

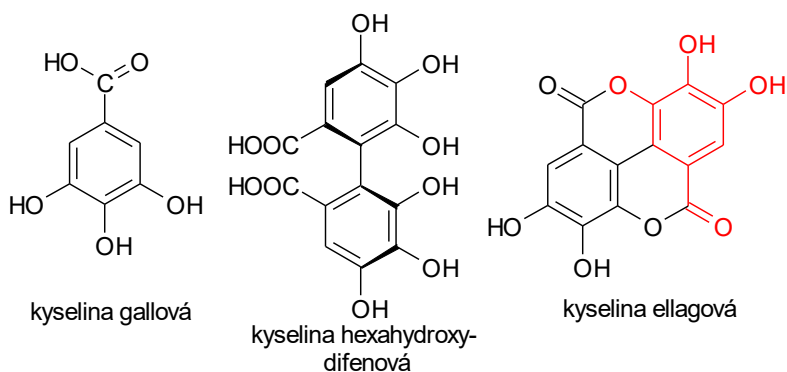
1.1. TŘÍSLOVINY

Třísloviny jsou látky přírodního původu, které vyčiňují surovou kůži na useň. Chemicky se jedná o heterogenní skupinu vícemocných fenolů, jejichž molekulová hmotnost je v rozmezí 1000 – 5000. Mnohé z nich se vyskytují jako glykosidy. Rozdělují se na dvě základní skupiny: hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny.

1.1.1. HYDROLYZOVATELNÉ TŘÍSLOVINY

Podléhají hydrolýze kyselinami nebo enzymy za vzniku kyseliny gallové, příp. ellagové a cukru. Jsou složeny z několika molekul těchto fenolových kyselin spojených esterovou vazbou s molekulou glukosy. Jsou obvykle známé jako pyrogallolové třísloviny. Se solemi železa dává kyselina gallová modré zbarvení.

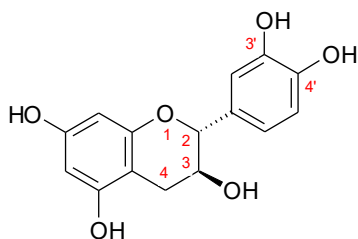
Skupina hydrolyzovatelných tříslovin se dělí na dva typy, na gallotaniny (rozdělují se na polyestery kyseliny fenolkarboxylové s glukosou a nesacharidové estery fenolkarboxylových kyselin) a ellagotaniny. Ellagová kyselina (depsid kyseliny gallové) může vzniknout laktonizací kyseliny hexahydroxydifenové v průběhu chemické hydrolýzy tříslovin. V přírodě se často vyskytuje kyselina chinová, která se nachází v kombinaci s kyselinou kávovou ve formě chlorogenové kyseliny.



Hydrolyzovatelné třísloviny jsou přítomny v drogách: *Galla*, *Tanninum*, *Hamamelidis folium*, *Juglandis folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Rubi idaeae folium*, *Alchemillae herba*, *Anserinae herba*, *Sanguisorbae radix*.

1.1.2. KONDENZOVANÉ TŘÍSLOVINY

Nepodléhají účinkům kyselin a enzymů, nerozkládají se na jednoduché molekuly a neobsahují cukernou složku. Jsou blízké flavonoidním pigmentům, mají strukturu odvozenou od kondenzovaných jednotek flavan-3-olu.



katechin (flavan-3-ol)
2R,3R-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan

Katechiny a flavan-3,4-dioly jsou intermediáty, které se objevují v biosyntéze polymerních struktur tříslovin. Působením kyselin a enzymů jsou kondenzované třísloviny konvertovány na červené nerozpustné sloučeniny nazývané flobafeny, které dávají drogám charakteristické zbarvení. Suchou destilací vzniká katechol, a proto se tyto třísloviny označují jako pyrokatecholové třísloviny. S chloridem železitým dávají zelené zbarvení. Vyskytují se téměř ve všech rostlinných orgánech v různých formách. Kondenzované třísloviny obsahují: *Quercus cortex*, *Myrtilli folium*, *Fragariae folium*, *Agrimoniae herba*, *Marrubii herba*, *Bistortae rhizoma*, *Ratanhiae radix*, *Tormentillae rhizoma*, *Polygoni avicularis herba*.

1.1.3. KOMPLEXNÍ TŘÍSLOVINY

Skupina tříslovin, které se skládají z hydrolyzovatelných tříslovin (většinou C-glukosidy ellagotaninu) a kondenzovaných tříslovin. Jednotky jsou spojeny C-C vazbou mezi C-1 uhlíkem glukosové jednotky ellagotaninu a C-8 nebo C-6 uhlíkem flavan-3-olu. Vytváří oligomerní formy. Komplexní třísloviny se nachází v rostlinách čeledí Fagaceae, Myrtaceae, Theaceae a Polygonaceae.

Pseudotaniny jsou sloučeniny s nižší molekulovou hmotností než pravé třísloviny, nesrážejí bílkoviny, nedávají pozitivní reakci na kožní test. Jsou přítomné téměř ve všech drogách obsahujících třísloviny.

Většina biologických vlastností tříslovin je dána jejich schopností tvořit komplexy s makromolekulami, především s proteiny. Afinita tříslovin k proteinům vzrůstá se zvyšujícím se počtem prolinových zbytků v bílkovině a flexibilitou bílkovinné konformace. Tato afinita

je také vysoce závislá na molekulové hmotnosti třísloviny a je maximální pro pentagalloylglukosidy a jejich oligomery. Bifenylové uskupení kyseliny hexahydroxydifenové snižuje konformační volnost molekuly a redukuje tak její afinitu k bílkovinám. Vlastním principem adstringentního působení tříslovin je jejich schopnost vytvářet vazebná spojení mezi jednotlivými proteinovými vlákny a tříslovinou. Primárně se jedná se o hydrofobní interakce a vznik vodíkových vazeb mezi fenolovými skupinami třísloviny a proteinem. Dalším typem vazby je vznik kovalentní vazby, která vzniká po oxidaci fenolu na chinon. Důležitým faktorem ovlivňujícím vznik vazeb je molekulová hmotnost tříslovin. Pokud je molekulová hmotnost příliš vysoká, nemůže dojít k zasunutí třísloviny do interfibrilárního prostoru proteinu a následné vazebné interakci. Je-li naopak molekulová hmotnost nízká, nemůže tříslovina vytvořit dostatečně stabilní vazbu s proteinem.

K charakterizaci tříslovin se používá řada vlastností společných pro celou skupinu:

- mají svíravou stahující chuť;
- srážejí vodné roztoky bílkovin a alkaloidů;
- způsobují aglutinaci erytrocytů;
- dávají barevné reakce a sraženiny se solemi těžkých kovů;
- jejich roztoky se na vzduchu oxidují a tmavnou.

1.1.4. KVALITATIVNÍ REAKCE TŘÍSLOVIN

Vzhledem k tomu, že třísloviny nejsou chemicky jednotnými látkami, nelze se spolehnout při jejich kvalitativním rozboru na výsledek jediné reakce. Drogu, resp. typ třísloviny, lze posoudit až podle výsledků několika reakcí. Přitom je nejlépe srovnávat výsledky s reakcemi známých vzorků.

1.1.4.1. Srážecí reakce

Využívají schopnosti různých látek srážet třísloviny z roztoku (roztoky bílkovin, soli alkaloidů, soli těžkých kovů, některá barviva, kyslík atd.). Z nich je důležitá především reakce tříslovin se želatinou, která se užívá rovněž na odtríslování roztoků tříslovin. Významné jsou též reakce se solemi kovů, hlavně Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , s nimiž poskytují třísloviny vločkovité, dobře filtrovatelné sraženiny, čehož lze využít i na jejich kvantitativní stanovení.

Reakce tříslovin se želatinou

Test s roztokem želatiny: 0,5 - 1,0% roztok tříslovin sráží 1% roztok želatiny obsahující 10% NaCl. Pseudotanniny sráží roztok želatiny až ve vyšších koncentracích.

K 5 ml čirého analyzovaného roztoku se po kapkách přidává želatinový roztok a pozoruje se, zda se vytváří sraženina. Želatina se musí přidávat opatrně, protože sraženina se může v nadbytku zkoumadla rozpustit. Doporučuje se používat vždy čerstvý roztok želatiny. Sraženinu nebo zákal dávají všechny třísloviny, ale všechny druhy nejsou stejně citlivé na tuto reakci (pseudotřísloviny). Chemická struktura sraženiny vznikající při reakci je sporná (pozitivně reagují též některé organické látky jako např. kyselina salicylová, *p*-hydroxybenzaldehyd).

Reakce tříslovin s formaldehydem

Povařením s roztokem formaldehydu a chlorovodíku se vysrážejí pyrokatecholové třísloviny kvantitativně, kdežto pyrogallolové zůstávají většinou v roztoku. Reakce se provádí tak, že se k 50 ml zkoušeného extraktu ve varné baňce (250 ml) přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové koncentrované a 10 ml 40% roztoku formaldehydu. Směs se vaří 30 minut pod zpětným chladičem. Případná sraženina (pyrokatecholové třísloviny) se odfiltruje. První podíl filtrátu se vylije a k dalším 10 ml se přidá 1 ml 1% roztoku kamence železitého a 5 g octanu sodného. V přítomnosti pyrogallolových tříslovin vznikne modrofialové zabarvení.

Vysvětlení: Fenol a jeho deriváty polykondenzují s aldehydy. Nejdříve dochází ke kondenzaci, přičemž se vytváří hydroxymethylfenoly. Další kondenzace probíhá za přítomnosti kyselých katalyzátorů. OH skupina řídí vstup do poloh *ortho* a *para*, přednostně reagují sloučeniny, které mají tyto polohy volné.

Reakce tříslovin s těžkými kovy

Sraženiny tříslovin s kovy nemají obvykle konstantní složení. Poměr kovů a tříslovin v nich kolísá a je závislý na reakčních podmínkách (stupeň zředění, teplota, způsob přidávání roztoků apod.). Nejsou to většinou stechiometricky vytvořené soli, ale sloučeniny proměnlivého složení.

Reakce s octanem olovnatým

Všechny třísloviny se kvantitativně srážejí zásaditým octanem olovnatým. Kromě tříslovin se jím srážejí též pseudotřísloviny fenolové povahy. Normální octan olovnatý sráží některé třísloviny pyrogallolové kvantitativně (např. ve výluhu z kaštanového a dubové kůry), ale u většiny tříslovin není vysrážení kvantitativní a roztok po odstranění sraženiny dává pozitivní

reakci se síranem železito-amonným. Přidáním kyseliny octové se zabrání srážení pyrokatecholových tříslovin normálním octanem olovnatým, přičemž pyrogallolové třísloviny se částečně nebo úplně vysrážejí. Na základě uvedených vlastností lze obě skupiny tříslovin, i když ne kvantitativně, oddělit tak, že k 5 ml přefiltrovaného vodného extraktu z drogy se přidá 10 ml 10% roztoku kyseliny octové a potom 5 ml 10% roztoku octanu olovnatého. Po pěti minutách se provede vyhodnocení. Když nevznikne sraženina, jsou přítomné pouze pyrokatecholové třísloviny, v opačném případě jsou přítomné pyrogallolové třísloviny.

Vysvětlení: Oba typy tříslovin mají kyselý charakter, ovšem ve srovnání s kyselinou octovou jsou silnějšími kyselinami pyrogallolové třísloviny, které se s octanem olovnatým v kyselém prostředí sráží a vytváří pravděpodobně sůl. V případě pyrokatecholových tříslovin ke vzniku soli třísloviny nedochází.

Kromě octanu olovnatého se k důkazu tříslovin používají následující roztoky, s nimiž tvoří třísloviny sraženiny: 10% roztok dusičnanu stříbrného, 5% roztok zásaditého octanu zinečnatého.

Reakce tříslovin s bromovou vodou

Bromovou vodou se srážejí do 5 minut třísloviny pyrokatecholové.

Vysvětlení: Jedná se o bromaci (substituce elektrofilní), kdy vznikají tetrabromderiváty. Pro substituci bromu jsou nutné volné polohy *ortho* a *para*.

1.1.4.2. Barevné reakce

Poskytují je třísloviny se solemi některých kovů. Z nich jsou nejdůležitější reakce tříslovin s roztoky železitých solí. Podkladem této barevné reakce je vznik silně kyselé komplexní sloučeniny železitého iontu s fenolem. Proto tuto reakci dávají též ostatní látky fenolového charakteru. Další barevnou reakcí, užívanou pro důkaz tříslovin, je reakce s kyselinou fosfowolframovou v alkalickém prostředí, kdy vzniká intenzivní modré zbarvení (wolframová modř).

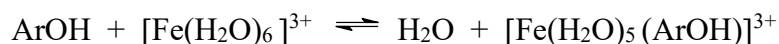
Reakce tříslovin se železitými solemi

Přidá-li se k 2-3 ml neutrálního roztoku tříslovin několik kapek 1% roztoku kamence železitého, vznikne za přítomnosti pyrokatecholových tříslovin zelenočerné zbarvení, kdežto

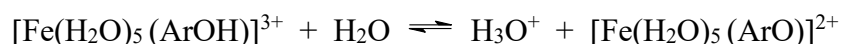
pyrogallolové třísloviny se barví do modra. Při stejném množství obou druhů tříslovin ve směsi je zbarvení do modra intenzivnější.

Reakce tříslovin se železitými solemi je velmi citlivá v neutrálním prostředí. V kyselém prostředí přechází zbarvení i u pyrogallolových tříslovin do fialova. Roztok chloridu železitého je vždy vlivem hydrolyzy kyselý, proto je výhodnější použít k reakci roztoku kamence železitého. Přebytkem železitých iontů, které mají oxidační schopnost, se zbarvení mění do špinavě hněda (během doby i vlivem vzdušného kyslíku).

Struktura vznikajícího fenolátového železitého komplexu nebyla ještě s konečnou platností určena, pravděpodobně vzniká $[\text{Fe}(\text{ArO})_6]^{3-}$. Podmínkou vzniku zbarvení je přítomnost aspoň jedné volné hydroxylové skupiny na aromatickém jádře. Ve vodném nebo alkoholovém roztoku může docházet k vytěsňování adovaných molekul rozpouštědla ze solvatovaného železitého ionu molekulami fenolu.



Voda nebo alkohol působí jako akceptor protonu, může dojít k náhradě jedné nebo více molekul rozpouštědla v solvatovaném železitém ionu fenoxidovým iontem.



Mohou vznikat různé komplexy: od $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{ArO})]^{2+}$ až po $[\text{Fe}(\text{ArO})_6]^{3-}$.

Reakce tříslovin s koncentrovanou kyselinou sírovou

K 2 ml roztoku tříslovin se přidá opatrně 1 ml kyseliny sírové koncentrované tak, aby se roztoky nesmíchaly. Na styčné ploše se utvoří barevný prstenec, jehož barva je pro mnohé třísloviny význačná. Když se roztok protřepe a zředí destilovanou vodou, přejde ve většině případů zbarvení prstence do roztoku. K této reakci se nejlépe hodí roztoky tříslovin v 96% ethanolu.

Důkaz katechinu

Roztok katechinu se zbarví růžově nebo červeně s floroglucinolem v kyselém prostředí.

Důkaz kyseliny chlorogenové

Extrakt obsahující kyselinu chlorogenovou dává s vodným roztokem amoniaku zelené zbarvení.

Fluorescenční analýza

Výluhy drog s obsahem tříslovin typicky fluoreskují, zvláště je-li jimi povlhčena vata nebo filtrační papír. Specifických výsledků se dosahuje zvláště při hodnocení kapilogramů srovnáním se známou drogou.

1.1.5. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ TŘÍSLOVIN – STANOVENÍ VEŠKERÝCH POLYFENOLŮ KOLORIMETRICKOU METODOU

0,500 g drogy se ve varné baňce smíchá se 150 ml vody. Zahřeje se k varu a vaří se dalších 30 minut pod zpětným chladičem. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede kvantitativně do 250ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Celkové polyfenoly: 5,0 ml filtrátu se zředí vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a 17,0 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Přesně po 2 minutách od přidání posledního roztoku se měří absorbance (A) při 750 nm za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{3,125 \times A}{0,316 \times m}$$

m je navážka v gramech.

1.1.6. STANOVENÍ TŘÍSLOVIN V ROSTLINNÝCH DROGÁCH (ČL 2009)

Všechny extrakční a ředící postupy se provádějí za chránění před světlem.

Rostlinné drogy nebo suché extrakty.

Předepsané množství práškované drogy nebo extraktu se v 250ml baňce s kulatým dnem smíchá se 150 ml vody a zahřívá se 30 minut na vodní lázni. Ochladí se pod tekoucí vodou a směs se převede kvantitativně do 250ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje vodou, promývací tekutina se přidá do odměrné baňky a zředí se vodou na 250,0 ml. Po

usazení částic drogy se tekutina zfiltruje filtračním papírem o průměru 125 mm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Tekuté extrakty nebo tinktury. Předepsané množství tekutého extraktu nebo tinktury se zředí vodou na 250,0 ml. Směs se zfiltruje filtračním papírem o průměru 125 mm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Celkové polyfenoly: 5,0 ml filtrátu se zředí vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a zředí se roztokem uhličitanu sodného (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách od přidání posledního roztoku se měří absorbance při 760 nm (A_1) za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek. K 10,0 ml filtrátu se přidá 0,10 g kožního prášku a intenzivně se protřepává 60 minut, pak se zfiltruje. 5,0 ml filtrátu se zředí vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a zředí se roztokem uhličitanu sodného (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách po přidání posledního roztoku se měří absorbance při 760 nm (A_2) za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok: 50,0 mg pyrogallolu se těsně před použitím rozpustí ve vodě a zředí se jí na 100 ml. 5,0 ml roztoku se zředí vodou na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a zředí se roztokem uhličitanu sodného (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách po přidání posledního roztoku se měří absorbance při 760 nm (A_3) za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech vyjádřený jako pyrogallol se vypočítá podle vzorce:

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

v němž značí:

m_1 – hmotnost zkoušené látky v gramech;

m_2 – hmotnost pyrogallolu v gramech.

U následujících drog se provedou zkoušky totožnosti a kolorimetrické stanovení obsahu celkových polyfenolů.

1.1.7. DROGY S OBSAHEM TŘÍSLOVIN

1.1.7.1. **Agrimoniae herba – Řepíková nať (ČL 2009)**

Jsou to usušené kvetoucí vrcholky druhu *Agrimonia eupatoria* L., řepík lékařský, Rosaceae.

Obsah: nejméně 2,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Dále jsou přítomné flavonoidy, které se dokazují tenkovrstvou chromatografií.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu

1. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 2,0 g práškové drogy se smíchají s 20 ml methanolu a zahřívají se 10 minut při 40 °C za protřepávání. Roztok se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1,0 mg rutosidu a 1,0 mg isokvercitosidu se rozpustí ve 2 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a ethyl-acetátu (10 : 10 : 80).

Nanášení: 10 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 12 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

Detekce: Ještě teplá deska se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a pak roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Suší se na vzduchu 30 minut. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části oranžově fluoreskující skvrna rutosidu a ve střední části oranžově fluoreskující skvrna isokvercitrinu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou od čela oranžově fluoreskující skvrny v pořadí: kvercitosid, isokvercitosid (shodná poloha se standardem), hyperosid a rutosid (shodná poloha se standardem).

2. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 1,000 g práškové drogy.

1.1.7.2. **Alchemillae herba – Kontryhelová nať (ČL 2009)**

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Alchemilla vulgaris* L. *sensu latiore*, kontryhel obecný, Rosaceae.

Obsah: Nejméně 6,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu:

1. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškové drogy se smíchá s 5 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem při 70 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1,0 mg kyseliny kávové a 1,0 mg kyseliny chlorogenové se rozpustí ve 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a ethyl-acetátu (8 : 8 : 84).

Nanášení: 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: 5 minut při 100 °C až 105 °C.

Detekce: Vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a pak roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Deska se suší na vzduchu asi 30 minut a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části světla modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové a v horní části světla modře fluoreskující skvrna kyseliny kávové.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou od čela dvě červeně fluoreskující skvrny chlorofylů, a pod nimi následují jedna nebo dvě intenzivně světle modře fluoreskující skvrny (shodná poloha se standardem kyseliny kávové), dále více intenzivních zeleně nebo zelenožlutě fluoreskujících skvrn. Na úrovni kyseliny chlorogenové je intenzivně žlutě nebo oranžově fluoreskující skvrna.

2. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,50 g práškové drogy.

1.1.7.3. Bistortae rhizoma – Rdesnový oddenek (ČL 2009)

Je to celý usušený oddenek zbavený postranních kořenů, nebo jeho úlomky druhu *Persicaria bistorta* (L.) SAMP. (syn. *Polygonum bistorta* L.), rdesno hadí kořen, Polygonaceae.

Obsah: nejméně 3,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu

1. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml směsí stejných objemových dílů vody a methanolu a zahřívá se 30 minut ve vodní lázni při 65 °C a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 5 mg fruktosy a 5 mg katechinu se rozpustí v 5 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé a ethyl-acetátu (5 : 10 : 85).

Nanášení: 2 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 7 cm.

Sušení: na vzduchu.

Detekce: Vrstva se postříká anisaldehydem a suší se 5 minut při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je u čela hnědá skvrna katechinu a u startu je zelená skvrna fruktosy. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny shodné se standardy a mezi nimi další hnědá, fialová, hnědá a oranžová skvrna.

2. Proveďte se stanovení tříslovin v rostlinných drogách; použijte se 1,000 g práškované drogy.

1.1.7.4. Hamamelidis folium – Vilínový list (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Hamamelis virginiana* L., vilín virginský, Hamamelidaceae.

Obsah: Nejméně 3 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu:

1. 1 g práškované drogy se smíchá s 10 ml ethanolu 30% (V/V) a zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. 1 ml tohoto roztoku se smíchá se 2 ml roztoku vanilinu (10 g/l) v kyselině chlorovodíkové; vzniká červené zabarvení.

2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml ethanolu 60% (V/V), protřepává se 15 minut a zfiltruje se.

Porovnávací roztok (a): 30 mg taninu se rozpustí v 5 ml ethanolu 60% (V/V).

Porovnávací roztok (b): 5 mg kyseliny gallové se rozpustí v 5 ml ethanolu 60% (V/V).

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a ethyl-formiátu (10 : 10 : 80).

Nanášení: 10 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Vrstva se suší 10 minut při 100 °C až 105 °C; nechá se ochladit.

Detekce: Postříká se chloridem železitým do objevení se modrošedých skvrn (fenolové sloučeniny).

Hodnocení: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní třetině hlavní skvrna odpovídající poloze hlavní skvrny porovnávacího roztoku (a) a druhá úzká skvrna v horní části odpovídající poloze skvrny porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ve střední části další slabě zbarvené skvrny.

3. Proveďte se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,750 g práškované drogy.

1.1.7.5. Quercus cortex – Dubová kůra (ČL 2009)

Je to řezaná usušená kůra čerstvých mladých větví druhů *Quercus robur* L., dub letní (křemelák), *Q. petraea* (Matt.) Liebl., dub zimní (drnák) a *Q. pubescens* Willd., dub pýřitý (šípák), Fagaceae.

Obsah: Nejméně 3,0 % tříslovin, vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu:

1. 1 g práškované drogy se smíchá s 10 ml ethanolu 30% (V/V) a zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. 1 ml tohoto roztoku se smíchá se 2 ml roztoku vanilinu (10 g/l) v kyselině chlorovodíkové; vzniká červené zbarvení.
2. Proveďte se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,700 g práškované drogy.

1.1.7.6. Tormentillae rhizoma – Nátržníkový oddenek (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek zbavený kořenů, druhu *Potentilla erecta* (L.) Raeusch, (*P. tormentilla* Stokes), mochna nátržník, Rosaceae.

Obsah: Nejméně 7,0 % tříslovin vyjádřeno jako pyrogallol, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti a stanovení obsahu:

1. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškované drogy se protřepává 10 minut s 10 ml vody a zfiltruje se. Filtrát se protřepává dvakrát 10 ml ethyl-acetátu. Spojené horní vrstvy se zfiltrují přes 6 g síranu sodného bezvodého. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v 1,0 ml ethyl-acetátu.

Porovnávací roztok: 1,0 mg katechinu se rozpustí v 1,0 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny octové ledové, diethyletheru, hexanu a ethyl-acetátu (20 : 20 : 20 : 40).

Nanášení: 10 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: 10 minut až 15 minut na vzduchu.

Detekce: Postříká se čerstvě připraveným roztokem modří pravé (5 g/l); objeví se načervenalé skvrny. Vrstva se vystaví působení par amoniaku; skvrny se zbarví intenzivněji červenohnědě. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části intenzivní skvrna katechinu, která polohou odpovídá skvrně katechinu u zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další méně intenzivní skvrny.

2. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,500 g práškované drogy.

1.1.7.7. Zkoušky totožnosti

Pro kvalitativní zkoušky tříslovin se používá 1% vodný výluh tříslovinných drog, který se připraví povařením drogy s vodou po dobu 15 minut a přefiltrováním. Výsledky (zabarvení resp. tvorba sraženiny) uveďte v tabulce.

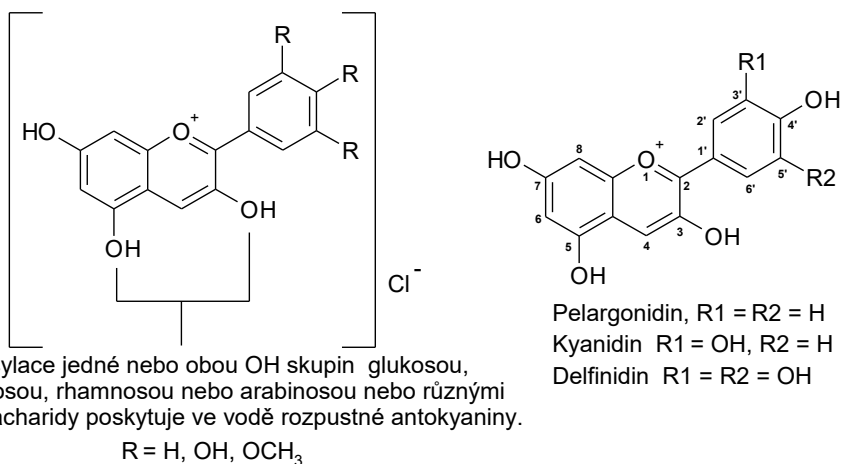
Barevné reakce	<i>Quercus cortex</i>	<i>Hamamelidis folium</i>	<i>Bistortae rhizoma</i>	<i>Tormentillae rhizoma</i>	<i>Agrimoniae herba</i>
Reakce s FeCl ₃					
Reakce s konc. kys.sírovou					

Srážecí reakce	<i>Quercus cortex</i>	<i>Hamamelidis folium</i>	<i>Bistortae rhizoma</i>	<i>Tormentillae rhizoma</i>	<i>Agrimoniae herba</i>
10% AgNO ₃					
5% K ₂ Cr ₂ O ₇					
4% CuSO ₄					
3% (CH ₃ COO) ₂ Pb					
Roztok želatiny					

1.2. ANTOKYANY

Antokyany jsou ve vodě rozpustná barviva růžových, červených, modrých a fialových květů a plodů četných rostlin. Vyskytují se ve formě glykosidů – antokyaninů a jejich aglykonů – antokyanidinů. Jejich struktura se odvozuje od flavyliumchloridu. Antokyanidiny se vyskytují v kyselém prostředí jako kationty. Na C-3 jsou vždy substituovány hydroxylovou skupinou. Nejčastěji jsou pentasubstituované 3,3',4',5,7 nebo hexasubstituované 3,3',4',5, 5',7, buď hydroxylovými nebo methoxylovými, případně oběma typy skupin.

V přírodě nejčastějšími antokyanidiny jsou pelargonidin (jasně červený), kyanidin (karmínový) a delphinidin (purpurový).



Změnou pH v roztocích těchto sloučenin se mění i jejich struktura a jejich změněný systém chromoforů se projevuje změnou barvy. Např. kyanidin je aglykon barviva červené růže i modré chrpy.

Izolace antokyaninů se provádí extrakcí ethanolem nebo methanolem obsahujícím 1-5 % chlorovodíku. Z extraktů se sráží surový chlorid přebytkem diethyletheru. Uplatnění při izolaci antokyanů našla adsorpční chromatografie zejména na Al_2O_3 .

1.2.1. KVALITATIVNÍ REAKCE ANTOKYANŮ

1.2.1.1. Barevná reakce

Přidáním uhličitanu sodného nebo octanu sodného do kyselého vodného roztoku antokyanů dochází ke změně barvy z červené až fialové na modrou až modrofialovou různě stálou. Barvivo se vytřepe z vodného výluhu do amylalkoholu, k výtřepku se přidá trochu octanu sodného a kapka zředěného roztoku chloridu železitého. Intenzivně modré zbarvení je charakteristické pro ty antokyanidiny, které mají dvě sousední volné hydroxylové skupiny, např. delfinidin a kyanidin.

1.2.1.2. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený vzorek: 1 g práškované drogy se extrahuje třepáním s 6 ml směsí methanol : kyselina chlorovodíková koncentrovaná (9 : 1). Extrakt se zfiltruje a odpaří na objem cca 0,5 ml.

Vyvíjecí soustava: n-butanol: kyselina octová ledová : voda (40 : 10 : 20).

Na vrstvu Silikagelu pro TLC se nanese 10 µl roztoku a vyvíjí se po dráze 12 cm. Po vysušení se vrstva pozoruje bez chemické detekce. Skvrny v dráze vzorku se vyhodnotí podle následující tabulky.

antokyan	R _F	barva
pelargonidin-3,5-diglukosid	0,5	fialová
petunidin-3,5-diglukosid	0,3	modrá
delfinidin-3,5-diglukosid	0,2	modrá
kyanidin-3,5-diglukosid	0,3	fialová
malvidin-3,5-diglukosid	0,4	červená
malvidin-3-glukosid	0,5	červená

1.2.2. DROGY S OBSAHEM ANTHOKYANŮ

1.2.2.1. Cyani flos – Chrpový květ

Drogu tvoří usušený květ, *Cyanus segetum* HILL., chrpa polní, Asteraceae.

Obsah: antokyany, saponiny, sliz.

Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie (viz výše).

1.2.2.2. **Hibisci sabdariffae flos – Květ ibišku sudánského (ČL 2009)**

Je to celý nebo řezaný usušený kalich a kalíšek druhu *Hibiscus sabdariffa* L., ibišek sudánský (rozella), Malvaceae, sklizený v době zralosti.

Obsah: Hibiscin = delfinidin-3-xylosyl-glukosid. Hodnotí se mohutnost vybarvení a metodou tenkovrstvé chromatografie.

Nejméně 13,5 % kyselin, vyjádřeno jako kyselina citronová, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti

1. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: K 1,0 g práškované drogy se přidá 10 ml ethanolu 60%, protřepává se 15 minut a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 2,5 mg červeně chinaldinové a 2,5 mg modře sulfanové se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a butan-1-olu (10 : 12 : 40).

Nanášení: 5 µl do proužků 10 mm.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Pozoruje se ihned v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve spodní části oranžovočervená skvrna červeně chinaldinové a pod ní v polovině spodní části desky je modrá skvrna modře sulfanové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku v poloze mezi skvrnami porovnávacího roztoku je intenzivní fialová skvrna (hibiscin) a ve spodní části intenzivní fialovomodrá skvrna.

1.2.2.3. **Malvae sylvestris flos – Květ slézu lesního (ČL2009)**

Je to usušený květ druhu *Malva sylvestris* L., sléz lesní, Malvaceae, nebo jeho pěstovaných odrůd, celý nebo jeho úlomky.

Obsah: sliz, antokyanové glykosidy (malvidin-3,5-diglukosid).

Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1 g práškové drogy se míchá 15 minut s 10 ml ethanolu 60% a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok: Roztok červeně chinaldinové (0,5 g/l) v ethanolu 96%.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny octové, vody a butan-1-olu (15 : 30 : 60).

Nanášení: 10 µl zkoušeného roztoku a 5 µl porovnávacího roztoku, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Posuzuje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části střední třetiny oranžovočervená skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, v poloze odpovídající poloze pod skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou ve střední třetině dvě fialové skvrny; hlavní skvrna (6''-malonylmalvin) je těsně pod fialovou skvrnou (malvin).