzielacz 250 ml; szkiełko zegarkowe; moździerz porcelanowy; parownica porcelanowa 1000 ml; eksykator próżniowy; wyparka obrotowa.

Wykonanie

a. Ekstrakcja

Suche liście herbaty (50 g) roztarte w moździerzu na proszek ekstrahować metanolem w aparacie Soxhleta w ciągu 5 godzin. Wyciąg metanolowy zagęścić na wyparce obrotowej do objętości około 100 ml.

b. Otrzymywanie surowego preparatu kofeiny

Ekstrakt metanolowy wlać do porcelanowej parownicy zawierającej 25 g MgO i 100 ml wody. Parownicę umieścić na gorącej łaźni piaskowej i uzyskaną papkę odparować do sucha często mieszając. Suchą pozostałość wygotować trzykrotnie ze 150 ml wody i przesączyć, za każdym razem zbierając przesącz. Do połączonych przesączy dodać 25 ml 10% kwasu siarkowego i zatężyć do 1/3 objętości na parownicy umieszczonej na łaźni piaskowej. W razie potrzeby odsączyć od osadu. Klarowny roztwór ekstrahować czterokrotnie chloroformem. Połączone wyciągi chloroformowe przepłukać 20 ml 10% NaOH, a następnie 20 ml wody. Przemyty wyciąg chloroformowy odparować na wyparce obrotowej do sucha.

c. Kryształizacja

Suchą pozostałość rozpuścić w jak najmniejszej objętości gorącej wody. Pozostawić do ostygnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie wstawić do lodówki. Kryształy kofeiny odsączyć na lejku Schotta, wysuszyć i zważyć.

d. Wyznaczenie widma absorpcyjnego

Kryształ kofeiny rozpuścić w metanolu i tak rozcieńczyć, aby wartość absorpcji przy 280 nm wynosiła 0,3-0,4. Wykonać pomiary absorpcji co 5 nm w zakresie 220-350 nm wobec metanolu jako próby odniesienia.

Opracowanie wyników

1. Podać ilość otrzymanego preparatu kofeiny oraz jego temperaturę topnienia. Wyliczyć procent zawartości kofeiny w liściach herbaty.
2. Wykreślić widmo absorpcyjne kofeiny.

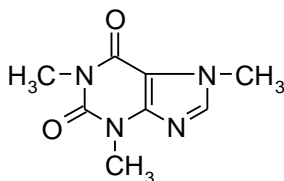
Ćwiczenie 18

Oznaczanie kofeiny w liściach herbaty metodą jodometryczną

Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) jest głównym alkaloidem ziaren kawy (*Coffea arabica*), skąd w została wyodrębniona po raz pierwszy w roku 1820. Przemysłowy proces dekofeinizacji kawy (przykład wyjątkowo wysokoselektywnego usuwania jednej substancji z bardzo złożonej mieszaniny) jest obecnie głównym źródłem otrzymywania tego alkaloidu. Kofeina występuje także w ilości do 5% w liściach herbaty (*Thea sinensis*) oraz do 3% w orzeszkach *cola*. W niewielkich ilościach alkaloid ten jest spotykany także w innych roślinach, między innymi w rosnącej w Polsce iglicy pospolitej (*Erodium cicutarium*) z rodziny *Geraniaceae*.

Kofeina jest związkiem o różnorodnym działaniu. Najsilniej działa na korę mózgową i ośrodkowy układ nerwowy. Wzmaga koncentrację, spostrzegawczość, pamięć, przyspiesza procesy myślowe i rozszerza naczynia krwionośne opon mózgowych. Działa moczopędnie, podnosi ciśnienie krwi i zwiększa wydzielanie soku żołądkowego.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie ilości kofeiny w liściach herbaty. Po ekstrakcji kofeiny za pomocą alkalicznego roztworu chloroformu, usuwamy rozpuszczalnik organiczny. Wyciąg wodny zakwaszamy i przeprowadzamy kofeinę w formę nadjodanu, a następnie oznaczamy metodą miareczkowania jodometrycznego.



Kofeina

Materiały i odczynniki

1. Sproszkowane liście herbaty
2. Chloroform
3. Amoniak
4. Kwas siarkowy
5. Roztwór jodu w jodku potasu
6. Tiosiarczan sodowy
7. Wskaźnik skrobiowy

Materiały pomocnicze i aparatura

Kolby stożkowe, lejek, bibuła filtracyjna, krystalizator, kolba miarowa 100 ml; biureta

Wykonanie

a. Ekstrakcja

7 g wysuszonych, drobno sproszkowanych liści herbaty wytrząsać w ciągu godziny w kolbie stożkowej zamkniętej korkiem szlifowym z 70 ml chloroformu z dodatkiem 4 ml 6 molowego roztworu amoniaku. Po zakończeniu wytrząsania przesączyć zawartość kolby przez sączek karbowany.

b. Otrzymywanie nadjodanu kofeiny

40 ml przesącza (co odpowiada 4 g surowca) przenieść do krystalizatora o poj. 60 cm³ zageścić w strumieniu ciepłego powietrza do objętości ok. 5 ml, dodać 15 ml wody i ogrzewać na łaźni wodnej do zaniku zapachu chloroformu. Gorący wyciąg wodny przesączyć do kolby miarowej poj. 100 ml płuczając krystalizator i lejek trzykrotnie po 10 ml gorącej wody. Po oziębieniu połączonych wyciągów wodnych dodać 5 ml 1,5 molowego roztworu H₂SO₄ i 30 ml 0,1 molowego roztworu jodu, po czym uzupełnić wodą do kreski.

c. Oznaczanie metodą analizy objętościowej

Po 10 minutach odsączyć wydzielony osad nadjodanu kofeiny, przy czym pierwsze 30 ml odrzucić, a dalsze 50 ml (co odpowiada 2 g surowca) zebrać do kolby stożkowej o poj. 100 ml. Do przesącza dodać 1 ml wskaźnika skrobiowego i miareczkować 0,1 molowym roztworem tiosiarczanu sodu, do zaniku zabarwienia.

Opracowanie wyników

Zawartość kofeiny obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{169,75 (15 \cdot F - M \cdot G)}{E \times 100}$$

Gdzie: E – naważka surowca w gramach

F – współczynnik molowości jodu

G – współczynnik molowości tiosiarczanu sodu

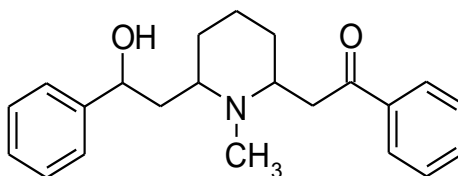
M – liczba ml tiosiarczanu sodu użytego do miareczkowania

Ćwiczenie 19

Wyodrębnienie lobeliny z zieleń stroiczkii rozdętej

Lobelina jest najważniejszym farmakologicznie związkiem z grupy ponad 20 podobnych związków alkaloidowych pochodnych pirydyny. Ma działanie synapsotropowe podobne do działania nikotyny i może być wykorzystywana w kuracjach odwykowych u palaczy tytoniu. Najważniejszą właściwością lobeliny jest silne pobudzanie ośrodku oddechowego, dlatego jest stosowana jako środek stymulujący oddychanie w porażeniu ośrodku oddechowego, np. do reanimacji porażonych prądem, przysypanych przez lawiny, topielców i w bezdechu u noworodków.

Celem ćwiczenia jest otrzymanie lobeliny z zieleń stroiczkii rozdętej (*Lobelia inflata*). Surowiec stanowi zieleń stroiczkii rozdętej zbierane w okresie przekwitania i delikatnie wysuszone, w którym występuje ponad 20 alkaloidów. Główne etapy otrzymywania najważniejszego z nich – lobeliny – wykorzystują różnice w rozpuszczalności alkaloidów w zależności od tego czy związki te występują w postaci wolnych zasad (dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych), czy w postaci soli (dobrze rozpuszczalne w wodzie).



Lobelina

Materiały i odczynniki

1. Wysuszone zieleń stroiczkii rozdętej
2. Kwas octowy
3. Wodorowęglan sodu
4. Eter etylowy
5. Kwas solny
6. Chloroform
7. KOH
8. H₂SO₄
9. Na₂SO₄ bezw.
10. Żel krzemionkowy do TLC (lub gotowe płytki)

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacz 100, 750 ml, 1000 ml; kolba stożkowa 1000 ml; wyparka obrotowa; łaźnia wodna; uniwersalne papierki wskaźnikowe.

Wykonanie

a. Ekstrakcja surowca

250 g sproszkowanego surowca (*Herba Lobelia inflata*) umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 1000 ml, i dodać 1% roztwór kwasu octowego do momentu pokrycia surowca i odstawić na kilka dni w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu zdekantować ekstrakt z nad surowca, następnie materiał roślinny przenieść na lejek Buchnera i odcisnąć, a uzyskany przesącz dodać do ekstraktu.

b. Otrzymywanie surowej frakcji chlorowodoru lobeliny

Do otrzymanego (punkt a) kwaśnego ekstraktu dodawać porcjami stały NaHCO_3 , aż do pojawienia się odczynu wyraźnie alkalicznego. Uzyskany alkaliczny roztwór ekstrahować czterokrotnie eterem etylowym, biorąc każdorazowo po około 250 ml rozpuszczalnika. Połączone wyciągi eterowe zatężyć na wyparce obrotowej do objętości około 200 ml, a następnie czterokrotnie wytrząsać w rozdzielaczu z 2% roztworem H_2SO_4 (každorazowo po ok. 100 ml). Połączone kwaśne roztwory wodne ponownie alkalizować stałym NaHCO_3 i ekstrahować – jak poprzednio – eterem. Do roztworu eterowego dodać bezwodny Na_2SO_4 , pozostawić na 30 min, a następnie płyn zdekantować z nad środka suszącego do kolby okrągłodennej i odparować pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 100 ml 2% HCl i wytrząsać pięciokrotnie z chloroformem, biorąc każdorazowo po 100 ml rozpuszczalnika.

c. Oczyszczanie chlorowodoru lobeliny

Połączone wyciągi chloroformowe odparować, a syropowatą pozostałość ogrzewać na łaźni wodnej o temp. 60°C dwukrotnie z 50 ml wody. Połączone roztwory wodne przenieść do kolbki Elenmayera, zatężyć do około 1/3 objętości w strumieniu ciepłego powietrza, zakorkować i pozostawić do krystalizacji w lodówce. Uzyskaną surową frakcję chlorowodoru lobeliny ponownie przekrystalizować z małej objętości gorącej wody. Kryształy odsączyć, wysuszyć i zważyć.

d. Otrzymywanie wolnej lobeliny

Otrzymany (punkt c) chlorowodorek lobeliny rozpuścić na gorąco w 50 ml wody, przenieść do rozdzielcza, zalkalizować wkraplając 2% KOH i ekstrahować czterokrotnie eterem. Połączone ekstrakty eterowe wysuszeniu bezwodnym siarczanem sodu, przesączyć przez sączek karbowany i eter odparować na wyparce do sucha. Wydzieloną lobelinę rozpuścić na gorąco w etanolu, zakorkować i zostawić do krystalizacji. Kryształy lobeliny odsączyć, wysuszyć na powietrzu i zważyć.

e. Chromatografii cienkowarstwowa

Na gotową płytkę pokrytą żelem krzemionkowym (10x20 cm) nanieść punktowo kilka kropli eterowego roztworu lobeliny oraz eterowego roztworu

wzorca lobeliny. Płytkę rozwijać w układzie chloroform : metanol (3:1 v/v) i po wysuszeniu spryskać 50% roztworem kwasu siarkowego (VI) i ogrzewać w temp. 120° C do momentu pojawienia się barwnych plam.

Opracowanie wyników

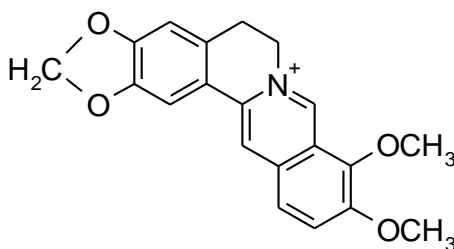
1. Podać wydajność chlorowodoru lobeliny i wolnej zasady.
2. Narysować schemat chromatogramu i obliczyć wartość R_f dla lobeliny.

Ćwiczenie 20

Wydzielanie berberyny z korzeni i kory berberysu pospolitego

Berberyna należy do grupy alkaloidów izochinolinowych mających jako zasadniczy element budowy cząsteczek pierścień izochinolinoliny lub tetraizochinolinoliny. Berberyna jest związkiem o żółtej barwie o charakterz zasady czwartorzędowej. Występuje, między innymi, w soku mlecznym glistnika jaskółczego ziała (*Chelidonium maius*), korzeniach i korze berberysu zwyczajnego (*Berberis vulgaris*) i kłęczach gorzknika kanadyjskiego (*Hydrastidis canadensis*). Berberyna jest otrzymywana z ziała glistnika (*Herba Chelidonii*) oraz kory berberysu (*Cortex Berberidis*), w której surowiec stanowi mieszanina korzeni i gałązek berberysu zwyczajnego. Berberyna działa żółciopędnie i przeciwbakteryjne. Używana jest także jako środek przeciwbiegunkowy – rozkurcza mięśnie gładkie jelit.

Podczas otrzymywania berberyny izolujemy najpierw berberynę w postaci soli, oczyszczając ją od domieszek organicznych (grupy alkaloidów trzeciorzędowych – głównie berbaminy). Po zalkalizowaniu otrzymujemy wolną zasadę, którą przeprowadzamy w chlorowodorek berberysy i oczyszczamy w procesie krystalizacji.



Berberyna

Materiały i odczynniki

1. Korzenie i gałązki berberysu pospolitego

2. Etanol
3. Kwas octowy
4. Eter etylowy
5. Na₂SO₄ bezw.
6. Amoniak
7. Kwas solny
8. Benzen
9. Odczynnik Dragendorffa

Roztwór A – 1,7 g zasadowego azotanu bizmutu w 100 ml 20% kwasu octowego

Roztwór B – 10 g jodku potasu w 25 ml wody

Bezpośrednio przed użyciem zmieszać 20 ml roztworu A z 5 ml roztworu B i dodać 70 ml wody.

10. Tlenek glinu do TLC (lub gotowe płytki)

11. Roztwory wzorcowe berberyny, chlorowodorku berberyny i chelidoniny

Materiały pomocnicze i aparatura

Rozdzielacz 250ml; kolba stożkowa; wyparka obrotowa; łaźnia wodna; uniwersalne papierki wskaźnikowe; lampa UV.

Wykonanie

- a. Ekstrakcja

100 g drobno sproszkowanych korzeni i gałązek berberysu ekstrahować 4 razy po 3 godziny lekko ogrzanym etanolem, biorąc każdorazowo po 150 ml rozpuszczalnika. Otrzymane wyciągi połączyć i zagęścić do małej objętości (10 – 15 ml) na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem.

- b. Wyodrębnianie i oczyszczanie berberyny

Do zagęszczonego wyciągu dodać 100 cm³ 5% kwasu octowego i przesączyć przez sączek karbowany. Otrzymany kwaśny roztwór ekstrahować trzema porcjami (po ok. 50 cm³) eteru etylowego. Wyciągi eterowe odrzucić. Oczyszczony kwaśny roztwór zalkalizować amoniakiem i wytrząsać trzykrotnie z eterem etylowym (po ok. 50 cm³). W wyciągu eterowym znajdują się alkaloidy trzeciorzędowe. Po wysuszeniu bezwodnym Na₂SO₄ odparować wyciąg do sucha, co pozwoli na uzyskanie tej grupy związków. Pozostały wyciąg wodny zawierający przede wszystkim berberynę zakwasić 2% HCl i odstawić do lodówki. Po kilku godzinach rozpoczyna się krystalizacja chlorowodorku berberyny. Po oddzieleniu i wysuszeniu kryształów, rozpuścić je w minimalnej objętości ciepłego etanolu, dodać kilka kropli eteru etylowego i odstawić do krystalizacji. Uzyskane kryształy odsączyć na lejku Schotta, wysuszyć i zważyć.

- c. Chromatografia cienkowarstwowa

Na płytki pokryte tlenkiem glinu nanieść punktowo: 1) otrzymany chlorowodorek berberyny, 2) wolną berberynę, 3) chelidoninę. Płytki rozwinąć w układzie: benzen : etanol (20:1 v/v) i po wysuszeniu obejrzeć w świetle UW. Zaznaczyć plamę berberyny fluoryzującą na żółto, następnie spryskać chromatogramy roztworem Dragendorffa.

Opracowanie wyników

1. Podać wydajność chlorowodoru berberyny.
2. Narysować schemat chromatogramu i obliczyć wartości R_f dla rozdzielanych związków.

Ćwiczenie 21

Identyfikacja olejków eterycznych

Olejki eteryczne są heterogenną chemicznie grupą mieszanin występująca w świecie roślin. Te złożone mieszaniny charakteryzują się intensywnym – zwykle przyjemnym – zapachem. Najwięcej olejków występuje w gatunkach roślin należących do rodzin: *Pinaceae*, *Umbelliferae*, *Labiatae* i *Compositae*.

Olejki eteryczne mają zróżnicowane działanie farmakologiczne. Używane są jako środki drażniące skórę, moczopędne, wykrztuśne, przeciwzapalne, żółciopędne, spazmolityczne, antyseptyczne i przeciwbacze. Poza zastosowaniem medycznym, olejki eteryczne są używane w kosmetyce i w przemyśle spożywczym.

Olejki eteryczne są głównymi składnikami czynnymi wielu surowców farmakognostycznych. Ze względu na wysoką cenę i możliwość fałszowania olejków, ich identyfikacja i oznaczanie parametrów fizyczno-chemicznych jest ważnym elementem charakterystyki surowców olejkowych. Chromatografia cienkowarstwowa umożliwia identyfikację

Celem ćwiczenia jest badanie chromatograficzne kilku olejków oraz oznaczanie liczb kwasowych i estrowych wybranych olejków. Liczba kwasowa mierzona jest liczbą miligramów wodorotlenku potasu konieczną do zobojętnienia wolnych kwasów organicznych zawartych w 1 g badanego olejku. Liczba estrowa mierzona jest liczbą miligramów wodorotlenku potasu potrzebną do zmydlenia (hydrolizy alkalicznej) estrów zawartych w 1 g badanego olejku.

Materiały i odczynniki

1. Olejek rumiankowy
2. Płytki plastikowe pokryte żelem krzemionkowym
3. Odczynnik EP: 0,25 g aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego rozpuścić w mieszaninie 45 ml lodowatego kwasu octowego, 5 ml 85% kwasu fosforowego(V) i 45 ml wody.
4. Roztwór waniliny (1 g waniliny rozpuścić w 100 ml stężonego kwasu siarkowego(VI)).
5. Etanol
6. Eter etylowy
7. KOH

8. Kwas solny
9. Fenoloftaleina

Materiały pomocnicze i aparatura

Kamera do chromatografii cienkowarstwowej; kolba okrągłodenna 100 ml; chłodnica zwrotna; spryskiwacz chromatograficzny; biureta

Wykonanie

- a. analiza chromatograficzna olejku rumianku i krwawnika.

Na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym nanieść w kilku stężeniach (różna liczba kropel) 10% roztwór olejku rumianku i krwawnika w ksylenie i 2% roztwór azulenu w ksylenie lub toluenie. Płytkę rozwijać w heksanie. Po wysuszeniu chromatografu zaznaczyć położenie niebiesko zabarwionej plamy azulenu i spryskać płytkę odczynnikami EP. Gdyby nie wystąpiły plamy płytkę ogrzać w strumieniu ciepłego powietrza. Zaznaczyć plamę chamazulenu.

- b. Analiza chromatograficzna olejku tataraku, szałwii i eukaliptusa

Na płytkę pokrytą żelem krzemionkowym nanieść w kilku stężeniach (różna liczba kropel) 10% roztwór olejku eukaliptusa, szałwii i tataraku w benzenie i 2% roztwór cyneolu w benzenie. Płytkę rozwijać w układzie: octan etylu : benzen (1:5 v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu płytki spryskać ją roztworem waniliny i ogrzewać stopniowo w strumieniu ciepłego powietrza.

- c. Oznaczanie liczby kwasowej olejku

Rozpuścić 5 g dokładnie odważonego nieznanego olejku w 50 cm³ mieszaniny etanolu z eterem etylowym (1:1 v/v). W przypadku trudności z rozpuszczeniem mieszaninę można lekko ogrzać. Otrzymany roztwór miareczkować intensywnie mieszając 0,1 M roztworem KOH wobec fenoloftaleiny do pojawienia się jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się w ciągu 1 minuty. Zobojętniona mieszanina pozostała po oznaczeniu liczby kwasowej służy do określania liczby estrowej.

- d. oznaczanie liczby estrowej olejku

Zobojętnioną mieszaninę (punkt c) przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml i dodać 25 ml 0,5 M etanolowego roztworu KOH. Na kolbie umieścić chłodnicę zwrotną i ogrzewać zawartość na łaźni wodnej w ciągu 90 minut. Po ochłodzeniu odmiareczkować nadmiar KOH za pomocą 0,5 M kwasu solnego do odbarwienia roztworu. Wykonać próbę kontrolną (bez olejku) z tymi samymi odczynnikami.

Opracowanie wyników

1. Narysować chromatogramy, obliczyć wartości R_f dla uzyskanych plam.
2. Obliczyć liczbę kwasową badanego olejku, wiedząc że 1 ml 0,1 M roztworu KOH zawiera 5,611 mg wodorotlenku potasu.
3. Obliczyć liczbę estrową, znając objętość roztworu KOH zużytą do hydrolizy estrów (różnica uzyskana po odjęciu objętości zużytego kwasu

solnego w próbie kontrolnej i badanej) i wiedząc, że 1 ml 0,5 M KOH zawiera 28,05 mg wodorotlenku potasu

Ćwiczenie 22

Oznaczanie wody i popiołu w różnych surowcach farmakognostycznych

Zawartość wody i popiołu służy do oceny wartości surowca farmakognostycznego i jego zgodności z normami. Zbyt duża zawartość wody z jednej strony stanowi środowisko korzystne dla rozwoju bakterii i grzybów, z drugiej zaś umożliwia powolny przebieg reakcji hydrolizy. Oba zjawiska obniżają leczniczą wartość surowca. Z kolei, zawartość popiołu większa od tzw. zawartości fizjologicznej poszczególnych surowców roślinnych świadczy o niedokładnym oczyszczeniu surowca w trakcie zbioru. Porównanie zawartości popiołu całkowitego, w którym obok popiołu fizjologicznego pojawiają się zanieczyszczenia mineralne, w porównaniu z zawartością popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym (w warunkach tej próby popiół fizjologiczny jest niemal całkowicie rozpuszczalny) pozwala na oszacowanie zanieczyszczenia surowców składnikami gleby. Jest to szczególnie ważne dla oceny surowców z grupy: *radix et rhizoma*.

Celem ćwiczenia jest:

1. oznaczenie wody metodą pośrednią, polegającą na ustaleniu zmian masy badanej próbki w czasie jej ogrzewania w temp. 105° C, w prawidłowym i zawilgoconym surowcu w grupy *folium* lub *herba*,

2. oznaczenie popiołu całkowitego w wyniku spalania próbki w tyglu porcelanowym, w prawidłowym i zanieczyszczonym pozostałościami gleby surowcu z grupy *radix et rhizoma*

3. oznaczenie popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym poprzez reakcję otrzymanego popiołu całkowitego z 10% kwasem solnym na gorąco, w prawidłowym i zanieczyszczonym pozostałościami gleby surowcu z grupy *radix et rhizoma*

Materiały i odczynniki

1. Prawidłowy surowiec z grupy *folium* lub *herba*, np: *Herba Hyperici*, *Folium Salviae*, *Folium Betulae*, *Herba Rutaе*.
2. Zawilgocony surowiec z grupy *folium* lub *herba*
3. Prawidłowy surowiec z grupy *radix et rhizoma*, np: *Radix Rei*, *Rhizoma Hellebori*, *Radix Taraxaci*, *Rhizoma Agropyri*.
4. Zanieczyszczony glebą surowiec z grupy *radix et rhizoma*

Materiały pomocnicze i aparatura

Szalki Petriego, ekzykator, tygla, trójkąt porcelanowy, palnik gazowy, lejki, sączi bezpopiołowe.

Wykonanie

a. oznaczanie wody metodą pośrednią (próbę wykonujemy dla surowca prawidłowego i zawilgoconego)

Na zważonej szalce Petriego umieścić sproszkowany surowiec w ilości 3 g z dokładnością do 1 mg. Szalkę wstawić do suszarki ogrzanej do temp. 105° C, suszyć w ciągu 120 minut, a następnie, używając szczypiec, przenieść szalkę wraz z zawartością do ekzykatora z środkiem suszącym (np. P₂O₅). Po ostygnięciu próbki natychmiast zważyć szalkę z wysuszonym surowcem i zanotować wynik. Surowiec ponownie suszyć w ciągu 30 minut i powtórzyć procedurę ochładzania w ekzykatorze i ważenia. Zanotować wynik. Suszenie i ochładzanie powtarzać dotąd, aż dwa kolejne ważenia dadzą wyniki różniące się mniej niż 1 mg. Następnie obliczyć zawartość wody w surowcu korzystając z wzoru:

$$\% \text{ wody} = \frac{\text{ubytek masy w trakcie suszenia (w gramach)}}{\text{masa surowca w gramach}} \times 100$$

b. Oznaczenie popiołu całkowitego

5 g surowca (odważonego z dokładnością do 1 mg) przenieść do tygla porcelanowego o znanej masie. Tygiel umieścić w trójkącie porcelanowym na trójnogu. Rozpocząć ogrzewanie słabym płomieniem. Po zakończeniu wydzielania się dymu, zwiększać intensywność ogrzewania aż do osiągnięcia czerwonego żaru. Co kilka minut (używając szczypiec) delikatnie potrząsać tygłem, w celu osiągnięcia równomiernego spalania. Po uzyskaniu popiołu przenieść tygiel do ekzykatora i pozostawić do ostygnięcia. Zważyć tygiel wraz z popiołem. Powtarzać procedurę spalania i studzenia do stałej masy (dwa kolejne wyniki nie powinny różnić się od siebie więcej niż o 1 mg).

Obliczyć zawartość popiołu korzystając z wzoru:

$$\% \text{ popiołu} = \frac{\text{masa popiołu w gramach}}{\text{masa surowca w gramach}} \times 100$$

c. oznaczenie popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym poprzez reakcję otrzymanego popiołu całkowitego z 10% kwasem solnym na gorąco (próbę wykonujemy dla surowca prawidłowego i zanieczyszczonego pozostałościami gleby)

Do uzyskanego w punkcie b popiołu całkowitego dodać 5 ml gorącego 10% kwasu solnego, przykryć tygiel szkiełkiem zegarkowym i gotować delikatnie w ciągu 6 minut. Do tygła dodać 5 ml gorącej wody i zawartość tygła przesączyć przez sącdek bezpopiołowy. Osad przemywać gorącą wodą destylowaną do momentu zaniku reakcji na chlorki (co pewien czas sprawdzać przesącz 1% roztworem AgNO_3). Przenieść sącdek z popiołem do tygła, wysuszyć delikatnie ogrzewając tygiel. Zwiększyć płomień, spalić sącdek i wyprażyć tygiel do stałej masy. Korzystając z wzoru (jak w punkcie b) obliczyć zawartość popiołu nierozpuszczalnego w kwasie solnym w stosunku do suchej masy surowca.

Opracowanie wyników

Po obliczeniu wyników określić różnicę:

1. zawartości wody w surowcu prawidłowym i zawilgoconym
2. zawartości popiołu w surowcu prawidłowym i zanieczyszczonym pozostałościami gleby

III. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac – reszta acetylwi
ACP - białkowym nośnikiem grup acylowych
Ala - alanina
Arg – arginina
Asn – asparagina
Asp – asparaginan
ATP – adenzynatryfosforan
CoA – koenzym A
Cys – cysteina
dh – dehydrogenaza
DMAPP - pirofosforan dimetyloallilu
FER – kwas ferulowy
GGPP – pirofosforan geranylogeranylu
Glc – glukoza
Gln – glutamina
Glu – glutaminian
Gly – glicyna
GPP – pirofosforan geranylu
His – histydyna
HMG-CoA - 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA
Ile – izoleucyna
IPP - pirofosforan izopentenyłu
LDL – lipoproteina o małej gęstości
Leu - leucyna
Lys – lizyna
Met – metionina
NAD, NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy i jego forma zredukowana
NADP, NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego i jego forma zredukowana
P – fosforan nieorganiczny
Phe – fenyloalanina
PP - pirofosforan
PQ – plastochinon
Pro – prolina
Q - ubichinon
Rha – ramnoza
SAM – S-adenozylometionina
Ser – seryna
 α -T – α -tokoferol
 α -T – α -tokoferol
Thr – treonina
Trp – tryptofan
Tyr – tyrozyna

UV – ultrafiolet

Val – walina

VIS – światło widzialne

IV. Bibliografia

- Andrzejewska-Golec E., (1995) Farmakologiczne znaczenie irydoidów. *Farmacja Polska*, 51, 649 – 707.
- Bisset N.G., Wichtl J.D., *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. CRC Press, Boca Raton 2001.
- Blumenthal M. *The ABC Clinical guide to herbs*. American Botanical Council, Austin, Texas USA 2003.
- Borkowski B., Miłkowska K. (1995) Garbniki, tanoidy i związki pokrewne cz. I. *Herba Polonica* 62, 217-238.
- Borkowski B., Miłkowska K. (1996) Garbniki, tanoidy i związki pokrewne cz. II., III, IV, V. *Herba Polonica* 62, 55-62, 118-126, 174-190.
- Broda B., *Zarys botaniki farmaceutycznej*. PZWŁ, Warszawa 2002.
- Bruneton J., *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*. Intercept Ltd, Londres, Paris, New York 1999.
- Chojnicka I., Janiszowska W. (2007) Przeciwnowotworowe działanie roślinnych triterpenoidów: kwasu oleanolowego i ursolowego oraz ich pochodnych. *Kosmos* 56, 335-341.
- Chołuj A., Janiszowska W. (2005) Pochodne kwasu oleanolowego i ich działanie farmakologiczne. *Herba Polonica* 51, 66-76.
- Cody V., Middleton E., Harborne J.B., Beretz A., *Plant Flavonoids in Bioplogy and Medicine*. Acad. Press, New York 1988.
- Maławska I. (Red.) *Farmakognozja*, Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej. Poznań 2006.
- Harborne B., Baster M. (Ed.) *Phytochemical Dictionary*. Taylor – Francis, Bristol 1993.
- Heldt H.W., *Plant Biochemistry*, Elsevier Academic Press San Diego California 2005.
- Heldt H.W., *Plant Biochemistry*. Elsevier Acad. Press, San Diego California 2005.
- Ikeda T., Yokomizo K., Okawa M., Tsuchihashi R., Kinjo J., Nohara T., Uyeda M. (2005) Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1779-1781.

- Ikeda T., Yokomizo K., Okawa M., Tsuchihashi R., Kinjo J., Nohara T., Uyeda M. (2005) Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1779-1781.
- Jędrzejko K., Klama H. *Zagadnienia z botaniki farmaceutycznej i zielarstwa ogólnego*. Wydawnictwa Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice 1993.
- Kączkowski J., *Biochemia Roślin*, PWN Warszawa 1992, 1993.
- Kohlmunzer S. *Farmakognozja*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998, 2000, 2007.
- Lamer-Zarawska E., Kowal-Gierczak B., Niedworok J. *Fitoterapia i leki roślinne*. Wydawnictwo Lekarskie. PZWL. Warszawa 2007.
- Oberbeil K., *Witaminy*. Świat Książki, Warszawa 1997.
- Ożarowski A., Jaroniewski W., *Rośliny lecznicze*. IWZZ, Warszawa 1987.
- Plakwicz M., Janiszowska W. (2008). Przeciwwirusowe działanie triterpenoidów roślinnych. *Kosmos* 57, 351-361.
- Podbielkowski Z., *Rośliny użytkowe*. Wyd. Szkolne i Ped., Warszawa 1992.
- Roeske W., *Zarys fitoterapii*. PZWL, Warszawa 1995.
- RembIELiński R., Kuźnicka B. *Historia farmacji*. PZWL. Warszawa 1987.
- Southon I.W., Buckingham J., *Dictionary of Alkaloids*. Chapman Hall, London 1989.
- Steinegger E., Hansel R. *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytofarmazie*. Springer Verlag, Berlin 1988.
- Strzelecka H., Kowalski J.(Red.), *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa*. PWN, Warszawa 2000.
- Thorwald J. *Dawna medycyna, jej tajemnice i potęga. Egipt, Babilonia, Indie, Chiny, Peru*. Ossolineum, Wrocław – Warszawa – Kraków 1990.
- Wagner H., Wiesenauer M., *Phytotherapie*. G. Fischer Verl., Stuttgart 1995.
- Wiłkomirski B., Kucharska E. (1992) Triterpene chemotypes of some Polish populations of *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry* 31(11): 3915 – 3916.