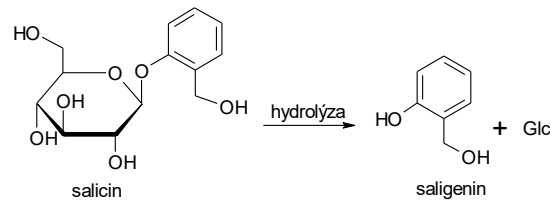


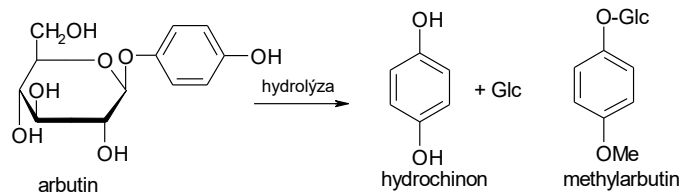
1. Fenolové glykosidy

Fenolové glykosidy jsou přírodní látky, jejichž molekula je složena z cukerné složky, glykosidicky navázané na necukernou část – aglykon (genin), zastoupený deriváty fenolů a jejich homologů. Podle charakteru fenolu je možné rozdělit je do dvou skupin:

1. glykosidy odvozené od jednomocných fenolů (např. salicin, populin), které kromě fenolové skupiny obsahují i skupinu alkoholovou; po hydrolyze a oxidaci poskytují kyselinu salicylovou a glukosu.



2. glykosidy odvozené od dvojmocných fenolů (arbutin) hydrolyzující na hydrochinon a glukosu.



Fenolové glykosidy se biogeneticky odvozují z metabolismu kyseliny šikimové. Kyselina salicylová vzniká z kyseliny isochorismové. Hydrochinon je produktem oxidativní dekarboxylace kyseliny *p*-hydroxybenzoové.

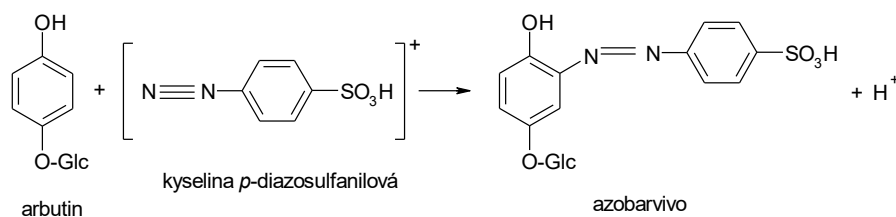
1.1. Kvalitativní důkaz fenolových glykosidů

Kvalitativní důkaz fenolových glykosidů je založen na oxidoredukčních vlastnostech aglykonů, které se uvolňují hydrolyzou kyselinami. Mezi zkoumadla nejčastěji používaná pro důkaz fenolů patří chlorid železitý, molybdenany, vanilin v prostředí kyseliny chlorovodíkové, 4-diazobenzensulfonát v uhličitanu sodném, 4-nitrofenyldiazonium tetrafluorborát v octanu sodném (vznikají barevné azobenzeny nebo styrylazobenzeny) a 2,6-dichlorchinon-4-chlorimin (vzniká indofenolát). Reakce dvojsytných fenolů s *p*-diazosulfanilovou kyselinou v zásaditém prostředí, kdy vzniká kopulací červené

azobarvivo, se využívá při detekci chromatogramů. Novější metody pak využívají plynovou chromatografii nebo HPLC.

1.2. Kvantitativní stanovení fenolových glykosidů

Kvantitativní stanovení fenolových glykosidů v drogách lze provádět buď titračně s jodem nebo kolorimetricky (reakce arbutinu s *p*-diazosulfanilovou kyselinou nebo Emersova reakce – deriváty hydrochinonu za přítomnosti oxidačního zkoumadla reagují s 4-aminofenazonem za vzniku červeně zbarveného produktu).



1.3. DROGY S OBSAHEM FENOLOVÝCH GLYKOSIDŮ

1.3.1. *Salicis cortex* – Vrbová kůra (ČL 2009)

Je to celá usušená kůra mladých větví nebo její úlomky, nebo celé usušené kousky letorostů různých druhů rodu *Salix*, včetně druhů *S. purpurea* L., vrba nachová, *S. daphnoides* WILL., v. lýkovcová a *S. fragilis* L., v. křehká, Salicaceae.

Droga musí obsahovat nejméně 1,5 % celkových salicylových derivátů, vyjádřeno jako salicin, počítáno na vysušenou drogu. Mezi fenolové glykosidy patří salicin, salikortin, fragilin a populin. Dále jsou přítomné třísloviny, organické kyseliny a flavonoidy.

Zkoušky totožnosti:

1. Prášková droga se povlhcí koncentrovanou kyselinou sírovou. Vzniká červené zbarvení (salicin).
2. K 0,5 g práškové drogy se přidá 10 ml vody, povaří se a odvar se po vychladnutí zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 kapka roztoku chloridu železitého (13 g/l), vzniká hnědozelená sraženina (třísloviny).
3. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok (a): 1,0 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při asi 50 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Zkoušený roztok (b): K 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 1,0 ml roztoku uhličitanu sodného bezvodého (50 g/l) a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při asi 60 °C. Je-li třeba, po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 2 mg salicinu a 2 mg kyseliny chlorogenové se rozpustí v 1,0 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (8 : 15 : 77).

Nanášení: 10 µl zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: V proudu teplého vzduchu.

Detekce: Postříká se směsí objemových dílů kyseliny sírové 95,0-97,0% a methanolu (5 : 95), zahřívá se 5 minut při 100-105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části červenofialová skvrna salicinu a ve spodní části hnědá skvrna kyseliny chlorogenové. U obou zkoušených roztoků je patrná červenofialová skvrna odpovídající polohou salicinu porovnávacího roztoku. U zkoušeného roztoku (a) jsou nad salicinem přítomné další červenofialové skvrny.

1.3.2. *Salicis corticis extractum siccum* – Extrakt z vrbové kůry suchý (ČL 2009)

Je to suchý extrakt připravený z drogy *Salicis cortex*. Hnědý amorfni prášek. Musí obsahovat nejméně 5 % celkových salicylových derivátů, vyjádřeno jako salicin, počítáno na suchý extrakt. Vyrábí se vhodným postupem z rostlinné drogy za použití vody nebo vodně-ethanolového rozpouštědla o koncentraci odpovídající nejvýše 80 % (V/V) ethanolu.

Zkouška totožnosti:

Důkaz salicinu tenkovrstvou chromatografií na silikagelu.

Stanovení obsahu:

Metodou kapalinové chromatografie a spektrofotometrickým detektorem při 270 nm.

1.3.3. *Uvae ursi folium* – Medvědicový list (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., medvědice lékařská, Ericaceae (dříve Vacciniaceae), podčeleď Vaccinioideae.

Musí obsahovat nejméně 7 % bezvodého arbutinu, počítáno na vysušenou drogu.

Obsahové látky: arbutin, methylarbutin, třísloviny, flavonoidy, triterpeny.

1.3.4. *Myrtilli folium* – Borůvkový list

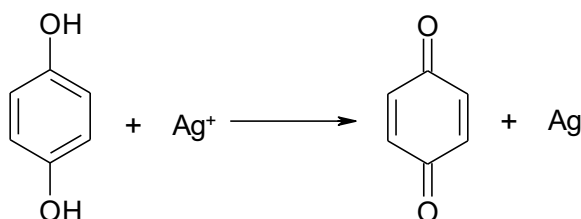
Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Vaccinium myrtillus* L., borůvka černá, Ericaceae (dříve Vacciniaceae), podčeleď Vaccinioideae. Obsahuje arbutin, methylarbutin, třísloviny a flavonoidy.

1.3.5. *Vitis idaeae folium* – Brusinkový list

Rhodococcus (Vaccinium) vitis-idaea (L.) Avronin, syn. *Rhodococcus vitis-idaea*, brusinka obecná, Ericaceae (dříve Vacciniaceae), podčeleď Vaccinioideae. Obsahuje arbutin, volný hydrochinon, třísloviny, flavonoidy.

1.4. Zkoušky totožnosti pro výše uvedené tři drogy

- 0,5 g práškovaných listů se povaří s 5 ml vody a odvar se po vychladnutí zfiltruje. K 1 ml filtrátu se na porcelánové misce přidají 4 ml roztoku amoniaku a 1 ml 10% roztoku kyseliny fosfomolybdenové. Vzniká tmavě modrá sraženina (arbutin).
- 0,5 g drogy se povaří s 5 ml vody a odvar se po vychladnutí zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 kapka 10% roztoku chloridu železitého – vzniká tmavě modrá sraženina (třísloviny).
- Úlomek listu se vloží do roztoku vanilinu v koncentrované kyselině chlorovodíkové, zbarví se intenzivně červeně (*Vaccinium myrtillus* je téměř bezbarvý).
- Prášková droga se povlhčí koncentrovanou HCl a podrobí se mikrosublímaci. Při teplotě 120-130 °C vysublímuje hydrochinon.
 - Pokápně-li se sublimát amoniakálním roztokem AgNO₃, zčerná vyredukovaným stříbrem (důkaz hydrochinonu).
 - Sublimát rozpustíme v 1 ml horké vody a přikápneme roztok chloridu železitého; vzniká modrozelené zbarvení, které přechází v hnědožluté (důkaz hydrochinonu).



5. Tenkovrstvá chromatografie na silikagelu – důkaz hydrochinonu

Zkoušený roztok: 0,1 g práškové drogy se pokápně koncentrovanou HCl a při 160 °C se sublimuje po dobu 15 minut. Vysublimovaný hydrochinon se rozpustí v malém množství methanolu.

Porovnávací roztok: hydrochinon (1 mg/10 ml methanolu)

Vyvíjecí směs: chloroform : methanol (8 : 2)

Detekční zkoumadlo I: kyselina fosfomolybdenová

Detekční zkoumadlo II: 20% roztok uhličitanu sodného

Na silikagel nanese se 8-10 µl zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjíme po dráze 10-12 cm od startu. Chromatogram vyjmeme, necháme vysušit při pokojové teplotě, poté se postříká detekčním zkoumadlem I a po třech minutách detekčním zkoumadlem II. V místech, kde se nachází hydrochinon, se objeví modré skvrny.

6. Tenkovrstvá chromatografie na silikagelu – důkaz arbutinu

Zkoušený roztok: 0,1 g práškové drogy se 10 minut vaří s 5 ml vody a 5 ml methanolu pod zpětným chladičem na vodní lázni. Směs se ještě za horka zfiltruje, k filtrátu se po ochlazení přidá 0,2 ml roztoku octanu olovnatého a opět se zfiltruje.

Porovnávací roztok: arbutinu (2 mg/10 ml methanolu)

Vyvíjecí směs: ethyl-acetát : methanol : voda = (100 : 17 : 13)

Detekční zkoumadlo I: diazotovaná kyselina sulfanilová

Detekční zkoumadlo II: ethanolový roztok KOH

Na silikagel nanese se 10 µl zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjíme po dráze 10-12 cm od startu. Chromatogram vyjmeme, necháme vysušit při pokojové teplotě, poté se postříká detekčním zkoumadlem I a po pěti minutách detekčním zkoumadlem II. V místech, kde se nachází arbutin se objeví červené skvrny.

1.5. Stanovení obsahu fenolových glykosidů

1. Jodometricky (ČsL 4)

Asi 0,5 g práškové drogy se přesně odváží a vaří se 1 hodinu s 60 ml vody a vyvařená voda se doplní. Výluh se nechá vychladnout a odsáváním se zfiltruje. Zbytek na filtru se promyje malým množstvím vody a ta se přidá k filtrátu. Filtrát se přenesse kvantitativně do odměrné

baňky na 100 ml, přidá se 10 ml 3% roztoku octanu olovnatého, protřepe se a doplní vodou po značku. Tekutina se zahřívá několik minut na vodní lázni, a když se sraženina sbalila, odsáváním se zfiltruje. K čirému filtrátu se přidá 0,6 ml koncentrované kyseliny sírové a postaví se na 1 hodinu do sušárny vyhřáté na 100 °C. Pak se zfiltruje, k filtrátu se přidá 0,1 g práškovatého zinku a protřepává se 15 minut. Zneutralizuje se na lakmus hydrogenuhličitanem sodným, kterého se přidá ještě nadbytek 2 g a opět se zfiltruje. K 50 ml filtrátu (polovina navážené drogy) se přidají 3 ml škrobového roztoku, tekutina se zředí vodou asi na 250 ml a opatrně titruje po kapkách z mikrobyrety 0,05 M roztokem jodu až do modrého zbarvení, které se udrží přesně 1 minutu.

1 ml 0,05 M roztoku jodu udává 0,01361 g arbutinu a volného hydrochinonu, počítáno jako arbutin. Vypočítejte obsah arbutinu v droze v procentech.

2. Kapalinová chromatografie

Zkoušený roztok: 0,800 g práškovaté drogy se ve 100ml baňce se zabroušeným hrdlem smíchá s 20 ml vody a směs se zahřívá 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes vatku. Vata se zbytkem drogy se vloží zpět do 100ml baňky, přidá se 20 ml vody a zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes papírový filtr. Spojené filtráty se zředí vodou na 50,0 ml. Roztok se zfiltruje přes papírový filtr. Prvních 10 ml filtrátu se odstraní.

Porovnávací roztok (a): 50,0 mg arbutinu se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b): 2,5 mg hydrochinonu se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 10,0 ml.

Kolona: délka 0,25 m, vnitřní průměr 4 mm; stacionární fáze silikagel oktadecylsilanizovaný (C18) deaktivovaný pro chromatografii bazických látek (5 µm).

Mobilní fáze: methanol : voda (10 : 90).

Průtoková rychlost: 1,2 ml/minutu.

Detekce: Spektrofotometrický detektor, 280 nm.

Nástřik: 20 µl

Obsah arbutinu v procentech se vypočítá podle vzorce:

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

v němž značí:

F₁ – plochu píku odpovídajícího arbutinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

F_2 – plochu píku odpovídajícího arbutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

m_1 – hmotnost zkoušené drogy použité pro přípravu zkoušeného roztoku v gramech;

m_2 – hmotnost arbutinu použitého pro přípravu porovnávacího roztoku v gramech;

p – obsah arbutinu v procentech ve standardu arbutinu (100).