

### 1.1.1. STANOVENÍ ALKALOIDŮ

Kvantitativní hodnocení alkaloidů v drogách se většinou omezuje na stanovení celkového množství alkaloidů v droze přítomných nebo na stanovení hlavního alkaloidu.

Jednotlivé metody jsou propracovány na základě chemického charakteru stanovovaných látek. Je brán ohled na rozpustnost, schopnost tvořit soli o různém stupni hydrolyzovatelnosti, na disociační konstantu bazí, schopnost tvorby krystalů, podle nichž, resp. podle jejich váhového množství, by se dalo provést kvantitativní stanovení, je využívána schopnost některých alkaloidů poskytovat s zkoumadly stálá zbarvení vhodná pro kolorimetrii a podobně. Výsledky stanovení jsou srovnatelné jen tehdy, je-li stanovení konáno za stejných podmínek.

Postup kvantitativního stanovení alkaloidů v drogách je možno rozdělit na tři části: 1) příprava drogy a extrakce alkaloidů, 2) čištění výluhu a 3) vlastní kvantitativní stanovení alkaloidů.

#### 1.1.1.1. Příprava drogy a extrakce alkaloidů

Alkaloidy se vyskytují prakticky ve všech částech alkaloidních rostlin. Rostlinné orgány používané k extrakci jsou jimi obvykle bohaté. Nelze říci paušálně, který orgán je na alkaloidy nejbohatší. Někdy je to kořen (*Veratri*, *Scopoliae*, *Ipecacuanhae*, *Hydrastidis radix*), jindy je to list (*Belladonnae*, *Hyoscyami*, *Stramonii*, *Theae folium*), nať (*Lobeliae herba*) nebo kůra (*Cinchonae*, *Granati cortex*), plod (*Capsici*, *Conii fructus*) nebo semeno (*Colae*, *Strychni semen*).

Podle lokalizace maximálního množství alkaloidů v tom kterém orgánu je zřejmé, že např. z listů, které jsou tvořeny snadno rozdrtitelným měkkým pletivem, budou se alkaloidy extrahovat lépe než z tvrdého pletiva kůry. Pro extrakci se proto používají vždy drogy rozdrobněné, aby extrakce alkaloidů z nich byla co nejdokonalejší. Rozdrobnění se provádí obvykle těsně před stanovením. Drogu je nutno přesát požadovaným sítem (obvykle od 180 do 1000).

Alkaloidní drogy tvořené semeny (*Strychni semen*, *Colchici semen*) je nutno před stanovením odtučnit v petroletheru. V bílku a dělohách je značné množství olejů a tuků, které by značně ztížily, ne-li znemožnily zamýšlené stanovení alkaloidů.

Vážení drogy pro kvantitativní stanovení se provádí s přesností uvedenou v příslušném lékopisném článku, u neoficinálních drog s přesností nejméně na setiny gramu, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce drogy se provádí macerací, perkolací nebo nepřetržitou extrakcí nejčastěji v Soxhletově přístroji. Úplné vyloužení alkaloidů se zkouší Mayerovým zkoumadlem, které se přidá k několika kapkám posledního zfiltrovaného výluhu nebo perkolátu (výjimku tvoří kolchicin a purinové baze, které reagují s Mayerovým zkoumadlem pouze ve značných koncentracích). Zkouška se obvykle provádí tak, že se odparek výluhu drogy rozpustí v nepatrném množství zředěné kyseliny chlorovodíkové a přidá se kapka Mayerova zkoumadla. Při stanovení kolchicinu nebo purinových bazí se přidává kapka Lugolova zkoumadla.

Extrakce alkaloidů se provádí nejčastěji organickými rozpouštědly (diethylether, chloroform, petrolether, benzen, pentan, dichlorethan) za současného zalkalizování směsi, čímž se uvolní baze alkaloidů z vazby s organickými kyselinami. Alkalizování se provádí nejčastěji roztokem amoniaku, který má před alkalickými hydroxidy tu výhodu, že nezmýdelňuje v droze přítomné tuky. Některé metody používají k zalkalizování uhličitan sodný, který lépe proniká tvrdým pletivem endospermu (např. *Strychni semen*). Výjimku, dalo by se říci ze všeobecného postupu alkalizace → uvolnění baze alkaloidů → vytřepání do organického rozpouštědla, činí *Cinchonae cortex*. Zde jsou totiž alkaloidy vázány na třísloviny. Tuto vazbu lze rozštěpit působením chlorovodíku, nikoliv zásady. Na *Cinchonae cortex* se tedy nejprve působí roztokem kyseliny chlorovodíkové, alkaloidy se uvolní z vazby s tříslovinou a vytvářejí hydrochloridy + kyselinu tříslovou. Přidáním hydroxidu sodného do extraktu se vytvoří částečně opět soli alkaloidu s taninem, ty však nejsou stálé a nadbytkem alkálií se opět rozkládají.

Jako vyluhovadla alkaloidů lze použít kromě výše jmenovaných organických rozpouštědel také zředěného ethanolu, který se používá při extrakci alkaloidů obsažených v rostlinách z čeledi Solanaceae, dále se jako vyluhovadla používá roztok hydroxidu vápenatého (extrakce opia).

Z těch drog, které obsahují prchavé baze alkaloidů, získávají se alkaloidy destilací s vodní párou (*Conii fructus*, *Nicotianae folium*).

#### 1.1.1.2. Čištění výluhu

Extrakt z drogy se musí dále čistit, protože obsahuje značné množství znečištěnin, které jsou tvořeny vedlejšími a balastními obsahovými látkami. Vyskytují se zde zejména různé sacharidy, polysacharidy, tuky, vosky, pryskyřice, saponiny, barviva, u nadzemních částí rostlin chlorofyl. Čištění se musí provádět zvláště pečlivě, stanovuje-li se obsah alkaloidů gravimetricky.

Schematicky lze popsat proces čištění výluhu následovně: roztok alkaloidů v organickém rozpouštědle se několikrát vytřepe okyselenou vodou, čímž alkaloidy přejdou ve formě solí do vodného výluhu a většina balastních lipofilních látek zůstane v organickém rozpouštědle. Oddělený kyselý vodný výluh se zalkalizuje a vytřepe asi polovičním objemem vhodného organického rozpouštědla, čímž alkaloidy znovu přejdou jako baze do organického rozpouštědla. Opětovným okyselením roztoku, zalkalizováním a vytřepáním do organického rozpouštědla se alkaloidy vyčistí. Tento způsob čištění je vhodný především proto, že je časově nenáročný. Lepších výsledků v čištění lze dosáhnout pomocí sloupcové chromatografie, která je však zdlouhavá a nákladná.

Obsahuje-li výluh jemné suspendované látky nebo látky snižující povrchové napětí (mýdla, saponiny), nastává špatné oddělení organického rozpouštědla od vodní vrstvy, neboť se při třepání vytváří emulze. Proto se doporučuje přidat do výluhu práškový tragant, který po protřepání strhne na sebe všechny nečistoty, takže potom dojde k snadnějšímu rozdělení dvou vzájemně nemísitelných rozpouštědel.

Výluh užívaný ke stanovení musí být vždy čirý, jinak není zaručen správný výsledek stanovení. Při titračních a kolorimetrických stanoveních působí rušivě chlorofyl. Jeho odstranění se provádí vysrážením 10% roztokem kyseliny citronové, jímž se upraví pH výluhu na hodnotu 3. Kyselina citronová se přidává k zahuštěnému ethanolovému extraktu z drogy. Vysrážený chlorofyl se odfiltruje jemným sintrem. Filtrát se zalkalizuje uhličitanem sodným a hydroxidem sodným na pH 9 a vytřepe se do chloroformu, kam přejdou baze alkaloidů.

### 1.1.1.3. Vlastní kvantitativní stanovení alkaloidů

Alkaloidy se většinou stanovují titračně. Acidimetricky se stanoví alkaloidy v *Cinchonae cortex*, *Granati cortex*, alkaloidy rostlin z čeledi Solanaceae, dále *Ipecacuanhae radix*, *Strychni semen*, *Aconiti tuber* a další. V případě acidimetrického stanovení alkaloidů se jedná o titraci slabé zásady silnou kyselinou, ekvivalentního bodu se dosahuje v rozmezí pH obvykle mezi hodnotami 3 až 6. Z tohoto důvodu se jako indikátory hodí pro titrace alkaloidů methylčerven, methyloranž a podle druhu baze i jiné kyselé indikátory, jako např. erythrosin.

Většinou lze i dvojsytné alkaloidy titrovat jako jednosytné baze, neboť jejich druhá disociační konstanta bývá zpravidla velmi malá (např. chinin, brucin, strychnin aj.). To vše platí o vodných roztocích.

Většina alkaloidních bazí je ve vodě nerozpustná, rozpouští se však dobře v 50% ethanolu. Ethanol v takové koncentraci mění již patrnou měrou jejich disociační konstanty, což má za následek, že někdy není barevný přechod methylčerveně na konci titrace dost jasný. V takových případech koná dobré služby bromthymolová modř.

V běžné analytické praxi jde zpravidla o stanovení alkaloidů a jim podobných bazí ve vyčištěných extraktech získaných z drog nebo z rozličných galenických přípravků vytřepáním ze zásaditého prostředí diethyletherem, chloroformem a pod. Takto izolované organické baze potom rozpouštíme buď v lihu a titrujeme přímo na methylčerveně nebo bromthymolovou modř jako indikátor, nebo postupujeme také tak, že získanou bazi rozpustíme v nadbytku odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové nebo sírové a stanovujeme zpětnou titrací nespotřebovanou kyselinu odměrným roztokem hydroxidu sodného na methylčerveně.

Při gravimetrickém stanovení je třeba výluh s alkaloidy důkladně pročistit. Alkaloidy se pak stanoví přímo sušením odparku výluhu drogy do konstantní hmotnosti, nebo se stanoví hmotnost sraženiny vzniklé přidáním vhodného zkoumadla (např. kyseliny fosfowolframové, pikrové, fosfomolybdenové) k vyčištěnému výluhu.

Z fyzikálně chemických metod se ke stanovení alkaloidů v drogách používá nejčastěji kolorimetrie a nefelometrie.

Kolorimetricky lze stanovit zejména takové alkaloidy, které dávají s vhodnými zkoumadly specifickou barevnou sloučeninu (např. ergotamin s *p*-dimethylamino- benzaldehydem v prostředí kyseliny sírové modré zbarvení). Intenzita zbarvení se pak srovnává s intenzitou barvy roztoku o známé koncentraci.

Při nefelometrickém stanovení obsahu alkaloidů v drogách měříme zákal, který způsobuje v tekutině nerozpustná látka (např. zákal vzniklý ve velmi zředěných roztocích alkaloidů po přidání vhodných srážecích zkoumadel) a srovnává se se suspenzí o známém množství suspendovaných látek. K srážení výluhu alkaloidů se používá některých zkoumadel používaných rovněž k jejich důkazu, např. Mayerova zkoumadla, kyseliny fosfowolframové, kyseliny pikrové aj.

Posledních 10-15 let zasáhla podstatně i do kvantitativního stanovení alkaloidů chromatografie, spojená s některou fyzikálně chemickou metodou detekce, nejčastěji s UV spektrofotometrií. Tento způsob je vhodný především proto, že umožňuje stanovení jednoho nebo více (chromatografií oddělených) alkaloidů současně.

### 1.1.2. DROGY S OBSAHEM PURINOVÝCH BAZÍ

Methylderiváty xanthinu kofein, theofylin a theobromin se vyskytují v drogách semeno kávovníku – *Coffeae semen*, list čajovníku – *Theae folium*, kolové semeno – *Colae semen*, kakaové semeno – *Cacao semen*, list Maté – *Maté folium* a *Guarana* – *Guarana*, ze kterých se získávají.



#### 1.1.2.1. *Colae semen* – Kolové semeno (ČL 2009)

Je to celé nebo lámané usušené semeno (semenný klíček) druhů *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl., kola lesklá (*C. vera* K. Schum, kola pravá) a jeho odrůd nebo druhu *C. acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl., kola hrotitá, (*Sterculia acuminata* P. Beauv.), Malvaceae (dříve Sterculiaceae), zbavené osemení.

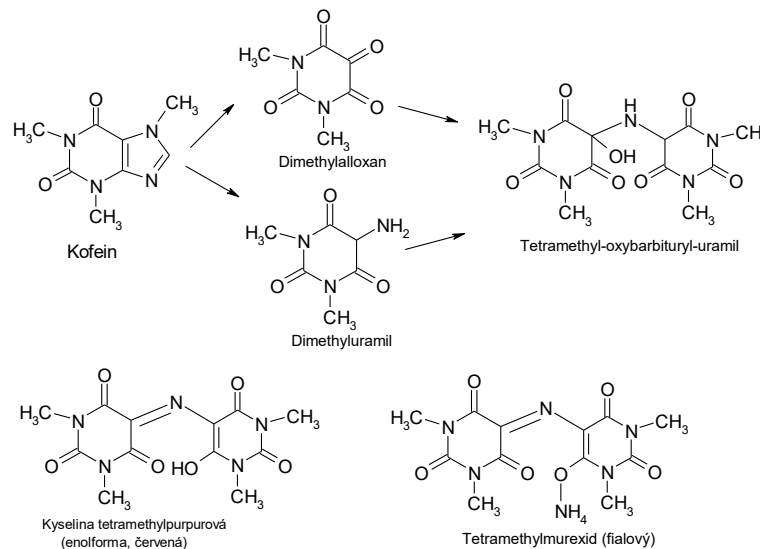
Obsah: Nejméně 1,5 % kofeinu, počítáno na vysušenou drogu. Dále theobromin a katechinové třísloviny.

Zkoušky totožnosti:

- 0,5 g práškované drogy se zahřeje k varu s 5,0 ml roztoku kyseliny sírové zředěné (98 g/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Směs se ještě za horka zfiltruje. K filtrátu se přidá 5 ml roztoku amoniaku zředěného (100 g/l NH<sub>3</sub>) a 10 ml chloroformu. Po důkladném protřepání se chloroformová vrstva přefiltruje přes vatou do porcelánové misky a odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v několika kapkách zředěné kyseliny chlorovodíkové, přidá se malé množství (1 ml) koncentrovaného peroxidu vodíku a směs se odpaří na vodní lázni do sucha. V přítomnosti purinových alkaloidů vzniká odparek růžově zabarvený. Tato barva přechází po pokápnutí několika kapkami roztoku amoniaku do fialova – murexidová reakce. Účinkem silných oxidačních činidel (kromě peroxidu vodíku lze použít chlorečnany, chlorovou vodu aj.) v kyselém prostředí se odbourává imidazolový kruh a vzniká

methylderivát alloxanu a methylderivát uramilu. Tyto vytvářejí kondensací methylderivát oxybarbituryluramilu, který přechází odpařením z vody v methylderivát kyseliny purpurové. Po přidání amoniaku přechází červeně zbarvená kyselina purpurová na murexid, který je zbarvený fialově.

2. Mikrosublimate. Droga poskytuje bezbarvý sublimát, skládající se z dlouhých jehlic (kofein), které dávají pozitivní murexidovou reakci.



### 3. Tenkovrstvá chromatografie:

*Zkoušený roztok:* 1,0 g práškové drogy (355) se smíchá s 5 ml ethanolu 60% (V/V), protřepává se 30 minut při 40 °C a zfiltruje se. Lze použít i sublimát získaný zkouškou 2 a rozpuštěný v malém množství chloroformu.

*Porovnávací roztok (a).* 25 mg kofeinu se rozpustí v 10 ml ethanolu 60%.

*Porovnávací roztok (b).* 50 mg theobrominu se rozpustí v 10 ml mobilní fáze a zfiltruje se.

*Stacionární fáze:* Deska s vrstvou silikagelu F<sub>254</sub> pro TLC.

*Mobilní fáze:* Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (10 : 13 : 77)

*Nanášení:* 20 µl, do proužků.

*Vyvíjení:* Po dráze 10 cm.

*Sušení:* 5 minut na vzduchu.

*Detekce A:* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

*Hodnocení A:* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě hlavní skvrny zhášející fluorescenci, které odpovídají polohou skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

*Detekce B:* Vrstva se postříká směsí stejných objemových dílů ethanolu 96% a kyseliny

chlorovodíkové a potom roztokem připraveným těsně před použitím rozpuštěním 1 g jodu a 1 g jodidu draselného ve 100 ml ethanolu 96%.

*Hodnocení B:* Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá červenohnědá hlavní skvrna polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Stanovení obsahu:

1. Stanovení purinů vázkovou metodou:

5,0 g práškované drogy se 10 minut protřepává se 40 ml chloroformu, přidá se 1 ml koncentrovaného amoniaku a směs se nechá za občasného protřepávání 1 h stát. 18 ml filtrátu se nalije do chromatografické kolony naplněné 4 g oxidu hlinitého s přísávkem 0,1 g aktivního uhlí. Po prokapání filtrátu se sorbent v koloně promyje dvakrát vždy 15 ml chloroformu. Spojené chloroformové výluhy se na vodní lázni odpaří na objem 3 ml a přidá se 25 ml horké vody. Výluh se pak zahřívá na vodní lázni, až se zbytek chloroformu odpaří. Horký výluh se ihned přefiltruje do odvážené odpařovací misky, původní nádoba se vypláchne a vyvaří dvakrát vždy s 10 ml vody a roztoky se potom stejným filtrem přefiltruje do už zmíněné předem zvážené odpařovací misky. Spojené vodné výluhy se odpaří, zbytek se vysuší při teplotě 100 °C a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Hmotnost zbytku vynásobená koeficientem 33,3 udává obsah kofeinu v %.

2. Kapalinová chromatografie:

*Zkoušený roztok:* 1,00 g práškované drogy (355) se smíchá s 50 ml methanolu, zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 10 ml methanolu, zbytek se smíchá s 50 ml methanolu a předchozí postup se opakuje. Spojené filtráty a promývací tekutiny se v 200ml odměrné baňce zředí methanolem na 200,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se v baňce s kulatým dnem odpaří za sníženého tlaku do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v mobilní fázi, převede se do 50ml odměrné baňky a zředí se stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok:* 30,0 mg kofeinu a 15,0 mg theobrominu se ve 100ml odměrné baňce rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml odměrné baňky a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

*Kolona:* délka 0,25 m, vnitřní průměr 4,6 mm.

*Stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný (5 µm).

*Mobilní fáze:* Směs objemových dílů methanolu a vody (25 : 75)

Průtoková rychlost: 1 ml/minutu.

Detekce: Spektrofotometrický detektor, 272 nm.

Nástřik: Vhodný objem každého roztoku, injektorovou smyčkou.

Test způsobilosti, porovnávací roztok: Rozlišení nejméně 2,5 mezi píkem kofeinu a píkem teobrominu; je-li třeba, upraví se objem vody v mobilní fázi.

Obsah kofeinu se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_2 \times A_1 \times 50}{m_1 \times A_2}$$

v němž značí:

A<sub>1</sub> – plochu píku kofeinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;

A<sub>2</sub> – plochu píku kofeinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;

m<sub>1</sub> – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

m<sub>2</sub> – hmotnost kofeinu v porovnávacím roztoku v gramech.

#### 1.1.2.2. Theae folium – Čajovníkový list

Usušené, fermentované nebo nefermentované listy *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, kamélie čínská, (syn. *Thea sinensis* L., čajovník čínský), Theaceae.

Obsah: purinové baze, hlavně kofein (více v černém čaji), stopy theofylinu a theobrominu, katechinové třísloviny, flavonoidy, silice.

#### 1.1.2.3. Coffeae semen – Semeno kávovníku

Semena druhů rodu *Coffea*, zvláště *Coffea arabica* L. kávovník arabský, *C. liberica* Bull. ex Hiern, kávovník liberijský, *C. canephora* Pierre ex Froehner, kávovník statný (syn. kávovník robusta), Rubiaceae. Zelená semena musí obsahovat nejméně 1 % kofeinu.

Drogu tvoří semena zbavená oplodí a osemení a pražená při 200-250 °C.

Obsah: kofein do 2,5 %, stopy theobrominu a theofylinu, kyselina chlorogenová, tuk, třísloviny a látky vznikající pražením.

#### 1.1.2.4. Maté folium – List cesmíny paraguajské (Yerba maté)

Jsou to usušené, lámané světlezelené kožovité, lesklé listy stromu *Ilex paraguariensis* St.-Hil., cesmína paraguajská, Aquifoliaceae.

Obsah: až 1,5 % kofeinu, 0,3 % theobrominu, cca 12 % kyseliny chlorogenové, silice,



třísloviny.

### 1.1.3. ALKALOIDY OPIA A SOUVISEJÍCÍ DROGY

#### 1.1.3.1. **Opium crudum – Opium surové (ČL 2009)**

Surové opium je určeno výhradně jako výchozí surovina pro přípravu galenických přípravků. Samostatně se nesmí vydat. Je to na vzduchu usušená mléčná šťáva získaná naříznutím nezralých plodů druhu *Papaver somniferum* L., mák setý, Papaveraceae.

Obsah, počítáno na vysušenou drogu:

- morfin nejméně 10 %;
- kodein nejméně 2 %.

Droga se používá k přípravě:

#### **Opium extractum siccum normatum – Opiový extrakt suchý standardizovaný (ČL 2009)**

Je to standardizovaný suchý extrakt vyrobený ze surového opia (*Opium crudum*).

Obsah:

- morfin 19,6-20,4 %;
- kodein nejméně 2,0 %.

#### **Opium pulvis normatus – Opium práškované standardizované (ČL 2009)**

Je to surové opium práškované a vysušené při teplotě nepřevyšující 70 °C.

Obsah (droga sušená 4 h při 100 °C až 105 °C):

- morfin 9,8 – 10,2 %;
- kodein nejméně 1 %.

#### **Opium tinctura normata – Opiová tinktura standardizovaná (ČL 2009)**

Je to standardizovaná tinktura vyrobená ze surového opia.

Obsah:

- morfin 0,95 – 1,05 %;
- kodein nejméně 0,1 %.

Výroba: Připravuje se z drogy a stejných objemových dílů ethanolu 70% (V/V) a vody vhodným postupem.

Vzhled: červenohnědá tekutina.

### 1.1.3.2. Opiové alkaloidy uvedené v ČL 2009

**Codeini hydrochloridum dihydricum – Kodein-hydrochlorid dihydrát**

**Codeini phosphas hemihydricus – Kodein-fosfát hemihydrát**

**Codeini phosphas sesquihydricus – Kodein-fosfát seskvihydrát**

**Codeinum monohydricum – Kodein monohydrát**

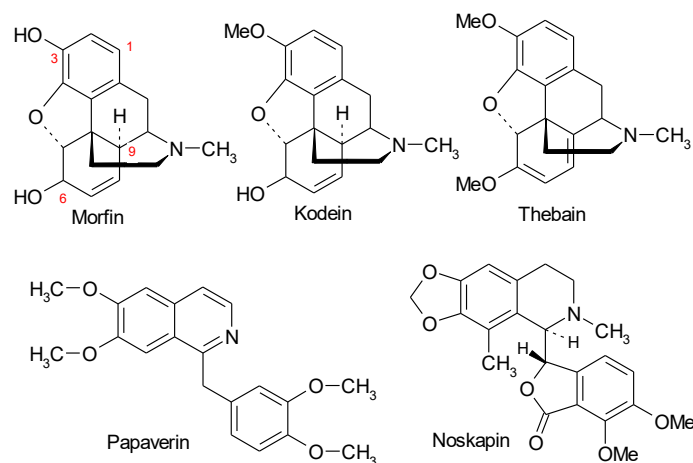
**Morphini hydrochloridum trihydricum – Morfin-hydrochlorid trihydrát**

**Morphini sulfas pentahydricus – Morfin-sulfát pentahydrát**

**Noscapini hydrochloridum monohydricum – Noskapin-hydrochlorid monohydrát**

**Noscapinum – Noskapin**

**Papaverini hydrochloridum – Papaverin-hydrochlorid**



### 1.1.3.3. Papaveris fructus maturus – Zralý plod máku

*Papaver somniferum* L., mák setý, Papaveraceae.

Obsahové látky: morfinanové alkaloidy morfin, kodein, thebain ve formě solí s kyselinou mekonovou a jiné typy alkaloidů (papaverin, noskapin, berberin aj.), organické kyseliny (mekonová, mléčná, fumarová) a cukry.

Zkoušky totožnosti:

1. 1,0 g práškové drogy (355) se protřepává 5 minut s 5 ml vody a pak se zfiltruje. K filtrátu se přidá 0,25 ml roztoku chloridu železitého (13 g/l); vzniká červené zbarvení,

kteřé se po přidání 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné (73 g/l HCl) nemění.

## 2. Tenkovrstvá chromatografie na silikagelu:

*Zkoušený roztok:* 5 g vysušené práškované drogy (355) *Papaveris fructus maturus* se vaří 30 minut s 30 ml hydroxidu vápenatého 5% (m/V) pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu se změří pH a přidá se Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> až na pH 6–7 (přibližně 10 g). Suspenze se odstředí na centrifuze 3 minuty při 3000 ot/minutu. Supernatant se slije do baňky, zbytek v centrifugačních zkumavkách se promyje chloroformem, znovu odstředí a přidá se k vodné fázi v baňce. Po protřepání v dělicí nálevce se organická fáze oddělí a vodná fáze se ještě dvakrát extrahuje vždy 15 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se vysuší bezvodým síranem sodným a po filtraci se odpaří na rotační vakuové odparce na objem cca 1 ml. Zahuštěný chloroformový extrakt se nanese na tenkou vrstvu a zbytek se ponechá na stanovení obsahu.

*Porovnávací roztok:* chloroformový roztok noskapinu, papaverinu, morfinu a kodeinu (5 mg/ml).

*Stacionární fáze:* Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

*Mobilní fáze:* Směs objemových dílů toluenu, ethylacetátu, diethylaminu (10 : 10 : 2); použije se čerstvě připravená směs.

*Nanášení:* 10 µl zkoumaného a porovnávacího roztoku do proužků.

*Vyvíjení:* Po dráze 12 cm.

*Detekce:*

a) Po vysušení se pozoruje pod UV při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dobře patrné tmavě hnědé skvrny noskapinu a kodeinu a mezi nimi žlutomodře fluoreskující skvrna papaverinu. Na chromatogramu vzorku je dobře patrná nad startem tmavomodře fluoreskující skvrna morfinu, dále méně výrazné skvrny kodeinu, papaverinu a narkotinu, na chromatogramu mohou být patrné i další slaběji viditelné skvrny.

b) Postříká se jodobismutitanem draselným (zkoumadlo Dragendorffovo). Na světle-oranžovém pozadí jsou patrné růžové skvrny alkaloidů. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části oranžovočervená skvrna (morfin), nad ní podobně zbarvená skvrna (kodein), v horní části oranžovočervená skvrna (papaverin) a nad ní podobně zbarvená skvrna (noskapiin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; v poloze odpovídající poloze mezi skvrnami kodeinu a papaverinu může být tmavočervená skvrna (thebain).

Stanovení obsahu:

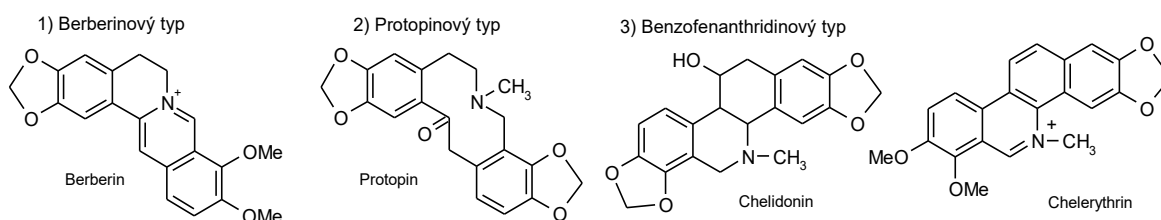
Chloroformový extrakt ze zkoušky 2) naředíme 10 ml chloroformu, kvantitativně převedeme do odměrné baňky na 25 ml a doplníme chloroformem po značku. Změříme absorbanci při 420 nm oproti čistému chloroformu a obsah morfinu vypočteme z kalibrační křivky.

#### 1.1.3.4. Chelidonii herba – Vlaštovičnicková nať (ČL 2009)

Je to usušená celá nebo řezaná kvetoucí nať druhu *Chelidonium majus* L., vlašovičnick větší, Papaveraceae.

Obsah: Nejméně 0,6 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako chelidonin, počítáno na vysušenou drogu.

Jsou přítomny alkaloidy berberinové (berberin), protopinové (protopin, allokryptopin) a benzofenanthridinové (chelidonin, chelerythrin, sanguinarin, makarpin aj.), vázané na organické kyseliny (chelidonová, mléčná, fumarová).



Zkoušky totožnosti

1. 1 g práškové drogy (355) se zvlhčí 1 ml roztoku amoniaku a 5 minut se protřepává s 5 ml chloroformu. Výluh se zfiltruje a filtrát se vytřepe 3 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné. Kyselý podíl se oddělí a rozdělí na dvě části:

- k 1 ml se přidá 5 kapek roztoku tetrajodortu'natanu draselného (Mayerovo zkoumadlo). Vznikne šedá sraženina.
- k 1 ml se přidá 5 kapek roztoku tetrajodobismutitanu draselného (Dragendorffovo zkoumadlo). Vznikne oranžová sraženina.

2. Tenkovrstvá chromatografie:

*Zkoušený roztok:* 0,4 g práškové drogy (710) se vaří 30 minut s 50 ml kyseliny octové zředěné (115 g/l) ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. K filtrátu se přidá amoniak 26% do silně zásadité reakce a protřepává se 30 ml dichlormethanu. Organická vrstva se vysuší síranem sodným bezvodým, zfiltruje se a ve vakuu se odpaří do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 1,0 ml methanolu.

*Porovnávací roztok:* 2 mg papaverin-hydrochloridu a 2 mg červeně methylové se rozpustí v 10 ml ethanolu 96%.

*Stacionární fáze:* Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

*Mobilní fáze:* Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a propan-2-olu (1 : 9 : 90).

*Nanášení:* 10 µl, do proužků.

*Vyvíjení:* Po dráze 10 cm.

*Detekce:* A) Po vysušení se pozoruje pod ultrafialovou lampou při 365 nm.

*Hodnocení:* Na chromatogramu zkoušeného vzorku je dobře patrná řada žlutě, modře a zeleně fluoreskujících skvrn. Ve spodní části chromatogramu jsou patrné žlutě fluoreskující skvrny (koptisin, berberin, chelerythrin), ve vrchní části chromatogramu je slabě žlutá skvrna (chelidonin) a další modrofialové skvrny.

*Detekce:* B) Vrstva se postříká jodobismutitanem draselným (zkoumadlo Dragendorffovo), usuší se na vzduchu, postříká se dusitanem sodným čerstvě připraveným (100 g/l) a znovu se suší na vzduchu; pozoruje se v denním světle.

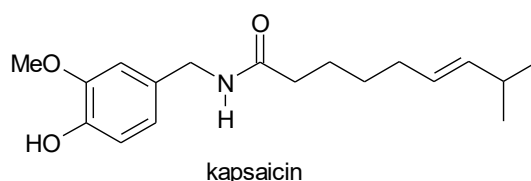
*Hodnocení:* Na chromatogramu porovnávacího roztoku je přibližně uprostřed šedohnědá skvrna (papaverin) a nad ní červená skvrna (červeně methylová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v sestupném uspořádání dvě hnědé skvrny, šedohnědá skvrna na úrovni papaverinu a pod ní další dvě hnědé skvrny. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další méně výrazné skvrny.

### 1.1.4. DALŠÍ TESTOVANÉ ALKALOIDNÍ DROGY

#### 1.1.4.1. Capsici fructus – Paprikový plod

Je to usušený, celý nebo řezaný plod (bobule) rostliny *Capsicum annuum* L., paprika setá, Solanaceae.

Hlavní obsahové látky: protoalkaloid kapsaicin, karotenoidy, silice.



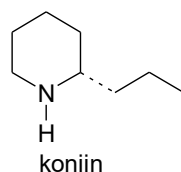
Zkoušky totožnosti

1. 0,2 g práškované drogy se 3 minuty protřepávají se 3 ml vody okyselené 3 kapkami kyseliny chlorovodíkové zředěné a zfiltruje se. Po přidání 5 kapek roztoku tetrajodortuťnatanu draselného (Mayerovo zkoumadlo) k filtrátu se tvoří sraženina alkaloidů.
2. 1 g práškované drogy se protřepe s 5 ml acetonu, zfiltruje se, okyselí se 4 kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové, přidá se 0,1 g metavanadičnanu amonného a promísí se. Roztok se zbarví zeleně (kapsaicin).
3. 0,1 g práškované drogy se na porcelánové misce nasype na koncentrovanou kyselinu sírovou. Prášek se zbarví modrozeleně, později hnědozeleně (kapsanthin).

#### 1.1.4.2. Conii fructus – Bolehlavový plod

Je to usušený plod (dvojnažky) *Conium maculatum* L., bolehlav plamatý, Apiaceae.

Obsahuje alkaloid koniin, olej.



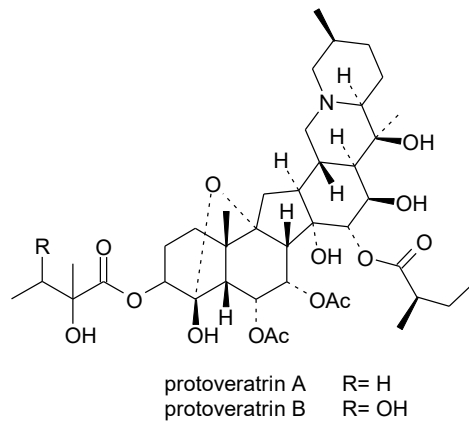
Zkoušky totožnosti:

1. Po povlhčení práškové drogy kapkou roztoku hydroxidu draselného vzniká nepříjemný zápach po myšíně (koniin).
2. Řez drogy po povlhčení kyselinou sírovou a kapkou Mandelinova zkoumadla se zbarvuje červenofialově (koniin).

#### 1.1.4.3. Veratri albi radix – Kořen kýchavice bílé

Je to usušený oddenek s kořeny druhu *Veratrum album* L., kýchavice bílá, Melanthiaceae.

Hlavní obsahové látky: steroidní alkaloidy.



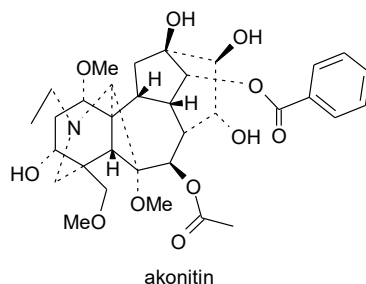
Zkoušky totožnosti:

1. 0,5 g drogy se 3 minuty protřepává s 5 ml vody, okyselené 3 kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové a výluh se zfiltruje. K filtrátu se přidá 5 kapek Mayerova zkoumadla; vznikne žlutobílá sraženina (alkaloidy).
2. K řezu drogou se na podložním sklíčku přikápně 1 kapka koncentrované kyseliny sírové; řez se barví žlutě oranžově, pak oranžově až červeně fialově (alkaloidy).

#### 1.1.4.4. Aconiti tuber – Omějový kořen

Je to usušená hlíza a oddenek druhu *Aconitum callibotryon* Reichenb. (syn. *Aconitum napellus* L.), *A. plicatum* Koechler ex Reichenb., oměj šalamounek, Ranunculaceae.

Hlavní obsahové látky: 0,3-1,5 % směsi diterpenových esterových alkaloidů, hlavní je akonitin.



Zkoušky totožnosti:

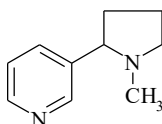
0,2 g práškové drogy se povaří se směsí 5 ml vody a 5 kapek roztoku zředěné kyseliny chlorovodíkové a odvar se zfiltruje. Filtrát se rozdělí na dvě části:

1. K první části se přidá 5 kapek roztoku tetrajodortuřnatanu draselného (Mayerovo zkoumadlo). Vznikne sraženina alkaloidů.
2. Ke druhé části se přidá roztok kyseliny fosfomolybdenové. Tvoří se jemná sraženina (alkaloidy).

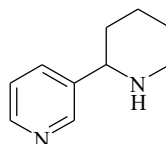
#### 1.1.4.5. Nicotianae folium - Tabákový list

*Nicotiana tabacum*, tabák viržinský, *Solanaceae*

Obsahové látky: alkaloidy (0,6-3 % nikotinu, anabasin).



nikotin



anabasin

Zkoušky totožnosti:

1. Drogu navlhčíme amoniakálním roztokem chloroformu, promísíme a uvolněný tmavě hnědý extrakt nanese kapilárou na čtvereček filtračního papíru. Nadbytek chloroformu vysušíme a papír detekujeme Dragendorffovým zkoumadlem. V přítomnosti nikotinu se objeví červená skvrna.
2. Tenkovrstvá chromatografie

*Zkoušený roztok:* 5 cigaret se navlhčí 3 ml 20% NaOH a extrahuje se 1 hodinu v Soxhletově aparatuře diethyletherem nebo petroletherem. Roztok alkaloidů v organickém rozpouštědle se třikrát protřepe 25 ml 11% HCl. Spojené kyselé výluhy se zalkalizují 20% NaOH na pH 11 a filtrát se kvantitativně (třikrát) vytřepe vždy s 25 ml diethyletheru.



Spojené diethyletherové extrakty se odpaří na vodní lázni a olejovitý zbytek se vyhodnotí na tenké vrstvě.

*Vyvíjecí soustava:* benzen : methanol (9:1, V/V).

*Detekční zkoumadlo:* roztok jodobismutitanu draselného (zkoumadlo Dragendorffovo).

Zkoušený roztok se nanese na vrstvu a nechá se vyvíjet po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší, postříká detekčním zkoumadlem a pozoruje na denním světle.

