

Sacharidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1-2) Skúšky totožnosti

- **Oryzae amylum** (ryžový škrob)
Oryza sativa L.(ryža siata)
Poaceae

A3) Skúšky totožnosti

- **Taraxaci officinalis radix** (koreň púpavy lekárskej)
Taraxacum officinale F. H. Wigg. (púpava lekárska)
Asteraceae

ad A1-2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[ml]
Oryzae amylum, solutio gelata (tzv. škrobový maz)	5,0

ad A1) K 5 ml škrobového mazu* a sa pridá 5 kvapiek jódu ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). **Roztok sa farbí tmavomodro → dôkaz prítomnosti škrobu farebnou reakciou.**

ad A2) K 5 ml škrobového mazu* a sa pridá 0,5 ml 11 % kyseliny chlorovodíkovej a zahrieva sa 30 minút vo vodnom kúpeli. Potom sa zalkalizuje 20 % roztokom hydroxidu sodného na pH 10. Po pridaní 5 ml Fehlingovho skúmadla [#] a zahriatí na vodnom kúpeli **vylúči sa oxid meďný ako červená zrazenina. → dôkaz prítomnosti redukujúcich sacharidov zrážacou reakciou po hydrolýze škrobu v kyslom prostredí.**

ad A3) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Taraxaci officinalis radix	q. s.

Prášková droga sa prevlhčí kvapkou 20 % alkoholického roztoku α -naftolu a 1 kvapkou koncentrovanej kyseliny sírovej. **Roztok sa farbí fialovo → dôkaz prítomnosti inulínu Molischovou reakciou.**

Príprava škrobového mazu*: 0,5 g Oryzae amylum (ryžový škrob) sa povarí s 25 ml vody, maz sa nechá vychladnúť. (p. p. uchováva sa ako zásobný roztok na studenom a tmavom mieste.)

[#] Fehlingovo skúmadlo:

Fehling I: 7 g síranu meďnatého sa rozpustí vo vode a doplní do 100 ml.

Fehling II: 35 g vinanu sodno-draselného a 10 g hydroxydu draselného sa rozpustá vo vode a doplní do 100 ml.

Pred použitím sa zmiešajú rovnaké objemy oboch roztokov.

Slizy.

ÚLOHY:

DROGY:

B) Stanovenie čísla napučievania slizov

- **Althaeae folium** (list ibiša)
Althaea officinalis L. (ibiš lekársky)
Malvaceae
- **Althaeae radix** (koreň ibiša)
Althaea officinalis L. (ibiš lekársky)
Malvaceae
- **Lichen islandicus** (lišajník islandský)
Cetraria islandica (L.) **Acharius s. l.** (pľuzgierka islandská /lišajník islandský)
Parmeliaceae
- **Lini semen** (semeno ľanu)
Linum usitatissimum L. (ľan siaty)
Linaceae
- **Malvae sylvestris flos** (kvet slezu lesného)
Malva sylvestris L. (slez lesný)
Malvaceae
- **Plantaginis ovatae seminis tegumentum** (osemenie skorocelu vajcovitého)
Plantago ovata Forssk., syn. *P. ispaghula* Roxb. (skorocel vajcovitý)
Plantaginaceae
- **Tiliae flos** (kvet lipy)
Tilia cordata Miller (lipa malolistá)
T. platyphyllos Scop. (lipa veľkolistá)
T. × europea L. (lipa obyčajná)
Malvaceae
- **Verbasci flos** (kvet divozela)
Verbascum thapsus L. (divozel málokvetý)
V. densiflorum Bertol. (*V. thapsiforme* Schrad.) (divozel veľkokvetý)
V. phlomoides L. (divozel sáповitý)
Scrophulariaceae

ad B) Stanovenie čísla napučievania slizov

POSTUP:

UPOZORNENIE: Robia sa tri paralelné stanovenia!

Droga	Návažok	Etanol 96 % na navlhčenie
	[g]	[ml]
Althaeae folium	0,2	1,0
Althaeae radix	1,0	1,0
Lichen islandicus	1,0	1,0
Lini semen	1,0	1,0
Malvae sylvestris flos	0,2	0,5
Plantaginis ovatae seminis tegumentum	< 0,1	1,0
Tiliae flos	0,2	0,5
Verbasci flos	1,0	2,0

Do 25-ml odmerného valca sa odváži predpísané množstvo práškovanej drogy (250) (pozri vyššie). Droga sa navlhčí predpísaným množstvom 96 % etanolu a pridá sa 25 ml destilovanej vody. Počas jednej hodiny sa pretrepáva vždy po 10 min. Ďalšie 3 hodiny sa nechá stáť. Po uplynutí 90 minút od začiatku skúšky je už väčšina kvapaliny viazaná na drogu. Častice, ktoré zostali na hladine sa odstránia miernym krúživým pohybom valca. Po uplynutí uvedeného času sa odčíta objem, ktorý zaberá droga spolu s prilipnutým slizom. Výsledná hodnota je priemerom troch paralelných stanovení.

Saponíny.

ÚLOHY:

DROGY:

B) Stanovenie čísla penivosti

- **Herniariae herba** (vňat' prietržníka)
Herniaria glabra L. (prietržník holý)
H. hirsuta L. (prietržník chlpatý)
[*H. incana* Lam. (prietržník sivý)
– Monografia EÚ uvádza aj ako možnú materskú rastlinu]
Caryophyllaceae
- **Primulae radix** (koreň prvosienky)
Primula veris L. (prvosienka jarná)
P. elatior (L.) Hill (prvosienka vyššia)
Primulaceae
- **Quillajae cortex** (kôra kviláje)
Quillaja saponaria Molina s. l. (kvilája mydlová)
Quillajaceae
- **Solidaginis herba** (vňat' zlatobyle)
Solidago gigantea Ait. (zlatobyl' obrovská)
S. canadensis L. (zlatobyl' kanadská)
Asteraceae

ad B) Stanovenie čísla penivosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Herniariae herba	0,2
Primulae radix	0,2
Quillajae cortex	0,1
Solidaginis herba	0,1

K predpísanému množstvu práškovanej drogy (250) sa pridá 100 ml vody a varí sa v 200-ml Erlenmayerovej banke počas 15 minút. Odvar sa prefiltruje a filtrát sa zneutralizuje 1 % roztokom uhličitanu sodného pridávaného po kvapkách. Po neutralizácii sa doplní vodou do 100 ml. Tento výluh sa znova prefiltruje a z filtrátu sa postupne odpipetuje 1 až 10 ml do 10 skúmaviek o priemere 16 mm. Výluhy v jednotlivých skúmavkách sa doplnia destilovanou vodou do 10 ml a obsah každej skúmavky sa 15 sekúnd intenzívne pretrepáva. Skúmavky sa po pretrepaní postavia do stojanu a po 15 minútach sa zistí, v ktorej skúmavke s najmenším množstvom výluhu sa ešte vytvoril prstenec peny vysoký 1 cm.

Príklad: Ak sa prstenec peny výšky 1 cm vytvoril v 8. skúmavke, ktorá obsahuje 8 ml výluhu, potom je v 8 ml 0,1 % výluhu prítomných 0,008 g drogy a pomer riedenia sa vypočíta z úmery: $0,008 : 10 = 1 : x \Rightarrow x = 1\ 250$. V tomto prípade číslo penivosti je 1 250.

Horčiny.

ÚLOHY:

DROGY:

B) Stanovenie čísla horkosti

- **Absinthii herba** (vňat' paliny pravej)
Artemisia absinthium L. (palina pravá)
Asteraceae
- **Centaurii herba** (vňat' zemežlče)
Centaurium erythraea Rafn s. l. (syn. *Centaurium umbellatum* Gilib.; *Erythraea centaurium* Pers.) (zemežlč lekárska)
Gentianaceae
- **Condurango cortex** (kôra marsdénie / kondurangová kôra)
Ruehssia cundurango (Triana) Liede et H. A. Keller (syn. *Marsdenia cundurango* Rchb. fil.) (marsdénia horká / kondurango)
Apocynaceae
- **Gentianae radix** (koreň horca)
Gentiana lutea L. (horec žltý)
Gentianaceae
- **Menyanthidis trifoliatæ folium** (list vachty trojlístkovej)
Menyanthes trifoliata L. (vachta trojlístková)
Menyanthaceae

ad B) Stanovenie čísla horkosti

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pri stanovení čísla horkosti pracujte len s čistým a suchým laboratórnym sklom a s čerstvo prevarenou destilovanou vodou!

Droga	Návažok
	[g]
Absinthii herba	1,0
Centaurii herba	1,0
Condurango cortex	1,0
Gentianae radix	1,0
Menyanthidis trifoliatae folium	1,0

1. Určenie korekčného faktora

Zásobný roztok. 0,1 g chiníniumchloridu sa rozpustí v destilovanej vode a zriedi sa na 100,0 ml. 1,0 ml tohto roztoku sa zriedi destilovanou vodou na 100,0 ml.

Referenčné roztoky. Pripraví sa série riedení zásobného roztoku. Do prvej skúmavky sa pipetou pridá 3,6 ml zásobného roztoku a do ďalšej skúmavky vždy o 0,2 ml viac zásobného roztoku, až po objem 5,8 ml. Objem skúmaviek sa doplní vodou do 10,0 ml. Určí sa riedenie roztoku s najnižšou koncentráciou, ktoré má ešte horkú chuť. 10,0 ml najzriedenejšieho roztoku sa 30 sekúnd nechá v ústach pohybovať z jednej strany na druhú na koreni jazyka. Ak sa roztok nevníma ako horký, vyplúje sa a počká sa 1 minútu. Potom sa ústa vypláchnu vodou. Po 10 minútach sa obdobne skúša najbližšie riedenie s vyššou koncentráciou.

Korekčný faktor k sa vypočíta podľa vzorca

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

kde n = počet mililitrov zásobného roztoku v riedení s najnižšou koncentráciou, ktorá sa ešte vníma ako horká.

2. Príprava vzorky

K 1,0 g práškovanej drogy (250) sa pridá 100,0 ml prevarenej destilovanej vody a zmes sa zahrieva 30 minút za stáleho miešania. Ochladí sa a doplní vodou do 100,0 ml. Po premiešaní sa prefiltruje, pričom sa prvé 2 ml filtrátu odstráni. Filtrát sa označí C-1 a má faktor zriedenia (FZ) 100.

3. Určenie čísla horkosti

Skúšané roztoky

10,0 ml C-1 sa zriedi vodou na 100 ml: C-2 (FZ = 1 000)

10,0 ml C-2 sa zriedi vodou na 100 ml: C-3 (FZ = 10 000)

20,0 ml C-3 sa zriedi vodou na 100 ml: C-3A (FZ = 50 000)

10,0 ml C-3 sa zriedi vodou na 100 ml: C-4 (FZ = 100 000)

Každá testujúca osoba začne ochutnávať vzorku C-4. Určí sa najnižšie riedenie, ktoré má ešte horkú chuť. Tento roztok sa označí D. FZ roztoku sa označí Y.

Začínajúc roztokom D sa pripraví táto postupnosť riedení:

Roztok D [ml]	1,2	1,5	2,0	3,0	6,0	8,0
Voda [ml]	8,8	8,5	8,0	7,0	4,0	2,0

Určí sa počet mililitrov roztoku D, ktorý má po zriedení na 10,0 ml ešte horkú chuť a označí sa X.

Číslo horkosti sa vypočíta podľa vzorca

$$\text{č. horkosti} = \frac{Y \times k}{X \times 0,1}$$

Flavonoidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1) Skúšky totožnosti

- **Crataegi folium cum flore** (list hlohu s kvetom)
Crataegus monogyna Jacq. (Lindm.) (hloh jednosemenný)
C. laevigata (Poir.) DC. (hloh obyčajný)
C. pentagyna Waldst. et Kit. ex Willd. (hloh päťsemenný)
C. nigra Waldst. et Kit. (hloh čierny)
C. azarolus L. (hloh stredomorský)
Rosaceae
- **Sambuci flos** (kvet bazy)
Sambucus nigra L. (baza čierna)
Viburnaceae

A2) Skúšky totožnosti

- **Aurantii amari epicarpium et mesocarpium** (oplodie citrónovníka horkého)
Citrus aurantium L. ssp. *aurantium* (syn. *C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.)
(citrónovník horký)
Rutaceae

A3) Hodnotenie flavonoidov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

- **Rutae herba** (vňat' ruty)
Ruta graveolens L. (ruta voňavá)
Rutaceae
- **Tiliae flos** (kvet lipy)
Tilia cordata Miller (lipa malolistá)
T. platyphyllos Scop. (lipa veľkolistá)
T. × europea L. (lipa obyčajná)
Malvaceae
- **Verbasci flos** (kvet divozela)
Verbascum thapsus L. (divozel málokvetý)
V. densiflorum Bertol. (*V. thapsiforme* Schrad.) (divozel veľkokvetý)
V. phlomoides L. (divozel sápvitý)
Scrophulariaceae

B) Stanovenie flavonoidov spektrofotometricky

- **Betulae folium** (list brezy)
Betula pendula Roth (breza previsnutá)
B. pubescens Ehrh. (breza páperistá)
Betulaceae

- **Equiseti herba** (vňat' prasličky)
Equisetum arvense L. (praslička roľná)
Equisetaceae
- **Euphrasiae herba** (vňat' očianky)
Euphrasia L. (očianka)
Orobanchaceae
- **Fagopyri herba** (vňat' pohánky)
Fagopyrum esculentum Moench (pohánka jedlá)
Polygonaceae
- **Ginkgonis folium** (list ginka)
Ginkgo biloba L (ginko dvojľaločné)
Ginkgoaceae
- **Polygoni avicularis herba** (vňat' stavikrva vtáčieho)
Polygonum aviculare L. s. l. (stavikrv vtáčí)
Polygonaceae
- **Sambuci flos** (kvet bazy)
Sambucus nigra L. (baza čierna)
Viburnaceae
- **Solidaginis herba** (vňat' zlatobyle)
Solidago gigantea Ait. (zlatobyl' obrovská)
S. canadensis L. (zlatobyl' kanadská)
Asteraceae

ad A1) Skúšky totožnosti

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! *Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť! Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplotu varu má 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!*

Droga	Návažok
	[g]
Crataegi folium cum flore	0,2
Sambuci flos	0,2

0,2 g práškovanej drogy sa varí 2 minúty v skúmavke s 5 ml metanolu. Po vychladnutí sa zmes prefiltruje a filtrát sa odparí na porcelánovej miske (na vodnom kúpeli) do sucha. K odparku na miske sa pridajú 3 ml 3 % roztoku kyseliny boritej a 1 ml 10 % roztoku kyseliny šťaveľovej a zmes sa opäť odparí do sucha a nechá sa asi 5 minút na vodnom kúpeli. K odparku sa po vychladnutí pridá dietyléter, prip. etanol 96 %. **Dietyléterový roztok fluoreskuje žltozeleno (pod UF lampou, $\lambda = 366 \text{ nm}$) → dôkaz prítomnosti flavonoidov.**

ad A2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Aurantii amari epicarpium et mesocarpium	q. s.

Niekoľko kúskov drogy sa dá do skúmavky a pretrepe sa s 5 ml 6,5 % roztoku hydroxidu draselného. **Roztok sa farbí sýtožltá → dôkaz hesperidínu.**

ad A3) Hodnotenie flavonoidov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Rutae herba	0,3
Tiliae flos	0,3
Verbasci flos	0,3

Príprava extraktov (vzoriek). 0,3 g práškovanej drogy a 5 ml metanolu sa povarí v skúmavke 5 minút na vodnom kúpeli. Extrakt sa prefiltruje a odparí sa na minimálny objem. Tento roztok sa použije na tenkovrstvovú chromatografiu.

TLC chromatografia

<i>Nosič</i>	Silufol® UV254
<i>Spôsob vyvíjania</i>	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
<i>Vyvíjacia sústava</i>	etylacetát : kyselina mravčia : voda = 8 : 1 : 1
<i>Detekcia</i>	a) 5 % roztok kyseliny trihydrogénboritej a 2 % roztok kyseliny šťaveľovej v pomere 1 : 2 b) pod UF lampou ($\lambda = 366 \text{ nm}$)
<i>Štandardy</i>	kvercetin (Q), rutín (R)
<i>Vzorky</i>	metanolový extrakt Rutae herba (RH), metanolový extrakt Tiliae flos (TF), metanolový extrakt Verbasci flos (VF).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie cca. 5 μl vzorky, teda metanolového extraktu drog (pozri vyššie) spolu s uvedenými štandardmi. Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od jeho horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestóriu až do vymiznutia zápachu. Po vysušení sa deteguje detekčným skúmadlom. Škvry látk sa pozorujú pred aj po detekcii pod UF lampou. Chromatogram sa vyhodnotí vypočítaním porovnaním extraktov drog so štandardami, vypočítajú sa R_F hodnoty.

ad B) Stanovenie flavonoidov spektrofotometricky

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Betulae folium	0,1000
Equiseti herba	0,4000
Euphrasiae herba	0,1500
Fagopyri herba	0,1500
Ginkgonis folium	0,2000
Polygoni avicularis herba	0,2000
Sambuci flos	0,3000
Solidaginis herba	0,1000

Základný roztok. K predpísanému množstvu práškovanej drogy (800) v 100-ml varnej banke sa pridá 0,5 ml roztoku metenamínu (hexametyléntetraamínu) (5 g/l), 15 ml acetónu a 1 ml 25 % kyseliny chlorovodíkovej. Zmes sa 30 minút zahrieva na vodnom kúpeli pri teplote varu pod spätným chladičom. Po ochladení sa zmes prefiltruje cez vatú do 50-ml odmernej banky. Extrahovaná droga i vata sa zahrievajú v tej istej banke tým istým spôsobom ešte 2× s 10 ml acetónu po 10 minútach.

Jednotlivé výluhy sa po ochladení prefiltrujú do tej istej odmernej banky. Banka a filter sa premyjú acetónom a objem sa doplní acetónom na 50 ml. 10,0 ml tohto roztoku sa preniesie do deliaceho lievika, pridá sa 10 ml vody a zmes sa pretrepáva 1× s 10 ml a potom 3× s 5 ml etylacetátu. Etylacetátové podiely sa spoja v ďalšom deliacom lieviku a pretrepávajú sa 2× s 25 ml vody. Následne sa prefiltrujú cez 2 g bezvodého síranu sodného do 25-ml odmernej banky. Objem sa zriedi etylacetátom na 25,0 ml za súčasného premytia filtračného lievika a síranu sodného.

Skúšaný roztok. K 4,0 ml základného roztoku sa pridá 0,4 ml 2 % roztoku chloridu hlinitého v zmesi metanolu a koncentrovanej kyseliny octovej (95 : 5) a zriedi sa zmesou metanolu a koncentrovanej kyseliny octovej (95 : 5) na 10,0 ml.

Porovnávaci roztok. 4,0 ml základného roztoku sa zriedia zmesou metanolu a koncentrovanej kyseliny octovej (95 : 5) na 10,0 ml.

Po 30 minútach sa meria absorbanca skúšaného roztoku pri $\lambda = 425 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu flavonoidov.

Percentuálny obsah flavonoidov sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{A \times 0,625}{m} \quad A = \text{absorbanca}$$

m = návažok drogy v gramoch

za predpokladu, že špecifická absorbanca hyperozidu resp. izokvercetrozidu pri $\lambda = 425 \text{ nm}$ je 500.

Obsah flavonoidov sa vyjadrí:

ako **hyperozid** – drogy *Betulae folium*, *Polygoni avicularis herba* a *Solidaginis herba*,

ako **izokvercetrozid** – drogy *Equiseti herba*, *Euphrasiae herba*, *Fagopyri herba* a *Sambuci flos*.

FaF UK - Farmakognózia (2)

Silice.
Deriváty kyseliny hydroxyškoricovej.

RASTLINY ČELADE LAMIACEAE, PODČELADE NEPETOIDEAE SÚ TYPICKÉ OBSAHOM SILICE S PREVAHOU MONOTERPÉNOV (I.) A OBSAHOM FENOLOVÝCH LÁTOK – DERIVÁTOV KYSELINY HYDROXYŠKORICOVEJ (II.).

ÚLOHY:

DROGY:

I. Silice.

- B1) Stanovenie obsahu silice v *Menthae piperitae folium*
B2) Izolácia silice z *Menthae piperitae folium*
A) Dôkaz mentolu v silici (*Menthae piperitae aetheroleum*)
tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)
- *Menthae piperitae folium* (list mäty piepornej)
Mentha × piperita L. (mäta pieporná)
Lamiaceae

II. Deriváty kyseliny hydroxyškoricovej.

- B) Stanovenie celkového obsahu derivátov kyseliny hydroxyškoricovej vyjadrených ako kyselina rozmarínová v drogách rastlín čelade Lamiaceae
- *Melissae folium* (list medovky)
Melissa officinalis L. (medovka lekárska)
Lamiaceae
 - *Menthae piperitae folium* (list mäty piepornej)
[*Menthae piperitae herba* (vňať mäty piepornej) – SFK obsahuje monografiu]
Mentha × piperita L. (mäta pieporná)
Lamiaceae
 - *Rosmarini folium* (list rozmarínu)
Salvia rosmarinus Spenn. (syn. *Rosmarinus officinalis* L.) (rozmarín lekársky)
Lamiaceae
 - *Salviae officinalis folium* (list šalvie lekárskej)
Salvia officinalis L. (šalvia lekárska)
Lamiaceae

I. Silice.

POSTUP:

ad B1,2) Stanovenie obsahu silice a jej izolácia z *Menthae piperitae folium*

Droga	Návažok
	[g]
Menthae piperitae folium	10,0

1. Stanovenie obsahu silice v *Menthae piperitae folium*

10,0 g rezanej drogy, 200 ml destilovanej vody a niekoľko varných kamienkov sa vpraví do 1000-ml varnej banky, ktorá sa potom spojí s aparátúrou na destiláciu silice. Do aparatúry sa postrannou trubicou pridá destilovaná voda tak, aby hladina v kalibrovanej trubici dosiahla výšku ohybu v bočnom ramene. Postrannou trubicou sa pridá 0,50 ml xylénu a postranná trubica sa zatvorí chumáčikom vaty.

Obsah v banke sa zahreje na variči do varu a destiluje sa 2 hodiny. Po uplynutí najmenej 10 minút od skončenia destilácie sa v kalibrovanej trubici odčíta objem destilátu, od ktorého sa odčíta objem xylénu. Rozdiel týchto hodnôt vyjadruje množstvo silice získanej destiláciou odváženého množstva drogy.

Výsledok sa prepočíta na **ml/1000 g drogy**, resp. na **objemovo-hmotnostné percentá [% (V/m)]**.

2. Izolácia silice (*Menthae piperitae aetheroleum*)

Vydestilovaná silica rozpustená v xyléne sa vypustí z kalibrovanej stupnice, (po otvorení kohútika a opatrnom vypustení vody) do skúmavky.

ad A) Dôkaz mentolu v silici tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

3. Dôkaz mentolu v silici (*Menthae piperitae aetheroleum*) tenkovrstvovou chromatografiou

UPOZORNENIE:

V detekčnom skúmadle sa nachádza koncentrovaná kyselina sírová (žieravina)!

TLC chromatografia

Nosič	Silufol® 254/366
Spôsob vyvíjania	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
Vyvíjacia sústava	chloroform : benzén = 3 : 1
Detekcia	roztok vanilínu v kyseline sírovej #
Štandard	mentol (M)
Vzorka	izolovaná silica mäty piepornej (<i>Menthae piperitae aetheroleum</i>) (Vz)

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie získaná silica a roztok mentolu (štandard). Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave. Vyvinutý chromatogram sa vysuší v digestore a deteguje sa detekčným skúmadlom. Potom sa vloží asi na 10 sekúnd do sušiarne vyhriatej na 105 °C. Po vychladnutí sa pozorujú škvrny látok pri dennom svetle (VIS). Prítomnosť mentolu sa zistí porovnávaním so štandardom, vypočítajú sa R_F hodnoty. → **Pomocou TLC sa dokázal mentol a ďalšie monoterpény v liekopisnom prípravku *Menthae piperitae aetheroleum*.**

Roztok vanilínu v kyseline sírovej: 3 g vanilínu sa rozpustí v 100 ml etanolu (96 %) a pridá sa 3 ml koncentrovanej kyseliny sírovej.

II. Deriváty kyseliny hydroxyškoricovej.

ad B) Stanovenie obsahu celkového derivátov kyseliny hydroxyškoricovej vyjadrených ako kyselina rozmarínová v drogách rastlín čeľade Lamiaceae

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Melissae folium	0,0500
Menthae piperitae folium	0,1000
Salviae officinalis folium	0,2000
Rosmarini folium	0,2000

Základný roztok: K predpísanému množstvu práškovanej drogy (800) sa pridá 80 ml 50 % etanolu a varí sa 30 minút pod spätným chladičom na vodnom kúpeli. Ochladí sa a prefiltruje sa do 100-ml odmernej banky a filter sa premyje 10 ml 50 % etanolu. Obsah sa doplní 50 % etanolom na 100 ml.

Skúšaný roztok: Odoberie sa 1,0 ml základného roztoku do 10-ml odmernej banky, pridajú sa 2 ml roztoku 0,5 mol/l kyseliny chlorovodíkovej, 2 ml Arnovovho skúmadla[#]. Potom sa pridajú 2 ml zriedeného roztoku hydroxidu sodného (8,5 g/100 ml), doplní sa vodou na 10,0 ml a premieša sa. Ihneď sa meria absorbancia skúšaného roztoku pri $\lambda = 505 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Porovnávací roztok. 1,0 ml základného roztoku sa zriedi do 10,0 ml destilovanou vodou.

Celkový percentuálny obsah hydroxyškoricových derivátov, vyjadrených ako kyselina rozmarínová, sa vypočíta podľa vzorca

$$\% = \frac{A \times 2,5}{m}$$

A = absorbancia skúšaného roztoku pri $\lambda = 505 \text{ nm}$
m = návažok drogy v gramoch

za predpokladu, že špecifická absorbancia kyseliny rozmarínovej pri $\lambda = 505 \text{ nm}$ je 400.

[#] Arnovovo skúmadlo sa pripraví rozpustením 10 g dusitanu sodného a 10 g molybdénanu sodného v 100 ml vody

Triesloviny.

ÚLOHY:

DROGY:

A) Skúšky totožnosti

- **Agrimoniae herba** (vňat' repíka)
Agrimonia eupatoria L. (repík lekársky)
Rosaceae
- **Bistortae rhizoma** (podzemok hadovníka)
Persicaria bistorta (L.) Samp. (syn. *Polygonum bistorta* L.) (hadovník väčší)
Polygonaceae
- **Hamamelidis folium** (list hamamelu)
Hamamelis virginiana L. (hamamel virgínsky)
Hamamelidaceae

B) Stanovenie trieslovín spektrofotometricky

- **Agrimoniae herba** (vňat' repíka)
Agrimonia eupatoria L. (repík lekársky)
Rosaceae
- **Bistortae rhizoma** (podzemok hadovníka)
Persicaria bistorta (L.) Samp. (syn. *Polygonum bistorta* L.) (hadovník väčší)
Polygonaceae
- **Hamamelidis folium** (list hamamelu)
Hamamelis virginiana L. (hamamel virgínsky)
Hamamelidaceae
- **Quercus cortex** (kôra duba)
Quercus robur L. (dub letný)
Q. petraea (Matt.) Liebl (dub zimný)
Q. pubescens Willd. (dub páperistý)
Fagaceae
- **Tormentillae rhizoma** (podzemok nátržníka)
Potentilla erecta (L.) Raeusch. (syn. *P. tormentilla* Stokes) (nátržník vzpriamený)
Rosaceae

ad A) Skúšky totožnosti

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Agrimoniae herba	1,0
Bistortae radix	1,0
Hamamelidis folium	1,0

Pripraví sa asi 50 ml 2 % odvaru z drogy povarením 5 minút s vodou. Prefiltruje sa cez vatú.

Filtrát sa rozdelí do skúmaviek po 5 ml a následne sa po kvapkách pridávajú skúmadlá:

1. 10 % roztoku chloridu železitého,
2. 5 % roztok dichrómanu draselného,
3. 4 % roztok síranu meďnatého,
4. 3 % roztok octanu olovnatého,
5. 0,5 % roztok želatíny.

Výsledky reakcií sa zaznamenajú a porovnajú → **dôkaz prítomnosti trieslovín zrážacími reakciami.**

ad B) Stanovenie trieslovín

V droge určenej na stanovenie trieslovín sa paralelne stanoví aj strata sušením.

ad B1) Stanovenie straty sušením

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Agrimoniae herba	1,0000
Bistortae radix	1,0000
Hamamelidis folium	1,0000
Quercus cortex	1,0000
Tormentillae radix	1,0000

1,0000 g práškovanej drogy (180) (určenej na stanovenie obsahu trieslovín) sa v predváženej navažovačke suší 2 hodiny v sušiarňi pri teplote 100 až 105 °C. Navažovačka sa nechá vychladnúť v exsikatore a odváži sa. Z rozdielu hmotností sa vypočíta strata sušením a vyjadrí sa v percentách.

Zistená hodnota straty sušením sa použije pri výpočte obsahu trieslovín pri prepočítaní obsahu na vysušenú drogu.

ad B2) Stanovenie trieslovín spektrofotometricky

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Agrimoniae herba	1,0000
Bistortae radix	0,2000
Hamamelidis folium	0,7000
Quercus cortex	0,7000
Tormentillae radix	0,5000

1. Stanovenie trieslovín spektrofotometricky

UPOZORNENIE: Na stanovenie sa použije destilovaná voda bez oxidu uhličitého (prevarená)!

K predpísanému množstvu práškovanej drogy (180) vo varnej banke sa pridá 150 ml vody. Zahreje sa do varu a varí sa 30 minút pod spätným chladičom. Ochladí sa pod tečúcou vodou, prenesie sa do 250-ml odmernej banky, varná banka sa 3× vypláchne 10 ml vody, a doplní sa vodou po značku. Potom sa výluh prefiltruje cez skladaný filter, prvých 50 ml filtrátu sa odstráni.

Celkový obsah polyfenolov. 5,0 ml filtrátu sa zriedi vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohto roztoku sa zmieša s 1,0 ml fosfomolybdénano-volfrámanového skúmadla # a s 10,0 ml vody. Zmes sa doplní 29 % roztokom uhličitanu sodného na 25,0 ml. Po 30 minútach sa meria absorbancia **pri $\lambda = 760 \text{ nm}$ (A_1)** oproti vode ako porovnávaciemu roztoku.

Polyfenoly neadsorbované kožným práškom. K 10,0 ml filtrátu sa pridá 0,10 g kožného prášku CRS a 60 minút sa silne pretrepáva. Roztok sa prefiltruje. 5,0 ml tohto roztoku sa zriedi vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohto roztoku sa zmieša s 1,0 ml fosfomolybdénano-volfrámanového skúmadla # a s 10,0 ml vody. Zmes sa doplní 29 % roztokom uhličitanu sodného na 25,0 ml. Po 30 minútach sa meria absorbancia **pri $\lambda = 760 \text{ nm}$ (A_2)** oproti vode ako porovnávaciemu roztoku.

Referenčná skúška. 50,0 mg pyrogallolu sa rozpustí vo vode a zriedi sa tým istým rozpúšťadlom na 100,0 ml. 5,0 ml roztoku sa zriedi vodou na 100,0 ml. 2,0 ml tohto roztoku sa zmieša s 1,0 ml fosfomolybdénano-volfrámanového skúmadla # a 10,0 ml vody. Zmes sa doplní 29 % roztokom uhličitanu sodného na 25,0 ml. Po 30 minútach sa meria absorbancia **pri $\lambda = 760 \text{ nm}$ (A_3)** oproti vode ako porovnávaciemu roztoku. (**$A_3 = 0,350$**)

2. Obsah trieslovín počítaný na vysušenú drogu

- Percentuálny obsah trieslovín sa vypočíta podľa vzorca

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

A_1 = absorbancia vzorky pri stanovení celkového obsahu polyfenolov

A_2 = absorbancia vzorky pri stanovení polyfenolov
neadsorbovaných kožným práškom

A_3 = absorbancia pyrogallolu v referenčnej skúške (**$A_3 = 0,350$**)

m_1 = návažok drogy v gramoch

m_2 = návažok pyrogallolu v gramoch (**$m_2 = 0,0502 \text{ g}$**)

- Stanovený obsah trieslovín sa prepočíta na vysušenú drogu. Na výpočet sa použije zistená hodnota straty sušením.

Skúmadlo fosfomolybdénano-volfrámanové:

100 g volfrámanu sodného a 25 g molybdénanu sodného sa rozpustí v 700 ml vody. Pridá sa 100 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a 50 ml koncentrovanej kyseliny fosforečnej. Zmes sa zahrieva 10 hodín v sklenenej aparatúre pod spätným chladičom. Pridá sa 150 g síranu lítneho, 50 ml vody a niekoľko kvapiek brómu. Zmes sa zahrieva pri teplote varu do odstránenia prebytku brómu (15 minút), ochladí sa, zriedi sa vodou na 1000 ml a prefiltruje sa. Skúmadlo má byť žlté. Ak je zafarbené do zelenkasta, nesmie sa použiť. Môže sa opäť regenerovať

zahrievaním pri teplote varu s niekoľkými kvapkami brómu a prebytok brómu sa takto odstráni. Uchováva sa pri teplote 2 °C až 8 °C.

Skúmadlo fosfomolybdénano-volfrámanové, zriedené:

1 diel fosfomolybdénano-volfrámanového skúmadla sa zmieša s 2 dielmi vody.

Alkaloidy – Chinínové alkaloidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1-4) Skúšky totožnosti[§]

- † **Cinchonae cortex** (kôra chinínovníka)
Cinchona pubescens Vahl (syn. *Cinchona succirubra* Pav. (chinínovník páperistý)
Cinchona calisaya Wedd. (chinínovník južný)
Cinchona ledgeriana Moens ex Trimen (chinínovník Ledgerov)
Rubiaceae

B) Stanovenie obsahu alkaloidov titračnou metódou

- † **Cinchonae cortex** (kôra chinínovníka)
Cinchona pubescens Vahl (syn. *Cinchona succirubra* Pav. (chinínovník páperistý)
Cinchona calisaya Wedd. (chinínovník južný)
Cinchona ledgeriana Moens ex Trimen (chinínovník Ledgerov)
Rubiaceae

ad A1-3) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
† Cinchona cortex	0,2

0,2 g práškovanej drogy Cinchona cortex sa 1 minútu pretrepáva s 10 ml 15 % roztoku kyseliny sírovej a prefiltruje sa.

A1) K 1 ml filtrátu sa pridá niekoľko kvapiek Mayerovho skúmadla #. **Vzniká žltobiela zrazenina → dôkaz prítomnosti alkaloidov.**

A2) K 1 ml filtrátu sa pridá niekoľko kvapiek Dragendorffovho skúmadla #. **Vzniká oranžovočervené zafarbenie → dôkaz prítomnosti alkaloidov.**

A3) 1 ml filtrátu sa zriedi vodou na 10 ml. Tento roztok v ultrafialovom žiarení intenzívne **modro fluoreskuje**. Pridaním niekoľkých kvapiek 25 % kyseliny chlorovodíkovej fluorescencia hneď zmizne → **dôkaz prítomnosti chinínových alkaloidov.**

ad A4) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
† Cinchona cortex	0,2

0,2 g drogy Cinchona cortex sa zahrieva vo vodorovne položenej suchej skúmavke – vyvíjajú sa fialové pary, ktoré kondenzujú na chladnejších miestach skúmavky na tmavofialový decht. Etanolový (96 %) roztok dechtu **fluoreskuje** v ultrafialovom žiarení ($\lambda = 366 \text{ nm}$) **svetlomodro** → **dôkaz prítomnosti chinínových alkaloidov.**

ad B) Stanovenie alkaloidov titračnou metódou

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť! Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplota varu je 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!

Droga	Návažok
	[g]
† Cinchona cortex	1,25

1,25 g práškovanej drogy (250) sa vo varnej banke so zátkou alebo v liekovke (200 ml) so zátkou zmieša s 2 ml koncentrovanej kyseliny mravčej a 15 ml vody a zahrieva sa 30 minút na vodnom kúpeli. Po vychladnutí sa pridá 15 ml chloroformu a 60 ml dietyléteru a pretrepe sa. Po pretrepaní sa pridá ešte 3,5 ml nasýteného roztoku hydroxidu sodného. Zmes sa 10 minút intenzívne pretrepáva a potom sa za častého pretrepávania nechá stáť ďalších 30 minút. Po tomto čase sa pridajú 2 g práškovaného tragantu alebo agaru a pretrepáva sa do vyjasnenia. Následne sa horná vrstva opatrne oddelí, napr. dekantovaním.

48,0 g číreho, priesvitného roztoku (zodpovedá 1,0 g drogy) sa odváži do titračnej banky a rozpúšťadlo sa odparí na vodnom kúpeli. Odparok v titračnej banke sa rozpustí v 10 ml 96 % etanolu s prípadným miernym zahriatím, pridá sa 10 ml vody a niekoľko kvapiek roztoku metyloranže (acidobázický indikátor). Následne sa titruje odmerným roztokom kyseliny chlorovodíkovej ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) do začínajúcej zmeny zafarbenia (prechod: oranžová → červená). Potom sa pridá ďalších 50 ml vody a dotitruje sa do červeného zafarbenia.

Predpokladaná spotreba odmerného roztoku kyseliny chlorovodíkovej ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) sa vypočíta za predpokladu, že Cinchona cortex obsahuje **min. 6,5 %** (Ph. Eur.) alkaloidov počítaných ako chinín a cinchonín.

Percentuálny obsah alkaloidov počítaných ako chinín a cinchonín sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{V \times f \times m_v \times 100}{m}$$

V = spotreba použitého odmerného roztoku v ml

f = faktor odmerného roztoku kyseliny chlorovodíkovej ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$)

m_v = množstvo stanovených alkaloidov počítaných ako chinín a cinchonín v gramoch zodpovedajúce 1 ml odmerného roztoku (**$m_v = 0,03094 \text{ g}$**)

m = množstvo drogy v gramoch (**1,0 g**), ktoré zodpovedá 48,0 g filtrátu

Alkaloidy – Tropánové alkaloidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1,2) Skúšky totožnosti^s

- † **Belladonnae folium** (list ľuľkovca)
Atropa bella-donna L. (ľuľkovec zlomocný)
Solanaceae

B) Stanovenie obsahu alkaloidov titračnou metódou

- † **Belladonnae folium** (list ľuľkovca)
Atropa bella-donna L. (ľuľkovec zlomocný)
Solanaceae

ad A1,2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
† Belladonnae folium	1,0

1,0 g práškovanej drogy sa 3 minúty pretrepáva s 5,0 ml 11 % kyseliny chlorovodíkovej a 5,0 ml vody, potom sa prefiltruje.

A1) K 1 ml filtrátu sa pridá niekoľko kvapiek Mayerovho skúmadla [#]. **Vzniká žltobiela zrazenina → dôkaz prítomnosti alkaloidov.**

A2) K 1 ml filtrátu sa pridá niekoľko kvapiek Dragendorffovho skúmadla [#]. **Vzniká oranžovočervené zafarbenie → dôkaz prítomnosti alkaloidov.**

ad B) Stanovenie alkaloidov titračnou metódou

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť! Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplota varu je 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!

Droga	Návažok
	[g]
† Belladonnae folium	2,0

2,0 g práškovanej drogy (125) sa v 250-ml varnej banke so zátkou alebo v liekovke so zábrusom (200 ml) zmieša s 50 ml dietyléteru. Po 5 minútach sa pridajú 4 ml 10 % roztoku amoniaku a 16 ml vody a 30 minút sa silno pretrepáva. Následne sa zmes nechá 5 minút stáť a potom sa horná dietyléterová vrstva rýchlo oddelí a prípadne prefiltruje cez vatú.

30 g filtrátu (zodpovedá 1,2 g drogy) sa odváži do titračnej banky a odparí sa do sucha. K odparku sa následne pridá 1,0 ml 96 % etanolu, znovu sa odparí a odparok sa suší 2 hodiny pri teplote 105 °C. Potom sa rozpustí v 1,0 ml chloroformu, pridá sa 5,0 ml roztoku kyseliny sírovej ($c = 0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$) a zahrieva sa na vodnom kúpeli do odparenia chloroformu. Potom sa pridá 5,0 ml vody, niekoľko kvapiek zmesného indikátora ^{#3} a titruje sa roztokom hydroxidu sodného ($c = 0,02 \text{ mol.dm}^{-3}$) (prechod: fialová → zelená). **Nájdená spotreba sa odčíta od spotreby slepého pokusu (spätná titrácia).**

Slepý pokus: K 5,0 ml vody sa pridá 5,0 ml roztoku kyseliny sírovej ($c = 0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$), premieša sa a ku kyslému vodnému roztoku sa pridá niekoľko kvapiek zmesného indikátora ^{#4} a titruje sa roztokom hydroxidu sodného ($c = 0,02 \text{ mol.dm}^{-3}$) (prechod: fialová → zelená).

Predpokladaná spotreba odmerného roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,02 \text{ mol.dm}^{-3}$) sa vypočíta za predpokladu, že Belladonnae folium obsahuje **min. 0,3 %** alkaloidov počítaných ako hyoseyamín (Ph. Eur.).

Percentuálny obsah alkaloidov počítaných ako hyoseyamín sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{(V_S \times f_{H_2SO_4} - V_{VZ} \times f_{NaOH}) \times m_v \times 100}{m}$$

[#] **Zmesný indikátor** = zásobný roztok : 96 % etanol : voda (1 : 1 : 2 V/V)

Zásobný roztok = 200 ml 0,1 % roztoku metylčervene v 96 % etanole + 50 ml roztoku metylénovej modrej. Nastaví sa 0,01 mol/l odmerným roztokom NaOH (bez CO₂) až do vymiznutia poslednej stopy červenej farby, roztok zostane zelený.

Farebný prechod = fialová → zelená.

[#] **Zmesný indikátor** = zásobný roztok : 96 % etanol : voda (1 : 1 : 2 V/V)

Zásobný roztok = 200 ml 0,1 % roztoku metylčervene v 96 % etanole + 50 ml roztoku metylénovej modrej. Nastaví sa 0,01 mol/l odmerným roztokom NaOH (bez CO₂) až do vymiznutia poslednej stopy červenej farby, roztok zostane zelený.

Farebný prechod = fialová → zelená.

Farmakognózia (2) – praktické cvičenia – 3. ročník
Letný semester akad. r. 2024/2025

V_s = spotreba použitého odmerného roztoku v ml pri slepom pokuse

V_{vz} = spotreba použitého odmerného roztoku v ml pri vzorke

$F_{H_2SO_4}$ = faktor odmerného roztoku kyseliny sírovej ($c = 0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$)

F_{NaOH} = faktor odmerného roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,02 \text{ mol.dm}^{-3}$)

m_v = množstvo stanovených alkaloidov počítaných ako hyoscyamín v gramoch odpovedajúce

1 ml odmerného roztoku (**$m_v = 0,005788 \text{ g}$**)

m = množstvo drogy v gramoch (**1,2 g**), ktoré zodpovedá 30,0 g filtrátu

FaF UK - Farmakognózia (2)

Alkaloidy – Námel'ové alkaloidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1,2) Skúšky totožnosti

- † **Secale cornutum** (námel' / ražná hubka)
Claviceps purpurea (Fr.) Tul. (kyjanička purpurová)
Clavicipitaceae

ad A1,2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! *Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť!* Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplota varu je 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!

Droga	Návažok
	[g]
† Secalis cornuti extractum siccum	0,1

0,1 g suchého extraktu drogy sa pretrepáva 3 minúty s 8 ml dietyléteru a 5 kvapkami 15% amoniaku. Výluh sa prefiltruje a filtrát sa vytrepe s 3 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkovej. Po oddelení vrstiev sa zo spodnej vodnej vrstvy pipetou odmerajú 2 ml a rozdelia sa na 2 diely:

A1) k 1 ml sa pridá 5 kvapiek Mayerovho skúmadla [#], vzniká **žltobiela zrazenina** → **dôkaz prítomnosti alkaloidov**.

A2) na 1 ml sa v skúmavke opatrne navrstvia 2 ml roztoku *p*-dimetylamino-benzaldehydu (van Urkovho skúmadla) [#]. Na styku oboch tekutín sa vytvorí **modrý prstenec** → **dôkaz prítomnosti námeľových alkaloidov**.

5

⁵ **van Urkovo skúmadlo (*p*-dimetylamino-benzaldehyd):** 0,125 g *p*-dimetylamino-benzaldehydu sa rozpustí v 50 ml 65 % roztoku kyseliny sírovej, pridá sa 0,1 ml 5 % roztoku chloridu železitého a doplní sa 65 % roztokom kyseliny sírovej do 100 ml. Použitelnosť – najskôr o 3 dni, najneskôr – 3 mesiace.

Alkaloidy – Ópiové alkaloidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1) Skúšky totožnosti – dôkaz alkaloidov

- **Papaveris fructus maturus** (zrelý plod maku)
***Papaver somniferum* L.** (mak siaty)
Papaveraceae

A2) 1. Skúšky totožnosti – dôkaz kyseliny mekónovej

- **Papaveris fructus maturus** (zrelý plod maku)
***Papaver somniferum* L.** (mak siaty)
Papaveraceae

A3) Dôkaz ópiových alkaloidov tenkovrstvovou chromatografiou

Tinctura opii methanolica (tinktúra ópia v metanole)

- † **Opium crudum** (surové ópium)
***Papaver somniferum* L.** (mak siaty)
Papaveraceae

B) Stanovenie obsahu morfinu v makovine

- **Papaveris fructus maturus** (zrelý plod maku)
***Papaver somniferum* L.** (mak siaty)
Papaveraceae

Ópiové alkaloidy.

ad A1) Skúšky totožnosti – dôkaz alkaloidov

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Papaveris fructus maturus	0,2

0,2 g práškovanej drogy Papaveris fructus maturus sa 1 minútu pretrepáva s 10 ml 15 % roztoku kyseliny sírovej a prefiltruje sa.

K 1 ml filtrátu sa pridá niekoľko kvapiek Dragendorffovho skúmadla. **Vzniká oranžovočervené zafarbenie → dôkaz prítomnosti alkaloidov.**

ad A2) Skúšky totožnosti – dôkaz kyseliny mekónovej

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Papaveris fructus maturus	0,1

0,1 g práškovanej drogy sa zahreje s 5 ml vody a prefiltruje. K filtrátu sa pridá 1 kvapka 10 % roztoku chloridu železitého. **Vzniká hnedočervené zafarbenie → dôkaz prítomnosti kyseliny mekónovej.**

ad A3) Dôkaz ópiových alkaloidov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

TLC chromatografia

Nosič	Silufol® UV254
Spôsob vyvíjania	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
Vyvíjacia sústava	toluén : acetón : 25 % amoniak : 99 % etanol = 45 : 45 : 3 : 7
Detekcia	a) pod UF lampou ($\lambda = 366 \text{ nm}$) b) Dragendorffovo skúmadlo
Štandardy	morfin (M), kodeín (K), tebaín (T), papaverín (P), noskapín (syn. narkotín) (N). (UPOZORNENIE: <i>Štandardy treba naniesť v uvedenom poradí!</i>)
Vzorka	Tinctura opii methanolica (Ti).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie Tinctura opii methanolica – metanolvý extrakt ópia spolu so štandardmi. Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestore až do vymiznutia zápachu (30 minút). Alkaloidy pozorujeme najskôr pod UF lampou a následne pri dennom svetle po detekcii s Dragendorffovým skúmadlom, kedy sa alkaloidy prejavia **oranžovými** škvrnami. Nakoniec sa vypočítajú R_f hodnoty príslušných škvŕn. V Tinctura opii methanolica sa pomocou metódy TLC dokázali **ópiové alkaloidy**.

ad B) Stanovenie morfinu v makovine

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Papaveris fructus maturus	0,2500

Základný roztok. 0,2500 g usušenej rozomletej makoviny (800) sa 20 minút homogenizuje v rozotieračke s 3 g kyslého oxidu hlinitého. Zmes sa kvantitatívne prenesie do banky so zábrusom a pridá sa 40 ml destilovanej vody a pretrepáva sa 20 minút. Vodný extrakt sa prefiltruje cez filter do Erlenmayerovej banky a pridá sa 0,2 g chloridu amónneho. Tento roztok sa zalkalizuje 10 % roztokom amoniaku na pH 8,5 až 9,5. Po úprave pH sa roztok prenesie do deliaceho lievika a trojnásobne sa vytrepáva v zmesi chloroform : propán-2-ol = 3 : 1 (vytrepáva sa 2 × s 20 ml a 1 × s 10 ml, vždy po dobu 5 minút). Spojené chloroformové podiely sa odparia v destilačnej banke na vákuovej rotačnej odparovačke do sucha. Po vychladnutí sa odparok rozpustí v 5 ml chloroformu a vytrepáva sa do 15 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkovej. Po vypustení chloroformovej vrstvy sa odpipetuje 5,0 ml kyslého základného roztoku do skúmavky (skúšaný roztok), ďalších 5,0 ml sa použije na prípravu porovnávacieho roztoku.

Skúšaný roztok. K 5,0 ml kyslého základného roztoku v skúmavke sa pridajú 2,0 ml čerstvo pripraveného 1 % roztoku dusitanu sodného a ihneď sa 20 sekúnd silne pretrepáva. Po 15 minútach sa pridajú 3,0 ml 10 % roztoku amoniaku a pretrepe sa. Nakoniec sa pridá ešte 2,5 ml destilovanej vody. Po ďalších 5 minútach, v priebehu ktorých sa pripraví porovnávací roztok, sa meria absorbancia skúmaného roztoku pri $\lambda = 420$ nm oproti porovnávaciemu roztoku.

Porovnávací roztok. 5 ml kyslého základného roztoku sa zmieša v skúmavke s 3 ml 10 % roztoku amoniaku a 4,5 ml destilovanej vody. Zmes sa zahrieva na vodnom kúpeli 5 minút a po ochladení sa prenesie do kyvety.

Výpočet obsahu morfinu.

Množstvo morfinu vo vzorke (m_a) sa odčíta z kalibračnej krivky. Percentuálny obsah morfinu v makovine sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{m_a \times 0,0003}{m}$$

m_a = množstvo morfinu vo vzorke odčítané z kalibračnej krivky (v μg)

m = návažok drogy v gramoch

Metylchantínové deriváty.

ÚLOHY:

DROGY:

A1) Skúšky totožnosti

- **Camelliae sinensis folium non fermentatum** (nefermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae
- **Camelliae folium fermentatum** (fermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae

**A2) Dôkaz metylchantínových derivátov
tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)**

- **Camelliae sinensis folium non fermentatum** (nefermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae
- **Camelliae folium fermentatum** (fermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae
- **Coffeae semen** (semeno kávovníka)
Coffea L. spp. (rôzne druhy rodu kávovník)
Rubiaceae
- **Mate folium** (list cezmíny / maté)
Ilex paraguariensis A. St.-Hil. (cezmína paraguajská)
Aquifoliaceae

B) Stanovenie metylchantínových derivátov gravimetrickou metódou

- **Camelliae sinensis folium non fermentatum** (nefermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae
- **Camelliae folium fermentatum** (fermentovaný list čajovníka čínskeho)
Camellia sinensis (L.) Kuntze (čajovník čínsky)
Theaceae
- **Coffeae semen** (semeno kávovníka)
Coffea L. spp. (rôzne druhy rodu kávovník)
Rubiaceae

ad A1) Skúšky totožnosti

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Camelliae folium non fermentatum (seu) Camelliae folium fermentatum	q. s.

Na malé množstvo drogy Camelliae folium non-fermentatum / Camelliae folium fermentatum sa použije proces mikrosublímácie, tak že sa pomaly zahrieva na hodinovom sklíčku, ktoré je prikryté druhým hodinovým sklíčkom. Horné sklíčko sa zároveň ochladzuje chumáčikom vaty, navlhčeným studenou vodou. Na hornom hodinovom sklíčku kondenzuje bezfarebný kryštalický sublimát v podobe dlhých ihlíc (kofeín). Kryštály sa pozorujú voľným okom alebo pod mikroskopom → dôkaz kofeínu.

(Tento sublimát možno tiež použiť aj na murexidovú reakciu.)

ad A2) Dôkaz metylxantínových derivátov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Coffeae semen	1,0
Camelliae folium non fermentatum (seu) Camelliae folium fermentatum	1,0

Príprava vzorky. 1,0 g práškovanej drogy sa v 100-ml liekovke preleje 1 ml koncentrovaného amoniaku, pridá sa 10 ml chloroformu a 30 minút sa pretrepáva na trepačke. Potom sa extrakt prefiltruje a odparí sa na vodnom kúpeli na objem cca 2 ml. Extrakt sa použije na tenkovrstvovú chromatografiu.

TLC chromatografia

<i>Nosič</i>	Silufol® UV254
<i>Spôsob vyvíjania</i>	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
<i>Vyvíjacia sústava</i>	chloroform : metanol = 95 : 5
<i>Detekcia</i>	pod UF lampou ($\lambda = 254 \text{ nm}$)
<i>Štandardy</i>	kofeín (K), teobromín (Tb), teofylín (Tf). (UPOZORNENIE: Štandardy <u>treba naniest' v uvedenom poradí!</u>)
<i>Vzorky</i>	extrakt z Coffeae semen (CS), extrakt z Camelliae folium non-fermentatum / Camelliae folium fermentatum (CF).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesú extrakty drog spolu so štandardmi. Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestore až do vymiznutia zápachu. Metyl xantínové deriváty pozorujeme pod UF lampou. Nakoniec sa vypočítajú R_f hodnoty príslušných škvŕn. V extraktoch Coffeae semen a Camelliae folium non-fermentatum / Camelliae folium fermentatum sa pomocou metódy TLC dokázala prítomnosť **metyl xantínových derivátov**.

ad B) Stanovenie metylxantínových derivátov gravimetrickou metódou

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Coffeae semen	3,0
Camelliae folium non fermentatum (seu) Camelliae folium fermentatum	4,0
Mate folium	4,0

Príprava extraktu. K práškovanej droge (800) v 100-ml liekovke sa pridá 30 ml chloroformu a 3 ml 29% roztoku uhličitanu sodného a 30 minút sa silno pretrepáva na trepačke. Potom sa pridá 7 ml vody, silno sa pretrepe a cez suchý filter sa prefiltruje do 250-ml deliaceho lievika.

Izolácia metylxantínových derivátov: Filtrát chloroformového výluhu (dolná fáza) sa v deliacom lieviku pretrepe najprv s 20,0 ml a potom 3× s 15,0 ml zmesi zriedenej kyseliny chlorovodíkovej a vody (1 : 9 obj.).

Spojené **kyslé** vodné (horné) podiely sa v ďalšom deliacom lieviku zalkalizujú 10 % roztokom amoniaku a tento alkalický roztok sa vytrepáva s 20,0 ml a potom ešte 3× s 15,0 ml chloroformu.

Gravimetrické stanovenie. Spojené **chloroformové** (dolné) podiely sa prefiltrujú cez suchý filter do suchej vopred odváženej (analytické váhy) 250-ml destilačnej banky, filter sa premyje s 2 až 3 ml chloroformu a zmes sa na vákuovej rotačnej odparovačke odparí do sucha. Odparok v banke sa suší 30 minút v sušiarňi pri 105 °C. Po vychladnutí v exsikátore sa banka s odparkom odváži. Obsah metylxantínových derivátov v droge sa vyjadří v percentách.

ad A2) *Kvalitatívny dôkaz metylxantínových derivátov v odparku.* Vysušený odparok sa (po odvážení banky) rozpustí v niekoľkých kvapkách 6 mol/l kyseliny chlorovodíkovej pomocou sonikácie a roztok sa preleje na odparovaciu misku. K roztoku na odparovacej miske sa pridá asi 0,5 ml koncentrovaného peroxidu vodíka a na vodnom kúpeli sa odparí do sucha (dostatočne dlho). V prítomnosti metylxantínových derivátov vznikne ružovočerveno zafarbený odparok, po pokvapkaní niekoľkými kvapkami 6 mol/l amoniaku sa farba zmení na fialovú (**murexidová reakcia**).

Antraglykozidy

ÚLOHY:

DROGY:

A) Skúšky totožnosti

- **Frangulae cortex** (kôra krušiny)
***Rhamnus frangula* L. (syn. *Frangula alnus* Miller)** (krušina jelšová)
Rhamnaceae
- **Rhei radix** (koreň rebarbory)
***Rheum palmatum* L.** (rebarbora okrasná, syn. rebarbora dlanitá)
***Rheum officinale* Baillon** (rebarbora lekárska)
Polygonaceae
- **Rumicis radix** (koreň štiavca)
***Rumex* sp.** (rôzne druhy rodu štiav)
Polygonaceae
- **Sennae foliolum** (lístok senny)
***Senna alexandrina* Mill. (syn. *Cassia acutifolia* Delile a *Cassia angustifolia* Vahl)**
(senna alexandrijská)
Fabaceae

B) Delenie a identifikácia antraglykozidov stĺpcovou a tenkovrstvovou chromatografiou

- **Frangulae cortex** (kôra krušiny)
***Rhamnus frangula* L. (syn. *Frangula alnus* Miller)** (krušina jelšová)
Rhamnaceae
- **Rhei radix** (koreň rebarbory)
***Rheum palmatum* L.** (rebarbora okrasná, syn. rebarbora dlanitá)
***Rheum officinale* Baillon** (rebarbora lekárska)
Polygonaceae

ad A) Skúšky totožnosti

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Frangulae cortex	0,5
Rhei radix	0,5
Rumicis radix	0,5
Sennae foliolum	0,5

Na drogu kvapneme 1 kvapku 6,5 % roztoku hydroxidu draselného. **Vzniká tmavočervené zafarbenie → dôkaz prítomnosti antrachinónov.**

**ad B) Delenie a identifikácia antraglykozidov stĺpcovou
a tenkovrstvovou chromatografiou**

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť! Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplota varu je 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!

Droga	Návažok
	[g]
Frangulae cortex	0,2
Rhei radix	0,2

1. Príprava extraktu

Predpísané množstvo práškovanej drogy (800) sa za varu hydrolyzuje s 10 ml 0,5 % kyseliny chlorovodíkovej pod spätným chladičom po dobu 10 minút. Po vychladnutí sa k zmesi pridá 20 ml chloroformu a extrahuje sa za varu 15 minút. Po ochladení sa extrakt prefiltruje cez vatú do deliaceho lievika. Po oddelení vodnej fázy sa chloroformový roztok prefiltruje do porcelánovej misky a odparí sa do sucha. Odparok sa rozpustí v 2 ml chloroformu a adsorbuje sa na malé množstvo silikagélu v porcelánovej miske.

2. Delenie derivátov antrachinónu na stĺpci silikagélu

Príprava stĺpca silikagélu. 7 g silikagélu sa suspenduje v 30 ml cyklohexánu v malej suchej kadičke. Suspenzia sa dobre rozmieša tyčinkou a naleje sa do chromatografickej kolóny, v ktorej je na dne kúsok vaty. Po usadení silikagélu sa steny chromatografickej kolóny opláchnu ešte asi 5 ml cyklohexánu. Na stĺpec sa opatrne nanesie (nasype) adsorbovaný extrakt z drogy. Po jeho usadení a vsiaknutí cyklohexánu sa steny chromatografickej kolóny opláchnu 1 až 2 ml cyklohexánu, ktorý sa opäť nechá vsiaknuť. Ihneď sa začne premývať elučnou sústavou, lebo povrch adsorbentu nesmie vyschnúť.

Delenie látok na stĺpci silikagélu. Chromatografická kolóna sa premýva najprv čistým cyklohexánom tak dlho, až sa prvá žltá zóna posunie smerom dolu tak, aby za ňou vznikol asi 3 cm široký pás čistého odfarbeného adsorbentu. Potom sa polarita elučnej zmesi postupne zvyšuje pridaním 10, 20, 30, 40 a 50 % dietyléteru k cyklohexánu (vždy 5 ml zmesi), čím sa vytvoria ďalšie zóny polárnejších derivátov.

Frakcie sa odoberajú po 5 ml do skúmaviek (prvá zóna sa odoberie naraz ako jedna frakcia, t. j. asi 25 ml). Frakcie sa opatrne odparia na vodnom kúpeli v digestóriu, odparok sa vždy rozpustí v 1 ml chloroformu a použije sa na identifikáciu na tenkej vrstve.

3. Identifikácia derivátov antrachinónu pomocou metódy tenkovrstvovej chromatografie (TLC)

TLC chromatografia

Nosič	Silufol® UV366
Spôsob vyvíjania	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 2 – 3×
Vyvíjacia sústava	cyklohexán : dietyléter = 3 : 1
Detekčné skúmadlo	10 % etanolový roztok hydroxidu draselného
Štandardy	chryzofanol (CH), fysción (F), frangula-emodín (FE), aloe-emodín (AE). (UPOZORNENIE: <i>Štandardy treba naniesť v uvedenom poradí!</i>)
Vzorky	jednotlivé frakcie z kolóny (1, 2, 3...).

Jednotlivé frakcie z kolóny sa nanesú vždy novou kapilárou na chromatografickú platničku spolu so štandardami. Do komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestore a opakovane sa vyvinie v tej istej sústave. Po vysušení sa deteguje detekčným skúmadlom a vyhodnotí sa.

Rastlinné farbivá

ÚLOHY:

DROGY:

A1) Skúšky totožnosti

- **Malvae sylvestris flos** (kvet slezu lesného)
Malva sylvestris L. (slez lesný)
Malvaceae
- **Paeoniae flos** (kvet pivonky)
Paonia officinalis L. (pivonka lekárks)
Paeoniaceae
- **Sambuci fructus** (kvet bazy)
Sambucus nigra L. (baza čierna)
Viburnaceae

A2) Dôkaz antokyanínov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

- **Malvae sylvestris flos** (kvet slezu lesného)
Malva sylvestris L. (slez lesný)
Malvaceae
- **Paeoniae flos** (kvet pivonky)
Paonia officinalis L. (pivonka lekárks)
Paeoniaceae
- **Sambuci fructus** (kvet bazy)
Sambucus nigra L. (baza čierna)
Viburnaceae
- **Papaveris rhoados flos** (kvet maku vlčieho)
Papaver rhoeas L. (mak vlčí)
Papaveraceae

B1) Stanovenie antokyanínov spektrofotometricky

- **Malvae sylvestris flos** (kvet slezu lesného)
Malva sylvestris L. (slez lesný)
Malvaceae
- **Paeoniae flos** (kvet pivonky)

***Paonia officinalis* L.** (pivonka lekárks)
Paeoniaceae

- ***Sambuci fructus*** (kvet bazy)
***Sambucus nigra* L.** (baza čierna)
Viburnaceae

B2) Stanovenie betalaínov spektrofotometricky

- ***Betae radix*** (koreň cvikly)
***Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *crassa* provar. *conditiva* (Alef.) Helm**
(repa obyčajná pravá krmna cviklová – cvikla)
Chenopodiaceae

B3) Stanovenie celkových karotenoidov spektrofotometricky

- ***Aurantii amari epicarpium et mesocarpium*** (oplodie citrónovníka horkého)
***Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (syn. *C. aurantium* L. ssp. *amara* Engl.)**
(citrónovník horký)
Rutaceae
- ***Capsici fructus*** (plod papriky)
***Capsicum annum* L. var. *minimum* (Miller) Heiser** (paprika ročná drobnoplodá a maloplodé variety)
***C. frutescens* L.** (paprika kríčkovitá)
Solanaceae
- ***Calendulae flos sine calyce*** (kvet nechtíka)
***Calendula officinalis* L.** (nechtík lekársky)
Asteraceae
- ***Rosae pseudo-fructus*** (nepravý plod ruže)
***Rosa canina* L.** (ruža šípová)
***R. pendulina* L.** (ruža ovisnutá)
Rosaceae

ad A1) Skúšky totožnosti

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Malvae sylvestris flos	0,3
Paeoniae flos	0,3
Sambuci flos	0,3

Predpísané množstvo práškovanej drogy sa na vodnom kúpeli povarí s 5 ml roztoku kyseliny sírovej (0,5 mol/l). Po ochladení sa extrakt prefiltruje a po kvapkách sa pridá roztok amoniaku (6 mol/l). Pri prítomnosti antokyánov je extrakt z drogy **červeno sfarbený**. Po pridaní alkálií dochádza k zmene farby **na modrú alebo zelenú**, ktoré nie sú stále.

ad A2) Dôkaz antokyanínov tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

POSTUP:

<i>Droga</i>	<i>Návažok</i>
	[g]
Malvae sylvestris flos	0,3
Paeoniae flos	0,3
Sambuci flos	0,1

Príprava extraktov (vzoriek). Predpísané množstvo práškovanej drogy sa povarí s 5 ml metanolu a 0,5 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Po ochladení sa zmes prefiltruje a tento extrakt sa sa použije na tenkovrstvovú chromatografiu.

TLC chromatografia

<i>Nosič</i>	Silufol® UV366
<i>Spôsob vyvíjania</i>	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
<i>Vyvíjacia sústava</i>	etylacetát : propán-2-ol : voda = 65 : 25 : 10
<i>Detekcia</i>	VIS
<i>Štandardy</i>	bez štandardov (porovnávanie s literatúrou)
<i>Vzorky</i>	metanolvý extrakt Malvae sylvestris flos (MSF), metanolvý extrakt Paeoniae flos (PF), metanolvý extrakt Sambuci flos (SF).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie cca. 5 µl vzorky, teda metanolového extraktu drog (pozri vyššie). Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od jeho horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestóriu až do vymiznutia zápachu. Po vysušení sa škvrny látok sa pozorujú pri dennom svetle (VIS), ako červeno sfarbené oxóniové soli. Chromatogram sa vyhodnotí vypočítaním porovnaním extraktov drog so štandardami, vypočítajú sa R_F hodnoty.

ad B1) Stanovenie antokyanínov spektrofotometricky

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Malvae sylvestris flos	0,2500
Paeoniae flos	0,2500
Sambuci flos	0,2500

Skúšaný roztok. K predpísanému množstvu práškovanej drogy (800) v 100-ml varnej banke so zábrusom sa pridá 20 ml metanolu a pretrepáva sa na trepačke 30 min. Prefiltruje sa do 25-ml odmernej banky, banka a filter sa premyjú malým množstvom metanolu a objem sa doplní metanolom na 25 ml. 0,5 ml tohto roztoku sa v odmernej banke zriedi 0,1% roztokom kyseliny chlorovodíkovej v metanole na 25,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,1% roztok kyseliny chlorovodíkovej v metanole.

Absorbancia skúšaného roztoku sa meria okamžite pri $\lambda = 528 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu antokyanínov.

Percentuálny obsah antokyanínov sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{A \times 1250}{718 \times m}$$

A = absorbancia
m = návažok drogy v gramoch

za predpokladu, špecifická absorbancia cyanidín-3-glukozid chloridu pri $\lambda = 528 \text{ nm}$ je 718.

Obsah antokyanínov sa vyjadrí ako cyanidín-3-glukozid chlorid.

ad B2) Stanovenie betalaínov spektrofotometricky

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Betae radix	1,0

Skúšaný roztok. Z predpísaného množstva Betae radix (mrazené vzorky koreňa cvikly) sa pripraví etanolový extrakt v pomere 1 : 10, teda zo vzorky sa odoberie 1 g, rozdrobní sa, a doplní do 10 ml 60 % etanolom, potom sa pomocou sonikácie (5 minút) pripraví extrakt, ktorý sa prefiltruje najprv cez buničitú vatu a následne cez filtračný papier (vzorky musia byť číre).

[Extrakt sa pred analýzou obvykle uchováva v chladničke (2 – 8 °C) a chráni sa pred slnečným svetlom → **Extractum betae radice ethanolicum**. Niektoré vzorky je potrebné upraviť, napr. riedením extraktu (60 % etanolom)].

Porovnávací roztok. destilovaná voda

Absorbancia skúšaného roztoku sa meria okamžite pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu antokyanínov.

Percentuálny obsah betalaínov sa vypočíta z kalibračnej krivky betanínu.

Obsah betalaínov sa vyjadrí ako betanín.

ad B3) Stanovenie celkových karotenoidov spektrofotometricky

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Aurantii amari epicarpium et mesocarpium	0,5000
Capsici fructus	0,1000
Calendulae flos sine calyce	0,2000
Rosae pseudo-fructus	0,5000

Skúšaný roztok: Presne odvážené predpísané množstvo práškovanej drogy (800) sa v 100-ml Erlenmayerovej banke so zábrusom pretrepáva na trepačke 20 minút s 20,0 ml acetónu. Acetónový extrakt sa prefiltruje do 50-ml odmernej banky tak, aby droga ostala v banke. K droge sa opäť pridá 20 ml acetónu a pretrepáva sa ešte 20 minút. Prefiltruje sa k prvému extraktu v odmernej banke a objem sa doplní acetónom na 50,0 ml (**acetónový extrakt A**).

20,0 ml **acetónového extraktu A** sa v deliacom lieviku pretrepe s 10 ml petroléteru, pričom karotenoidy prechádzajú do petroléterového extraktu. Po pretrepaní sa k zmesi v deliacom lieviku pridá 20 ml destilovanej vody, aby sa oddelili fázy. Spodná acetónovo-vodná fáza sa ešte raz vytrepe s 15 ml petroléteru. Spojené petroléterové výtrečky sa ďalej pretrepú 2× s 10 ml 10% roztoku KOH v 50% etanole (odstránenie chlorofylu). Nakoniec sa petroléterový extrakt premýva 3× s 20 ml destilovanej vody, prefiltruje sa cez 2 g bezvodého síranu sodného do 25 ml odmernej banky. Filter so síranom sodným sa premyje malým množstvom petroléteru a objem sa doplní petroléterom na 25,0 ml. Absorbancia sa meria po 5 minútach pri $\lambda = 450 \text{ nm}$ oproti petroléteru.

Porovnávací roztok: petroléter.

Obsah celkových karotenoidov v meranej vzorke sa vyjadrí ako β -karotén v jednotkách [mg.100 g⁻¹] a vypočíta sa podľa vzorca

$$[\text{mg.100 g}^{-1}] = \frac{A \times 41,667}{m}$$

A = absorbancia

m = návažok drogy v gramoch

Kardioglykozidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1-2) Skúšky totožnosti

- **Digitalis lanatae folium** (list náprstníka vlnatého)
Digitalis lanata Ehrh. (náprstník vlnatý)
Scrophulariaceae
- **Digitalis purpureae folium** (list náprstníka červeného)
Digitalis purpurea L. (náprstník červený)
Scrophulariaceae
- **Convallariae herba** (vňat' konvalinky)
Convallaria majalis L. (konvalinka voňavá)
Liliaceae

B1) Stanovenie kardioglykozidov spektrofotometricky (Baljetova reakcia)

- **Digitalis lanatae folium** (list náprstníka vlnatého)
Digitalis lanata Ehrh. (náprstník vlnatý)
Plantaginaceae

B2) Stanovenie kardioglykozidov spektrofotometricky (Keddeho reakcia)

- **Digitalis purpureae folium** (list náprstníka červeného)
Digitalis purpurea L. (náprstník červený)
Plantaginaceae

ad A1-2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

UPOZORNENIE: Pozor! *Pri manipulácii s dietyléterom sa vyžaduje zvýšená opatrnosť! Ide o horľavinu 1. triedy. Teplota samovznietenia je 170 °C (dietyléter sa môže samovoľne vznietiť napr. aj kontaktom s horúcim povrchom bez plameňa či iskry), teplotu varu má 32 °C. Hrozí riziko vzniku požiaru a výbuchu pri nedodržaní zásad BOZP!*

Droga	Návažok
	[g]
Digitalis lanatae folium	2
Digitalis purpureae folium	2
Convallariae herba	2

Príprava základného roztoku. Predpísané množstvo práškovanej drogy (800) sa povarí s 30 ml destilovanej vody a po vychladnutí sa odvar prefiltruje cez buničitú vatú a rozdelí na dve časti:

ad A1) K 10 ml odvaru sa pridá po kvapkách 10 % roztok octanu olovnavnatého až nevzniká ďalšia zrazenina a prefiltruje sa. K filtrátu sa pridáva 10 % roztok dihydrogénfosforečnanu sodného až nezniká zrazenina a prefiltruje sa. K tomuto filtrátu sa pridá rovnaký objem čerstvo pripraveného Baljetovho skúmajka. Do 20 minút **sa roztok zafarbí červenooranžovo. → dôkaz prítomnosti kardioglykozidov farebnou reakciou (Baljetova reakcia).**

ad A2) K 10 ml odvaru sa pridá 10 ml chloroformu, 2 ml dietyléteru a 2 ml 96 % etanolu a pretrepe sa v deliacom lieviku. Následne spodná chloroformová vrstva sa v porcelánovej miske odparí do sucha; suchý odparok sa rozpustí v 3 ml koncentrovanej kyseline octovej, pridá sa 1 kvapka 0,1 % roztok chloridu železitého a v skúmavke opatrne sa podvrství 3 ml koncentrovanej kyseliny sírovej → **na styku dvoch vrstiev sa vytvorí červenohnedý prstenec (aglykóny = digitaligeníny) a vrstva kyseliny octovej sa potom farbí modrozeleno (sacharidy = digitoxóza) → dôkaz prítomnosti kardioglykozidov farebnou reakciou (Keller-Kilianiho reakcia).**

ad B1) Stanovenie kardioglykozidov spektrofotometricky (Baljetova reakcia)

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Digitalis lanatae folium	4,00

Základný roztok. K predpísanému množstvu práškovanej drogy (800) sa preleje vo vyváženej destilačnej banke s 50 ml 70 % horúceho etanolu a zahrieva sa 15 minút na vodnom kúpeli pod spätným chladičom k varu. Ponechá sa 15 minút na vodnom kúpeli stáž pri laboratórnej teplote a potom sa tečúcou vodou ochladí na 20 °C. Ak je potrebné, doplní sa na pôvodnú hmotnosť 70 % etanolom, pridá sa 110 ml destilovanej vody, premieša, prefiltruje a nakoniec sa pridá 50 ml 15 % roztoku octanu olovnatého. Dobré sa opäť premieša, vznikajúca zrazenina sa po krátkom usadení odfiltruje cez skladaný filter a k 160 ml číreho filtrátu (= 3,2 g drogy) sa pridá 48 ml 10 % roztoku hydrogénfosforečnanu sodného. Dobré sa premieša a opäť sa prefiltruje cez skladaný filter.

165,5 ml filtrátu (= 2,50 g drogy) sa preleje do deliaceho lievika, banka sa opláchnie s cca 5 ml 70 % etanolu. Postupne sa vytrepáva (jemne) s 50, 40, 40, 40 ml chloroformu. Spojené spodné chloroformové výtrepky (v destilačnej banke s guľatým dnom) sa odparia na vákuovej rotačnej odparke do sucha. Zvyšok sa rozpustí v zmesi chloroform : metanol (1 : 1) na objem 25 ml.

Skúšaný roztok. 2 ml tohto chloroformovo-metanolového extraktu (= 200 mg drogy) sa odparí do sucha. Odparok sa rozpustí v 35 ml metanolu. 5 ml metanolového roztoku sa zmieša s 5 ml # Baljetovho skúmadla.

Porovnávajuci roztok. Zmes 5 ml metanolu a 5 ml # Baljetovho skúmadla.

Po 30 minútach sa meria absorbanca farebného roztoku pri $\lambda = 494 \text{ nm}$ proti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu kardioglykozidov.

Percentuálny obsah kardioglykozidov sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = A \times 3,41 \quad A = \text{absorbanca}$$

Obsah kardioglykozidov sa vyjadrí ako **lanatozid C**.

Skúmadlo Baljetovo:

95 ml 1 % roztoku kyseliny pikrovej sa zmieša s 5 ml 10 % roztoku hydroxidu sodného. Pred použitím sa riedi s metanolom v pomere 1 : 1. Pripravuje sa vždy čerstvé skúmadlo.

ad B2) Stanovenie kardioglykozidov spektrofotometricky (Keddeho reakcia)

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Digitalis lanatae folium	0,2500
Digitalis purpureae folium	0,2500
Convallariae herba	0,2500

Základný roztok. Asi 0,250 g práškovanej drogy (800) sa v liekovke pretrepáva 1 hodinu s 50,0 ml destilovanej vody na trepačke. Pridá sa 5,0 ml roztoku octanu olovnatého (150 g/l) a krátko sa premieša. Pridá sa 7,5 ml roztoku hydrogénfosforečnanu dvojsodného (40 g/l) a prefiltruje sa cez skladaný filtračný papier. K 50,0 ml filtrátu sa pridá 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (150 g/l) a zahrieva sa 1 hodinu pod spätným chladičom. Roztok sa preniesie do deliaceho lievika a banka sa 2× opláchnie, vždy s 5 ml destilovanej vody. Pretrepáva sa 3×, vždy s 25 ml chloroformu. Spojené chloroformové roztoky sa vysušia 2 g bezvodého síranu sodného, prefiltrujú sa a zriedia chloroformom na 100 ml.

Skúšaný roztok. 40 ml chloroformového roztoku sa odparí na vákovej rotačnej odparovačke do sucha a zvyšok sa rozpustí v 7 ml liehu 50 %; pridajú sa 2 ml roztoku kyseliny 3,5-dinitrobenzoovej (20g/l) a 1 ml roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l).

Porovnávací roztok. Ako porovnávací roztok sa použije zmes 7 ml liehu 50 % (V/V), 2 ml kyseliny 3,5-dinitrobenzoovej a 1 ml hydroxidu sodného (1 mol/l).

V priebehu 12 minútach sa meria maximálna absorbanca skúšaného roztoku pri $\lambda = 540 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu kardioglykozidov.

Percentuálny obsah kardioglykozidov sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% = \frac{A \times 227,27}{m} \quad A = \text{absorbancia}$$

m = návažok drogy v miligramoch

Obsah kardioglykozidov sa vyjadrí ako digitoxín.

Fenolové glykozidy.

ÚLOHY:

DROGY:

A1) Skúšky totožnosti

- **Salicis cortex** (kôra vrbu)
S. purpurea L. (vrba purpurová), *S. daphnoides* Vill. (vrba lykovcovitá), *S. fragilis* L. (vrba krehká)
Salicaceae

A2-3) Skúšky totožnosti

- **Uvae ursi folium** (list medvedice)
Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (medvedica lekárska)
Ericaceae

A4) Dôkaz hydrochinónu tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

- **Uvae ursi folium** (list medvedice)
Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (medvedica lekárska)
Ericaceae

A5) Dôkaz arbutínu tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

- **Uvae ursi folium** (list medvedice)
Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (medvedica lekárska)
Ericaceae

B) Stanovenie obsahu arbutínu kolorimetricky

- **Uvae ursi folium** (list medvedice)
Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (medvedica lekárska)
Ericaceae

ad A1) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Salicis cortex	q. s.

Predpísané množstvo drogy (v skúmavke) sa vloží do koncentrovanej kyseliny sírovej, najprv parechým sa farbí červeno (salicín), lykové vlákna najprv zeleno, neskôr do červena → **dôkaz prítomnosti salicínu**.

ad A2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Uvae ursi folium	0,5

Predpísané množstvo práškovanej drogy sa povarí s 5 ml destilovanej vody a odvar sa po vychladnutí prefiltruje. K filtrátu sa pridá 1 kvapka 10 % roztoku chloridu železitého → **vzniká tmavomodrá zrazenina** → **dôkaz prítomnosti fenolových glykozidov**.

ad A3) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Uvae ursi folium	q. s.

Potrebné množstvo práškovanej alebo rezanej sa vloží do 0,1 % roztoku vanilínu v koncentrovanej kyseline chlorovodíkovej → **droga sa zafarbí na červeno** → **dôkaz prítomnosti fenolových glykozidov**. (Pozn.: *Vaccinium myrtillus* a *Buxus sempervirens* dávajú negatívnu reakciu, teda ide o vylúčenie falšovanie drogy *Uvae ursi folium*)

A4) Dôkaz hydrochinónu tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Uvae ursi folium	0,1

Príprava vzorky = sublimátu. Predpísané množstvo práškovanej drogy sa pokvapká 6 ml dm⁻³ roztokom kyseliny chlorovodíkovej a pri teplote 160 °C sa sublimuje asi 15 minút. Vysublimovaný hydrochinón sa rozpustí v metanole. Tento roztok sa použije na tenkovrstvovú chromatografiu.

TLC chromatografia

Nosič	Silufol® UV254
Spôsob vyvíjania	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
Vyvíjacia sústava	chloroform : metanol = 9 : 1
Detekcia	Skúmadlo fosfomolybdénano-volfrámanové, zriedené
Štandard	hydrochinón (H),
Vzorky	metanolový roztok sublimátu Uvae ursi folium (UUF).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie cca. 5 µl vzorky, teda metanolového roztoku sublimátu Uvae ursi folium (pozri vyššie) spolu s uvedeným štandardom. Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od jeho horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestóriu až do vymiznutia zápachu. Po vysušení sa deteguje detekčným skúmadlom. Škvry látk (čierne) sa pozorujú pri dennom svetle. Chromatogram sa vyhodnotí vypočítaním porovnaním extraktov drog so štandardami, vypočítajú sa R_F hodnoty.

Skúmadlo fosfomolybdénano-volfrámanové:

100 g volfrámanu sodného a 25 g molybdénanu sodného sa rozpustí v 700 ml vody. Pridá sa 100 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a 50 ml koncentrovanej kyseliny fosforečnej. Zmes sa zahrieva 10 hodín v sklenenej aparátúre pod spätným chladičom. Pridá sa 150 g síranu lítneho, 50 ml vody a niekoľko kvapiek brómu. Zmes sa zahrieva pri teplote varu do odstránenia prebytku brómu (15 minút), ochladí sa, zriedi sa vodou na 1000 ml a prefiltruje sa. Skúmadlo má byť žlté. Ak je zafarbené do zelenkasta, nesmie sa použiť. Môže sa opäť regenerovať zahrievaním pri teplote varu s niekoľkými kvapkami brómu a prebytok brómu sa takto odstráni. Uchováva sa pri teplote 2 °C až 8 °C.

Skúmadlo fosfomolybdénano-volfrámanové, zriedené:

1 diel fosfomolybdénano-volfrámanového skúmadla sa zmieša s 2 dielmi vody.

A5) Dôkaz arbutínu tenkovrstvovou chromatografiou (TLC)

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Uvae ursi folium	0,1

Príprava vzorky. Predpísané množstvo práškovanej drogy sa 15 minút varí na vodnom kúpeli v destilačnej banke sa 5 ml metanolu a 5 ml destilovanej vody pod spätným chladičom. Zmes sa ešte sa ešte za horúca prefiltruje, k filtrátu sa po ochladení pridá 0,20 ml 10 % octanu olovnatého a opäť sa prefiltruje. Tento roztok sa použije na tenkovrstvovú chromatografiu.

TLC chromatografia

Nosič	Silufol® UV254
Spôsob vyvíjania	jednorozmerná vzostupná chromatografia, 1×
Vyvíjacia sústava	chloroform : metanol = 9 : 1
Detekcia	a) 10 % roztok diazotovanej kyseliny sulfanilovej, b) následne po 5 minútach sa postrieka ešte 2 mol.dm ⁻³ roztokom hydroxidu sodného v etanole.
Štandard	arbutín (A),
Vzorky	metanolový extrakt Uvae ursi folium (UUF).

Na štart chromatografickej platničky sa nanesie cca. 5 µl vzorky, teda metanolového roztoku sublimátu Uvae ursi folium (pozri vyššie) spolu s uvedeným štandardom. Do vyvíjacej komory sa naleje 40 ml čerstvo pripravenej sústavy a komora sa nechá sýtiť. Chromatogram sa nechá vyvíjať v uvedenej sústave do výšky 1 cm od jeho horného okraja. Po vyvinutí sa chromatogram vysuší v digestóriu až do vymiznutia zápachu. Po vysušení sa deteguje detekčným skúmadlom. Škvry látk (červené) sa pozorujú pri dennom svetle. Chromatogram sa vyhodnotí vypočítaním porovnaním extraktov drog so štandardami, vypočítajú sa R_F hodnoty.

Skúmadlo diazotovanej kyseliny sulfanilovej

1,0 g kyseliny sulfanilovej za mierneho zahriatia rozpustíme v 900 ml destilovanej vody, pridáme 10 ml dýmavej kyseliny chlorovodíkovej, ochladíme na teplotu 20 °C a doplníme destilovanou vodou na 1 000 ml. Roztok uchovávaní v chlade je dlhší čas stály. Pred použitím k 100 ml roztoku pridáme 1 g dusitanu sodného a premiešame.

B) Stanovenie obsahu arbutínu kolorimetricky

Droga	Návažok
	[g]
Uvae ursi folium	0,0500

Príprava extraktu. Predpísané množstvo práškovanej drogy (800) sa vo varnej banke varí 30 min na elektrickom variči pod spätným chladičom s 30 ml destilovanej vody a 0,10 g uhličitanu vápenatého. Po ochladení sa výluh prefiltruje do odmernej banky na 100 ml tak, aby droga zostala v banke. Čiastočky drogy prípadne uchytené na filtračnom papieri sa opláchnu 30 ml vody späť do banky a zmes sa znovu varí 30 min. Po ochladení sa výluh prefiltruje tým istým filtrom do tej istej odmernej banky a zvyšky na filtri i v banke sa premyjú 3-razy s 10 ml vriacej destilovanej vody. K spojeným filtrátom sa pridajú 2,0 ml 10% roztoku octanu olovnatého a tekutina sa premieša. Po vychladnutí sa obsah banky doplní destilovanou vodou po značku a prefiltruje sa suchým filtrom. K filtrátu sa pridá 0,20 g hydrogénfosforečnanu sodného a po dôkladnom pretrepaní sa opäť prefiltruje suchým filtrom.

Skúmaný roztok. K 10,00 ml filtrátu sa do odmernej banky na 50 ml pridá 10,0 ml zriedeného roztoku amoniaku a za stáleho miešania 5,0 ml roztoku diazotovanej kyseliny sulfanilovej tak, aby roztok nestekal po stenách banky.

Porovnávací roztok. Zmes 10,0 ml zriedeného roztoku amoniaku a 5,0 ml roztoku diazotovanej kyseliny sulfanilovej.

Po 20 min sa zmeria absorbancia skúšaného roztoku pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ oproti porovnávaciemu roztoku.

Obsah arbutínu ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$) sa vypočíta z kalibračnej krivky.

Skúmadlo diazotovanej kyseliny sulfanilovej

1,0 g kyseliny sulfanilovej za mierneho zahriatia rozpustíme v 900 ml destilovanej vody, pridáme 10 ml dymavej kyseliny chlorovodíkovej, ochladíme na teplotu 20 °C a doplníme destilovanou vodou na 1 000 ml. Roztok uchovávaní v chlade je dlhší čas stály. Pred použitím k 100 ml roztoku pridáme 1 g dusitanu sodného a premiešame.

Kumaríny.

ÚLOHY:

DROGY:

A1-2) Skúšky totožnosti

- **Angelicae archangelicae radix** (koreň archangeliky lekárskej)
Angelica archangelica L. (archangelika lekárska)
Apiaceae
- **Matricariae flos** (kvet rumančeka)
Matricaria recutita L., syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (rumanček kamilkový)
Asteraceae

B1) Stanovenie kumarínov spektrofotometricky

- **Matricariae flos** (kvet rumančeka)
Matricaria recutita L., syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (rumanček kamilkový)
Asteraceae

ad A1-2) Skúšky totožnosti

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Angelicae archangelicae radix	0,1
Matricariae flos	0,1

Príprava základného roztoku. Predpísané množstvo drogy zahrievame 2 minúty so 4 ml 96 % etanolu na vodnom kúpeli. Extrakt rozdelíme do dvoch skúmaviek.

ad A1) Prvá (aj druhá) skúmavka. K základnému roztoku pridáme 1 kvapku koncentrovaného amoniaku a obsah premiešame → **pozorujeme modrú fluorescenciu pod UV lampou pri $\lambda = 366$ nm** → **dôkaz prítomnosti kumarínov.** (Vznik konjugovaných fenolátov po otvorení laktónového kruhu kumarínov po pridaní alkalických roztokov.)

ad A2) Druhá skúmavka. (zopakujeme rovnaký postup ako pri prvej skúmavke vyššie, pozorujeme modrú fluorescenciu pod UV lampou) → následne pridáme do druhej skúmavky 3 až 5 kvapiek 11 % kyseliny chlorovodíkovej. → **pozorujeme zníženie fluorescence na pôvodnú intenzitu.** (Uzatvorenie laktónového kruhu, zánik fenolátov po pridaní silnej kyseliny.).

ad B1) Stanovenie kumarínov spektrofotometricky

POSTUP:

Droga	Návažok
	[g]
Matricariae flos	1,0000

Základný roztok. Predpísané množstvo drogy extrahujeme v Soxhletovom extrakčnom prístroji s 80 ml metanolu v 250 ml destilačnej banke, kým nie je vytekajúci extrakt bezfarebný. Metanolvý extrakt prefiltrujeme cez vatú, odparíme na vákuovej rotačnej odparovačke na objem asi 1 až 2 ml. Potom pridáme 3 ml 2 % roztoku KOH a zmes zahrievame za občasného miešania na vodnom kúpeli pri teplote 70 až 75 °C počas 30 minút. Teplý roztok zmiešame s 2 ml 10 % roztoku octanu olovnatého a po 10 minútach vzniknutú zrazeninu odfiltrujeme cez papierový skladaný filter. Zvyšok na filteri premyjeme 3× 5 ml destilovanej vody. K zachytenému filtrátu pridáme 0,2 g bezvodého Na₂CO₃ a po jeho úplnom rozpustení roztok opäť prefiltrujeme cez papierový filter. Filtrát zachytávame do odmernej banky na 25 ml a papierový filter premývame horúcou destilovanou vodou tak dlho, až kým je banka doplnená po značku.

Skúšaný roztok. Po ochladení banky a prípadnom doplnení po značku odpipetujeme 5 ml roztoku ($\cong$ 0,2000 g) do skúmavky, pridáme 1 ml 10 % roztoku KOH a zahrievame na vodnom kúpeli (v držiaku na skúmavky) pri teplote 70 až 75 °C počas 5 minút. Potom pridáme 0,5 ml 10 % roztoku persíranu amónneho a po 10 minútach zmeriame absorbanciu pri $\lambda = 495$ nm.

Porovnávajúci roztok. Destilovaná voda.

Farmakognózia (2) – praktické cvičenia – 3. ročník
Letný semester akad. r. 2024/2025

Po 10 minútach sa meria absorbancia farebného roztoku **pri $\lambda = 495 \text{ nm}$** proti porovnávaciemu roztoku.

Výpočet obsahu kumarínov.

Obsah kumarínov v percentách vypočítame z kalibračnej krivky umbeliferónu v prepočte na reálny návažok.

FaF UK - Farmakognózia (2)