

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA
Ústav přírodních léčiv

PRAKTICKÁ CVIČENÍ Z FARMAKOLOGIE

Suchý Václav, Daňková Iva, Dvorská Margita, Hrazdilová Eva,
Kubínová Renata, Šmejkal Karel, Špačková Věra, Žemlička Milan

BRNO 2013



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

PŘEDMLUVA

Farmakognozie je interdisciplinární věda, která představuje jednu z pěti základních oblastí farmaceutického vzdělávání. Zahrnuje studium fyzikálních, chemických, biochemických a biologických vlastností drog biogenního původu, jejich obsahových látek, potenciálních drog a jejich obsahových látek a hledání nových léčiv z přírodních zdrojů.

Skriptum je určené studentům magisterského studijního programu farmacie. Poskytne studentům základ, z něhož budou vycházet při hodnocení rostlinných drog v praktickém cvičení z farmakognozie. Skriptum neuvádí všechny používané rostlinné drogy, přináší výběr se zaměřením na drogy, které jsou jednak důležité v praxi, jednak jsou charakteristické svou strukturou nebo obsahovými látkami. Dominantní vliv na obsah skriptu mají metody, postupy a zařazení drog v Českém lékopisu 2009. Dále jsou uvedeny i některé drogy, které slouží jako důležité suroviny, bez nichž se výroba léčiv neobejde.

Skriptum je formálně rozděleno na dvě části. V *Obecné části* jsou uvedeny základní informace a údaje týkající se především obecných zkušebních postupů pro posuzování drog, se zvláštním zřetelem k ČL 2009. *Speciální část* obsahuje návody pro zkoušky totožnosti a kvantitativní hodnocení obsahových látek jednotlivých drog uspořádaných do skupin podle jejich hlavních obsahových látek. Léčivou hodnotu rostliny, resp. drogy, určují obsahové látky. Jejich množství závisí na mnoha faktorech a může být různé, proto je hodnocení obsahových látek drog věnována hlavní pozornost. Jak při kvalitativních reakcích, tak při hodnocení obsahu účinných látek jsme vycházeli ze struktury hodnocené látky a snažili jsme se podat výklad mechanismu jednotlivých reakcí, pokud je znám. Proto jsme do úvodních částí jednotlivých skupin obsahových látek uvedli strukturní vzorce příslušných látek.

Smyslem a cílem praktického cvičení je individuální obohacení vědomostí a osvojení si znalostí, dovedností a specifických postupů při hodnocení biogenních léčiv každým studentem. Správnost svého pozorování a z něho vyplývající závěry si studenti ověřují konzultací s učitelem.

Autoři

OBSAH

1. FARMAKOGNOSTICKÉ HODNOCENÍ DROG	8
2. ČESKÝ LÉKOPIS 2009 (ČL 2009) Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX)	10
2.1. <i>OBECNÉ ČLÁNKY</i>	10
2.1.1. PLANTAE MEDICINALES – ROSTLINNÉ DROGY	10
2.1.2. PLANTAE MEDICINALES AD POTIONEM AQUOSAM - ROSTLINNÉ DROGY URČENÉ K PŘÍPRAVĚ ČAJŮ	13
2.1.3. PLANTARUM MEDICINALIUM PRAEPARATA - PŘÍPRAVKY Z ROSTLINNÝCH DROG	14
2.1.4. ETHEROLEA - SILICE	14
2.1.5. EXTRACTA – EXTRAKTY	16
2.1.6. OLEA PLANTARUM PINGUIA - ROSTLINNÉ MASTNÉ OLEJE	18
2.2. <i>VŠEOBECNÉ ZÁSADY – OBECNÁ USTANOVENÍ, ČESKÝ LÉKOPIS 2009 (ČL 2009) - PHARMACOPOEA BOHEMICA MMIX (PH. B. MMIX)</i>	19
2.3. <i>ZKOUŠENÍ DROG</i>	23
2.3.1. ZKUŠEBNÍ METODY	23
2.3.2. FARMAKOGNOSTICKÉ METODY.....	26
3. SACHARIDY	43
3.1. <i>MONOSACHARIDY</i>	43
3.2. <i>OLIGOSACHARIDY</i>	46
3.3. <i>KVALITATIVNÍ ANALÝZA SACHARIDŮ</i>	47
3.3.1. ANALYTICKÉ METODY	49
3.3.2. REDUKČNÍ VLASTNOSTI SACHARIDŮ	49
3.3.3. ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI SACHARIDŮ PODLE ČL 2009	51
3.3.4. OXIDACE SACHARIDŮ IONTY KOVŮ	52
3.3.4.1. Fehlingovo zkoumadlo – komplexní měďnatá sůl.....	52
3.3.4.2. Barfoedovo zkoumadlo – roztok octanu měďnatého	52
3.3.4.3. Tollensovo zkoumadlo – komplexní amoniakální sůl stříbra $[Ag(NH_3)_2]^+$	53
3.3.4.4. Nylanderovo zkoumadlo - komplexní bismutitá sůl	53
3.3.4.5. Boettgerova reakce	53
3.3.4.6. Nitrochromová reakce	53
3.3.5. BAREVNÉ REAKCE SACHARIDŮ	54
3.3.5.1. <i>Molischova zkouška</i> (reakce s α -naftolem).....	54
3.3.5.2. <i>Selivanovova zkouška</i> (reakce s resorcinolem)	54
3.3.5.3. <i>Anthronová zkouška</i> (reakce s anthronem)	54
3.3.5.4. Reakce s octanem olovnatým	55
3.3.6. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SACHARIDŮ	55
3.3.7. TESTOVANÉ SUBSTANCE A DROGY	55
3.3.7.1. Glucosum monohydricum – Glukosa monohydrát (ČL 2009)	55
3.3.7.2. Galactosum – Galaktosa (ČL 2009).....	56
3.3.7.3. Fructosum – Fruktosa (ČL 2009) (syn. levulosa)	56
3.3.7.4. Xylosum – Xylosa (ČL 2009).....	56
3.3.7.5. Xylitolum – Xylitol (ČL 2009).....	56
3.3.7.6. Mannitolum - Mannitol (ČL 2009).....	57
3.3.7.7. Lactosum anhydricum – Laktosa bezvodá (ČL 2009)	57
3.3.7.8. Saccharosum – Sacharosa (ČL 2009)	58
3.3.7.9. Mel – Med (ČL 2009).....	58
3.3.7.10. Malti extractum – Sladový výtažek	59
3.3.7.11. Ceratoniae fructus – Svatojánský chléb.....	60

3.3.7.12.	Passulae minores – Hrozinky.....	60
3.3.7.13.	Cynosbati fructus – Šípek (ČL 2009) syn. Rosae pseudo-fructus.....	60
3.3.8.	ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI	61
3.4.	POLYSACHARIDY	62
3.4.1.	ŠKROBY, CELULOSA A INULIN	62
3.4.1.1.	Oryzae amyllum – Rýžový škrob (ČL 2009).....	63
3.4.1.2.	Solani amyllum – Bramborový škrob (ČL 2009)	63
3.4.1.3.	Tritici amyllum – Pšeničný škrob (ČL 2009)	64
3.4.1.4.	Dextrinum – Dextrin (ČL 2009)	64
3.4.1.5.	Inulinum – Inulin	65
3.4.1.6.	Cellulosum - celulosa	66
3.4.1.7.	Cellulosi pulvis – Celulosa prášková (ČL 2009)	66
3.4.1.8.	Cellulosum ligni – Buničitá vata (ČL 2009).....	67
3.4.1.9.	Lana mixta depurata – Obvazová vata čištěná (ČL 2009).....	67
3.4.2.	SLIZY A KLOVATINY	68
3.4.2.1.	Důkaz slizu v drogách	69
3.4.2.2.	Hodnocení slizových drog – Číslo bobtnavosti (ČL 2009).....	69
3.4.2.3.	Agar – Agar (ČL 2009).....	69
3.4.2.4.	Althaeae folium – Proskurníkový list (ČL 2009).....	70
3.4.2.5.	Althaeae radix – Proskurníkový kořen (ČL 2009).....	71
3.4.2.6.	Cyamopsidis seminis pulvis – Guar (ČL 2009).....	71
3.4.2.7.	Guar galactomannanum – Guar galaktomannan (ČL 2009)	72
3.4.2.8.	Farfarae folium – Podbělový list (ČL 2009).....	72
3.4.2.9.	Fucus – Chaluha (ČL 2009).....	72
3.4.2.10.	Lichen islandicus – Lišejník islandský (ČL 2009).....	73
3.4.2.11.	Lini semen – Lněné semeno (ČL 2009).....	74
3.4.2.12.	Malvae sylvestris flos – Květ slézu lesního (ČL 2009)	74
3.4.2.13.	Plantaginis folium – Jitrocelový list (ČL 2009) syn. Plantaginis lanceolatae folium.	74
3.4.2.14.	Plantaginis ovatae semen – Semeno jitrocele vejčitého (ČL 2009).....	74
3.4.2.15.	Plantaginis ovatae testa – Osemení jitrocele vejčitého (ČL 2009).....	75
3.4.2.17.	Acaciae gummi – Arabská klovatina (ČL 2009)	75
3.4.2.18.	Acaciae mucilago – Sliz z arabské klovatiny (ČL 2009).....	76
3.4.2.19.	Tragacantha - Tragant (ČL 2009)	77
3.4.2.20.	Xanthani gummi – Xanthanová klovatina (ČL 2009).....	77
4.	GLYKOSIDY JAKO HLAVNÍ ÚČINNÉ LÁTKY DROG	79
4.1.	FENOLOVÉ GLYKOSIDY	79
4.1.1.	KVALITATIVNÍ DŮKAZ FENOLOVÝCH GLYKOSIDŮ.....	80
4.1.2.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FENOLOVÝCH GLYKOSIDŮ	80
4.1.3.	DROGY S OBSAHEM FENOLOVÝCH GLYKOSIDŮ	81
4.1.3.1.	Salicis cortex – Vrbová kůra (ČL 2009).....	81
4.1.3.2.	Salicis corticis extractum siccum – Extrakt z vrbové kůry suchý (ČL 2009)	82
4.1.3.3.	Uvae ursi folium – Medvědicový list (ČL 2009).....	82
4.1.3.4.	Myrtilli folium – Borůvkový list	82
4.1.3.5.	Vitis idaeae folium – Brusinkový list	83
4.1.3.6.	Zkoušky totožnosti pro výše uvedené tři drogy	83
4.1.3.7.	Stanovení obsahu fenolových glykosidů	84
4.2.	KUMARINY	87
4.2.1.1.	Asperulae herba - Mařinková nať	88
4.2.1.2.	Levistici radix - Libečkový kořen (ČL 97 a ČL 2009)	88
4.2.1.3.	Bergamottae etheroleum - Bergamotová silice (ČL 2009)	89
4.3.	FLAVONOIDY	91
4.3.1.	KVALITATIVNÍ DŮKAZ FLAVONOIDŮ.....	92
4.3.2.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FLAVONOIDŮ	93
4.3.3.	DROGY S OBSAHEM FLAVONOIDŮ	94
4.3.3.1.	Fagopyri herba – Pohanková nať (ČL 2009)	94
4.3.3.2.	Aurantii amari pericarpium – Oplodí hořkého pomeranče (ČL 2009).....	95

4.3.3.3.	Betulae folium – Březový list (ČL 2009)	96
4.3.3.4.	Calendulae flos – Měsíčkový květ (ČL 2009)	99
4.3.3.5.	Crataegi folium cum flore – Hlohový list s květem (ČL 2009)	100
4.3.3.6.	Crataegi fructus - Hlohový plod (ČL 2009).....	103
4.3.3.7.	Diosminum – Diosmin (ČL 2009).....	103
4.3.3.8.	Equiseti herba – Přesličková nať (ČL 2009).....	104
4.3.3.9.	Passiflorae herba – Mučenková nať (ČL 2009)	106
4.3.3.10.	Polygoni avicularis herba – Nať rdesna ptačího (ČL 2009).....	108
4.3.3.11.	Sambuci nigrae flos - Květ bezu černého (ČL 2009).....	110
4.3.3.12.	Solidaginis virgaureae herba – Nať zlatobýlu obecného (ČL 2009).....	112
4.3.3.13.	Tiliae flos – Lipový květ (ČL 2009).....	114
4.3.3.14.	Violae herba cum flore – Violková nať kvetoucí (ČL 2009).....	115
4.3.3.15.	Propolis – Propolis.....	115
4.4.	ANTOKYANY	117
4.4.1.	KVALITATIVNÍ REAKCE ANTOKYANŮ	118
4.4.1.1.	Barevná reakce	118
4.4.1.2.	Tenkovrstvá chromatografie	118
4.4.2.	DROGY S OBSAHEM ANTHOKYANŮ	118
4.4.2.1.	Cyani flos – Chrpový květ.....	118
4.4.2.2.	Hibisci sabdariffae flos – Květ ibišku sudánského (ČL 2009)	119
4.4.2.3.	Malvae sylvestris flos – Květ slézu lesního (ČL2009)	119
4.5.	ANTHRACHINONOVÉ GLYKOSIDY	121
4.5.1.	KVALITATIVNÍ DŮKAZ ANTHRAGLYKOSIDŮ	122
4.5.2.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ANTHRAGLYKOSIDŮ	124
4.5.3.	DROGY S OBSAHEM ANTHRACHINONŮ	124
4.5.3.1.	Aloe barbadensis – Aloe barbadoská (ČL 2009)	124
4.5.3.2.	Aloe capensis – Aloe kapská (ČL 2009).....	124
4.5.3.3.	Frangulae cortex – Krušinová kůra (ČL 2009).....	126
4.5.3.4.	Rhamni purshianae cortex – Kůra řešetláku Purshova (ČL 2009).....	127
4.5.3.5.	Rhei radix – Reveňový kořen (ČL 2009).....	128
4.5.3.6.	Sennae folium - Sennový list (ČL 2009)	130
4.5.3.7.	Chrysarobinum - Chrysarobin	133
4.5.3.8.	Hyperici herba – Třezalková nať (ČL 2009)	133
4.6.	KARDIOAKTIVNÍ GLYKOSIDY	136
4.6.1.	KVALITATIVNÍ REAKCE KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ	137
4.6.1.1.	Reakce typické pro kardenolidy	137
4.6.1.2.	Reakce vázáné na cukernou složku.....	138
4.6.1.3.	Reakce charakteristické pro steroidy	138
4.6.2.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ	139
4.6.3.	DROGY S OBSAHEM KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ	139
4.6.3.1.	Digitalis purpureae folium – List náprstníku červeného (ČL 2009)	139
4.6.3.2.	Digitalis lanatae folium – List náprstníku vlnatého	142
4.6.3.3.	Digitoxinum – Digitoxin (ČL 2009), Digoxinum – Digoxin (ČL 2009)	143
4.6.3.4.	Ouabainum octahydricum – Ouabain oktahydrát (ČL 2009) dřívě: g-Strophanthin	143
4.6.3.5.	Convallariae herba – Konvalinková nať	144
4.7.	SAPONINY	146
4.7.1.	KVALITATIVNÍ REAKCE SAPONINŮ	147
4.7.1.1.	Srážecí reakce	147
4.7.1.2.	Barevné reakce	147
4.7.2.	KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ SAPONINŮ	148
4.7.2.1.	Stanovení čísla pěnivosti podle Koflera	149
4.7.3.	DROGY S OBSAHEM SAPONINŮ	149
4.7.3.1.	Primulae radix – Prvosenkový kořen (ČL 2009)	149
4.7.3.2.	Saponariae radix – Kořen mydlice lékařské	150
4.7.3.3.	Polygalae (Senegae) radix – Senegový kořen (ČL 2009)	150
4.7.3.4.	Verbasci flos – Diviznový květ (ČL 2009).....	151
4.7.3.5.	Herniariae herba – Průrtníková nať.....	152

4.7.3.6.	Ononidis radix – Jehlicový kořen (ČL 2009)	153
4.7.3.7.	Liquiritiae radix – Lékořicový kořen (ČL 2009)	154
4.8.	HOŘČINY	158
4.8.1.	KVALITATIVNÍ DŮKAZ HOŘČIN	158
4.8.2.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HOŘČIN	158
4.8.2.1.	Stanovení čísla hořkosti (ČL 2009)	158
4.8.3.	DROGY S OBSAHEM HOŘČIN	160
4.8.3.1.	Absinthii herba - Pelyňková nať (ČL 2009)	160
4.8.3.2.	Centaurii herba – Zeměžlučová nať (ČL 2009)	162
4.8.3.3.	Gentianae radix – Hořcový kořen (ČL 2009)	163
4.8.3.4.	Marrubii herba – Jablečnicková nať (ČL2009)	164
4.8.3.5.	Trifolii fibrini folium – Vachtový list (ČL2009)	165
4.9.	TŘÍŠLOVINY	168
4.9.1.	HYDROLYZOVATELNÉ TŘÍŠLOVINY	168
4.9.2.	KONDENZOVANÉ TŘÍŠLOVINY	169
4.9.3.	KOMPLEXNÍ TŘÍŠLOVINY	169
4.9.4.	KVALITATIVNÍ REAKCE TŘÍŠLOVIN.....	170
4.9.4.1.	Srážecí reakce	170
4.9.4.2.	Barevné reakce	172
4.9.5.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ TŘÍŠLOVIN – STANOVENÍ VEŠKERÝCH POLYFENOLŮ KOLORIMETRICKOU METODOU	174
4.9.6.	STANOVENÍ TŘÍŠLOVIN V ROSTLINNÝCH DROGÁCH (ČL 2009)	175
4.9.7.	DROGY S OBSAHEM TŘÍŠLOVIN	176
4.9.7.1.	Agrimoniae herba – Řepíková nať (ČL 2009)	176
4.9.7.2.	Alchemillae herba – Kontryhelová nať (ČL 2009)	177
4.9.7.3.	Bistortae rhizoma – Rdesnový oddenek (ČL 2009).....	178
4.9.7.4.	Hamamelidis folium – Vilínový list (ČL 2009).....	179
4.9.7.5.	Quercus cortex – Dubová kůra (ČL 2009).....	180
4.9.7.6.	Tormentillae rhizoma – Nátržníkový oddenek (ČL 2009).....	180
4.9.7.7.	Zkoušky totožnosti.....	181
4.10.	KYANOGENNÍ GLYKOSIDY	182
4.10.1.1.	Laurocerasi folium - Bobkovišňový list	182
4.11.	THIOGLYKOSIDY	184
4.11.1.1.	Sinapis semen - Semeno černohořčice.....	184
4.11.1.2.	Sinapis albae semen - Semeno bílé hořčice	185
5.	SILICE	186
5.1.1.	KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ SILIC	188
5.1.2.	ZKOUŠKY NA ČISTOTU.....	189
5.1.3.	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SILIC	189
5.1.3.1.	Stanovení obsahu silic v rostlinných drogách.....	190
5.1.4.	DROGY S OBSAHEM SILIC	194
5.1.4.1.	Absinthii herba – Pelyňková nať (ČL 2009).....	194
5.1.4.2.	Anisi fructus – Anýzový plod (ČL 2009)	195
5.1.4.3.	Aurantii amari pericarpium – Oplodí hořkého pomeranče (ČL 2009).....	196
5.1.4.4.	Balsamum peruvianum – Peruánský balzám (ČL 2009).....	197
5.1.4.5.	Carvi fructus – Kmínový plod (ČL 2009).....	199
5.1.4.6.	Caryophylli flos – Hřebíčkovcový květ (ČL 2009)	200
5.1.4.7.	Chamomillae romanae flos – Květ heřmánku římského (ČL 2009)	201
5.1.4.8.	Cinnamomi cortex – Skořicovníková kůra (ČL 2009).....	202
5.1.4.9.	Coriandri fructus – Koriandrový plod (ČL 2009).....	203
5.1.4.10.	Eucalypti folium – Blahovičnickový list (ČL 2009)	204
5.1.4.11.	Foeniculi amari fructus – Plod fenyklu obecného pravého (ČL 2009)	205
5.1.4.12.	Foeniculi dulcis fructus – Plod fenyklu obecného sladkého (ČL 2009)	206
5.1.4.13.	Juniperi fructus – Jalovcový plod (ČL 2009)	207
5.1.4.14.	Lavandulae flos – Levandulový květ (ČL 2009)	209
5.1.4.15.	Matricariae flos – Heřmánkový květ (ČL 2009).....	210
5.1.4.16.	Melissae folium – Meduňkový list (ČL 2009).....	211

5.1.4.17.	Menthae piperitae folium – List máty peprné (ČL 2009)	213
5.1.4.18.	Millefolii herba – Řebříčková nať (ČL 2009).....	215
5.1.4.19.	Rosmarini folium – Rozmarýnový list (ČL 2009).....	217
5.1.4.20.	Salviae officinalis folium – List šalvěje lékařské (ČL 2009).....	218
5.1.4.21.	Salviae trilobae folium – List šalvěje trojlaločné (ČL 2009).....	219
5.1.4.22.	Serpylli herba – Mateřídoušková nať (ČL 2009).....	220
5.1.4.23.	Thymi herba – Tymiánová nať (ČL 2009).....	221
5.1.4.24.	Valerianae radix - Kozlíkový kořen (ČL 2009).....	223
6.	ALKALOIDY	225
6.1.1.	KVALITATIVNÍ REAKCE ALKALOIDŮ	226
6.1.1.1.	Srážecí reakce	226
6.1.1.2.	Barevné reakce	227
6.1.2.	STANOVENÍ ALKALOIDŮ	229
6.1.2.1.	Příprava drogy a extrakce alkaloidů	229
6.1.2.2.	Čištění výluhu.....	231
6.1.2.3.	Vlastní kvantitativní stanovení alkaloidů.....	231
6.1.3.	DROGY S OBSAHEM CHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ.....	233
6.1.3.1.	Cinchonae cortex – Chinovníková kůra (ČL 2009).....	233
6.1.4.	DROGY S OBSAHEM TROPANOVÝCH ALKALOIDŮ	236
6.1.4.1.	Belladonnae folium – Rulíkový list (ČL 2009)	237
6.1.4.2.	Belladonnae radix – Rulíkový kořen	237
6.1.4.3.	Hyoscyami folium – Blínový list.....	238
6.1.4.4.	Stramonii folium – Durmanový list (ČL 2009)	238
6.1.5.	DROGY S OBSAHEM ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ	241
6.1.5.1.	Ipecacuanhae radix – Hlavěnkový kořen (ČL 2009)	241
6.1.6.	DROGY S OBSAHEM PURINOVÝCH BAZÍ	242
6.1.6.1.	Colae semen – Kolové semeno (ČL 2009)	243
6.1.6.2.	Theae folium – Čajovníkový list	246
6.1.6.3.	Coffeae semen – Semeno kávovníku	246
6.1.6.4.	Maté folium – List cesmíny paraguayské (Yerba maté).....	246
6.1.7.	ALKALOIDY OPIA A SOUVISEJÍCÍ DROGY	247
6.1.7.1.	Opium crudum – Opium surové (ČL 2009).....	247
6.1.7.2.	Opiové alkaloidy uvedené v ČL 2009	248
6.1.7.3.	Papaveris fructus maturus – Zralý plod máku	248
6.1.8.	DALŠÍ TESTOVANÉ ALKALOIDNÍ DROGY	252
6.1.8.1.	Capsici fructus – Paprikový plod.....	252
6.1.8.2.	Conii fructus – Bolehlavový plod.....	252
6.1.8.3.	Veratri albi radix – Kořen kýchavice bílé.....	253
6.1.8.4.	Aconiti tuber – Omějový kořen	253
6.1.8.5.	Nicotianae folium - Tabákový list	254

ČÁST OBECNÁ

1. FARMAKOGNOSTICKÉ HODNOCENÍ DROG

Léčivou hodnotu rostliny, resp. drogy, určují *obsahové látky*. Drogy vzniklé převážně usušením materiálů biologického původu jsou značně variabilní nejen tvarem a barvou, ale i obsahem účinných látek. Tato variabilita je podmíněna faktory genetickými, podmínkami prostředí, ve kterém rostlina nebo živočich žije a v nemalé míře způsobem zpracování (doba sběru, způsob sušení, rozdrobnění a skladování). Často dochází také k různým záměnám nebo i porušování drog, ať už následkem neznalosti nebo nepozornosti, nebo dokonce záměrně s cílem zlepšit vzhled, nebo nahradit drogu drahou drogou levnější.

K zajištění účinnosti a konstantního vzhledu drogy předepisují lékopisy přesná kritéria. Český lékopis 2009 (dále ČL 2009) uvádí u rostlinných drog za latinským a českým názvem definici, zda je předmětem článku např. celá droga nebo práškovaná droga. Pokud se článek týká celé i práškované drogy, záhlaví článku to jasně udává. Následuje údaj nazvaný Obsah, převážně určující nejmenší procentuální obsah účinné látky (látek). Dále jsou u většiny drog popsány vlastnosti (organoleptické zkoušky).

Zkoušky totožnosti sestávají zpravidla ze tří částí: A) podrobný makroskopický popis drogy, včetně lupového obrazu; B) mikroskopická analýza upráškované drogy s popisem charakteristických znaků; C) Tenkovrstvá chromatografie – popisuje přípravu zkoušeného roztoku (extrakt analyzované drogy) a porovnávacího roztoku, (standard), stacionární a mobilní fáze, podmínky vyvíjení a detekci a vlastní hodnocení. Zkoušky na čistotu zahrnují stanovení cizích příměsí, stanovení vody v droze, celkový popel a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové. Nakonec je uvedena analytická (někdy speciální) metoda na stanovení obsahu, která se liší podle charakteru studované látky (látek).

Makroskopické metody jsou takové, při nichž se pozoruje droga pouhými smysly bez použití přístrojů. Většinou se takto vyšetřuje droga celá nebo hrubě řezaná, někdy také droga práškovaná nebo práškovitá. Droga v celku je v mnohých případech tak charakteristická, že její totožnost může být určena již podle vnějšího vzhledu a tvaru. Poněkud obtížnější je to již u drog řezaných. Při makroskopickém vyšetřování drog si

všímáme také jejich vůně, barvy a chuti. Čistotu drog zjišťujeme makroskopicky tak, že zkoumáme, zda droga neobsahuje přímíseniny jiných drog, které mají odlišné znaky.

Mikroskopickým hodnocením drog rozumíme zkoumání anatomické stavby rostlinných orgánů pomocí mikroskopu, a to na příčných nebo podélných řezech nebo také na plošných preparátech (zvláště listy a květy). Také drogy práškované a práškovité vyšetřujeme mikroskopicky. Podle charakteristických znaků zjišťujeme totožnost drog a zároveň jejich čistotu, pátrajíce po znacích odlišných a typických pro jiné drogy.

Chemické hodnocení drog spočívá v důkazu a kvantifikaci obsahových látek, které dávají typické reakce s vhodnými chemickými zkoumadly. Tím lze drogy identifikovat nebo potvrdit jejich totožnost zjištěnou makroskopicky či mikroskopicky. Chemickými zkouškami lze také stanovit čistotu drog důkazem znečištěnin a přímísenin. Ke zkouškám na čistotu patří rovněž stanovení sušiny a popela.

Kromě totožnosti a čistoty drog se stanovuje chemickými metodami především přítomnost a obsah účinných látek. Dominantní postavení při důkazu obsahových látek rostlinných drog má tenkovrstvá chromatografie, méně pak reakce barevné a srážecí se specifickými zkoumadly. Pro stanovení obsahu látek se používají metody gravimetrické, volumetrické, kolorimetrické, polarimetrické, refraktometrické, chromatografické aj. K chemickým kvantitativním metodám počítáme také stanovení zbytku po vysušení extraktu. Může-li být totožnost nebo čistota drogy ověřena mikrosublímací, je uvedena i tato zkouška.

Hodnocení drog je úplné tehdy, použije-li se všech tří způsobů: makroskopického, mikroskopického a chemického, jejichž kombinací lze dojít ke správnému výsledku.

2. ČESKÝ LÉKOPIS 2009 (ČL 2009) Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX)

V následující části jsou uvedeny ty části nebo kapitoly lékopisu, které se vztahují k farmakognostickému hodnocení drog.

2.1.OBECNÉ ČLÁNKY

2.1.1.PLANTAE MEDICINALES – ROSTLINNÉ DROGY

Definice: Jsou to většinou celé, rozlámané nebo řezané rostliny, části rostlin, řasy, houby a lišejníky v nezpracovaném stavu, obvykle usušené, někdy čerstvé. Mezi rostlinné drogy se řadí také vybrané exsudáty, které nejsou specificky zpracovány. Rostlinné drogy jsou jednoznačně definovány botanickým vědeckým názvem podle binominálního systému (rod, druh, odrůda a jméno autora).

Výroba: Získávají se z pěstovaných nebo z planě rostoucích rostlin. Jakost rostlinných drog je podstatně zaručena vhodným sběrem, pěstováním, sklizní, sušením, rozdrobňováním a skladovacími podmínkami. Rostlinné drogy jsou, je-li to možné, prosté nečistot, jako je zemina, prach, a jiné kontaminanty, jako jsou plísňe, hmyz a ostatní živočišné kontaminanty. Rostlinné drogy nejsou shnilé.

Při použití dekontaminace je třeba prokázat, že obsahové látky v droze nebyly dotčeny a že droga neobsahuje škodlivé zbytky. Použití ethylenoxidu pro dekontaminaci rostlinných drog není povoleno.

Zkoušky totožnosti: Totožnost rostlinných drog je prokázána makroskopickým a mikroskopickým popisem a dále mohou být požadovány další zkoušky (např. tenkovrstvá chromatografie).

Zkoušky na čistotu:

Cizí příměsi. Nejvýše 2 %, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak. Zkouška se provede, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak. K vyloučení záměn rostlinných drog mohou být provedeny specifické dodatečné zkoušky.

Ztráta sušením. Zkouška se provede, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

Stanovení vody destilací. Zkouška se provede místo zkoušky Ztráta sušením u rostlinných drog s vysokým obsahem silic.

Zbytky pesticidů. Rostlinné drogy vyhovují požadavkům zkoušky. Požadavky zohledňují charakter rostliny a, kde je to nutné, přípravek, v němž může být rostlina použita a, kde je to vhodné, i úplné záznamy o zacházení s drogou určité šarže.

Mikrobiologické znečištění. Doporučení, týkající se mikrobiologické jakosti přípravků obsahujících výhradně jednu nebo více rostlinných drog, jsou uvedeny ve stati *Mikrobiologická jakost léčivých přípravků*.

Mikrobiologická jakost léčivých přípravků

Při výrobě, balení, skladování a distribuci léčivých přípravků se musí přijmout vhodná opatření, aby se zajistila jejich mikrobiologická jakost. Léčivé přípravky by měly vyhovovat dále uvedeným požadavkům.

Kategorie 3 B. Přípravky k perorálnímu podání obsahující látky přírodního (živočišného, rostlinného nebo nerostného) původu, které nelze protimikrobně ošetřit a pro něž oprávněná autorita připouští mikrobiální kontaminaci použité látky překračující 10^3 životaschopných mikroorganismů v gramu nebo v mililitru. Nevztahuje se na přípravky z rostlin popsané ve 4. kategorii. Celkový počet životaschopných aerobních mikroorganismů nejvýše 10^4 aerobních bakterií a nejvýše 10^2 hub v gramu nebo v mililitru. Nejvýše 10^2 enterobakterií a některých jiných Gram-negativních bakterií v gramu nebo mililitru. Nepřítomnost *Salmonella* sp. (v 10 g nebo 10 ml). Nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1 g nebo 1 ml). Nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (v 1 g nebo v 1 ml).

Kategorie 4. Přípravky z rostlin sestávající jen z jedné nebo více rostlinných drog (celých, rozdrobněných, nebo práškovaných).

Přípravky z rostlin, k nimž se před použitím přidává vroucí voda. Celkový počet životaschopných mikroorganismů. Nejvýše 10^7 aerobních bakterií a nejvýše 10^5 hub v gramu nebo v mililitru. Nejvýše 10^2 *Escherichia coli* v gramu nebo v mililitru.

Přípravky z rostlin, k nimž se před použitím vroucí voda nepřidává. Celkový počet životaschopných mikroorganismů. Nejvýše 10^5 aerobních bakterií a nejvýše 10^4 hub v gramu nebo v mililitru. Nejvýše 10^3 enterobakterií a některých jiných Gram-negativních bakterií v gramu nebo v mililitru. Nepřítomnost *Escherichia coli* v gramu nebo v mililitru. Nepřítomnost *Salmonella* sp. (v 10 g nebo v 10 ml).

Celkový popel.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelné látky.

Číslo bobtnavosti.

Číslo hořkosti.

Těžké kovy. Je nutno zvážit riziko kontaminace rostlinných drog těžkými kovy. Není-li v jednotlivém článku předepsána zkouška na těžké kovy nebo specifické prvky, může být tato zkouška nebo zkoušky požadovány a schváleny.

Stanovení obsahu aflatoxinu B₁ v rostlinných drogách. Kde je to nutné, mohou být požadovány limity pro aflatoxiny.

Radioaktivní kontaminace. V některých specifických případech je nutné zvážit riziko radioaktivní kontaminace.

Stanovení obsahu. Proveďte se vhodnou metodou, není-li předepsáno nebo zdůvodněno a schváleno jinak.

Skladování: Chráněny před světlem.

2.1.2. PLANTAE MEDICINALES AD POTIONEM AQUOSAM - ROSTLINNÉ DROGY URČENÉ K PŘÍPRAVĚ ČAJŮ

syn. **Plantae ad ptisanam**

Definice: Čaje se skládají výhradně z jedné nebo více rostlinných drog určených k přípravě perorálních vodných přípravků, jako jsou odvary, nálevy nebo maceráty. Přípravují se v čas potřeby. Obvykle jsou distribuovány nerozplněné (bulk) nebo v sáčcích.

Rostlinné drogy vyhovují požadavkům jednotlivých příslušných článků Českého lékopisu, nebo v případě, že články nejsou vypracovány, vyhovují požadavkům článku *Plantae medicinales*.

Doporučení na mikrobiologickou jakost čajů bere v úvahu předepsaný způsob přípravy čaje (použije se vroucí nebo nevroucí voda).

Zkoušky totožnosti: Totožnost rostlinných drog v čajích se určuje botanickým hodnocením.

Zkoušky na čistotu: Stanovení podílu jednotlivých rostlinných drog v čajové směsi se provádí vhodnými metodami.

Čaje v sáčcích vyhovují následující zkoušce:

Hmotnostní stejnoměrnost. Stanoví se průměrná hmotnost dvaceti namátkově vybraných jednotek; plné sáčky čaje se jednotlivě zváží. Sáček se pak otevře tak, aby nedošlo k žádným ztrátám, důkladně se za pomoci štětce vyprázdní, prázdný sáček se zváží a z rozdílu se vypočítá hmotnost obsahu. Postup se opakuje s devatenácti zbývajících sáčků. Není-li uvedeno jinak, neliší se více než dva sáčky z dvaceti jednotlivých sáčků od průměrné hmotnosti o více procent, než uvádí tabulka; žádný ze sáčků se neliší o více než dvojnásobek.

Průměrná hmotnost	Odchylka v procentech
méně než 1,5 g	15 %
1,5 g až 2,0 g včetně	10 %
více než 2,0 g	7,5 %

Skladování: Chráněny před světlem.

2.1.3. PLANTARUM MEDICINALIUM PRAEPARATA - PŘÍPRAVKY Z ROSTLINNÝCH DROG

syn. **Plantae medicinales praeparatae**

Definice: Přípravují se extrakcí, destilací, lisováním, rozdrobňováním, čištěním, zahušťováním nebo fermentací z rostlinných drog. Zahrnují řezané nebo práškové rostlinné drogy, tinktury, extrakty, silice, lisované šťávy a zpracované exsudáty.

Čaje připravené z rostlinných drog vyhovují požadavkům článku *Plantae medicinales ad potionem aquosam*. Instantní čaje jsou tvořeny práškem nebo granulemi připravenými z jedné nebo několika rostlinných drog. Jsou určeny k přípravě perorálních roztoků těsně před použitím.

2.1.4. ETHEROLEA - SILICE

syn. **Aetherolea**

Definice: Jsou to vonné látky, obvykle komplexního složení, získané z botanicky definovaných rostlinných surovin destilací s vodní parou, suchou destilací nebo vhodným mechanickým postupem bez zahřívání. Silice se obvykle oddělují od vodné fáze fyzikálním postupem, který významně neovlivňuje jejich složení.

Silice se mohou podrobit vhodným následným úpravám a mohou tedy být komerčně dostupné jako deterpenované, deseskviterpenované, rektifikované nebo neobsahující složku „x“.

Deterpenovaná silice je silice, ze které byly částečně nebo úplně odstraněny monoterpenické uhlovodíky.

Deterpenovaná a deseskviterpenovaná silice je silice, ze které byly částečně nebo úplně odstraněny mono- a seskviterpenové uhlovodíky.

Rektifikovaná silice je silice, která byla podrobena frakční destilaci za účelem odstranění určitých složek nebo k úpravě složení.

Silice neobsahující složku „x“ je silice, která byla podrobena částečnému nebo celkovému odstranění jedné nebo více složek.

Výroba: V závislosti na článku může být rostlinná surovina čerstvá, zvadlá, sušená, celá, rozlámaná nebo rozemletá.

Destilace s vodní párou. Silice se získává proháněním vodní páry surovinou rostlinného původu ve vhodné aparatuře. Pára se může přivádět z vnějšího zdroje nebo může vznikat varem vody pod surovinou, nebo varem vody, ve které je surovina ponořena. Páry vody i silice kondenzují. Voda a silice se oddělí dekantací.

Suchá destilace. Silice se získává ohřevem lodyh, větviček, nebo kůry na vysokou teplotu ve vhodné aparatuře bez přístupu vody nebo páry.

Mechanický proces. Silice, obvykle označovaná jako „lisovaná za studena“, se získává mechanickým postupem bez jakéhokoliv ohřevu. Tento postup se používá zejména pro citrusové plody a zahrnuje lisování oleje z oplodí a následné oddělení fyzikálními prostředky.

V některých případech se může k silici přidat vhodná antioxidační látka.

Vlastnosti: Určí se vzhled a pach silice.

Zkoušky totožnosti: Silice se identifikují jejich chromatografickým profilem (plynová chromatografie) nebo, pokud není uvedeno, jinou požadovanou zkouškou (např. tenkovrstvá chromatografie).

Zkoušky na čistotu: Obecné zkoušky. Silice vyhovují předepsaným limitům následujících zkoušek:

Relativní hustota.

Index lomu.

Optická otáčivost.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Doplňující zkoušky: Je-li třeba, vyhovuje silice předepsaným limitům následujících zkoušek.

Teplota tuhnutí.

Číslo kyselosti.

Číslo peroxidové.

Cizí estery v silicích.

Zbytek po odpaření silic.

Voda v silicích.

Rozpustnost silic v ethanolu.

Padělký: Je-li to vhodné, mohou se provést zkoušky na přítomnost jednoho nebo více padělků tenkovrstvou chromatografií, plynovou chromatografií, je-li třeba za použití chirální kolony nebo jinými vhodnými metodami.

Skladování: Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněny před světlem.

Označování: V označení na obalu se uvede:

- vědecký název použité rostlinné suroviny;
- typ a/nebo chemotyp silice;
- metoda výroby;
- název a koncentrace jakékoliv přidané antioxidační látky;
- další výrobní postupy, které nejsou uvedeny v odstavci Definice.

2.1.5. EXTRACTA – EXTRAKTŮ

Definice: Jsou to přípravky tekuté (tekuté extrakty a tinktury), polotuhé (husté extrakty a oleopryskyřice) nebo pevné (suché extrakty), obvykle připravované z usušených rostlinných nebo živočišných drog.

Rozlišují se různé typy extraktů. Standardizované extrakty se upraví v přijatelném rozsahu na požadovaný obsah látek se známým léčebným účinkem; standardizace se dosahuje úpravou extraktu inertní látkou nebo smícháním extraktů různých šarží.

Kvantifikované extrakty se upraví na požadovaný obsah látek; úprava se provede smícháním extraktů různých šarží. Ostatní extrakty jsou definovány zejména výrobním postupem (charakterem rostlinné nebo živočišné drogy použité k extrakci; druhem rozpouštědla a podmínkami extrakce) a svými vlastnostmi.

Výroba: Extrakty se vyrábějí vhodnými metodami za použití ethanolu nebo jiných vhodných rozpouštědel. Různé šarže rostlinných nebo živočišných drog se před extrakcí smíchají. Extrahované rostlinné nebo živočišné drogy se mohou předem upravit, např. inaktivací enzymů, rozdrobněním nebo odtučněním. Kromě toho se mohou po extrakci odstranit nežádoucí látky.

Rostlinné i živočišné drogy a organická rozpouštědla použitá k výrobě extraktů vyhovují příslušnému lékopisnému článku.

Extrakce daným rozpouštědlem vede k typickému zastoupení charakteristických složek v extrahovaném materiálu; během výroby standardizovaných a kvantifikovaných extraktů purifikačními postupy se může toto zastoupení zvýšit nad očekávané hodnoty, takové extrakty se označují jako čištěné.

Zkoušky na čistotu: Kde je to vhodné, použijí se výsledky uvedené u jednotlivých použitých rostlinných a živočišných drog. U extraktů se provádějí, s přihlédnutím k výrobnímu postupu, zkoušky na mikrobiologickou jakost, těžké kovy, aflatoxiny a zbytky pesticidů.

Označování: V označení na obalu se uvede:

- název použité rostlinné nebo živočišné suroviny;
- zda se jedná o tekutý, hustý nebo suchý extrakt, nebo zda se jedná o tinkturu;
- u standardizovaných extraktů obsah složek se známým léčebným účinkem;
- u kvantifikovaných extraktů obsah složek (markerů) použitých pro kvantifikaci;
- poměr výchozího materiálu k získanému extraktu (extrakt bez pomocných látek);
- název rozpouštědla nebo rozpouštědel použitých k extrakci;
- kde je to vhodné, zda byla použita čerstvá rostlina nebo živočišná droga;
- kde je to vhodné, zda se jedná o čištěný extrakt;
- název a množství použitých pomocných látek, včetně stabilizátorů a protimikrobních látek;
- kde je to vhodné, zbytek po vysušení v procentech.

Extracta fluida – Tekuté extrakty

Jsou to tekuté přípravky, u nichž obvykle jeden hmotnostní nebo objemový díl odpovídá jednomu hmotnostnímu dílu usušené rostlinné nebo živočišné drogy. Tyto

přípravky jsou, je-li třeba, upraveny tak, že odpovídají požadavkům na obsah rozpouštědla a, kde je to vhodné, i na obsah složek.

Tincturae – Tinkтуры

Jsou to tekuté přípravky obvykle získávané za použití jednoho dílu rostlinné nebo živočišné drogy a deseti dílů extrakční tekutiny nebo jednoho dílu rostlinné nebo živočišné drogy a pěti dílů extrakční tekutiny.

Extracta spissa – Extrakty husté

Jsou to polotuhé přípravky získané odpařením nebo částečným odpařením tekutiny použité k extrakci.

Oleoresina – Oleopryskyřice

Jsou to polotuhé extrakty tvořené roztokem pryskyřice v silici a/nebo v mastném oleji, získané odpařením roztoku/roztoků použitých při jejich výrobě. Tento článek se vztahuje na oleopryskyřice získané extrakcí, ne na přírodní oleopryskyřice.

Extracta sicca – Extrakty suché

Jsou to tuhé přípravky získané odpařením extrakční tekutiny použité při jejich výrobě. U suchých extraktů je ztráta sušením nejvýše 5 %, nejsou-li limity zkoušky Ztráta sušením odlišné od limitů zkoušky 'Voda' uvedené v článku.

2.1.6. OLEA PLANTARUM PINGUIA - ROSTLINNÉ MASTNÉ OLEJE

Syn. Olea herbaria

Definice: Jsou to převážně tuhé nebo tekuté triacylglyceroly mastných kyselin. Mohou obsahovat malá množství jiných lipidů, vosků, volných mastných kyselin, parciální acylglycerolů nebo nezmýdelnitelné látky. Rostlinné mastné oleje se získávají ze semen, plodů nebo jader různých rostlin lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem, následně se mohou čistit a hydrogenovat. Je-li třeba, může se přidat vhodná antioxidační látka.

Panenský olej. Olej získaný z čerstvé drogy vysoké kvality mechanickými postupy (např. lisováním za studena nebo odstředováním).

Čištěný olej. Olej získaný lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem a následně buď alkalickým přečištěním (následované bělením a případnou dezodorací), nebo fyzikálním přečištěním.

Hydrogenovaný olej. Olej získaný lisováním a/nebo extrakcí rozpouštědlem a následně buď alkalicky nebo fyzikálně přečištěný, případně bělený, následně sušený, hydrogenovaný a dále bělený a dezodorizovaný.

Technologické postupy přípravy jednotlivých typů olejů spadají více do předmětu Farmaceutická technologie. Jsou uvedeny v ČL 2009.

2.2.VŠEOBECNÉ ZÁSADY – OBECNÁ USTANOVENÍ, ČESKÝ LÉKOPIS 2009 (ČL 2009) - PHARMACOPOEA BOHEMICA MMIX (PH. B. MMIX)

Lékopisné texty uvedené v Evropské části Českého lékopisu jsou překlady Evropského lékopisu, 6. vydání a jeho 1. a 2. doplňku do češtiny.

Léčivý přípravek musí vyhovovat požadavkům lékopisu po celou dobu své použitelnosti; odlišnou dobu použitelnosti a/nebo specifikace pro otevřené nebo načaté obaly může rozhodnout oprávněná autorita.

Léčivé látky, pomocné látky, léčivé přípravky a jiné výrobky popsané v člancích jsou určeny pro humánní a veterinární použití (není-li přesně vymezen jeden z těchto účelů) a pokud nevyhovují všem požadavkům uvedeným v článku, nejsou lékopisné jakosti.

Zkoušky na čistotu a stanovení obsahu nebo účinnosti popsané v lékopisu jsou oficiální metody, na nichž jsou založeny lékopisné normy. Se souhlasem oprávněné autority se pro kontrolní účely mohou použít alternativní analytické metody za předpokladu, že bude dosaženo shody s oficiálními metodami. V případě pochybností nebo sporu jsou rozhodující pouze lékopisné metody analýzy.

Obecné články. U látek a přípravků, které jsou předmětem jednotlivých článků, se také požaduje, aby vyhovovaly souvisejícím vhodným obecným článkům. Odkazy na

tyto související obecné články nejsou obvykle v jednotlivých člancích uvedeny. Obecné články a jednotlivé články se doplňují. Jestliže ustanovení obecného článku není použitelné pro určitý výrobek, je to výslovně uvedeno v jednotlivém článku.

Konvenční termíny. Výraz „oprávněná autorita“ značí národní, nadnárodní nebo mezinárodní orgán nebo organizaci, které mají oprávnění rozhodovat příslušné problémy. Může to být např. národní lékopisná autorita, autorita vystavující povolení k tomu, aby dané léčivo mohlo být uvedeno na trh s léčivy, nebo oficiální kontrolní laboratoř. *V České republice se oprávněnou autoritou v oblasti humánních léčiv rozumí zejména Státní ústav pro kontrolu léčiv a Ministerstvo zdravotnictví ČR, v oblasti veterinárních biopreparátů a léčiv Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv a Ministerstvo zemědělství ČR, v oblasti zabezpečující krizové situace (nouzový stav, stav ohrožení státu a válečný stav) Ministerstvo obrany ČR.*

Další ustanovení týkající se obecných statí a článků.

Množství. Ve zkouškách na čistotu s číselnými limity a ve stanoveních obsahu (účinnosti) se ke zkoušení předepisuje množství, jímž se rozumí množství přibližné. Množství skutečně použité, které se může lišit nejvýše o 10 % od předepsaného množství, se přesně naváží nebo odměří a výsledek se počítá z tohoto přesného množství. Ve zkouškách na čistotu, kde limit není udán číselně, ale obvykle závisí na porovnání s chováním porovnávací látky za stejných podmínek, se použije ke zkoušce předepsané množství. Také zkoumadla se používají v předepsaných množstvích.

Množství se naváží nebo odměří s přesností přiměřenou udanému stupni přesnosti. Pro vážení odpovídá přesnost ± 5 jednotek za poslední udanou číslici (např. 0,25 g představuje množství 0,245 až 0,255 g). Pro měření objemu je důležité, zda číslice za desetinnou čárkou je nula, nebo číslo končí nulou (např. 10,0 ml nebo 0,50 ml). V těchto případech se má objem měřit pipetou, odměrnou baňkou nebo byretou a podle toho, co je vhodné. Jinak se může použít odměrný válec nebo dělená pipeta. Objemy udané v mikrolitrech se měří mikropipetou nebo injekční mikrostříkačkou.

Přístroje a postupy. Odměrné skleněné nádoby odpovídají požadavkům třídy A příslušné mezinárodní normy vydané Mezinárodní organizací pro normalizaci. Není-li předepsáno jinak, analytické postupy se provádějí při teplotě 15 °C až 25 °C.

Vodní lázeň. Výraz „vodní lázeň“ znamená lázeň vroucí vody, není-li uvedena jiná teplota vody. Jiné metody zahřívání se mohou použít za předpokladu, že nebude překročena teplota 100 °C nebo předepsaná teplota.

Sušení a žihání do konstantní hmotnosti. Výrazy „vysušený do konstantní hmotnosti“ a „vyžiháný do konstantní hmotnosti“ znamenají, že dvě následující vážení se neliší o více než 0,5 mg; druhé vážení následuje po další době sušení nebo žihání přiměřené povaze a množství zbytku.

Zkoumadla. Správné provádění analytických postupů popsaných v lékopisu a spolehlivost výsledků závisí částečně na jakosti použitých zkoumadel. Předpokládá se použití zkoumadel analytického stupně jakosti.

Rozpouštědla. Neuvádí-li se název rozpouštědla, znamená výraz „roztok“ vodný roztok. Výraz „voda destilovaná“ označuje čištěnou vodu připravenou destilací.

Výraz „ethanol“ je nahrazen v souladu s Ph. Eur. 6 termínem „ethanol bezvodý“. Výraz „láh 96%“ je nahrazen v souladu s Ph. Eur. 6 termínem „ethanol 96%“ [= 96 % (V/V) ethanolu]. Jiná ředění ethanolu se označují termínem „ethanol“ s vyznačením objemového nebo hmotnostního procenta ethanolu.

Vyjadřování koncentrací. Při vyjadřování koncentrací se výraz „procento“ (%) používá podle okolností v jednom ze dvou významů:

- procenta m/m (hmotnostní procenta, hmotnost v hmotnosti) udávají počet gramů látky ve 100 gramech konečného produktu. V ČL se označení m/m obvykle nepoužívá; pokud není uvedeno, o jaká procenta se jedná, rozumí se hmotnostní procenta.
- procenta V/V (objemová procenta, objem v objemu) udávají počet mililitrů látky ve 100 mililitrech konečného produktu.

Teplota. Kde analytický postup uvádí teplotu bez číselných hodnot, mají obecně používané výrazy tento význam:

- v mrazicím boxu: pod -15 °C;
- v chladničce: 2 °C až 8 °C;
- v chladu: 8 °C až 15 °C;
- při teplotě místnosti: 15 °C až 25 °C.

Lékopisné články (Monografie). Lékopisné články se člení na části: záhlaví článků, definice, výroba, vlastnosti, zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu, stanovení obsahu (účinnosti), funkční charakteristiky, skladování, označování a nečistoty. Podle svého charakteru nemusí článek nutně obsahovat všechny části.

Hlavní názvy lékopisných názvů v Ph. Eur. jsou v anglickém nebo francouzském jazyce a jako vedlejší je název v latinském jazyce. V Českém lékopisu 2009 a jeho doplňcích je jako hlavní název upřednostněn název latinský a jako vedlejší název je název český. Jako synonymní název je uveden název latinský Ph. Eur. nebo český, nebo latinský název ČL 2005, pokud je rozdílný. Označení, zda se jedná o omamnou nebo psychotropní látku, venenum nebo separandum, zda jde o článek přeložený z Ph. Eur. nebo o české specifikum již v ČL 2009 součástí názvu není. Články zařazené v národní části nejsou na rozdíl od ČL 97 označeny písmenem N.

Rostlinné drogy. V člancích rostlinných drog se v záhlaví článku uvádí, zda je předmětem článku např. celá droga nebo prášková droga. Pokud se článek týká celé i práškové drogy, záhlaví článku to jasně udává.

Práškové rostlinné drogy. Články práškových rostlinných drog mohou obsahovat schematický náčrt totožnosti práškové drogy. Tento náčrt doplňuje úplný popis v odpovídající zkoušce totožnosti.

Chráněné druhy. Články zejména o rostlinných léčivech se mohou týkat materiálu získaného z chráněných druhů. Začlenění těchto článků respektuje opatření na ochranu těchto druhů národním nebo mezinárodním právem.

Rostlinné drogy. Pro rostlinné drogy se síranový popel, celkový popel, ve vodě rozpustná látka, v ethanolu 96% rozpustná látka, obsah vody, obsah sílice a obsah účinné látky počítají s odkazem na drogu, která nebyla zvlášť vysušena, pokud není v článku předepsáno jinak.

Vybrané značky a symboly

A	absorbance	$A_{1cm}^{1\%}$	specifická absorbance
A_r	relativní atomová hmotnost	α_D^{20}	specifická optická otáčivost
mol/l	molarita (v Ph. Eur. označeno M)	CRL	chemická referenční látka
d_{20}^{20}	relativní hustota	λ	vlnová délka
m. j.	mezinárodní jednotka	M_r	relativní molekulová hmotnost

n_D^{20}	index lomu		
ppm	jedna miliontina celku (parts per milion)		
R_F	retardační (retenční) faktor používaný v chromatografii, vyjadřující poměr vzdálenosti středu skvrny zkoušené látky ke vzdálenosti čela mobilní fáze, měřeno od místa nanášení		
R_{st}	poměr vzdálenosti středu skvrny zkoušené látky od místa nanášení ke vzdálenosti středu skvrny porovnávací látky od místa nanášení používaný v chromatografii		
TT	teplota tání	TV	teplota varu
ν	vlnočet, reciproční metr, 1/m	nm	nanometr, 10^{-9} m
μm	mikrometr, 10^{-6} m		

2.3. ZKOUŠENÍ DROG

Všeobecné zásady.

Obecné zásady se týkají všech článků a jiných textů Českého lékopisu 2009. Pro farmakognozii jsou relevantní následující údaje:

2.3.1. ZKUŠEBNÍ METODY

Ultrafialové lampy pro analytické účely

Ultrafialové lampy pro analytické účely se zpravidla skládají ze rtuťové výbojky, která slouží jako zdroj ultrafialového světla, a z vhodného filtru, který eliminuje viditelnou část spektra emitovaného výbojkou. Pokud lékopis předepisuje ve zkoušce použití ultrafialového světla o vlnové délce 254 nm nebo 365 nm, použije se lampa, která se skládá ze rtuťové výbojky a filtru, jejichž emisní pásmo má maximum intenzity při 254 nm nebo 365 nm. Použitá lampa umožňuje spolehlivou detekci standardní skvrny salicylanu sodného o průměru asi 5 mm na vrstvě silikagelu G, pokud se skvrna pozoruje v běžné poloze vzhledem ke zdroji záření.

Síta

Používají se síta se čtvercovými otvory zhotovená z vhodných materiálů. Pro jiné než analytické účely mohou být použita síta s kruhovými otvory, jejichž vnitřní průměry jsou 1,25násobky velikosti čtvercových otvorů odpovídajícího síta. Materiál, ze

kteřého jsou síta zhotovena, nesmí reagovat s prosívanou látkou. Stupeň rozdrobnění je předepsán v jednotlivých člancích tak, že číslo síta, jehož hodnota odpovídá jmenovité velikosti otvorů v mikrometrech, je uvedena v závorce za názvem látky. Čísła síta (jmenovitá velikost otvorů v mikrometrech) podle ČL 2009: 11 200; 8000; 5600; 4000; 2800; 2000; 1400; 1000; 710; 500; 355; 250; 180; 125; 90; 63; 45; 38. Požadovaný stupeň rozdrobnění závisí na charakteru drogy a účelu jejího použití.

Teplota tání – stanovení v kovovém bloku (nepřevzato z ČL 2009)

Nejčastěji se používají komerční přístroje (např. Boetius). Zařizování sestává z kovového bloku s dobrou tepelnou vodivostí. Blok se rovnoměrně zahřívá pomocí elektrického ohřevu s jemnou regulací. V bloku je válcovitá dutina pro vložení teploměru. Přístroj se kalibruje za použití vhodných látek o známé teplotě tání.

Postup stanovení: Blok se zahřeje vhodnou rychlostí na teplotu asi 10 °C pod očekávanou teplotu tání, potom se nastaví rychlost ohřívání přibližně na 1 °C/minutu. V pravidelných intervalech se vkládá několik částecěk upráškované zkoušené látky, pokud je třeba i vysušené, na blok v sousedství nádržky teploměru. Zaznamená se teplota t_1 , při které látka taje. Další zahřívání bloku se zastaví. Během ochlazování se vkládá opět v pravidelných intervalech zkoušená látka na blok a zaznamená se teplota t_2 , při níž zkoušená látka v kontaktu s blokem přestává okamžitě tát. Okamžitá teplota tání se vypočítá podle vzorce

$$\frac{t_1 + t_2}{2}$$

v němž značí:

t_1 – první teplotu

t_2 – druhou teplotu odečtenou za výše popsaných podmínek.

Zkoušenou látku lze umístit také na upravené podložní sklíčko, přikryt krycím sklíčkem a pozorovat mikroskopem. Zaznamenáme teplotu, kdy látka začne tát, a teplotu, kdy zcela roztaje. Průměr naměřených teplot udává teplotu tání.

Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je separační metoda, u které stacionární fázi tvoří vhodný materiál nanesený v rovnoměrné tenké vrstvě na skleněný, kovový nebo plastový podklad (desku). Roztoky stanovovaných látek se na vrstvu nanášejí před vyvíjením.

Dělení (separace) je založeno na adsorpci, rozdělení, iontové výměně nebo na kombinaci těchto mechanismů a dochází k němu migrací (vyvíjením) rozpuštěných látek v rozpouštědle nebo vhodné směsi rozpouštědel (mobilní fázi) tenkou vrstvou (stacionární fázi). Stacionární fázi používanou při analýze obsahových látek rostlinných drog je silikagel G pro TLC nebo silikagel GF₂₅₄ pro TLC. Složení mobilní fáze, způsob detekce a vizualizace je uvedený u jednotlivých drog. Při vizuálním hodnocení se porovnává hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s odpovídající skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Porovnává se zbarvení, velikost a retardační faktor (R_F) obou skvrn. Retardační faktor (R_F) je definovaný jako poměr vzdálenosti místa nanášení a středu skvrny ke vzdálenosti čela mobilní fáze od místa nanášení. Porovnávací roztok obsahuje převážně látky, které jsou přítomny ve zkoušeném roztoku.

Poznámka. V ojedinělých případech (vysoká cena čistých látek nebo jejich omezená stabilita) porovnávací roztok obsahuje vhodné barvivo nebo strukturně odlišnou látku, které za daných podmínek vykazují stejnou nebo podobnou hodnotu R_F jako zjišťované látky ve zkoušeném roztoku.

Ztráta sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m).

Naváží se předepsané množství zkoušené látky do váženky předem vysušené za podmínek předepsaných pro zkoušenou látku. Pokud je předepsaná určitá teplota sušení a nikoli rozmezí teplot, sušení se provede při předepsané teplotě ± 2 °C. Látka se vysuší do konstantní teploty, nebo se suší předepsanou dobu jedním z následujících postupů:

- a) „v exsikátoru“ nad oxidem fosforečným;
- b) „ve vakuu“ nad oxidem fosforečným;
- c) „ve vakuu při stanoveném teplotním rozmezí“, nad oxidem fosforečným;
- d) „v sušárně při stanoveném teplotním rozmezí“;
- e) „pod vysokým vakuem“ nad oxidem fosforečným.

Pokud jsou předepsány jiné podmínky, postupuje se přesně tak, jak je předepsáno v jednotlivém článku.

Pach

0,5 g až 2,0 g zkoušené látky se rozetře v tenké vrstvě na hodinové sklíčko o průměru 6 cm až 8 cm. Po 15 minutách se určí pach nebo se ověří jeho nepřítomnost.

Těžké kovy v rostlinných drogách a mastných olejích

Zkouší se atomovou absorpční spektrometrií na komerčních validovaných přístrojích. Stanovuje se obsah kadmia, mědi, železa, olova, niklu, zinku za použití metody standardního přídatku. Arsen a rtuť se stanoví za použití porovnávacích roztoků arsenu a rtuti o známých koncentracích přímou kalibrací.

Stanovení obsahu (hodnocení olejů, tuků, vosků, silic)

Číslo kyselosti

Číslo kyselosti I_A udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné k neutralizaci volných kyselin obsažených v 1 g látky.

Číslo esterové

Esterové číslo I_E udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné ke zmýdlení esterů obsažených v 1 g látky. Vypočítá se z rozdílu čísla zmýdlení a čísla kyselosti.

Číslo jodové

Číslo jodové I_I udává množství halogenu (přepočtené na jod) v gramech, které se za předepsaných podmínek váže na 100 g látky.

Číslo peroxidové

Číslo peroxidové I_P udává množství aktivního kyslíku v miliekvivalentech obsažené v peroxidické formě v 1000 g látky.

Číslo zmýdlení

Číslo zmýdlení I_S udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné k neutralizaci volných kyselin a ke zmýdlení esterů obsažených v 1 g látky.

Nezmýdelnitelné látky

Pod pojmem „nezmýdelnitelné látky“ se rozumí látky netěkající při 100 °C až 105 °C získané ze zkoušené zmýdlené látky extrakcí organickým rozpouštědlem. Výsledek zkoušky se vyjadřuje v procentech.

2.3.2. FARMAKOGNOSTICKÉ METODY

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové

Je to podíl získaný po extrakci síranového popela nebo celkového popela kyselinou chlorovodíkovou, přepočítaný na 100 g drogy.

Do kelímku obsahujícího zbytek po stanovení síranového popela nebo celkového popela se přidá 15 ml vody a 10 ml kyseliny chlorovodíkové 35%, kelímek se přikryje hodinovým sklem a mírně se 10 minut zahřívá. Po ochlazení se zfiltruje bezpopelným filtrem, zbytek se promyje teplou vodou až do neutrální reakce filtrátu. Filtrační papír se v kelímku vysuší, spálí a po vychladnutí v exsikátoru zváží. Rozdíl mezi dvěma po sobě následujícími váženými je nejvýše 1 mg.

Cizí příměši

Rostlinné drogy by měly být prosté plísní, hmyzu a ostatních živočišných kontaminantů.

Cizí příměši jsou látky popsané v jednom nebo v obou odstavcích uvedených níže:

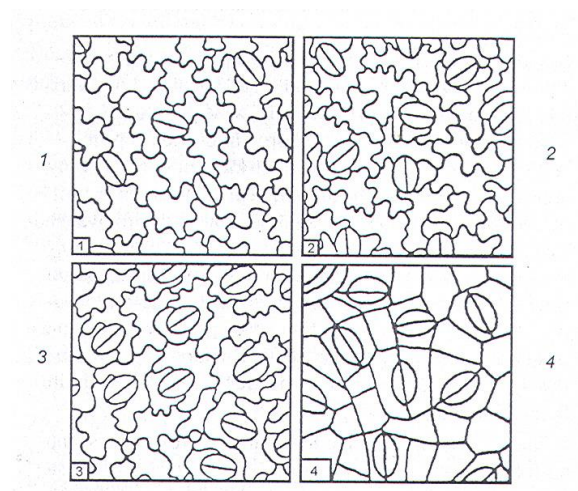
1. *jiné části matečné rostliny*: části matečné rostliny, které nejsou uvedeny v popisu drogy
2. *cizí látky*: látky rostlinného nebo minerálního původu, ne však části matečné rostliny.

Stanovení cizích příměsí: Odváží se 100 g až 500 g zkoušené látky nebo nejmenší množství uvedené v jednotlivých člancích. Vzorek se rozprostře do tenké vrstvy a cizí příměši se identifikují prostým okem nebo s použitím lupy (šestkrát). Cizí příměši se oddělí, zváží a jejich množství se vyjádří v procentech.

Stomata (průduchy) a stomatální index

Stomata (průduchy)

Obvyklé typy průduchů, viz obrázek, se rozlišují podle tvaru a uspořádání okolních buněk:



1. typ *anomocytický*: průduch je obklopen proměnlivým počtem buněk, které se tvarem a velikostí neliší od buněk pokožky;
2. typ *anizocytický*: průduch je obklopen obvykle třemi podpůrnými buňkami, z nichž jedna je výrazně menší než druhé dvě;
3. typ *diacytický*: průduch je obklopen dvěma podpůrnými buňkami, jejichž společná stěna je v pravých úhlech ke svěřacím buňkám;
4. typ *paracytický*: průduch je na každé straně obklopen jednou nebo více podpůrnými buňkami, jejich podélná osa je rovnoběžná se svěřací štěrbinou.

Stomatální index

Stomatální index se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100 \times S}{E + S}$$

v němž značí:

S - počet průduchů na dané ploše listu;

E - počet pokožkových buněk, včetně chlupů, na téže listové ploše.

Stanovení se provádí pro každý vzorek listu nejméně desetkrát a vypočítá se průměrná hodnota.

Číslo bobtnavosti

Je vyjádřeno objemem v mililitrech, který zaujme 1 gram drogy spolu s ulpívajícím slizem po nabobtnání ve vodní tekutině po dobu 4 h.

1,0 g drogy, celé nebo rozdrobněné podle požadavků uvedených v jednotlivých člancích, se převede do 25ml odměrného válce se zabroušenou zátkou o výšce 125 ± 5 mm a děleném po 0,5 ml. Není-li předepsáno jinak, navlhčí se droga 1,0 ml ethanolu 96%, přidá se 25 ml vody a válec se uzavře. Během první hodiny se intenzivně protřepává vždy po 10 minutách, pak se nechá stát 3 h. Po 90 minutách od začátku zkoušky je již většina kapaliny vázána na drogu. Částice drogy ulpívající na hladině se odstraní mírným vertikálním krouživým pohybem válce. Odečte se objem, který zaujímá droga spolu s ulpívajícím slizem. Provádějí se tři paralelní stanovení. Číslo bobtnavosti je vyjádřeno průměrem ze tří paralelních stanovení.

Voda v silicích

10 kapek silice se smíchá s 1 ml sirouhlíku, roztok zůstane čirý.

Cizí estery v silicích

1 ml silice se smíchá se 3,0 ml čerstvě připraveného roztoku hydroxidu draselného (100 g/l) v ethanolu 96% a zahřívá se 2 minuty na vodní lázni; do 30 minut ani po ochlazení nevznikají krystaly.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích

Kapka silice se kápne na filtrační papír a nechá se 24 h volně na vzduchu; na filtračním papíru nezůstane průsvitná nebo mastná skvrna.

Pach a chuť silic

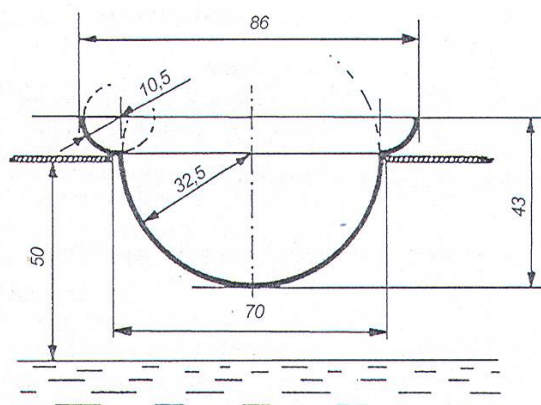
Tři kapky silice se smíchají s 5 ml ethanolu 90% (V/V) a směs se smíchá s 10 g práškové sacharosy. Pach i chuť jsou stejné jako u matečné rostliny nebo jejích částí, z nichž byla silice získána.

Zbytek po odpaření silic

Je to procento hmotnosti silice, které zbývá po odpaření na vodní lázni za dále uvedených podmínek

Přístroj, viz obrázek, se skládá (rozměry v milimetrech):

- z vodní lázně s víkem s otvory o průměru 70 mm;
- z odpařovací misky z tepelně odolného inertního skla;
- z exsikátoru.



Postup: Odpařovací miska se zahřívá 1 h na vodní lázni a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Do takto vysušené odpařovací misky se převede 5,00 g silice, není-li předepsáno jinak, a za chránění před proudícím vzduchem se zahřívá předepsaný čas na vroucí vodní lázni; po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Během provádění zkoušky se hladina vody ve vodní lázni udržuje asi 50 mm pod úrovní víka vodní lázně.

Rozpustnost silic v ethanolu

Do odměrného válce se zabroušenou zátkou na 25 ml nebo 30 ml se převede 1,0 ml silice; provádí se v termostatu při $(20 \pm 0,2)$ °C. Z byrety o objemu nejméně 20 ml se přidává do válce ethanol v článku předepsané koncentraci po 0,1 ml až do úplného rozpuštění silice a pak za intenzivního protřepávání po 0,5 ml až do 20 ml. Objem spotřebovaného ethanolu se zaznamená v okamžiku, kdy vznikne čirý roztok. Vznikne-li zakalený nebo opalizující roztok při spotřebě nižší než 20 ml ethanolu, zaznamená se spotřeba v okamžiku, kdy vznikne zákal nebo opalescence, a je-li to možné, když zákal nebo opalescence vymizí.

Nevznikne-li čirý roztok po přidání ethanolu předepsané koncentrace ani při 20 ml, provede se stanovení s následující vyšší koncentrací ethanolu.

Silice je hodnocena jako *“rozpustná v n nebo více objemových dílech ethanolu předepsané koncentrace t“*, jestliže čirý roztok v n objemových dílech po přidání ethanolu až do 20 ml zůstane beze změny v porovnání s neředěnou silicí.

Silice je hodnocena jako *“rozpustná v n objemových dílech ethanolu předepsané koncentrace t, dalším řešením se roztok kalí“*, jestliže čirý roztok v n objemových dílech se kalí po přidání n_1 objemových dílech (n_1 je méně než 20) a zůstává zakalen i po dalším přidání ethanolu téže koncentrace až do 20 ml.

Silice je hodnocena jako *„rozpustná v n objemových dílech ethanolu předepsané koncentrace t se zákalem vznikajícím mezi objemy n_1 a n_2 , jestliže čirý roztok v n objemových dílech se kalí po přidání n_1 objemových dílech (n_1 je méně než 20) a zůstává zakalen i po dalším přidání objemových dílů ethanolu téže koncentrace až do celkového objemu n_2 (n_2 je méně než dvacet). Po dalším přidání ethanolu do 20 ml vznikne čirý roztok.*

Silice je hodnocena jako *„rozpustná, roztok opalizuje“*, jestliže ethanolový roztok silice je namodralý tak jako čerstvě připravený porovnávací roztok.

Porovnávací roztok. 0,5 ml dusičnanu stříbrného (17 g/l) se smíchá s 0,05 ml kyseliny dusičné (63% až 70% HNO₃) a přidá se 50 ml roztoku chloridu sodného (12 mg/l); promíchá se a nechá se stát 5 minut za chránění před světlem.

Stanovení cineolu v silicích

3,00 g silice čerstvě vysušené síranem sodným bezvodým se odváží do suché zkumavky a přidá se 2,10 g kresolu taveného. Zkumavka se upevní do přístroje na

stanovení teploty tuhnutí, během chlazení se nepřetržitě míchá. V průběhu krystalizace dochází k pomalému vzestupu teploty. Zaznamenaná se nejvyšší dosažená teplota (t_1).

Směs se znovu roztaví na vodní lázni při teplotě nepřevyšující teplotu t_1 o více než 5 °C a zkumavka se umístí do přístroje nastaveného na teplotu o 5 °C nižší než t_1 . Míchá se nepřetržitě od okamžiku, kdy začíná probíhat krystalizace, nebo je-li teplota směsi nižší o 3 °C než t_1 . Zaznamenaná se nejvyšší teplota, při níž směs krystalizuje (t_2). Opakuje se tak dlouho, až rozdíl mezi dvěma hodnotami t_2 je nejvýše 0,2 °C. Dojde-li k přechlazení, vyvolá se krystalizace přidáním malého krystalku směsi složené ze 3,00 g cineolu a 2,10 g kresolu taveného. Jestliže je t_2 nižší než 27,4 °C, opakuje se stanovení s 5,10 g směsi.

Obsah cineolu odpovídající nejvyšší nalezené teplotě (t_2) je uveden v tabulce 2.8.11-1. Jestliže bylo použito 5,10 g směsi, vypočítá se obsah cineolu v procentech m/m podle vzorce:

$$2 \times (A - 50),$$

v němž značí:

A - hodnotu nalezenou v tabulce. Tabulka v ČL 2009 díl I str. 312.

Je-li třeba, vypočítá se obsah cineolu odpovídající nejvyšší nalezené teplotě (t_2) interpolací.

Stanovení silic v rostlinných drogách

Stanovení obsahu silic v rostlinných drogách se provádí destilací s vodní párou na zvláštním přístroji za podmínek uvedených níže. Destilát se jímá v kalibrované trubici, silice je zachycována v xylenu, vodná fáze se automaticky vrací zpět do destilační baňky.

Přístroj. Přístroj se skládá z následujících částí:

a) vhodné destilační baňky s kulatým dnem a krátkým zabroušeným hrdlem o vnitřním průměru 29 mm (používají se baňky o objemu 250-1000 ml – dle požadavků příslušného článku);

b) kondenzační části (viz obrázek), která přiléhá k destilační baňce zábrusem tak, že spolu tvoří jednolitý celek; použité sklo má nízký koeficient roztažnosti; zátka K' je odvětrávací, trubice K má otvor o průměru 1 mm, shodný s odvětrávacím otvorem zátky, širší konec trubice K o vnitřním průměru 10 mm je z matového skla, hruškovitě rozšířená část J o objemu 3 ml, trubice JL je dělena po 0,01 ml, kulovitá část L o

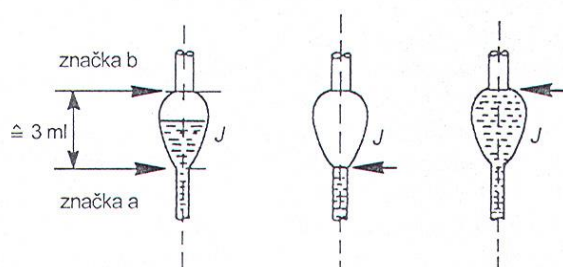
objemu asi 2 ml, trojcestný kohout *M*, ústí trubice *B* je o 20 mm výše než horní značka dělení na trubici;

c) vhodného tepelného zdroje umožňujícího přesné nastavení teploty;

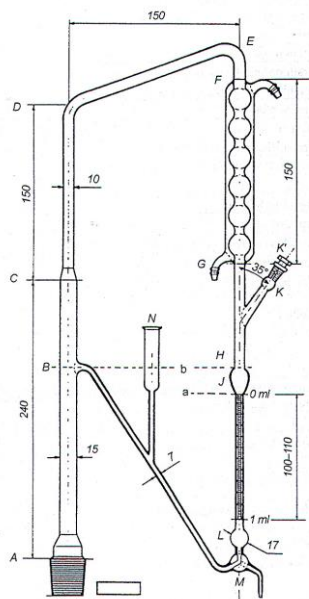
d) stojanu s kruhem pokrytým izolačním materiálem.

Postup. Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoušené drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu a připojí se kondenzační část. Nálevkou *N* se vlije do přístroje voda tak, aby její hladina dosáhla bodu *B*. Vyjme se zátka *K'* a pipetou, jejíž konec se dotýká spodní části trubice *K*, se přidá předepsané množství xylenu. Zátka *K* se uzavře, otvor v zátce odpovídá polohou otvoru v trubici *K*. Kapalina v baňce se zahřeje k varu, a není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 až 3 ml/minutu.

Určí se destilační rychlost, během destilace se sníží pomocí trojcestného kohoutu hladina kapaliny tak, aby odpovídala polohou spodní značce (a) (viz obrázek). Kohout se uzavře a změří se čas potřebný k tomu, aby hladina dosáhla horní značky (b).



Přístroj na stanovení silic v rostlinných drogách, rozměry v milimetrech (ČL 2009)



Kohout se otevře a pokračuje se v destilaci, destilační rychlost se upraví vhodným zahříváním. Destiluje se 30 minut. Pak se zahřívání přeruší a po nejméně 10 minutách se odečte objem xyleny v dělené trubici.

Do baňky se převede předepsané množství drogy a pokračuje se v destilaci výše uvedeným způsobem po předepsanou dobu a předepsanou rychlostí. Pak se zahřívání ukončí a po 10 minutách se odečte objem kapaliny v dělené trubici, od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem xyleny. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů v 1 kg drogy.

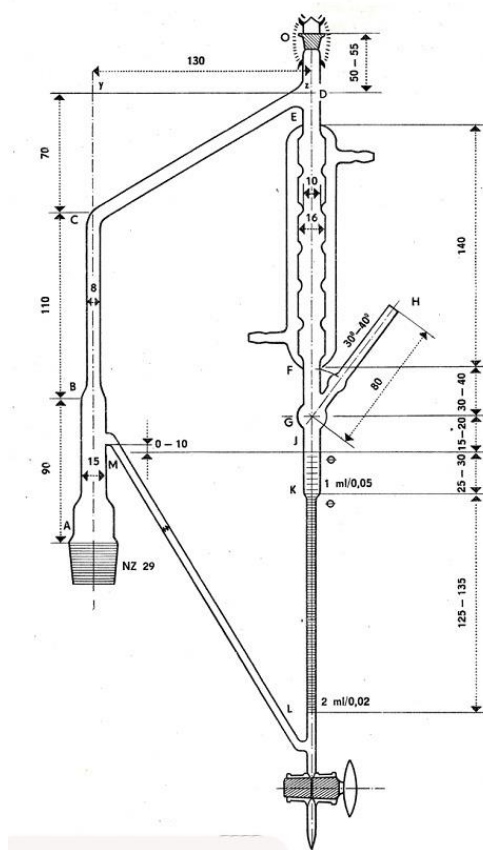
Má-li být silice použita pro další analytické účely, oddělí se její bezvodá část s xylenem následujícím způsobem. Vyjme se zátky K' a přidá se 0,1 ml roztoku fluoresceinu sodné soli (1 g/l) a 0,5 ml vody. Pomocí trojcestného kohoutu se vypustí směs xyleny a silice do kulovité části L a po 5 minutách stání se vypouští pomalu tak, až hladina klesne na úroveň kohoutu M . Kohout otočíme zprava doleva tak, aby vytekla voda ze spojovací trubice BM . Pomocí nálevky N promyjeme trubici acetonem a malým množstvím toluenu. Kohout se otočí zprava doleva a směs xyleny a silice se vypustí do vhodné baňky.

Alternativní přístroj na stanovení silic v rostlinných drogách, rozměry v milimetrech.

Postup. Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoušené drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu a připojí se kondenzační část.

Postranní trubicí GH se naplní trubice GLM vodou, až přetéká (v místě M) do baňky. Pipetou se tamtéž přidá předepsané množství xylenu a začne se destilovat. Po 30 utách se destilace přeruší a ne dříve než po 5 minutách se v dělené trubici JK odečte „skutečný“ objem xylenu. Po vychladnutí se do varné baňky vpraví předepsané množství drogy, rozdrobněné na stupeň uvedený u jednotlivých drog. Připojí se zábrusem k přístroji. Postranní trubice GH se uzavře chomáčkem vaty. Kapalina v baňce se zahřeje k varu, a není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 až 3 ml/minutu předepsanou dobu. Pak se zahřívání ukončí a po 10 minut se odečte objem kapaliny v jemně dělené trubici (KL), od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem xylenu. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů v 1 kg drogy.

Alternativní přístroj na stanovení silic v rostlinných drogách, rozměry v milimetrech.



Zbytky pesticidů

Pro lékopisné účely je pesticid jakákoli látka nebo směs látek určených k ochraně rostlin, likvidaci nebo regulaci jakýchkoli škůdců, nežádoucích druhů rostlin nebo

živočichů působících škody nebo jinak rušících při výrobě, zpracování, skladování, dopravě nebo prodeji rostlinných drog. Tato skupina zahrnuje látky používané jako regulátory růstu, defolianty nebo desikanty a jakékoli látky aplikované na rostliny před nebo po sklizni nebo jiné látky používané k ochraně zboží před znehodnocením během skladování a dopravy. Zbytky pesticidů mohou být přítomny a kontrolují se v rostlinných drogách a přípravcích z rostlinných drog.

Limity. Není-li v článku uvedeno jinak, zkoušená rostlinná droga přinejmenším vyhovuje limitům uvedeným v ČL 2009 v tabulce 2.8.13-1 (I/314). Limity pro pesticidy, které nejsou uvedeny v tabulce a jejichž přítomnost lze z jakéhokoliv důvodu předpokládat, se shodují s limity určenými směrnicemi Evropského společenství 396/2005, včetně doplňků a následných změn.

Odběr vzorků rostlinných drog se provádí podle obecné stati „Rostlinné drogy; vzorkování a příprava vzorku“.

Kvalitativní a kvantitativní analýza zbytků pesticidů: Použité analytické metody se validují (např. podle předpisu č. SANCO/10232/2006).

Zkoušení pesticidů - organochlorové, organofosfátové a pyrethroidní insekticidy.

Etapy zkoušení: Extrakce, čištění (chromatografie), kvantitativní analýza (plynová chromatografie). Vzhledem ke specifičnosti postupů a zařízení se v praktických cvičeních tato úloha nerealizuje.

Stanovení tříslovin v rostlinných drogách

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

Rostlinné drogy nebo suché extrakty.

Předepsané množství práškové drogy (180) 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 250 ml 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 po 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 100,0 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

Stanovení veškerých polyfenolů kolorimetrickou metodou (ČL 1997)

0,50 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 do odměrné baňky na 250 ml 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, a 17,0 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Přesně po 2 minutách od přidání posledního roztoku se měří

absorbance (A) v maximu při 760 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 – navážka v gramech

Číslo hořkosti

Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění sloučeniny, tekutiny nebo extraktu, které chutná ještě hořce. Stanoví se porovnáním s chinin-hydrochloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000.

Postup stanovení:

Stanovení korekčního faktoru

Je vhodné, aby zkoušku prováděla skupina nejméně šesti osob. Před ochutnáváním si musí vypláchnout ústa vodou. Je třeba stanovit korekční faktor pro každého člena skupiny tak, aby byly odstraněny individuální rozdíly vnímání hořké chuti.

Základní roztok: 0,100 g chinin-hydrochloridu se rozpustí ve vodě a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 100,0 ml.

Porovnávací roztoky: Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 3,6 ml základního roztoku a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí vodou na 10,0 ml.

Určí se roztok s nejnižší koncentrací, který chutná ještě hořce. 10,0 ml tohoto roztoku se převaluje v ústech 30 sekund tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka; jestliže roztok nechutná hořce vyplivne se a po 1 minutě se ústa vypláchnou vodou. Po 10 minutách se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor k se vypočítá pro každého člena skupiny podle vzorce:

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

v němž značí:

n – počet mililitrů základního roztoku o nejnižší koncentraci, který chutnal ještě hořce.

Osoba, které porovnávací roztok připravený z 5,8 ml základního nechutná hořce, je ze

zkoušení vyloučena.

Příprava vzorku: Je-li třeba, zkoušená droga se upráškuje. K 1,0 g se přidá 100 ml vroucí vody a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 minut na vodní lázni. Po ochlazení se zředí vodou na 100 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, první 2 ml filtrátu se odstraní. Filtrát se označí C-1 a jeho zředovací faktor (DF) je 100.

Stanovuje-li se číslo hořkosti tekutin, 1 ml zkoušené tekutiny se zředí vhodným rozpouštědlem na 100 ml a označí se C-1.

Stanovení čísla hořkosti

Zkoušené roztoky:

10,0 ml roztoku C-1 se zředí vodou na 100 ml: C-2 (DF = 1000)

10,0 ml roztoku C-2 se zředí vodou na 100 ml: C-3 (DF = 10 000)

20,0 ml roztoku C-3 se zředí vodou na 100 ml: C-3A (DF = 50 000)

10,0 ml roztoku C-3A se zředí vodou na 100 ml: C-4 (DF = 100 000)

Každý zkoušející hodnotí nejprve roztok C-4 a pokračuje tak dlouho, dokud některý z roztoků neshledá hořký. Tento roztok se označí D. Zředovací faktor (DF) roztoku D se označí jako Y.

Za použití roztoku D se připraví řada roztoků s následujícím postupným zředěním:

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 se objem roztoku D v mililitrech, který po zředění vodou na 10,0 ml chutná ještě hořce (X).

Vypočítá se číslo hořkosti pro každou ze zkoušejících osob podle vzorce:

$$\frac{Y \times k}{X \times 0,1}$$

Číslo hořkosti zkoušené látky se vyjádří jako průměrná hodnota zjištěná všemi zkoušejícími osobami.

Zbytek po vysušení extraktů

2,00 g nebo 2,0 ml zkoušeného extraktu se rychle převedou do misky s plochým dnem o průměru 50 mm a hloubce asi 30 mm. Extrakt se odpaří do sucha na vodní lázni a zbytek se suší 3 h v sušárně při 100 až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad

oxidem fosforečným nebo silikagelem bezvodým se zváží. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech nebo v gramech na litr.

Ztráta sušením u extraktů

0,50 g zkoušeného jemně práškovaného extraktu se rychle odváží do misky s plochým dnem o průměru asi 50 mm a hloubce asi 30 mm. Extrakt se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad oxidem fosforečným nebo silikagelem bezvodým se zváží. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech.

Stanovení obsahu aflatoxinu B₁ v rostlinných drogách

Aflatoxiny jsou přirozeně se vyskytující mykotoxiny produkované zejména druhy *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Tyto plísně jsou běžné a jsou v přírodě hojně rozšířené. Napadají všechny typy organických substrátů. Optimálními podmínkami pro jejich růst jsou vysoký obsah vlhkosti i vysoká teplota. Protože jsou velmi toxické a karcinogenní, vyžaduje ČL stanovení nejtoxičtějšího aflatoxinu B₁ v drogách. Aflatoxiny se rozkládají vlivem světla, proto se stanovení provádí za chránění před denním světlem. Hodnotí se validovanou metodou kapalinové chromatografie.

Rostlinné drogy: vzorkování a příprava vzorku

Aby se omezil vliv vzorkování na kvalitativní a kvantitativní analýzu, je nezbytné zajistit, aby byl vzorek šarže hodnoceného materiálu reprezentativní. Pro rostlinné drogy lze použít následující postupy:

Nerozplněný vzorek

V případě, že vnější hodnocení obalů, označení a štítků šarže ukazuje, že šarži lze považovat za homogenní, je vzorek počtu náhodně vybraných obalových jednotek (obalů) uveden dále. V případě, že šarže nemůže být označena jako homogenní, rozdělí se do dílčích šarží, které za homogenní lze považovat. Každá dílčí šarže se použije jako homogenní šarže, počet náhodně vybraných obalových jednotek (obalů) je uveden dále.

Počet obalů v šarži (N)	Počet zkoušených obalů (n)
1 – 3	všechny

> 3	$n^* = \sqrt{N+1}$
-----	--------------------

* n se zaokrouhlí nahoru na celé číslo

Odebere se vzorek z každé zkoušené obalové jednotky (obalu). Vzorek se odebere z horní, střední nebo dolní části obalu tak, aby odebrané vzorky z různých částí obalu byly reprezentativní. V případě velkých žoků nebo pytlů se musí vzorky odebrat z hloubky nejméně 10 cm. Hmotnost vzorku odebraného z každé obalové jednotky (obalu) odpovídá celkové hmotnosti vzorku šarže, který vyhovuje následujícím hodnotám.

Hmotnost rostlinné drogy v šarži (kg)	Minimální hmotnost vzorku, vyjádřená jako procento hmotnosti šarže rostlinné drogy
< 50	1,00 *
50 – 100	0,50
> 100 – 250	0,25
> 250 – 500	0,20
> 500 – 1000	0,18
> 1000 – 2500	0,15
> 2500 – 5000	0,10
> 5000 – 10 000	0,08
> 10 000 – 25 000	0,05

Poznámka. Jestliže je hmotnost šarže větší než 25 000 kg, rozdělí se do dílčích šarží, postup se uplatní pro každou dílčí šarži jako by to byla homogenní šarže.

*Nejmenší celková hmotnost vzorku nerozplněné šarže je 125 g; jestliže minimální požadavek představuje více než 10,0 % hmotnosti šarže rostlinné drogy, může se celá šarže použít jako vzorek.

Nerozplněný vzorek se připraví spojením a důkladným promícháním vzorků odebraných z každé náhodně vybrané obalové jednotky (obal).

Zkoušený vzorek:

Není-li v článku uvedeno jinak, připraví se vzorek následujícím postupem. Velikost vzorku nerozplněné šarže se redukuje čtvrtkováním (viz poznámka uvedená níže) nebo jinou metodou, která vede k získání homogenního vzorku; takže každá zbytková část představuje celek, dokud nejmenší zbytkové množství neodpovídá následujícím podmínkám.

Typ rostlinné drogy	Minimální hmotnost zkoušeného vzorku
kořeny, oddenky, kůry, natě	500 g nebo celý vzorek; jestliže je hmotnost nerozplněného vzorku menší než 500 g
listy, květy, semena, plody	250 g nebo celý vzorek, jestliže je hmotnost nerozplněného vzorku menší než 250 g
rozlámané nebo rozdrobněné drogy (průměrná hmotnost částí je menší než 0,5 g)	125 g

Poznámka: Čtvrtkování sestává z důkladného promíchání nerozplněného vzorku, rozložení na plochou hromádku a jejím rozdělení na čtyři stejné díly. Dvě protilehlé části se odstraní a zbytek se znovu promíchá. Je-li třeba, postup se opakuje až do získání minimální hmotnosti potřebné pro zkoušený vzorek.

Zkoušený vzorek se rozdrobní na velikost částic 1 mm nebo na velikost uvedenou v článku. Doporučuje se použít mlýnek.

Rozdrobněný vzorek se prosívá standardním sítem 1 mm nebo sítem uvedeným v článku. Zbytek na sítu nesmí být větší než 10 % celkové hmotnosti rozdrobněného vzorku nebo nejvýše 2 % celkové hmotnosti rozdrobněného vzorku mohou mít částice větší než 1,5 mm nebo 1,5krát větší než částice uvedené v článku. Za těchto podmínek se vzorek a zbytek na sítu dobře promíchají a tvoří tak zkoušený vzorek pro analýzy.

V případech, kde podmínky neodpovídají, složí se zkoušený vzorek pro analýzy ze dvou částí hodnocených odděleně. Nicméně množství potřebné pro každou analýzu se odvozuje z odvažování poměrných množství prášku a zbytku.

Poznámka: Pro stanovení mikroskopických charakteristik se část rozdrobněného zkoušeného vzorku opakovaně rozdrobní na velikost částic 0,355 mm.

ČÁST SPECIÁLNÍ

3. SACHARIDY

Sacharidy jsou významnou a rozsáhlou skupinou přírodních látek. Pro živé soustavy jsou důležitými substráty, v nichž je uložena chemická energie, vpravená do nich v procesu fotosyntetické asimilace. Jsou biologickými prekurzory lipidů, bílkovin a jiných složek živé hmoty. Některé sacharidy jsou látky zásobní, jiné tvoří podpůrná pletiva rostlin. Tvoří až 75 % váhy suchého rostlinného těla. Společně s tuky a proteiny jsou živinami pro živočichy včetně lidí.

Sacharidy jsou polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony s nejméně třemi alifaticky vázanými uhlíkovými atomy a také sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb. Jsou složeny z uhlíku, kyslíku a vodíku, výjimečně obsahují v molekule dusík nebo síru.

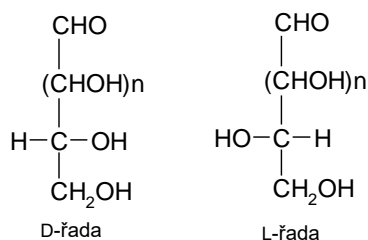
Sacharidy se dělí podle velikosti molekuly na:

- monosacharidy, jsou složeny z jedné cukerné jednotky a hydrolyticky se neštěpí;
- oligosacharidy, jsou složeny ze dvou až deseti monosacharidů vzájemně spojených glykosidovými (poloacetalovými) vazbami;
- polysacharidy, sestávají z více než deseti stejných nebo různých monosacharidů;
- složené sacharidy, obsahují ještě např. lipidy, proteiny nebo peptidy.

3.1. MONOSACHARIDY

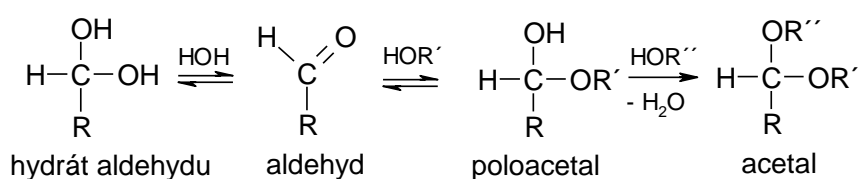
Monosacharidy se rozdělují podle povahy karbonylové skupiny na aldosity a ketosity, podle počtu atomů uhlíku na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy, resp. heptosy. Tato označení mohou být spojena, např. glukosa je aldohexosa, ribulosa je ketopentosa.

Konfigurace monosacharidů je označována prefixem D nebo L a je odvozena podle orientace hydroxylové skupiny nejvzdálenější od karbonylové skupiny. Je-li orientována doprava, patří do řady D, je-li vlevo, patří do řady L. Většina přírodních monosacharidů patří do D-řady (mimo L-rhamnosu, L-arabinosu, L-fukosu). Označení D, L nesouvisí s optickou otáčivostí, která se vyjadřuje znaménky (+) pro pravotočivé, (-) pro levotočivé. Typické vlastnosti cukrů začínají u tetros.



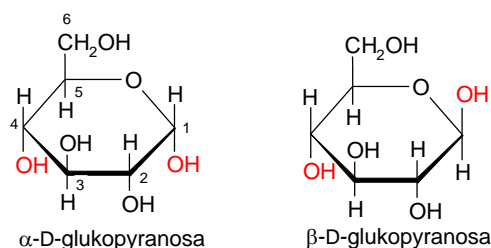
Fischerova projekce D- a L-sacharidů

Aldehydy a ketony reagují s alkoholy za vzniku poloacetalů. Reakcí poloacetalu s další molekulou alkoholu za odštěpení molekuly vody vznikají acetaly. Jde o reakci, která odpovídá tvorbě glykosidů.



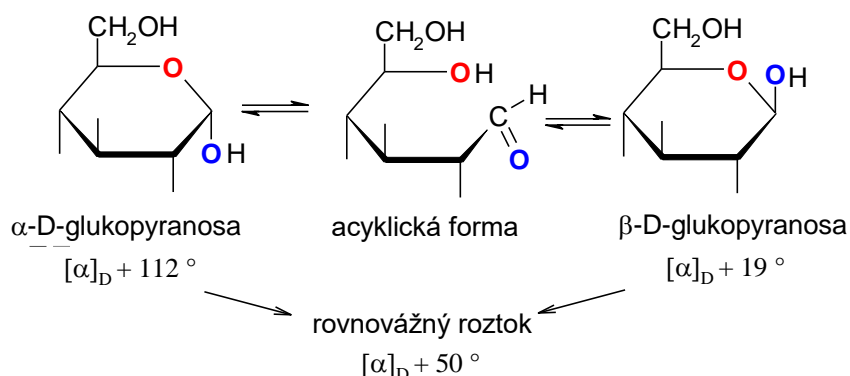
Intramolekulární adicí jedné z hydroxylových skupin (primární nebo sekundární hydroxylové skupiny) na karbonylovou skupinu vznikají ze sacharidů spontánně cyklické poloacetalu. Tyto cyklické formy tvoří přednostně šestičlenný, případně pětičlenný kruh. Struktury s pětičlenným kruhem se nazývají furanosy, se šestičlenným kruhem pyranosy.

Na uhlíku karbonylové skupiny (u aldos uhlík C-1, u ketos C-2) vzniká nové chirální centrum. Uhlík karbonylové skupiny se označuje jako anomerní uhlík, nově vytvořená hydroxylová skupina na anomerním uhlíku je anomerní hydroxylová skupina (poloacetalová hydroxylová skupina) a odpovídající dvojice izomerů jsou anomery. Pro označení konfigurace substituentů na anomerním uhlíku se používají konfigurační prefixy α a β . Ty udávají relativní konfiguraci vůči chirálnímu atomu uhlíku, který určuje příslušnost k řadě D nebo L. Anomer α má shodnou konfiguraci, anomer β opačnou. Každý z obou anomerů má odlišné chemické a fyzikální vlastnosti – teplotu tání, rozpustnost a zejména optickou otáčivost.

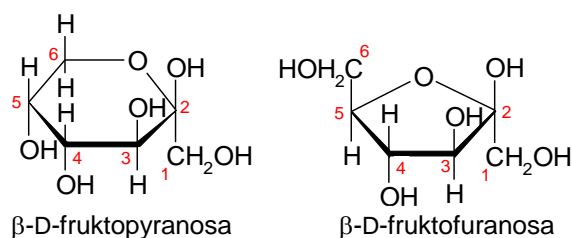


V krystalickém stavu existují monosacharidy výhradně v cyklických strukturách, tedy jako α - nebo β -anomery. Po rozpuštění dochází v roztoku po určité době k ustanovení rovnovážného stavu mezi α - a β -anomerem a ke změně optické rotace, která je pro každý monosacharid charakteristická. Tento jev se označuje jako mutarotace. Pokud se např. krystalická α -D-glukosa rozpustí ve vodě, optická otáčivost roztoku se pozvolna mění z původní hodnoty $+112^\circ$, až dosáhne hodnoty $+52^\circ$. Tato změna optické otáčivosti je výsledkem vytvoření rovnovážné směsi obsahující při teplotě 20°C 67 % β -anomeru a 33 % α -anomeru. Látky vykazující mutarotaci jsou často charakterizovány hodnotami počáteční a konečné rotace, např. $[\alpha]_D + 112^\circ \rightarrow 52^\circ$. Mutarotaci vykazují rovněž oligosacharidy, mající v molekule monosacharid s volnou poloacetalovou, tj. anomerní hydroxylovou skupinou.

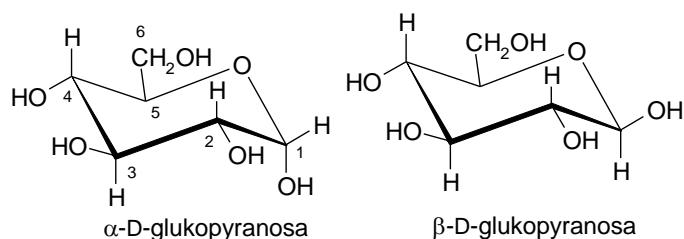
V metabolicky aktivních rostlinných tkáních je mutarotace sacharidů obsahujících vázanou glukosu a galaktosu katalyzována mutarotasou (aldosa 1-epimerasa).



D-fruktosa jako většina volných sacharidů tvoří přednostně pyranosový kruh. Furanosová forma fruktosy se vyskytuje pouze v oligosacharidech (sacharosa), v polysacharidech (inulin) a v některých fosforečných esterech sacharidů.



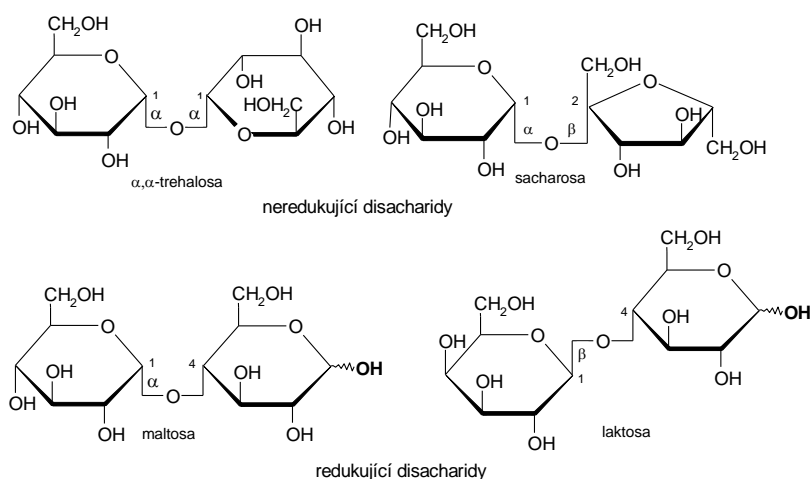
Cyklické formy sacharidů nejsou rovinnými útvary. Nejčastěji se vyskytující (termodynamicky nejvýhodnější) konformací pyranos jsou konformace židličkové.



3.2. OLIGOSACHARIDY

Oligosacharidy jsou složeny ze dvou až deseti molekul monosacharidů, vázaných α - nebo β -glykosidickou vazbou. Podle počtu stavebních jednotek se označují jako disacharidy, tri-, tetra- až dekasacharidy. Mohou být hydrolyzovány kyselinami nebo enzymaticky na monosacharidy. Oligosacharidy jsou glykosidy, v nichž je „aglykonem“ molekula jiného sacharidu. Proto se také nazývají homoglykosidy. Nejčastěji se v oligosacharidech vyskytují hexosy. Disacharidy se tvoří kondenzací α - nebo β -anomerní hydroxylové skupiny monosacharidu s libovolnou hydroxylovou skupinou jiného monosacharidu. Při vzájemné kondensaci dvou poloacetalových hydroxylových skupin neobsahuje vzniklý disacharid volnou anomerní hydroxylovou skupinu a je proto neredukující (např. trehalosa a sacharosa). V každém jiném případě vzniká redukující disacharid, který stejně jako výchozí monosacharid vykazuje v roztocích mutarotaci a vyskytuje se jako α - nebo β -anomer (např. maltosa a laktosa). Sacharosa je složena z D-glukosy a z D-fruktosy. Fruktosa je zde přítomná ve své stálé furanosové formě, proto se sacharosa štěpí již velmi zředěnými kyselinami na glukosu a fruktosu. Tento pochod se nazývá inverze, dochází při něm ke změně optické otáčivosti. Směs po hydrolyse (invertní cukr) je vedle sacharosy hlavní složkou medu.

Z trisacharidů je nejvíce v přírodě rozšířena rafinosa, jejím hlavním zdrojem je cukrová řepa. Nemá redukční vlastnosti a po hydrolyse poskytuje D-glukosu, D-fruktosu a D-galaktosu.



3.3.KVALITATIVNÍ ANALÝZA SACHARIDŮ

Chemické vlastnosti sacharidů jsou podmíněny četnými hydroxylovými skupinami. Jako sloučeniny s mnoha hydroxyly jsou sacharidy snadno rozpustné ve vodě, nerozpustné v organických rozpouštědlech a tucích a chutnají sladce. Skupiny aldehydické (a ketonické u ketos) se neprojevují; jednoduché barevné reakce na aldehydy jsou negativní, protože v roztoku není prakticky přítomen aldehyd, nýbrž jen poloacetalová forma sacharidu.

Funkční deriváty hydroxylových skupin

Alkoholické skupiny mohou být esterifikovány. Toho se využívá k charakterizaci sacharidů nebo k blokování určitých hydroxylů esterifikací. V biochemii mají zvláštní význam estery kyseliny fosforečné.

Alkoholické skupiny mohou tvořit ethery. Tvorba etherů (např. s dimethylsulfátem a hydroxidy) má význam při objasňování konstituce složených sacharidů. Mimořádně reaktivní je poloacetalový hydroxyl na prvním uhlíku u aldos. Sloučeniny od něho odvozené jsou glykosidy.

Deriváty karbonylové skupiny

Sacharidy nedávají mnohé z reakcí na aldehydy a ketony, protože aldehydy jsou přítomny v rovnovážném stavu pouze ve zlomcích procenta. Lze je však dokázat pomocí určitých reakcí, jako je např. tvorba oximů. Z hlediska identifikace sacharidů

3.3.1. ANALYTICKÉ METODY

K identifikaci monosacharidů a oligosacharidů se používají převážně metody chromatografické (papírová chromatografie, chromatografie na tenkých vrstvách). Barevné reakce sacharidů s anthronem, fenoly (resorcinol, orcinol a pod.) a kyselinami mají menší význam; některých se používá jako detekčních reagensů při postřikování chromatogramů nebo při stanoveních kolorimetrických. Redukční metody, které se dříve používaly ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení sacharidů jsou postupně opouštěny pro svoji nízkou specifitu.

Nejmodernější techniky využívají plynovou chromatografii nebo kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektroskopií.

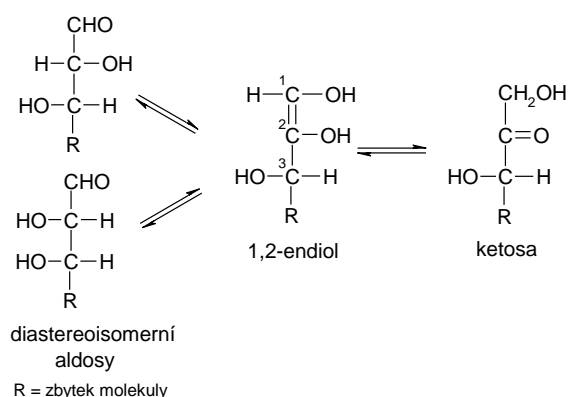
3.3.2. REDUKČNÍ VLASTNOSTI SACHARIDŮ

Monosacharidy nebo ve vodě rozpustné oligosacharidy s krátkým řetězcem povahením s zkoumadly založenými na 'CuSO₄/OH⁻' (např. Fehlingovo, Benedictovo), redukují Cu²⁺ ionty na Cu⁺ ionty za vzniku cihlově-červené sraženiny Cu₂O. Podmínkou uvedené reakce je, aby sacharidy obsahovaly nebo byly schopny poskytnout v alkalickém prostředí (0,2 M OH⁻) volnou aldehydickou (CHO) skupinu. Je to právě aldehydická skupina, která redukuje Cu²⁺ a oxiduje se na karboxylovou skupinu (COOH). Sacharidy, které splňují tento požadavek, jsou:

- (i) aldotriosy s otevřeným řetězcem (např. D-glyceraldehyd)
- (ii) ketotriosy s otevřeným řetězcem (např. dihydroxyaceton) a ketotetrosy (D-erytrulosa)
- (iii) monosacharidy aldosity a ketosity, které jsou ve vodných roztocích převážně v cyklické formě jako pyranosy nebo furanosy, které mají volnou hydroxylovou skupinu na anomerním uhlíkovém atomu (C-1 u aldosity, C-2 u ketosy, např. D-glukosa a D-fruktosa, ale ne jejich glykosidy)
- (iv) ve vodě rozpustné oligosacharidy s krátkým řetězcem, které mají monosacharidový zbytek (aldosu nebo ketosu) s volnou hydroxylovou skupinou na anomerním uhlíkovém atomu (např. maltosa, ale ne sacharosa).

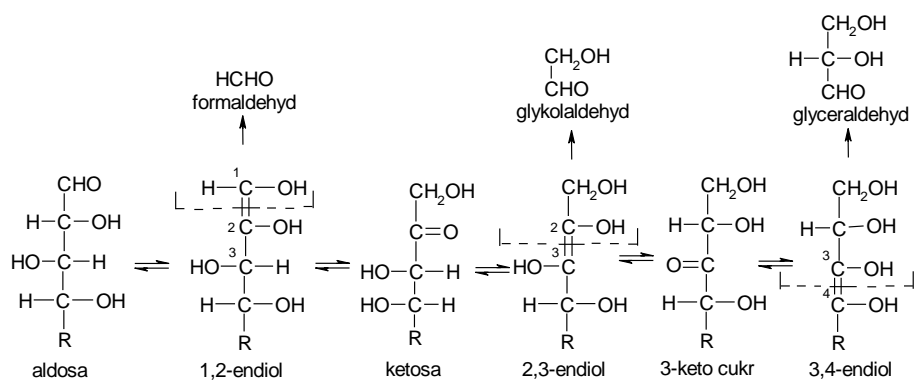
Sacharidy, které patří do kategorie (i) mají volnou aldehydickou skupinu, ale ty, které spadají do kategorie (ii) nikoliv. Ty v přítomnosti zředěných alkálií (0,02 M OH⁻ je

postačující) podléhají reverzibilní tautomerní izomerizaci, při které dochází k přeskupení (Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein přeskupení).



Sacharidy skupiny (iii) v krystalickém stavu existují výhradně buď jako α - nebo β -anomer v jedné z jejich cyklických forem. Ve vodných roztocích podléhají mutarotaci, takže existují v rovnovážné směsi α - a β -anomerů a v acyklické formě. Dosažení rovnovážného stavu v čisté vodě je pomalé, avšak téměř okamžité v přítomnosti OH^- iontů. Mutarotace aldosa tudíž vytváří volný aldehyd, acyklickou formu sacharidu, která je nezbytná pro redukci Cu^{2+} . Na druhé straně, mutarotace ketosa vytváří acyklickou formu s volnou ketoskupinou, která může redukovat Cu^{2+} až po Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein přeskupení, při kterém jsou reverzibilně generovány acyklické izomerní formy.

Nicméně, relativně vysoká koncentrace hydroxylových iontů ve Fehlingově a Benedictově zkoumadle zapříčiňuje tvorbu volného aldehydu a sacharidu s otevřeným řetězcem (z cyklické formy aldosa a ketosa) a dále poskytují přeskupením nejen 1,2-endioly, ale také 2,3-endioly a 3,4-endioly, které jsou v převládajících podmínkách nestálé. Ty pak poskytují řadu nižších aldehydů jako formaldehyd, glykolaldehyd a glycerinaldehyd, které jsou zodpovědné za redukci Cu^{2+} . To také vysvětluje, proč mají pentosy a hexosy stejnou redukční sílu jako nízkomolekulární aldehydy.



Lékopisy (Ph. Eur. a ČL) využívají pro důkaz sacharidů jak metodu tenkovrstvé chromatografie, tak barevné reakce, založené na výše uvedených principech.

3.3.3. ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI SACHARIDŮ PODLE ČL 2009

Glucosum anhydricum – glukosa bezvodá (ČL 2009) (uvedeno jako příklad)

Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy silikagelu G.

Zkoušený roztok: 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů vody a methanolu (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (a): 10 mg glukosy se rozpustí ve směsi objemových dílů vody a methanolu (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (b): 10 mg glukosy, 10 mg laktosy, 10 mg fruktosy a 10 mg sacharosy se rozpustí ve směsi objemových dílů vody a methanolu (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μ l každého roztoku a nanesené skvrny se důkladně vysuší. Vyvíjí se ve směsi objemových dílů vody, methanolu, kyseliny octové bezvodé a dichlorethanu (10 : 15 : 25 : 50) po dráze přesahující 15 cm. Rozpouštědla mají být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se opět usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g thymolu ve směsi složené z 5 ml kyseliny sírové 95–97% a 95 ml lihu 96% a zahřívá se 10 minut při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou (R_F), zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

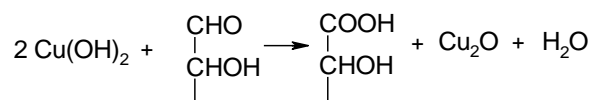
Připravte 20 ml 2% roztoku sacharidů (glukosa, laktosa, fruktosa, galaktosa, xylosa) ve směsi objemových dílů vody a methanolu (2 + 3) a proveďte výše popsanou chromatografickou analýzu.

3.3.4. OXIDACE SACHARIDŮ IONTY KOVŮ

Tyto reakce dávají redukující sacharidy. Ty redukují v alkalickém prostředí soli měďnaté, stříbrné, bismutité nebo rtuťnaté na sloučeniny o nižším mocenství, popřípadě až na kovy.

3.3.4.1. Fehlingovo zkoumadlo – komplexní měďnatá sůl

Připravte v čase potřeby smícháním Fehling I (roztok krystalického síranu měďnatého ve vodě) a Fehling II (roztok hydroxidu sodného a vlnanu sodno-draselného ve vodě) v poměru 1:1. 2 ml zkoumadla se zahřívají s 2 ml cukerného roztoku. V přítomnosti redukujícího sacharidu vzniká červenooranžové nebo zelené zbarvení nebo sraženina oxidu měďného (Cu_2O). Barva je závislá na teplotě, času a velikosti krystalů vyloučeného oxidu.

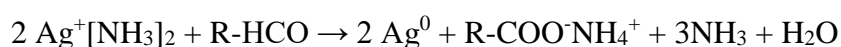


3.3.4.2. Barfoedovo zkoumadlo – roztok octanu měďnatého

Toto zkoumadlo je redukováno pouze monosacharidy. Redukce octanu měďnatého probíhá poněkud obtížněji než redukce Fehlingova roztoku, takže redukční schopnosti redukujících disacharidů, které jsou poměrně menší než redukční schopnosti monosacharidů, nestačí pro vyloučení oxidu měďného. Slouží k rozlišení redukujících monosacharidů od redukujících disacharidů. 2 ml zkoumadla se zahřívají s 2 ml cukerného roztoku.

3.3.4.3. Tollensovo zkoumadlo – komplexní amoniakální sůl stříbra [Ag(NH₃)₂]⁺

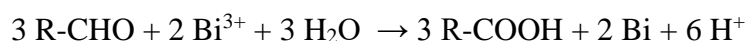
Zkoumadlo připravíme smícháním 1 ml 5% AgNO₃ s několika kapkami 5% vodného roztoku hydroxidu sodného. Vyloučený Ag₂O se rozpustí ve 2% hydroxidu amonném (nadbytek snižuje citlivost zkoumadla). Ke zkoumadlu přidáme 1 ml roztoku vzorku, protřepeme a necháme 10 minut stát. Pokud se roztok nezakalí vyloučeným stříbrem, slabě zahřejeme. Pokud ani tehdy nedojde k vyloučení stříbra, je reakce negativní. Po provedení reakce obsah zkumavek ihned vylijte! Tato reakce není specifická pro cukry, reagují i jiné snadno se oxidující látky (vícesytné fenoly, aminofenoly, aromatické aldehydy).



3.3.4.4. Nylanderovo zkoumadlo - komplexní bismutitá sůl

(Bi(OH)₂NO₃ + vínan sodno-draselný + NaOH)

Principem je oxidace sacharidů alkalickým roztokem solí trojmocného bismutu. V přítomnosti redukujících cukrů se vyloučí bismut. 2 ml cukerného roztoku se povaří s 1 ml zkoumadla. Roztok tmavne vyloučeným bismutem.



3.3.4.5. Boettgerova reakce

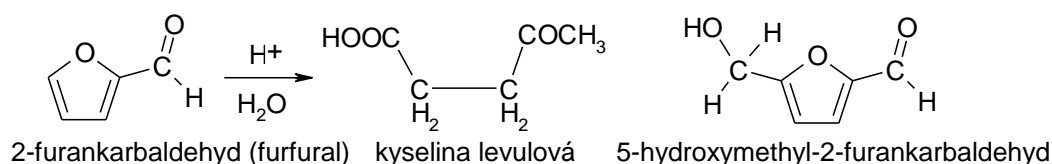
K 1 ml roztoku zkoušeného cukru se přidá několik krystalů zásaditého dusičnanu bismutitého a několik kapek 10% hydroxidu sodného. Nejprve se objeví bílá sraženina hydroxidu bismutitého, který se redukuje varem na černý bismut.

3.3.4.6. Nitrochromová reakce

Je založena na oxidaci daného typu sacharidu kyselinou dusičnou a chromanem draselným. Chroman se při reakci redukuje na chromnatou sůl. Zatímco hydratovaný chromanový aniont CrO₄²⁻ je žlutý, hydratovaný chromnatý kation Cr²⁺ je modrý. Ke 2 ml vzorků sacharidů přidejte opatrně 3 ml kyseliny dusičné a 5 kapek roztoku chromanu draselného.

3.3.5. BAREVNÉ REAKCE SACHARIDŮ

Sacharidy dávají barevné reakce s fenoly v prostředí silných minerálních kyselin. Působením kyselin dochází k dehydrataci spojené se ztrátou jedné až tří molekul vody a vzniku derivátů furanu a pyranu (z pentos furfural, z methylpentos 5-methylfurfural a z hexos 5-hydroxy-methylfurfural). Rychleji reagují pentosy a ketohexosy, kdežto aldohexosy, které uvolňují jen nepatrné množství hydroxyfurfuralu, obvykle nereagují. Z 6-deoxypentos, jako je L-rhamnosa, vzniká 5-methyl-2-furankarbaldehyd. Deriváty furfuralu se zčásti opět štěpí a vytváří nižší aldehydy. Aldehydy kondenzují s fenoly za vzniku barevných produktů. Jako fenolová látka se používá: α -naftol, resorcinol, floroglucin a orcin. Průběh reakcí není ještě zcela vyjasněn.



3.3.5.1. Molischova zkouška (reakce s α -naftolem)

K 1 ml cukerného roztoku přidejte 1-2 kapky methanolického roztoku α -naftolu, poté opatrně podvrstvěte 1 ml koncentrované kyseliny sírové. V přítomnosti sacharidů se vytváří na rozhraní vody a kyseliny červenofialový prstenec. Po promíchání se kapalina zbarví tmavofialově, zředěním se vyloučí modrofialová sraženina.

3.3.5.2. Selivanovova zkouška (reakce s resorcinolem)

K 1 ml vzorku přidejte 1 ml roztoku resorcinolu v koncentrované kyselině chlorovodíkové a postupně zahřívejte. Ketosy dávají červené zbarvení, aldosity nereagují.

3.3.5.3. Anthronová zkouška (reakce s anthronem)

K 1 ml vzorku opatrně přidejte 1 ml roztoku anthronu (0,1% roztok anthronu v H_2SO_4), aby vznikly dvě vrstvy. Pokud vzniká na rozhraní modré nebo modrozelené zbarvení, je reakce pozitivní. Některé deoxycukry dávají s tímto zkoumadlem červené zbarvení.

3.3.5.4. Reakce s octanem olovnatým

2 ml roztoku zkoušeného sacharidu se zahřívá se 2 ml 10% octanu olovnatého. Nejprve se objeví žluté zabarvení. Po přidání roztoku amoniaku vzniká sraženina hydroxidu olovnatého.

3.3.6. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ CUKRŮ

Metody stanovení sacharidů jsou založeny na stejných principech jako jejich metody kvalitativní. Nejčastěji se využívá redukčních vlastností cukrů a reakční produkty se stanovují titračně nebo gravimetricky. Barevných reakcí se využívá při stanovení kolorimetrickém. Sacharidy lze stanovit také metodami fyzikálně-chemickými, např. polarograficky, polarometricky, popřípadě se stanovují metodami biologickými.

3.3.7. TESTOVANÉ SUBSTANCE A DROGY

3.3.7.1. *Glucosum monohydricum* – Glukosa monohydrát (ČL 2009)

Monohydrát (+)-D-glukopyranosy

Bílý, krystalický prášek. Má sladkou chuť. Snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v ethanolu 96% a nerozpustná v chloroformu.

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1 g se rozpustí v 10 ml vody, přidají se 3 ml vlnanu měďnatého (Fehlingovo zkoumadlo) a zahřeje se; vznikne červená sraženina.
2. 0,1 g se rozpustí v 5,0 ml roztoku octanu měďnatého a povaří se. Vylučuje se oranžově červená sloučenina (odlišení od laktosy) (viz reakce s Barfoedovým zkoumadlem).
3. 1 ml roztoku glukosy se zahřívá s 1 ml alkalického roztoku kyseliny pikrové. Vzniká červená kyselina pikraminová (reaguje také fruktosa a laktosa).

Příprava alkalického roztoku kyseliny pikrové: 9,5 ml 1% kyseliny pikrové (2,4,6-trinitrofenol) se smíchá s 0,5 ml 10% roztoku hydroxidu sodného a zředí se 10 ml methanolu (příprava pro celý pracovní stůl).

3.3.7.2. Galactosum – Galaktosa (ČL 2009)

Je to D-galaktopyranosa (diastereoizomer glukosy, liší se konfigurací na uhlíku C4) Bílý, krystalický nebo jemně granulovaný prášek. Snadno rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v ethanolu 96%.

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1 g se rozpustí v 10 ml vody, přidají se 3 ml vlnanu měďnatého (Fehlingovo zkoumadlo) a zahřeje se; vznikne oranžová nebo červená sraženina.

3.3.7.3. Fructosum – Fruktosa (ČL 2009) (syn. levulosa)

(-)-D-arabino-hex-2-uloopyranosa

Bílý, krystalický prášek, chuti velmi sladké. Snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu 96% a nerozpustná v chloroformu.

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1 g se rozpustí v 10 ml vody, přidají se 3 ml vlnanu měďnatého (Fehlingovo zkoumadlo) a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

2. 5 g se rozpustí ve vodě a zředí se jí na 10 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se smíchá s 0,2 g resorcinolu a 9 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné a zahřívá se 2 minuty na vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

3. 1 ml roztoku vanilinu v HCl po zahřátí s 1 ml zkoušeného vzorku dává červené zbarvení.

3.3.7.4. Xylosum – Xylosa (ČL 2009)

Je to (+)-D-xylopyranosa, (syn. dřevní cukr)

Široce zastoupená pentosa ve dřevě rostlin ve formě xylanů. Existuje ve formě pyranosy i furanosy, stejně jako ve formě volného aldehydu. Není zkvašována kvasinkami.

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1 g se rozpustí v 10 ml vody, přidají se 3 ml vlnanu měďnatého (Fehlingovo zkoumadlo) a zahřeje se; vznikne oranžová nebo červená sraženina.

3.3.7.5. Xylitolum – Xylitol (ČL 2009)

Je to meso-xylitol. Vzniká redukcí xylosy. Opticky inaktivní C₅ cukerný alkohol.

Bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v ethanolu 96%. Xylitol je vedlejší produkt dřevní sacharifikace (cukernatění, zcukření). Má polovinu sladivosti sacharosy a vykazuje laxativní účinek.

3.3.7.6. Mannitolium - Mannitol (ČL 2009)

D-mannitol

Bílý, krystalický prášek, sladké chuti. Snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu 96%. Je polymorfní. Přítomný v droze *Manna*, což je zaschlá šťáva, vytékající po nařezání kůry stromu *Fraxinus ornus* L. – jasan zimnář, Oleaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. K 5 ml 2% vodného roztoku vzorku přidejte 1 ml 5% Na_2CO_3 a 3 ml KMnO_4 . Směs zahřívajte 2 minuty na vodní lázni, zfiltrujte a přidejte stejný objem Fehlingova zkoumadla. Povařením se vylučuje oranžově červená sraženina oxidu měďného Cu_2O . Cukerný alkohol se oxiduje manganistanem draselným na aldehyd, který vykazuje redukční schopnosti.
2. 1 g vzorku se rozpustí v destilované vodě prosté CO_2 a doplní se na 10 ml (roztok A). K 3 ml čerstvě připraveného roztoku pyrokatecholu (10 g/100 ml) se za chlazení ve vodní lázni s ledem přidá 6 ml konc. kyseliny sírové. K 3 ml ochlazené směsi se přidá 0,3 ml roztoku A a asi 30 sekund se opatrně zahřívá nad plamenem. Roztok se zabarví růžově.

3.3.7.7. Lactosum anhydricum – Laktosa bezvodá (ČL 2009)

Mléčný cukr, β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranosa; nebo směs β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranosy a β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopyranosy.

Bílý krystalický prášek sladké chuti. Snadno, ale pomalu rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v ethanolu 96%.

Zkoušky totožnosti:

1. Asi 0,25 g laktosy se rozpustí v 5 ml vody a přidá se 5 ml 17,5% amoniaku. Roztok zahříváme na vodní lázni při 80 °C, vznikne červené zbarvení.

2. Oxidací kyselinou dusičnou vzniká ve vodě málo rozpustná kyselina slizová (kyselina galaktarová). Jde o test specifický pro galaktosu.

3. 0,5 g octanu sodného a 0,5 g fenylylhydrazinu rozpustíme ve 2,5 ml vody a zahříváme na vodní lázni do úplného rozpuštění. Poté přidáme vzorek cukru a zahříváme 30 minut na vroucí vodní lázni. Po intenzivním ochlazení dochází k vylučování krystalů fenylosazonu.

S přebytky fenylylhydrazinu ve vodném prostředí tlumeném octanovým pufrem vznikají osazony, které představují vhodnější deriváty pro identifikaci cukrů. Jako vodítko při identifikaci může sloužit i rychlost tvorby osazonů a jejich rozpustnost, která se podstatně liší. Například osazony glukosy a fruktosy se vylučují krátce po zahřátí, kdežto sacharosa vyžaduje 20-30 minutové zahřívání. Osazony laktosy a maltosy se vylučují až po ochlazení. Sacharidy, které se liší pouze konfigurací skupin na posledních dvou uhlících, poskytují stejné osazony (D-glukosa, D-fruktosa, D-mannosa).

3.3.7.8. Saccharosum – Sacharosa (ČL 2009)

Saccharum, β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid

Krystalky bezbarvé nebo bílý krystalický prášek, sladké chuti. Snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v ethanolu 96%, prakticky nerozpustná v ethanolu bezvodém.

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1 g látky s několika kapkami koncentrované kyseliny sírové uhelnatí již za chladu, na rozdíl od glukosy a laktosy.

2. 1 g se rozpustí v 5 ml vody, přidá se 0,15 ml čerstvě připraveného síranu měďnatého (125 g/l) a 2 ml čerstvě připraveného hydroxidu sodného (8,5 g/100 ml). Roztok je modrý a čirý, povařením se jeho vzhled nemění. K horkému roztoku se přidají 4 ml kyseliny chlorovodíkové (20 g 35% kyseliny v 100 ml), vaří se 1 minutu a pak se přidají 4 ml hydroxidu sodného (8,5 g/100 ml); ihned vznikne oranžová sraženina.

3.3.7.9. Mel – Med (ČL 2009)

Produkt vzniklý z květního nektaru, sladkých šťáv rozličných rostlinných orgánů, enzymatickým štěpením v žaludku včely medonosné, *Apis mellifera*, Apidae a

následným odpařením vody, zahuštěním, a uložením do medonosných pláštíků k dozrání.

Téměř bílá až tmavohnědá viskózní tekutina, která může být částečně krystalizovaná. Obsahuje glukosu, fruktosu (invertní cukr), v menší míře sacharosu a další cukry.

Zkoušky totožnosti:

1. 20% vodný roztok reaguje na lakmus slabě kyselě (med obsahuje různé organické kyseliny např. kyselinu jablečnou, vinnou, stopy kyseliny mravenčí. Stáním se obsah kyselin zvyšuje.
2. Přidáním několika kapek vodného roztoku taninu se vodný roztok medu ihned znatelně kalí přítomnými bílkovinami.

Zkouška na čistotu:

5 g medu se roztírá 1 minutu v třence s 10 g diethyletheru, výluh se pak zfiltruje a na vlažné vodní lázni se odpaří v porcelánové misce. Suchý odparek se provlhčí několika kapkami čerstvě připraveného 1% roztoku resorcinolu v dýmavé HCl, roztok se nesmí zbarvit trvale červeně (umělý med).

Pravý včelí med se často přislazuje umělou invertosou, která se připravuje hydrolysou sacharosy koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Většinou je tato kyselina v nadbytku, dochází k reakci s fruktosou za vzniku 5-hydroxymethylfuralu, který snadno přechází do diethyletheru (na rozdíl od sacharosy) a s resorcinolem reaguje za vzniku červeného zbarvení.

U následujících drog zjistěte pomocí zkoušek a metodou tenkovrstvé chromatografie, jaké sacharidy obsahují.

3.3.7.10. Malti extractum – Sladový výtažek

Získává se vyluhováním sušeného, rozdrčeného sladu, nejčastěji ječmenného, *Hordeum vulgare* L., ječmen setý, Poaceae, teplou vodou (60 °C) v poměru 1:5 a zahřívá se 15 minut při 70–75 °C.

Obsahové látky: hlavní podíl přítomných cukrů tvoří redukující disacharid maltosa – cukr sladový. Suspenze se přefiltruje přes vatu a v získaném filtrátu se metodou tenkovrstvé chromatografie dokazují sacharidy.

3.3.7.11. Ceratoniae fructus – Svatojánský chléb

Ceratonia siliqua L., rohovník obecný, Fabaceae.

Obsahové látky: sacharidy (glukosa, fruktosa, xylosa, sacharosa, D-pinitol), škrob, pektin, vláknina, bílkoviny.

Zkoušky totožnosti:

1. Práškovanou drogu (0,3 g) přelijeme 20 ml směsí voda methanol (2:3) a necháme macerovat 10 minut v kádince přikrytou hodinovým sklíčkem. Suspenze se přefiltruje přes vatou a v získaném filtrátu se metodou tenkovrstvé chromatografie dokazují sacharidy.

3.3.7.12. Passulae minores – Hrozinky

Vitis vinifera L., réva vinná, Vitaceae.

Hlavní obsahové látky: sacharidy.

Zkoušky totožnosti:

Rozdrcené plody (3 g) přelijeme 20 ml směsí voda : methanol (2 : 3) a necháme macerovat 10 minut v kádince přikryté hodinovým sklíčkem. Suspenze se přefiltruje přes vatou a v získaném filtrátu se metodou tenkovrstvé chromatografie dokazují sacharidy.

3.3.7.13. Cynosbati fructus – Šípek (ČL 2009) syn. Rosae pseudo-fructus

Je to usušený nepravý plod se zbytky suchého kalicha druhu *Rosa canina* L., růže šípková, *R. pendulina* L., růže převislá a jiných druhů rodu *Rosa*, Rosaceae, zbavený nažek.

Obsahové látky: nejméně 0,3 % kyseliny askorbové, počítáno na vysušenou drogu.

Dále jsou přítomné cukry a karotenoidy.

Zkoušky totožnosti:

1. Rozdrcené plody (3 g) přelijeme 20 ml směsí voda : methanol (2 : 3) a necháme macerovat 10 minut v kádince přikryté hodinovým sklíčkem. Suspenze se přefiltruje přes vatou a v získaném filtrátu se metodou tenkovrstvé chromatografie dokazují sacharidy.

3.3.8. ZKOUŠKY TOTOŽNOSTI

Připravte vodné roztoky sacharidů (monosacharidy pentosy, hexosy, aldosa, ketosa; disacharidy redukující a neredukující) a proveďte reakce uvedené výše. Výsledky zaznamenejte do tabulky.

Tabulka výsledných reakcí:

Sacharid	Fehlingovo č.	Barfoedovo č.	Tollensovo č.	Nylanderovo č.

Sacharid	Molischova z.	Selivanovova z.	Anthronová z.

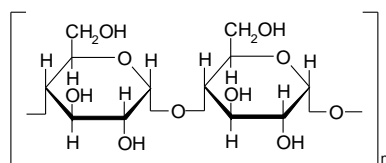
3.4.POLYSACHARIDY

Polysacharidy se skládají z monosacharidů vázaných glykosidickými vazbami. Lze je dělit na homopolysacharidy a heteropolysacharidy podle toho, zda se skládají z jednoho nebo více typů monosacharidů. Homopolysacharidy mohou být děleny podle druhu monomerní jednotky, např. glukany jsou polymery glukosy, zatímco galaktany polymery galaktosy. Polysacharidy, na rozdíl od proteinů a nukleových kyselin, vytvářejí jak lineární, tak větvené polymery, protože glykosidická vazba může vycházet z kterékoliv hydroxylové skupiny.

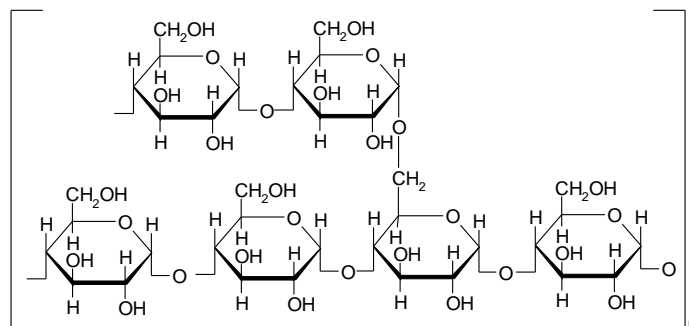
3.4.1.ŠKROBY, CELULOSA A INULIN

Škrob je směsí glukánů, biosyntetisovaných rostlinami jako jejich hlavní zásobní látka. V cytoplasmě rostlinných buněk je uložen v nerozpustných granulích, které se skládají z α -amylosy a amylopektinu. α -Amylosa je lineární polymer, obsahující 200-2000 $\alpha(1\rightarrow4)$ vázaných D-glukopyranosidových zbytků. Střední polymerační stupeň, což je počet jednotek glukosy na molekulu amylosy, je u škrobu různého původu rozdílný. Disacharidovou jednotkou amylosy je maltosa. Vlivem $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby je řetězec stočen do šroubovice. Při důkazu amylosy jodem se molekuly jodu dostávají do dutin vytvořených glukosovými jednotkami a ve formě klathrátu vykazují silnou absorpci světla – intenzivní modré zbarvení. Amylopektin se skládá převážně z glukosových zbytků spojených vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$, ale má větvenou molekulu s vazbami $\alpha(1\rightarrow6)$ přibližně vždy po 24 až 30 glukosových zbytcích. Hydrolysou škrobu vzniká vedle maltosy ještě isomaltosa (6-O- α -D-glukosyl-D-glukosid).

Škroby jsou ve studené vodě a v organických rozpouštědlech nerozpustné. Ve studené vodě škrobová zrna bobtnají, v horké vodě se rozpouštějí a tvoří maz, který je koloidním roztokem škrobu. Velmi šetrnou hydrolysou škrobu zředěnými kyselinami, enzymaticky nebo teplem se rozkládají jen některé glykosidické vazby a vznikají dextriny. Vyšší dextriny se barví jodem červeně až hnědě. Po silnější hydrolyse vzniká maltosa, isomaltosa a konečně glukosa.



amylosa



amylopektin

3.4.1.1. *Oryzae amyllum* – Rýžový škrob (ČL 2009)

Získává se z obiliek druhu *Oryza sativa* L., rýže setá, Poaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Asi 0,5 g se suspenduje ve 25 ml vody, vaří se 1 minutu a ochladí se; vznikne řídký, opalizující sliz.
2. K 1 ml slizu ze zkoušky 1) se přidají 2 kapky roztoku jodu; vznikne oranžovočervené až tmavomodré zabarvení, které po zahřátí zmizí.
3. K 5 ml škrobového mazu ze zkoušky 1) se přidá 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové a zahřívá se 30 minut na vodní lázni. Poté se zalkalizuje na lakmus roztokem hydroxidu sodného. Po přidání 5 ml Fehlingova zkoumadla a zahřátí na vodní lázni nastane redukce a vyloučí se Cu_2O .

3.4.1.2. *Solani amyllum* – Bramborový škrob (ČL 2009)

Získává se z hlíz *Solanum tuberosum* L., lilek brambor, Solanaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Asi 0,5 g se suspenduje ve 25 ml vody, vaří se 1 minutu a ochladí se; vznikne hustý, opalizující sliz.

2. K 1 ml slizu ze zkoušky 1) se přidají 2 kapky roztoku jodu; vznikne oranžovočervené až tmavomodré zbarvení, které po zahřátí zmizí.
3. K 5 ml škrobového mazu ze zkoušky 1) se přidá 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové a zahřívá se 30 minut na vodní lázni. Poté se zalkalizuje na lakmus roztokem hydroxidu sodného. Po přidání 5 ml Fehlingova zkoumadla a zahřátí na vodní lázni nastane redukce a vyloučí se Cu_2O .

3.4.1.3. Tritici amyllum – Pšeničný škrob (ČL 2009)

Získává se z obilek druhu *Triticum aestivum* L., (*T. vulgare* Vill.), pšenice obecná, Poaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Asi 0,5 g se suspenduje ve 25 ml vody, vaří se 1 minutu a ochladí se; vznikne řídký, zakalený sliz.
2. K 1 ml slizu ze zkoušky 1) se přidají 2 kapky roztoku jodu; vznikne tmavě modré zbarvení, které po zahřátí zmizí.
3. K 5 ml škrobového mazu ze zkoušky 1) se přidá 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové a zahřívá se 30 minut na vodní lázni. Poté se zalkalizuje na lakmus roztokem hydroxidu sodného. Po přidání 5 ml Fehlingova zkoumadla a zahřátí na vodní lázni nastane redukce a vyloučí se Cu_2O .

Poznámka: Maniokový škrob se získává z hlíz tropické dřevnatí byliny Manihot esculenta – manihot jedlý z čeledi Euphorbiaceae – pryšcovité. Místní názvy: kasava, maniok, tapioka, mandioka. Patří k důležitým potravinám obyvatel tropů.

3.4.1.4. Dextrinum – Dextrin (ČL 2009)

Je to směs polysacharidů vznikající z kukuřičného, bramborového nebo maniokového škrobu buď částečnou hydrolysou za nebo bez přítomnosti minerálních kyselin (při teplotě 100–120 °C) nebo pyrolytickým rozkladem škrobu či jeho enzymatickým štěpením.

Zkoušky totožnosti:

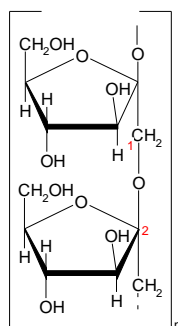
1. Asi 0,5 g se suspenduje ve 25 ml vody, vaří se 1 minutu a ochladí se; k 1 ml tohoto roztoku se přidají 2 kapky roztoku jodu; vznikne červenohnědé nebo tmavomodré zbarvení, které zahřátím zmizí.

2. 5 ml viskózní tekutiny ze zkoušky 1) se odstředí, k horní vrstvě se přidají 2 ml hydroxidu sodného zředěného a po kapkách za třepání se přidá 0,5 ml roztoku síranu měďnatého a vaří se. Vznikne červená sraženina Cu_2O .

Mezi polyglukany patří rovněž **dextrany**. Jsou to frakce dextranů různé relativní molekulové hmotnosti. Dextran se skládá z isomaltooligosacharidů. Vyrábí se hydrolysou a frakcionací polymerních dextranů získaných fermentací sacharosy za použití mikroorganismu druhu *Leuconostoc mesenteroides*. V ČL 2009 jsou officinální: Dextranum 1 pro iniectione, Dextranum 40 pro iniectione, Dextranum 60 pro iniectione, Dextranum 70 pro iniectione.

3.4.1.5. Inulinum – Inulin

Je to lineární polyfruktosan tvořený $\beta(2\rightarrow1)$ fruktofuranosovými jednotkami. Řetězec je zakončen glukosou, její celkový obsah je okolo 2 %. Jeho složení z méně než 100 jednotek podmiňuje dobrou rozpustnost ve vodě. Vyskytuje se sám nebo se škrobem jako rezervní polysacharid. Nalézá se v zásobních orgánech rostlin čeledi Asteraceae – hvězdnicovité (Compositae – složnokvěté), ze kterých se izoluje.



inulin

Zkoušky totožnosti:

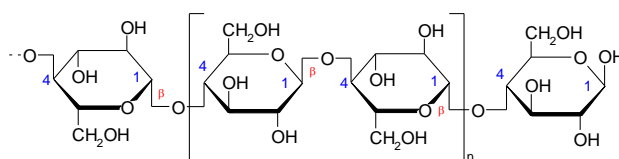
1. Asi 1,0 g se rozpustí mírným zahřátím v 20 ml vody. Roztok se použije také ke zkoušce 2). K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,05 g resorcinolu, 1,0 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 2 minuty se povaří. Vznikne sytě červené zbarvení (hydrolyzou vzniká fruktosa).
2. K 5 ml roztoku ze zkoušky 1. se přidá 0,5 ml roztoku floroglucinolu v kyselině chlorovodíkové. Roztok se zahřeje k varu a vaří se 2 minuty. Roztok se zbarví žlutohnědě až hnědě (reakce fruktosy).

3.4.1.6. Cellulosum - celuloza

Celuloza je vysokomolekulární lineární polymer z D-glukosových jednotek vázaných β -(1 \rightarrow 4). Základní stavební kámen je cellobiosa. Stupeň polymerace nativní celulosy je mezi 600 až 15 000. Celuloza je nejrozšířenější přírodní organická látka, stavební látka rostlinných buněk.

Téměř čistou celulosou jsou bavlněná vlákna, trichomy ze semen bavlníku, *Gossypium*. Technická celuloza se vyrábí ze dřeva jehličnanů, které se musí zbavit ligninu a příměsí. Získá se buničitá vata, *Cellulosum ligni*. Celuloza je produkována také mikroorganismem *Acetobacter xylinum*. Mikrokrystalická celuloza se získává z řas. Z celulosy se esterifikací nebo etherifikací připravují deriváty využívané průmyslově.

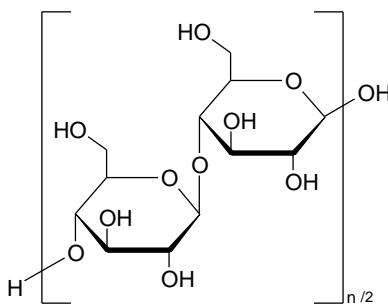
V ČL 2009 jsou oficiální: Cellulosi pulvis, Cellulosum ligni, Cellulosum microcrystallinum, Cellulosi acetas, Lana gossypii depurata, Lana mixta depurata, Lana cellulosi regenerati, Ethylcellulosum.



celuloza

3.4.1.7. Cellulosi pulvis – Celuloza prášková (ČL 2009)

Je to čištěná, mechanicky rozmělněná celuloza, připravená zpracováním celulosy získané jako buničina z vláknitého rostlinného materiálu.



Celuloza

Zkoušky totožnosti:

1. Asi 10 mg se umístí na hodinové sklíčko a disperguje se ve 2 ml chloridu zinečnatého s jodem; látka se zbarví fialovomodře.
2. Viskozimetrické stanovení stupně polymerace (v praktickém cvičení se neprovádí).

3.4.1.8. Cellulosum ligni – Buničitá vata (ČL 2009)

Jsou to splstěná, velmi krátká vlákna čisté vybělené celulosy vyrobené ze dřeva jehličnatých stromů s příměsí nejvýše 20 % vybělené celulosy vyrobené ze dřeva listnatých stromů.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikroskopicky mají vlákna celulosové kaše charakter elementů dřeva, obvykle smrkového, z něhož byla vyrobena. Jsou průhledná a do šířky zbobtnalá.
2. Působením chloridu zinečnatého s jodem se vlákna zbarví fialově.
3. 0,02 M roztokem jodu po přidání 80% kyseliny sírové se zbarví sytě zeleně až modrofialově.
3. Ve zkoumadle Schweitzerově vlákna bobtnají a později se rozpouštějí (celulosa). Schweitzerovo zkoumadlo se připravuje z 10 g CuSO_4 rozpuštěným ve 100 ml vody a 5 g KOH rozpuštěného v 50 ml vody, vzniklá sraženina se prefiltruje, promyje se a usuší. Poté se přidá 15% amoniak až do rozpuštění sraženiny.

Zkouška na čistotu:

1. Proužek buničité vaty se povlhčí 0,2 ml roztoku floroglucinolu v ethanolu 96%. Po 1 minutě se přidá 0,2 ml kyseliny chlorovodíkové. Zbarvení vzorku se nemění a je nejvýše slabě růžové. Nesmí se zbarvit červeně (lignin). Jiný kousek buničité vaty se povlhčí roztokem hydroxidu sodného (20 g/100 ml), smí se zbarvit nejvýše žlutě (suberin).

3.4.1.9. Lana mixta depurata – Obvazová vata čištěná (ČL 2009)

Je to směs čištěné obvazové bavlněné vaty a lesklé nebo matované viskózové vaty. Vysušena předepsaným způsobem obsahuje nejméně 45 % čištěné obvazové bavlněné vaty. Bavlněná, vyčištěná, tuku zbavená a vybělená vlákna semen rodu *Gossypium* L., Malvaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikroskopicky se jeví každé bavlněné vlákno jako jednobuněčné o délce do 4 cm a šířce 40 μm , mající tvar zploštělé a často zkroucené trubice s tlustými zaoblenými stěnami.
2. Viskózní vlákna mají průměrnou délku 25 mm až 50 mm a při pozorování pod mikroskopem v suchém stavu jsou zvlňená a mají stejnou šířku. Na vlákně se nachází mnoho podélných nepravidelně rozmístěných rovnoběžných čar. Průřez vláken je přibližně kulatý nebo eliptický s průměrem od 10 μm do 20 μm . Matovaná vlákna obsahují četné pigmentové částičky o průměru asi 1 μm .
3. Působením chloridu zinečnatého s jodem se vlákna bavlny zbarví fialově.
4. Roztokem jodu se vlákna bavlny barví hnědě. Přidáme-li ještě kyselinu sírovou, zbarví se vlákna fialově modře (celulosa).
5. Ve zkoumadle Schweitzerově bavlněná vlákna nabobtnají, a později se rozpouštějí (celulosa). Pozorujte pod mikroskopem a zakreslete změny tvaru vláken.

3.4.2. SLIZY A KLOVATINY

Slizy jsou makromolekulární polysacharidy, ve vodě silně bobtnající. Rozpouštějí se na viskózní koloidní roztoky hydrofilní. Označují se jako „rostlinné hydrokoloidy“ a na rozdíl od roztoků klovatin se nelepí a nitřovitě netáhnou. V lihu a organických rozpouštědlech jsou nerozpustné. Hydrolyzují na hexosy a pentosy, hlavně galaktosu a arabinosu a na deriváty cukrů – uronové kyseliny, anhydridy, estery s kyselinou sírovou aj. V rostlinách jsou slizy značně rozšířeny, nejvíce v *Malvales* (kyselé slizy) a *Fabales* (neutrální slizy endospermu).

Gumy (klovatiny) jsou makromolekulární polysacharidy, s vodou silně bobtnají nebo se rozpouštějí na koloidní, viskózní, lepivé roztoky kyselé reakce, opticky aktivní. Jsou to komplexní molekuly, vždy heterogenní a rozvětvené. Jsou pokládány za patologické produkty tvořící se po poranění rostliny. Jsou složeny z uronových kyselin a jejich solí spolu s galaktosou, arabinosou a xylosou. Jsou nerozpustné v organických rozpouštědlech. Vodné roztoky klovatin se nitřovitě táhnou a lepí.

3.4.2.1. Důkaz slizu v drogách

V pletivu lze sliz dokázat barevnými reakcemi, které se zakládají na vybarvování slizů některými barvivy. Např. lihový roztok methylenové modři barví slizy modře, roztok hydroxidu draselného žlutě až žlutozeleně, alkalický roztok koralinu červeně, lihový roztok thioninu modrofialově, roztok rutheniové červeně fialově.

K lokalizaci slizových buněk v pletivu se používá naplaveniny tuše. Řez drogou se vloží na podložním sklíčku do kapky tuše (vodou zředěná tuš 1:5) a přikryje se krycím sklíčkem. Za 1 minutu se tuš vymyje vodou a preparát se pozoruje mikroskopem. Pletivo drogy je zbarveno černě a slizové buňky „svítí“, protože sliz nezachytí tuš, která se z nich snadno promytím vyplaví.

3.4.2.2. Hodnocení slizových drog – Číslo bobtnavosti (ČL 2009)

Je vyjádřeno objemem v mililitrech, který zaujme 1 gram drogy spolu s ulpívajícím slizem po nabobtnání ve vodě po dobu 4 hodin.

Postup stanovení:

1,0 g drogy, celé nebo rozdrobněné podle požadavků uvedených v jednotlivých člancích, se převede do 25ml odměrného válce se zabroušenou zátkou o výšce 125 ± 5 mm a děleném po 0,5 ml. Není-li předepsáno jinak, navlhčí se droga 1,0 ml ethanolu 96%, přidá se 25 ml vody a válec se uzavře. Během první hodiny se intenzivně protřepává vždy po 10 minutách, pak se nechá stát 3 hodiny. Po 90 minutách od začátku zkoušky je již většina kapaliny vázána na drogu. Částice drogy ulpívající na hladině se odstraní mírným vertikálním krouživým pohybem válce. Odečte se objem, který zaujímá droga spolu s ulpívajícím slizem. Provádějí se tři paralelní stanovení. Číslo bobtnavosti je vyjádřeno průměrem ze tří paralelních stanovení.

3.4.2.3. Agar – Agar (ČL 2009)

Je to směs polysacharidů z různých druhů řas třídy Rhodophyceae, zejména rodu *Gelidium*. Vyrábí se extrakcí řas vroucí vodou. Výtažek se za horka zfiltruje, zahustí a usuší. Vyskytuje se ve formě prášku nebo stlačených proužků. Má slizovitou chuť.

Zkoušky totožnosti:

1. Pozoruje se pod mikroskopem. Proužky nebo vločky vložené do roztoku jodu (0,005 mol/l) se částečně zbarví hnědofialově. Při stonásobném zvětšení jsou patrná četná drobná bezbarvá vejčitá nebo okrouhlá zrna na amorfním pozadí, ojediněle mohou být přítomné hnědé okrouhlé nebo vejčité spory o průměru až 60 µm.
2. 0,1 g se rozpustí zahřátím v 50 ml vody. Po ochlazení se k 1 ml slizu přidají 3 ml vody tak, aby vznikly dvě oddělené vrstvy. Přidá se 0,1 ml jodu (0,05 mol/l). Rozhraní vrstev se zbarví tmavě hnědofialově. Po protřepání se tekutina zbarví světle žlutě.
3. 5 ml slizu ze zkoušky 2) se zahřívá 30 minut na vodní lázni s 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové 35%. Přidá se 1 ml chloridu barnatého. Do 30 minut vznikne bílý zákal.
4. 0,5 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 50 ml vody. Tekutina se nechá zvolna chladnout; při 35 °C až 30 °C přechází v gel. Tento gel při zahřívání na vodní lázni netaje při teplotě nižší než 80 °C.
5. 1,0 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni ve 100 ml vody a ochladí se na 50 °C. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml trinitrofenolu; do 10 minut nevznikne zákal (želatina).
6. K 1 ml roztoku agaru ze zkoušky 5) přidáme 5 kapek roztoku formaldehydu. Agar se nesráží na rozdíl od roztoku želatiny.
7. Číslo bobtnavosti musí být nejméně 10; nalezená hodnota se liší od deklarované hodnoty nejvýše o 10 %. 1,0 g práškové drogy se zpracuje způsobem popsaným výše.

3.4.2.4. Althaeae folium – Proskurníkový list (ČL 2009)

Je to usušený celý nebo řezaný list druhu *Althaea officinalis* L., proskurník lékařský, Malvaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku rutheniové červeně. Slizové buňky parenchymu jsou zbarveny oranžovočerveně.

2. Důkaz kvercitrósidu a kyseliny chlorogenové tenkovrstvou chromatografií na silikagelu.
3. Číslo bobtnavosti: Nejméně 10. Stanoví se s 0,2 g práškové drogy.

3.4.2.5. Althaeae radix – Proskurníkový kořen (ČL 2009)

Je to loupaný nebo neloupaný, celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Althaea officinalis* L., proskurník lékařský, Malvaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Úlomek kořene se pokápně roztokem jodu, barví se modře (škrob).
2. Úlomek kořene se pokápně zředěným roztokem hydroxidu draselného, barví se žlutě (slizy).
3. Řez drogou se vloží na 10 minut do roztoku orcínu. Pak se pokápně na podložním sklíčku koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a zahřeje se, slizové buňky se barví červeně až fialově (pentosy ve slizu).
4. 1,00 práškové drogy (IV) se protřepává ve zkumavce 3 minuty s 5,0 ml zředěné kyseliny octové a výluh se zfiltruje. K filtrátu se přidá nejdříve 10 kapek zředěné kyseliny sírové, pak 3,0 ml 95% lihu a protřepává se, do 5 minut se roztok nesmí zakalit, ani nesmí vzniknout sraženina. (Zkouška na vápenaté soli používané k bělení).
5. Číslo bobtnavosti: Nejméně 10. Stanovení se provádí s práškovou drogou.

3.4.2.6. Cyamopsidis seminis pulvis – Guar (ČL 2009)

Je to mletý endosperm semen druhu *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub., cyamopsis čtyřhranný, Fabaceae. Obsahuje převážně guarový galaktomannan. Bílý nebo téměř bílý prášek, ze kterého vzniká rozpuštěním ve vodě sliz o různé viskozitě. Je prakticky nerozpustný v ethanolu 96%.

Zkoušky totožnosti:

1. Ke 2 g se v kuželovité baňce rychle přidá 45 ml vody a 30 s se intenzivně promíchává. Po 5 až 10 minutách se vytvoří lepkavý gel, který při obrácení baňky nevytéká.
2. Suspenze 0,1 g v 10 ml vody se smíchá s 1 ml roztoku tetraboritanu sodného (10 g/l); rychle se vytvoří gel.

3. Důkaz galaktosy a mannosy chromatografií na tenké vrstvě silikagelu.

3.4.2.7. Guar galactomannanum – Guar galaktomannan (ČL 2009)

Získává se parciální hydrolysou rozemletého endospermu semen druhu *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub., cyamopsis čtyřhranný, Fabaceae. Je to žlutobílý prášek. Hlavní složky jsou polysacharidy složené z D-galaktosy a D-mannosy.

Zkoušky totožnosti:

1. 1,0 g se navlhčí 2 ml propan-2-olu. Za stálého míchání se zředí vodou na 100 g a míchá se, pokud není látka stejnoměrně dispergována. Pak se nechá stát nejméně 1 h. Roztok se použije pro další zkoušky.
5 g roztoku se smíchá s 0,5 ml roztoku tetraboritanu sodného (10 g/l), rychle se vytvoří gel.
2. 20 g roztoku se zahřívá 10 minut na vodní lázni. Po ochlazení se doplní na původní hmotnost vodou; netvoří se gel.
3. Důkaz galaktosy a mannosy chromatografií na tenké vrstvě silikagelu.

3.4.2.8. Farfarae folium – Podbělový list (ČL 2009)

Je to usušená listová čepel druhu *Tussilago farfara* L., podběl lékařský, Asteraceae. Droga slabě medovitého pachu, chuti slizovité, poněkud nahořklé.

Zkoušky totožnosti:

1. 2,0 g práškované drogy se smíchají s 20 ml vody, vaří se 2 minuty a pak se zfiltruje. 10,0 ml filtrátu se smíchá s 10,0 ml ethanolu 96% a po důkladném protřepání se zfiltruje. Sraženina na filtru se kvantitativně rozpustí v 10,0 ml vody, případný zákal se odstraní opakovanou filtrací. 5,0 ml čirého filtrátu se smíchá s 5,0 ml ethanolu 96%; vznikne intenzivní bílá opalescence (slizy).
2. Číslo bobtnavosti: Nejméně 10; stanoví se s 1,0 g práškované drogy.

3.4.2.9. Fucus – Chaluha (ČL 2009)

Jsou to úlomky usušené stélky druhu *Fucus vesiculosus* L., chaluha bublinatá, nebo *Fucus serratus* L., ch. pilovitá nebo *Ascophyllum nodosum* LeJolis, Fucaceae. Patří mezi hnědé řasy, Phaeophyceae. Droga má slanou slizovitou chuť a nepříjemný

mořský pach. Obsahuje 0,03 % až 0,2 % celkového jodu, počítáno na vysušenou drogu. Stélka dále obsahuje membránový sliz, mannitol, hořčinu a barviva.

Zkoušky totožnosti:

1. 1 g práškové drogy se smíchá s 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové 2% (V/V). Důkladně se protřepe a zfiltruje se. Zbytek se promyje 10 ml vody a zfiltruje se. Ke zbytku se přidá 10 ml roztoku uhličitanu sodného (200 g/l), protřepe se a odstředí, pH čiré supernatantní tekutiny se upraví kyselinou sírovou na hodnotu 1,5; pomalu vzniká bílá vločkovitá sraženina.

Stanovení obsahu:

Stanovuje se celkový jod titračně.

3.4.2.10. Lichen islandicus – Lišejník islandský (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná usušená stélka druhu *Cetraria islandica* L., puklérka islandská, Parmeliaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. 1,0 g práškové drogy se smíchá s 10,0 ml vody a vaří se 2 až 3 minuty. Šedohnědý roztok po vychladnutí vytvoří gel, který se jodem barví modře.

2. Mikrosublimate (ČsL 4)

0,1g práškové nebo rozemnuté drogy umístěte do středu hodinového skla o průměru asi 7 cm. Zahřívejte 5 minut při nižší teplotě (zbavení vlhkosti). Poté se hodinové sklíčko pokryje plochou skleněnou destičkou (lze nahradit těsně u sebe přiloženými podložními sklíčky), jejíž okraje přesahují asi o 1 cm hodinové sklo. Hodinové sklo se pak zahřívá na asbestové síťce malým plamenem (nejméně 10 cm pod síťkou). Během této doby lze ploché krycí sklo několikrát vyměnit k pozorování rozličných stadií mikrosublimate. Mikrosublimate se ihned po vychladnutí vyšetřuje mikroskopicky, nebo se podrobí předepsané chemické reakci. Prášková droga dává při 220-250 °C mikrokrystalický sublimát nažloutlé barvy (kyselina fumarová). Získaný mikrosublimate rozpustíte v kapce amoniaku. Odpařte tento roztok a pozorujte pod mikroskopem jehlicovité, často spojené krystalky (amonná sůl kyseliny fumarové).

3. Vyvařené úlomky drogy se pokápnou roztokem jodu a po chvíli se vymyjí vodou, barví se modře (dextrolichenin). (ČsL 4)
4. Číslo bobtnavosti: Nejméně 4,5; stanoví se s 1,0 g práškové drogy.

3.4.2.11. Lini semen – Lněné semeno (ČL 2009)

Je to usušené zralé semeno druhu *Linum usitatissimum* L., len setý, Linaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Několik rozdrcených semen se v porcelánové misce pokápnou roztokem orcinu a nechá se odpařit do sucha. Poté se přidají 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a směs se zahřeje na vodní lázni; tekutina se zbarví červeně až fialově (pentosy ve slizu).
2. Číslo bobtnavosti: Nejméně 4; stanoví se s 1,0 g drogy vcelku.

3.4.2.12. Malvae sylvestris flos – Květ slézu lesního (ČL 2009)

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

Zkouška totožnosti:

1. Chromatografický důkaz malvinu a malonylmalvinu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.
2. Číslo bobtnavosti: Nejméně 15; stanoví se s 0,2 g práškové drogy navlhčené 0,5 ml ethanolu bezvodého.

3.4.2.13. Plantaginis folium – Jitrocelový list (ČL 2009) syn. Plantaginis lanceolatae folium.

Je to usušený list a stvol, celý nebo části, druhu *Plantago lanceolata* L. *sensu lato*, jitrocel kopinatý, Plantaginaceae.

Obsahuje slizy, deriváty kyseliny *o*-dihydroxyskořicové, iridoidní glykosid aukubin.

Slouží k přípravě v Národní části ČL 2009 uvedených **Plantaginis extractum fluidum – Jitrocelový extrakt tekutý** a **Plantaginis sirupus – Jitrocelový sirup**.

3.4.2.14. Plantaginis ovatae semen – Semeno jitrocele vejčitého (ČL 2009)

Je to usušené zralé semeno druhu *Plantago ovata* Forssk. (*P. ispaghula* Roxb.), jitrocel vejčitý, Plantaginaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikroskopické.
2. Důkaz xylosy, galaktosy a arabinosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.
3. Číslo bobtnavosti: Nejméně 9. Stanoví se z 1,0 g rozdrobněné drogy.

3.4.2.15. Plantaginis ovatae testa – Osemení jitrocele vejčitého (ČL 2009)

Syn. *Plantaginis ovatae seminis tegumentum*

Je to osemení druhu *Plantago ovata* Forssk. (*P. ispaghula* Roxb.), jitrocel vejčitý, Plantaginaceae.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikroskopické.
2. Důkaz xylosy, galaktosy a arabinosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.
3. Číslo bobtnavosti: Nejméně 40; stanoví se s 0,1 g práškované drogy.

3.4.2.16. Psyllii semen – Chmelíkové semeno (ČL 2009)

Je to zralé celé usušené semeno druhu *Psyllium afra* (L.) Mirbel, (*Plantago afra* L., *Plantago psyllium* L.), chmelík blešníkový, nebo druhu *Psyllium arenaria* (W. et K.) Mirbel (*Plantago indica* L., *P. arenaria* (W. et K.) Mirbel, chmelík písečný, jitrocel indický, jitrocel písečný, Plantaginaceae.

Semena jsou světle hnědá až tmavě hnědá, hladká, lesklá, podlouhle oválná, 2 až 3 mm dlouhá a 0,8 až 1 mm široká, na jednom konci širší. Droga sladké chuti.

Zkoušky totožnosti:

1. Makroskopické.
2. Číslo bobtnavosti: Nejméně 10. Stanoví se z 1,0 g rozdrobněné drogy.

3.4.2.17. Acaciae gummi – Arabská klovatina (ČL 2009)

Je to na vzduchu ztvrdlá klovatina vytékající samovolně nebo získaná po naříznutí kmene a větví druhu *Acacia senegal* L. Willd., akácie senegalská a jiných druhů rodu

Acacia afrického původu a druhu *Acacia seyal* Del., akácie arabská, Fabaceae (dříve Mimosaceae), podčeleď Mimosoideae. Je velmi zvolna (asi po 2 h) a téměř beze zbytku rozpustná ve dvojnásobné hmotnosti vody. Získaná tekutina (sliz) je bezbarvá nebo nažloutlá, hustá, viskózní lepivá, průsvitná, na papír lakmusový modrý reaguje slabě kyselé. Arabská klovatina je prakticky nerozpustná v ethanolu 96%.

Zkoušky totožnosti:

1. 2 g práškované drogy se častým mícháním po dobu 2 h rozpustí ve 4 ml vody. Ke 2 ml se přidají 2 ml ethanolu 96%. Po protřepání vznikne bílý rosolovitý sliz; po přidání 10 ml vody vznikne tekutina (sliz se rozpustí).
2. Ke zbylým 2 ml roztoku z pokusu 1) se po kapkách přidá roztok octanu olovnatého zásaditého; po několika minutách vznikne bílá sraženina (klovatina).
3. Důkaz galaktosy, arabinosy a rhamnosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.

Z roztoku arabské klovatiny se získává **Acaciae gummi dispersione desiccatum – Arabská klovatina usušená rozprášením (ČL 2009)**.

3.4.2.18. Acaciae mucilago – Sliz z arabské klovatiny (ČL 2009)

Je to roztok arabské klovatiny *Acaciae gummi* v konzervační vodě. Ztvrdlá klovatina druhu *Acacia senegal* L. Willd., Fabaceae (dříve Mimosaceae), podčeleď Mimosoideae. Hydrolyticky se štěpí na kyselinu glukuronovou, galaktosu, rhamnosu a arabinosu. 100,0 g arabské klovatiny usušené rozprášením popř. práškované se rozpustí v konzervační vodě do objemu 300 ml.

Zkoušky totožnosti:

1. 1 ml roztoku se smíchá se 3 ml vody a po kapkách se přidá octan olovnatý zásaditý; po několika minutách vznikne bílá sraženina (klovatina).
2. Důkaz galaktosy, arabinosy a rhamnosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.
3. Ke 2 ml vzorku se přidá 0,5 ml zkoumadla Millonova a zahřeje se k varu. Kapalina se zbarví tmavě červeně (parabeny).
4. K 5 ml vzorku se přidá 5 kapek zředěného roztoku peroxidu vodíku a 5 kapek roztoku benzidinu; do 10 minut vznikne tmavě modré až modrozelené zbarvení (oxidasy a peroxidasy).

5. K 5 ml vzorku se přidají 3 ml zředěného roztoku peroxidu vodíku, protřepe se a přidá několik kapek guajakové tinktury. Roztok se ihned nebo po zahřátí zbarví modře (oxidasy a peroxidasy).

3.4.2.19. Tragacantha - Tragant (ČL 2009)

Je to lepkavý, na vzduchu tvrdnoucí sliz vytékající samovolně nebo po naříznutí kmenu a větví druhu *Astragalus gummifer* Labill., kozinec slizodárný, Fabaceae, a některých dalších druhů rodu *Astragalus* ze západní Asie.

Zkoušky totožnosti:

1. Droga se upráškuje. Téměř bílý prášek tvoří slizovitý gel s desetinásobným množstvím vody.
2. Prášková droga se pozoruje pod mikroskopem v glycerolu. Ve slizovité hmotě jsou patrné četné vrstevnaté buněčné membrány, které se barví chloridem zinečnatým s jodem fialově. Slizovitá hmota také obsahuje škrobová zrna jednotlivá nebo v malých skupinách.
3. 0,5 g práškové drogy se navlhčí 1 ml ethanolu 96% a postupně za stálého protřepávání se přidává 50 ml vody, dokud nevznikne homogenní sliz. 5 ml slizu se smíchá s 5 ml vody a 2 ml hydroxidu barnatého. Vznikne jemná vločkovitá sraženina. Zahřívá se 10 minut na vodní lázni; vzniká intenzivní žluté zbarvení.
4. Důkaz arabinosy, xylosy a galaktosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.

3.4.2.20. Xanthani gummi – Xanthanová klovatina (ČL 2009)

Je to vysokomolekulární anionický polysacharid, který vzniká při fermentaci cukrů mikroorganismem druhu *Xanthomonas campestris*. Skládá se z glukosy, anhydroglukosy, kyseliny glukuronové a mannosy. Většina koncových jednotek obsahuje pyruvátový podíl. Xanthanová klovatina má relativní molekulovou hmotnost přibližně 1×10^6 . Vyskytuje se ve formě sodné, draselné nebo vápenaté soli. Vzhled – bílý nebo žlutobílý sypký prášek. Dobře rozpustná ve vodě za vzniku silně viskozního roztoku, prakticky nerozpustná v organických rozpouštědlech.

Zkoušky totožnosti:

1. 1 g se v baňce suspenduje v 15 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 M, baňka se uzavře fermentační zátkou obsahující roztok hydroxidu barnatého (47,3 g/l) a

- 5 minut se opatrně zahřívá. Roztok hydroxidu barnatého se bíle zakalí.
2. Ke 300 ml vody předem zahřáté na 80 °C a intenzivně míchané mechanickým míchadlem ve 400 ml kádince se v okamžiku největší rychlosti přidá suchá směs obsahující 1,5 g zkoušené látky a 1,5 g rohovníkové moučky (mletý endosperm *Ceratonia siliqua* L. TAUB., Fabaceae, obsahující až 80 % vodou rozpustné galaktomannanové klovatiny). Míchá se do úplného rozpuštění a v míchání se pokračuje ještě 30 minut; během míchání teplota vody nepoklesne pod 60 °C. Pak se míchání přerušuje a směs se nechá stát nejméně 2 h. Při teplotě nižší než 40 °C vzniká tuhý gumovitý gel; gel však nevzniká v 1% kontrolním roztoku vzorku připraveném stejným způsobem, bez přídavku rohovníkové moučky.
 3. Důkaz glukosy a mannosy v hydrolyzátu metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.

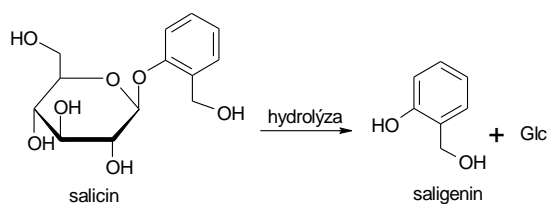
4. GLYKOSIDY JAKO HLAVNÍ ÚČINNÉ LÁTKY DROG

Glykosidy jsou organické látky složené ze sacharidu (glykon) a části necukerné (aglykon neboli genin). Mono- nebo oligosacharidové jednotky jsou spojeny acetalovou vazbou s hydroxylovou skupinou alkoholu nebo fenolu (*O*-glykosidy), s aminoskupinou (*N*-glykosidy), nebo se sulfhydrylovou skupinou (*S*-glykosidy). Podle konfigurace poloacetalového hydroxylylu v molekule cukru se glykosidy dělí na α -glykosidy nebo β -glykosidy. Štěpení α - resp. β -glykosidické vazby jsou schopny pouze α - resp. β - glykosidasy. Thioglykosidy se štěpí myrosinasou. Glykosidy jsou převážně bezbarvé krystalické látky rozpustné ve vodě a ve zředěném ethanolu a methanolu. Mají hořkou chuť a jsou opticky aktivní. Mnohé jsou cennými léčivy. Rozdělují se podle charakteru aglykonu, např. na fenolové, anthrachinonové, steroidní aj. Farmakodynamický účinek glykosidů je převážně vázán na aglykon, cukerná složka jej může modifikovat. Účinek některých glykosidů se dostaví po uvolnění aglykonu (např. hořčičná silice, kumarin), u jiných je podmíněn celým glykosidem (např. glykosidní hořčiny).

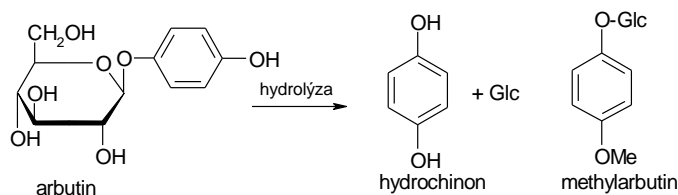
4.1.FENOLOVÉ GLYKOSIDY

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 hydrolýze a oxidaci poskytují kyselinu salicylovou a glukosu.



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



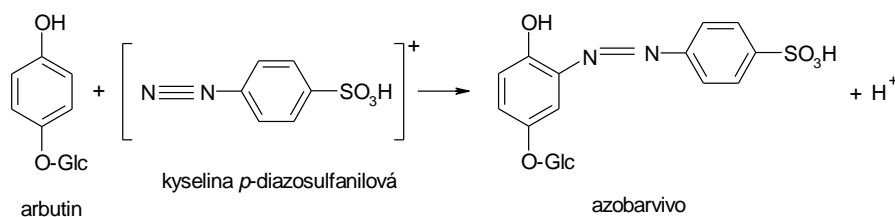
Fenolové glykosidy se biogeneticky odvozují z metabolismu kyseliny šikimové. Kyselina salicylová vzniká z kyseliny isochorismové. Hydrochinon je produktem oxidativní dekarboxylace kyseliny *p*-hydroxybenzoové.

4.1.1. 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.

4.1.2. 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 Emersonova reakce – deriváty hydrochinonu za přítomnosti oxidačního zkoumadla reagují s 4-aminofenazonem za vzniku červeně zbarveného produktu).



4.1.3. DROGY S OBSAHEM FENOLOVÝCH GLYKOSIDŮ

4.1.3.1. 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. lýkocová 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. Práškováná 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.

4.1.3.2. 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.

4.1.3.3. 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, trísloviny, flavonoidy, triterpeny.

4.1.3.4. Myrtilli folium – Borůvkový list

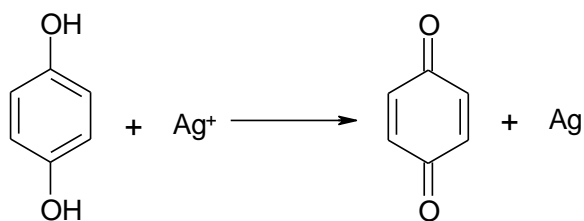
Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Vaccinium myrtillus* L., borůvka černá, Ericaceae (dříve Vacciniaceae), podčeleď Vaccinioideae. Obsahuje arbutin, methylarbutin, trísloviny a flavonoidy.

4.1.3.5. *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.

4.1.3.6. Zkoušky totožnosti pro výše uvedené tři drogy

1. 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).
2. 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).
3. Úlomek listu se vloží do roztoku vanilinu v koncentrované kyselině chlorovodíkové, zbarví se intenzivně červeně (*Vaccinium myrtillus* je téměř bezbarvý).
4. Prášková droga se povlhčí koncentrovanou HCl a podrobí se mikrosublímaci. Při teplotě 120-130 °C vysublímkuje hydrochinon.
 - a. Pokápneme-li se sublimát amoniakálním roztokem AgNO₃, zčerná vyredukovaným stříbrem (důkaz hydrochinonu).
 - b. 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 práškované 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 vyvíjí se 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 práškované 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 vyvíjí se 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.

4.1.3.7. Stanovení obsahu fenolových glykosidů

1. Jodometricky (ČsL 4)

Asi 0,5 g práškované 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 práškového 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 práškové 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 vatu. 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 fázi 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:

F_1 – 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).

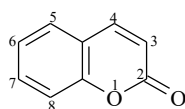
4.2.KUMARINY

Kumariny jsou laktony kyseliny o-hydroxyskořicové. Kyselina o-hydroxyskořicová se v rostlinách nachází ve formě glykosidových prekursorů a po hydrolyze probíhá cyklizace na lakton. Kumariny se v rostlinách vyskytují buď volné nebo ve formě glykosidů.

Kumariny jsou poměrně dobře rozpustné v horké vodě a v ethanolu. Normálním octanem olovnatým se nesrážejí; pokud v molekule obsahují fenolové hydroxylové skupiny, srážejí se zásaditým octanem olovnatým. Z chemické struktury kumarinů vyplývá absorpce světla v ultrafialové oblasti a jejich fluorescence, která je závislá na pH prostředí.

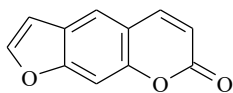
Podle chemické stavby je můžeme rozdělit na:

a) jednoduché

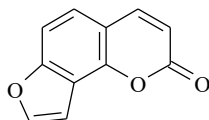


kumarin

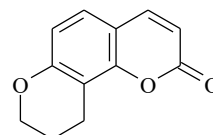
b) kondenzované kumariny, které se dále dělí na furanokumariny a pyranokumariny



furanokumariny C-6/C-7



furanokumariny C-7/C-8



pyranokumariny

Kumariny působí tlumivě na CNS, snižují teplotu. Mají účinky spasmolytické, sedativní, diuretické, antiseptické. Některé z nich senzibilizují pokožku na sluneční záření. Jiné se používají jako ochrana proti intenzivnímu slunečnímu záření (např. eskulin, eskuletin).

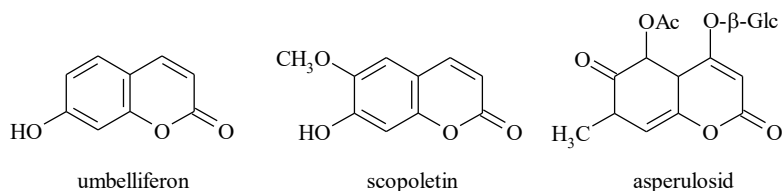
Ve vlhké droze (*Melilotus officinalis*, Fabaceae) se z nich fermentačním působením bakterií tvoří dikumarol, který má silný antikoagulační a hemoragický účinek, používá se i jako léčivo na profylaxi a terapii trombóz.

4.2.1.DROGY S OBSAHEM KUMARINŮ

4.2.1.1. Asperulae herba - Mařinková nat'

Galium odoratum (syn. *Asperula odorata*), *Rubiaceae*

Obsah: nesubstituovaný kumarin, další kumariny umbelliferon a scopoletin, glykosid asperulosid, hořčiny, trísloviny.



Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený vzorek: 1 g práškované drogy se na vodní lázni extrahuje 10 ml methanolu za stálého protřepávání 30 minut. Extrakt se zfiltruje a odpaří a objem cca 1 ml.

Porovnávací roztok: 1% methanolický roztok bergaptenu.

Vyvíjecí soustava: toluen : diethylether (1 : 1, V/V), nasycené 10% kyselinou octovou.

Detekční zkoumadlo: 10% roztok KOH v ethanolu.

Na vrstvu se nanese po 10 ml obou roztoků a vyvíjí se po dráze 12 cm. Po vysušení se vrstva postříká detekčním zkoumadlem a pozoruje se pod UV při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je těsně nad úrovní skvrny bergaptenu v porovnávacím roztoku patrná žlutozelená skvrna kumarinu, dále mohou být patrné slabé skvrny umbelliferonu ($R_f = 0,4$) a scopoletinu ($R_f = 0,25$).

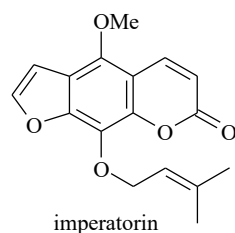
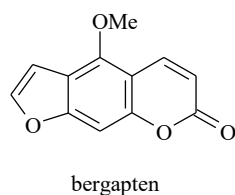
4.2.1.2. Levistici radix - Libečkový kořen (ČL 97 a ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek a kořen druhu *Levisticum officinale*, libeček lékařský, *Apiaceae*

Obsahové látky: furanokumariny (bergapten, imperatorin), silice, flavonoidy, sliz, sacharidy.

Obsah (počítáno na vysušenou drogu):

- silice: nejméně 4,0 ml/kg (celá droga)
- silice: nejméně 3,0 ml/kg (řezaná droga)



Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený vzorek: 1 g práškované drogy se na vodní lázni extrahuje 5 ml methanolu, vaří se 30 s. Extrakt se ochladí a zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1% methanolický roztok bergaptenu, 5 mg kumarinu a 25 μ l eugenolu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Vyvíjecí soustava: toluen : dichlormethan (1 : 1, V/V).

Nanášení: 20 μ l do proužků

Vyvíjení: 2 \times po dráze 10 cm.

Sušení: na vzduchu

Detekce: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Označí se zhášeující skvrny odpovídající eugenolu a kumarinu na chromatogramu porovnávací roztoku. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v dolní třetiněmodře nebo žlutě fluoreskující skvrna.

Podle ČL 97: mobilní fáze toluen : diethylether 1 : 1 nasycený 10% kyselinou octovou. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná modrá skvrna bergaptenu a případně i zelená skvrna imperatorinu se stejným R_f a dále skvrna umbelliferonu ($R_f = 0,4$). Výrazná modrá skvrna s $R_f = 0,9$ je 3-butylydenftalid.

Stanovení obsahu:

Provede se stanovení silic v rostlinných drogách. 40 g upráškované drogy těsně před stanovením se destiluje 4 h rychlostí 2-3 ml/minutu v 2000ml baňce s 500 ml vody a 10 kapkami parafinu tekutého; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu.

4.2.1.3. Bergamottae etheroleum - Bergamotová silice (ČL 2009)

Je to silice získaná lisováním čerstvého oplodí druhu *Citrus aurantium* L. subsp. *bergamia* (RISSO. Et POIT.) ENGLER.

Obsahové látky: silice (linalyl-acetát, geraniol, terpineol, linalool), kumariny (bergapten, citropten)

Obsah: nejméně 30,0 % esterů, vyjádřeno jako linalyl-acetát

Zkoušky totožnosti:

Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený vzorek: roztok bergamotové silice = 1 g se rozpustí v ethanolu bezvodém a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok: 1% methanolický roztok bergaptenu.

Vyvíjecí soustava: toluen : diethylether (1 : 1, V/V), nasycené 10% kyselinou octovou.

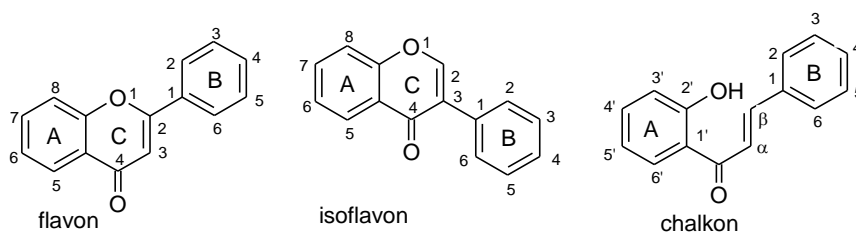
Detekční zkoumadlo: 10% roztok KOH v ethanolu.

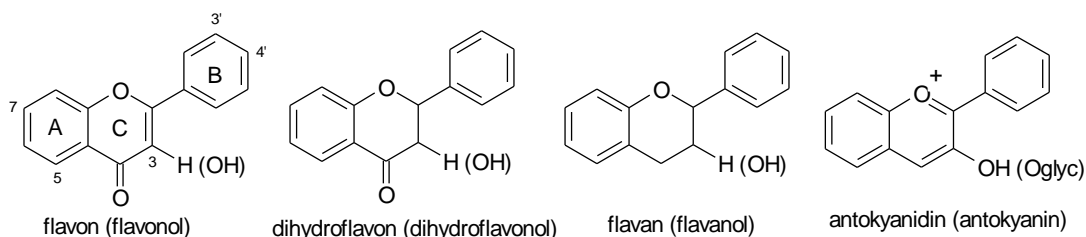
Na vrstvu se nanese po 10 ml obou roztoků a vyvíjí se po dráze 12 cm. Po vysušení se vrstva postříká detekčním zkoumadlem a pozoruje se pod UV při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná modrá skvrna bergaptenu. Dále je zde patrná skvrna citroptenu a případně i další skvrny.

4.3.FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou početnou skupinou rostlinných polyfenolů s C₆-C₃-C₆ skeletem. Většina flavonoidů má tento skelet ve formě fenylochromanu. Fenylyl může být napojen v poloze 2 (flavonoidy), v poloze 3 (isoflavonoidy) nebo 4 (neoflavonoidy). Flavonoidům jsou strukturně blízké jejich otevřené deriváty chalkony a dále aurony. K flavonoidům jsou přiřazeny antokyany pro strukturní a biosyntetickou podobnost. Další třídění je založeno na oxidačním stupni pyranového kruhu, na počtu a poloze hydroxylových a methoxylových skupin, na různém počtu, povaze a poloze glykosidicky vázaných cukrů. Flavonoidy se v rostlinách vyskytují zpravidla jako *O*-glykosidy, méně *C*-glykosidy. Cukerná složka flavonoidů je nejčastěji tvořena D-glukosou, D-galaktosou a L-rhamnosou, méně L-arabinosou nebo D-xylosou a dalšími. Z disacharidů jsou to např. rutinosa (6-β-L-rhamnosido-D-glukosa) nebo primverosa (6-β-D-xylosido-D-glukosa). Flavonoidy patří mezi všeobecně rozšířená rostlinná barviva, zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. Příkladem jsou žluté flavony spolu s chalkony a aurony a červené, modré nebo purpurové antokyany, měnící barvu v závislosti na pH. Některé flavonoidy nevykazují barevnost, ale přispívají k barvě jako kopigmenty. Flavonoidy absorbují ultrafialové záření, což je vnímáno pouze hmyzem a slouží jako navigace pro opylovače. Flavonoidy jsou přítomny také v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde chrání pletiva před destruktivním účinkem ultrafialového záření. V živém organismu se pravděpodobně zapojují do oxidačně-redukčních procesů, mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, vykazují protizánětlivé a vazoprotektivní účinky. Některé drogy s obsahem flavonoidů vykazují účinek diuretický a spasmolytický.

Základní skelety flavonoidů a chalkonů



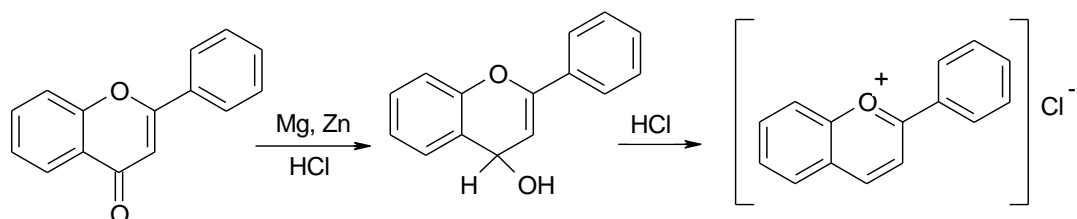


Početnější jsou v rostlinách obsaženy glykosidy s flavonovým aglykonem. Obvyklá je substituce karbonylovou skupinou v poloze C-4. V dalších polohách jsou časté substituce hydroxylem, alkoxyem (nejčastěji v polohách 3, 5, 7, a 4') nebo uhlovodíkovým řetězcem (nejčastěji v polohách 6 či 8).

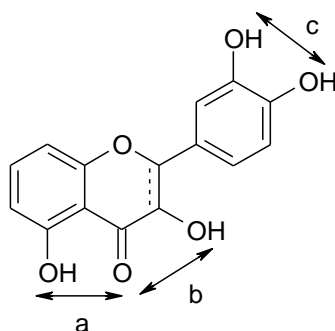
4.3.1. KVALITATIVNÍ DŮKAZ FLAVONOIDŮ

Flavonoidy jsou poměrně reaktivní sloučeniny. Za reaktivitu zodpovídají snadno disociovatelné fenolové hydroxylové skupiny, karbonylová skupina a chelátotvorné 4-keto-3-hydroxy a 4-keto-5-hydroxy seskupení, případně 3',4'-*o*-dihydroxy-seskupení. Nejreaktivnější jsou flavonoidy s aglykonem odvozeným od flavonolu.

Ke kvalitativnímu důkazu flavonoidů se užívá redukčního testu, při němž se působením hořčíku nebo zinku aglykony a glykosidy flavonové, flavonolové a flavanonové v okyseleném alkoholickém prostředí projevují červeným až fialovým zbarvením. Podstatou reakce je hydrolytické odštěpení cukerné části molekuly a uvolněný aglykon přechází na sloučeniny podobné antokyanidinům.

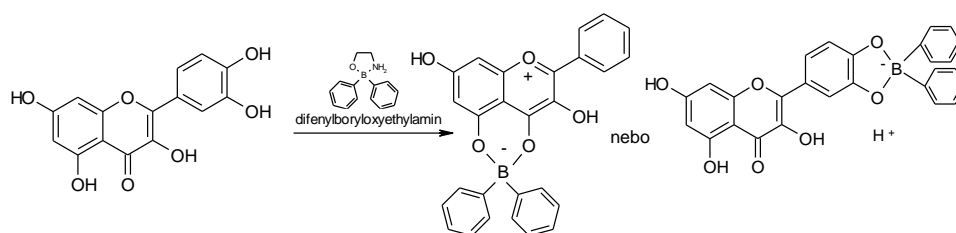


Dalším typem reakcí pro kvalitativní důkaz flavonoidů je tvorba chelátů s kovy. Tvorba komplexů je možná u flavonů substituovaných na C-3 nebo C-5 hydroxylovou skupinou, nebo u flavonoidů, substituovaných na kruhu B *o*-dihydroxylovým seskupením, tedy v místech označených a), b), c).



Komplexy flavonoidů jsou barevné a většinou fluoreskují. Například rutosid s octanem olovnatým v amoniakálním prostředí tvoří komplex oranžové barvy, s chloridem železitým v prostředí hydroxidu sodného dává komplex železa tmavě zelené zabarvení, které přidáním NaOH přechází v červenou až červenohnědou barvu.

Borátový test dávají flavonoidy splňující strukturální znaky výše uvedené [(a), b), c)]. V přítomnosti kyseliny borité vytvářejí komplex s borem (dvě hydroxylové skupiny kyseliny borité jsou substituovány organickým zbytkem), jehož vznik podporuje přítomnost kyseliny šťavelové. Komplex se projevuje zelenou fluorescencí. Borátový test je podstatou lékopisného detekčního zkoumadla (difenylboryloxyethylaminu, syn. Neuova zkoumadla), používaného pro vizualizaci flavonoidů po separaci na tenké vrstvě a následné detekci při 254 nebo 365 nm.



4.3.2. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ FLAVONOIDŮ

Stanovení obsahu flavonoidů se nejčastěji provádí kolorimetricky. Kolorimetrické stanovení je založené na vzniku barevných komplexů se solemi hlinitými nebo zirkoničitými. Tvorba komplexů flavonoidů s chloridem hlinitým se provádí nejlépe v rozpouštědle sestávajícím ze směsi kyseliny octové a pyridinu. V tomto rozpouštědle nedochází ke vzniku sraženin, které absorbují na svém povrchu část účinných látek a

tak způsobují snížení výsledků. Doprovodné látky (např. chlorofyl) rušící stanovení se mohou odstranit vytřepáním extraktu chloridem uhličitým. Výsledky měření se vztahují na standard, kterým je často rutosid. Přesnější metodou pro stanovení obsahu flavonoidů přítomných v droze je HPLC.

U následujících drog se provedou zkoušky totožnosti (podle 1-3 u Fagopyri herba) a u vybraných drog chromatografická analýza a spektrofotometrické stanovení obsahu flavonoidů.

4.3.3. DROGY S OBSAHEM FLAVONOIDŮ

4.3.3.1. Fagopyri herba – Pohanková nať (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná nať druhu *Fagopyrum esculentum* Moench, pohanka obecná, Polygonaceae, sbíraná v časně fázi kvetení před vytvořením plodů a ihned sušená.

Obsah: Nejméně 4,0 % rutosidu, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

1. 1,0 g práškové drogy se extrahuje za varu 15 ml ethanolu po dobu 5 minut. Po ochlazení se zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 1,0 g práškového zinku a 2,0 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné. Po několika minutách se roztok zbarví červeně.
2. Ke 3 ml filtrátu ze zkoušky 1) se přidá 0,5 ml roztoku octanu olovnatého a 0,5 ml roztoku amoniaku zředěného. Vznikne oranžově zbarvená sraženina (rutosid).
3. 5 ml filtrátu ze zkoušky 1) se odpaří na porcelánové misce do sucha. Ke zbytku se přidají 3,0 ml 3% roztoku kyseliny borité a 1,0 ml roztoku kyseliny šťavelové a směs se opět odpaří do sucha a ponechá ještě asi 5 minut na vodní lázni. Zbytek se po ochlazení extrahuje diethyletherem. Diethyletherový roztok fluoreskuje žluto-zeleně.
4. Důkaz flavonoidů chromatografií na tenké vrstvě:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškové drogy se smíchá s 5,0 ml methanolu a zahřívá se 10 minut na vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem, ochladí se a zfiltruje.

Porovnávací roztok: 10 mg hyperosidu a 10 mg rutosidu se rozpustí v 10 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: 20 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna hyperosidu oranžově fluoreskující a pod ní oranžovožlutě fluoreskující skvrna rutosidu.

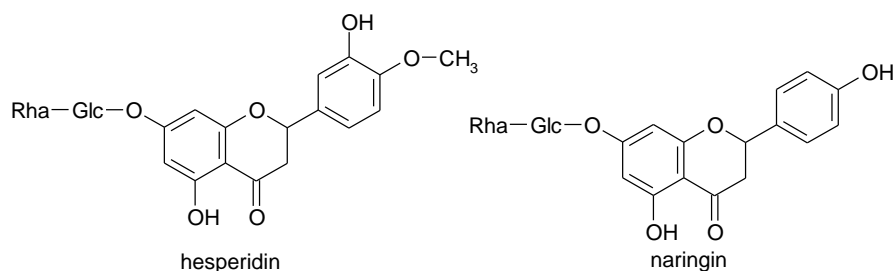
Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (rutosid a hyperosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v horní části další dvě červeně fluoreskující skvrny a dvě světle modře fluoreskující skvrny.

Stanovení obsahu:

Spektrofotometricky na rutosid.

4.3.3.2. Aurantii amari pericarpium – Oplodí hořkého pomeranče (ČL 2009)

Je to usušené oplodí zralého plodu druhu *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*Citrus aurantium* ssp. *amara* Engl.), citroník pomerančový hořký, Rutaceae, částečně zbavené bílé houbovité tkáně (albeda). Obsahuje flavonoidy hesperidin, naringin a silici.



Zkoušky totožnosti:

1. Několik úlomků drogy ve zkumavce se protřepe s 5,0 ml zředěného roztoku hydroxidu draselného, roztok se zbarví intenzivně žlutě (hesperidin).
2. Několik úlomků drogy se protřepává ve zkumavce s 5 ml koncentrované kyseliny sírové, roztok se barví žlutě, mírným zahříváním červenohnědě (hesperidin).
3. Chromatografický důkaz naringinu: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut při 65 °C ve vodní lázni za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1,0 mg naringinu a 1,0 mg kyseliny kávové se rozpustí v 1 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé a ethylacetátu (10 : 15 : 75). Vzorek se nanáší po 20 µl do proužků. Vyvíjí se po dráze 10 cm. Suší se na vzduchu a 5 minut v sušárně při 110 °C až 120 °C.

Detekce: Ještě teplá vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu v methanolu (10 g/l) a potom roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Pozoruje se za 1 h v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu je patrná tmavě zeleně fluoreskující skvrna naringinu.

4. Extrahovatelné látky: Nejméně 6 %.

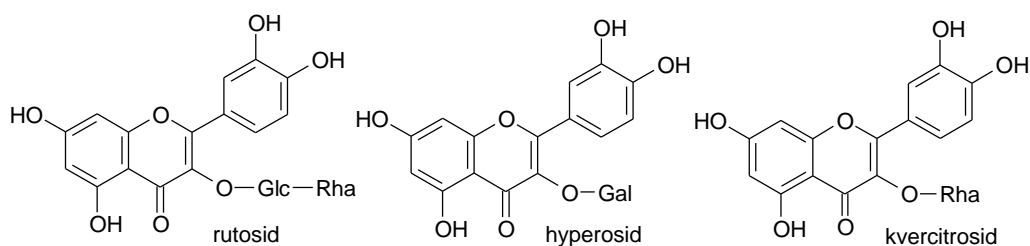
Ke 2,000 g práškové drogy se přidá směs 3 ml vody a 7 ml ethanolu 96%, nechá se stát 2 h za častého protřepávání a pak se zfiltruje. 2,000 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a pak se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad oxidem fosforečným se zváží. Hmotnost zbytku po vysušení je nejméně 120 mg.

Aurantii amari pericarpium (ČL 2009) slouží k přípravě **Aurantii amari pericarpium tinctura** – Tinktura z oplodí hořkého pomeranče (ČL 2009).

4.3.3.3. Betulae folium – Březový list (ČL 2009)

Je to usušený list, celý nebo jeho úlomky, druhu *Betula pendula* Roth, bříza bělokorá, *Betula pubescens* Ehrh., bříza pýřitá a/nebo jejich kříženců, Betulaceae.

Obsahuje nejméně 1,5 % flavonoidů (zejména glykosidy kvercetinu), vyjádřeno jako hyperosid, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. 2 g práškované drogy se smíchá s 20 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni při 65 °C; po ochlazení se zfiltruje. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.

2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1 g práškované drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut na vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 1 mg kyseliny chlorogenové, 2,5 mg hyperosidu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

Nanášení: 10 µl do proužku.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: V proudu teplého vzduchu.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině tři skvrny (v pořadí stoupající hodnoty R_F): žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutosid), světle modře fluoreskující skvrna (kyselina chlorogenová) a žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid); v horní třetině chromatogramu je světle modře fluoreskující skvrna (kyselina kávová).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny (rutosid, kyselina chlorogenová, hyperosid) odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna rutosidu je velmi slabá, skvrna hyperosidu je intenzivní. Také další slabě žlutohnědě fluoreskující skvrny jsou mezi skvrnami odpovídajícími kyselině kávové a kyselině chlorogenové na chromatogramu

porovnávacího roztoku. Blízko čela rozpouštědla je viditelná červená fluoreskující skvrna (chlorofyly). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mezi touto skvrnou a skvrnou odpovídající kyselině kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku je hnědožlutá skvrna odpovídající kvercetině.

Stanovení obsahu:

Zásobní roztok: 0,200 g práškové drogy se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009 = hexamethylentetramin], 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit při teplotě místnosti, kapalina se zfiltruje přes vatu do 100ml baňky. Vata se přidá ke zbytku v baňce s kulatým dnem a dvakrát se extrahuje 20 ml acetonu, pokaždé se vaří 10 minut pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit při teplotě místnosti, kapalina se zfiltruje přes vatu a potom přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se acetonem promytím baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se přenesou do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se jednou 15 ml a potom třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Ethyl-acetátové extrakty se spojí v dělicí nálevce, promyjí se dvakrát 50 ml vody a extrakt se zfiltruje přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: 10,0 ml zásobního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 10,0 ml zásobního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu vzorku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku při 425 nm;

m – hmotnost drogy v gramech;

1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard;

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

4.3.3.4. **Calendulae flos – Měsíčkový květ (ČL 2009)**

Jsou to celé nebo řezané usušené zcela rozkvetlé květy plnokvětých odrůd druhu *Calendula officinalis* L., měsíček lékařský, Asteraceae; květy jsou oddělené od lůžka.

Obsah: Nejméně 0,4 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid, počítáno na vysušenou drogu. Dále jsou přítomné silice a glykosidy kyseliny oleanolové – kalendulosidy.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 10 minut pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 1 mg kyseliny chlorogenové a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC

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

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

Vyvíjení: Po dráze 10 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 30 minut na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části skvrna se žlutohnědou fluorescencí (rutosid), ve střední části skvrna se světle modrou fluorescencí (kyselina chlorogenová) a v horní části skvrna se světle modrou fluorescencí (kyselina kávová).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny.

Stanovení obsahu:

Zásobní roztok: 0,800 g práškové drogy se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009], 20 ml acetonu a 7 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut

pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes vatu do 100ml odměrné baňky. Droga i vata se vaří pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes vatu a potom přes filtrační papír do téže odměrné baňky a zředí se acetonem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Ethyl-acetátové vrstvy se spojí a protřepávají se dvakrát 50 ml vody a zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: 10,0 ml zásobního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 10,0 ml zásobního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid, se vypočítá podle vzorce

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku při 425 nm;

m – hmotnost drogy v gramech;

1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

4.3.3.5. Crataegi folium cum flore – Hlohový list s květem (ČL 2009)

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky větví druhu *Crataegus monogyna* Jacq., hloh jednosemenný, *C. laevigata* (Poir.) D.C. (*C. oxyacanthoides* Thuill.), hloh obecný, nebo jejich kříženců, řidčeji jiných evropských druhů rodu *Crataegus*, hloh, Rosaceae.

Obsah: Nejméně 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.

2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut pod zpětným chladičem na vodní lázni při 65 °C. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny chlorogenové a 2,5 mg hyperosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

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

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna se světle modrou fluorescencí (kyselina chlorogenová) a nad ní skvrna žlutooranžově fluoreskující (hyperosid).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny, v horní části je žlutozeleně fluoreskující skvrna (vitexin).

Stanovení obsahu:

Základní roztok: 0,400 g práškované drogy (250) se ve 200ml baňce smíchá se 40 ml ethanolu 60% (V/V) a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes vatu do 100ml odměrné baňky. Použitá vata se vloží ke zbytku drogy ve 200ml baňce, přidá se 40 ml 60% ethanolu a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Nechá se ochladit a zfiltruje se do téže odměrné baňky. 200ml baňka a filtr se promyjí ethanolem 60% a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí ethanolem 60% na 100,0 ml a roztok se zfiltruje.

Zkoušený roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů

methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyselinu octové ledové (10 +100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml roztoku, který obsahuje kyselinu boritou (25,0 g/l) a kyselinu šťavelovou R (20,0 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé a zředí se kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů methanolu a kyselinu octové ledové (10 +100) a převede do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyselinu octové ledové (10 +100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml kyseliny mravenčí bezvodé a zředí se kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Celkový obsah flavonoidův procentech, vyjádřeno jako hyperosid, se vypočítá podle vzorce

$$\frac{A \times 1,235}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku při 410 nm;

m – hmotnost drogy v gramech;

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 405.

Droga je výchozí surovinou pro přípravu:

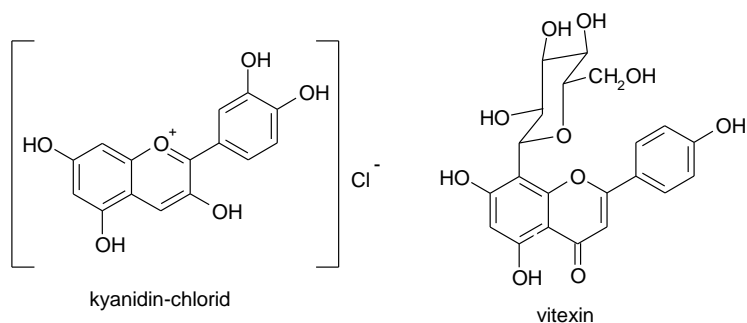
Crataegi folii cum flore extractum fluidum quantificatum – Extrakt z hlohového listu s květem tekutý kvantifikovaný (ČL 2009)

Crataegi folii cum flore extractum siccum – Extrakt z hlohového listu s květem suchý (ČL 2009)

4.3.3.6. Crataegi fructus - Hlohový plod (ČL 2009)

Je to usušený nepravý plod (malvice) druhu *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *C. laevigata* (Poir.) D.C. (*C. oxyacanta* Thuill.) nebo jejich kříženců, nebo směs plodů výše uvedených druhů hlohu, Rosaceae. Droga sladké slizovité chuti.

Obsah: Nejméně 1,0 % prokyanidinů, vyjádřeno jako kyanidin-chlorid, počítáno na vysušenou drogu. Dále obsahuje nejméně 1,5 % flavonoidů, zejména kvercetinové a apigeninové *O*-glykosidy, *C*-glykosid vitexin.

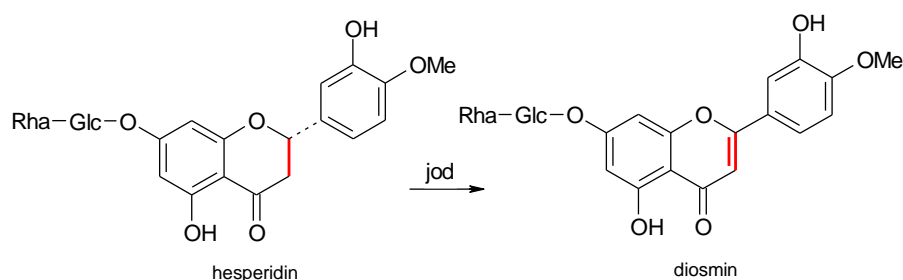


Zkoušky totožnosti se provádí jako u *Crataegi folium cum flore*.

4.3.3.7. Diosminum – Diosmin (ČL 2009)

Je to 7-[[6-*O*-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-4*H*-chromen-4-on.

Látka se získává oxidací (2*S*)-7-[[6-*O*-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)-4*H*-chroman-4-onu (hesperidinu) přírodního původu za přítomnosti jodu.



Zkoušky totožnosti:

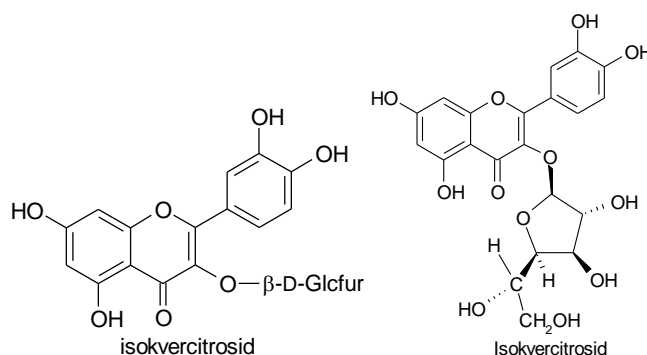
1. Infračervená absorpční spektrofotometrie. Porovnání se standardem diosminu.

- Hodnotí se HPLC chromatogramy – hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčním časem a velikostí hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

4.3.3.8. Equiseti herba – Přesličková nat' (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná usušená sterilní lodyha druhu *Equisetum arvense* L., přeslička rolní, Equisetaceae.

Obsah: Nejméně 0,3 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako isokvercitrósíd, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

- Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
- Metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml methanolu a 10 minut se zahřívá ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání; nechá se ochladit a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 1,0 mg kyseliny kávové, 2,5 mg hyperosidu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, kyseliny octové ledové, vody a ethyl-acetátu (7,5 : 7,5 : 18 : 67).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části zelenomodře fluoreskující skvrna kyseliny kávové, uprostřed oranžově fluoreskující skvrna hyperosidu a ve spodní části oranžově fluoreskující skvrna rutosidu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou u čela dvě červeně fluoreskující skvrny, pod úrovní skvrny kyseliny kávové porovnávacího roztoku jsou dvě zelenomodře fluoreskující skvrny a pod nimi oranžově fluoreskující skvrna. Pod ní jsou ještě dvě zelenomodře fluoreskující skvrny. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou těsně nad startem žlutě nebo zelenožlutě fluoreskující skvrny.

3. Metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu se zjistí přítomnost cizích příměsí z jiných a kříženců druhů rodu *Equisetum*. Jejich přítomnost se projeví žlutě nebo zelenožlutě fluoreskujícími skvrnami těsně nad startem zkoušeného roztoku.

Stanovení obsahu:

Základní roztok: 0,800 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009], 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes vatu do 100ml odměrné baňky. Droga i vata se vaří pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes vatu a potom přes filtrační papír do téže odměrné baňky a zředí se acetonem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Spojené ethyl-acetátové vrstvy se protřepou dvakrát 50 ml vody, zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého (2,0 g $AlCl_3$ se rozpustí ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu) a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako isokvercitrósíd, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 425 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

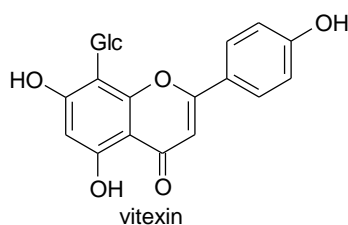
1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard.

Specifická absorbance isokvercitrósídu má hodnotu 500.

4.3.3.9. Passiflorae herba – Mučenková nat' (ČL 2009)

Je to rozlámaná nebo řezaná nadzemní část druhu *Passiflora incarnata* L., mučenka pletní, Passifloraceae, může obsahovat také květy a/nebo plody.

Obsah: Nejméně 1,5 % celkových flavonoidů, vyjádřeno jako vitexin, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti a zkouška na čistotu (jiné druhy rodu *Passiflora*) metodou tenkovrstvé chromatografie na silikagelu:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 5 ml methanolu a zahřívá se po dobu 10 minut k varu pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 2,0 mg rutosídu a 2,0 mg hyperosídu a se zahřátím rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

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

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutosid), ve střední třetině žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou intenzivní zelenožlutě nebo oranžovožlutě fluoreskující skvrny mezi skvrnou diglykosylflavonů a skvrnou isoorientinu (*Passiflora coerulea* a *Passiflora edulis*).

Stanovení obsahu:

Základní roztok: 0,200 g práškové drogy (250) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá se 40 ml ethanolu 60% a za častého protřepávání se zahřívá 30 minut pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a směs se zfiltruje přes vatou do 100ml baňky. Droga i vata se převede zpět do baňky s kulatým dnem. Přidá se 40 ml ethanolu 60% a opět se zahřívá 10 minut pod zpětným chladičem ve vodní lázni při 60 °C. Nechá se ochladit a směs a první filtrát ze 100ml baňky se zfiltrují přes papírový filtr do 100ml odměrné baňky a zředí se na 100 ml stejným rozpouštědlem použitým k promytí baňky s kulatým dnem a filtru.

Zkoušený roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100). Přidá se 10 ml roztoku obsahujícího kyselinu boritou (25 g/l) a kyselinu šťavelovou (20 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé a zředí se kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Porovnávací roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v druhé baňce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100). Přidá se 10 ml kyseliny mravenčí bezvodé a zředí se kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 401 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní kapaliny.

Obsah celkových flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako vitexin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 0,8}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 401 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

0,8 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard.

Specifická absorbance vitexinu má hodnotu 628.

Passiflorae herba – Mučenková nat' (ČL 2009) slouží k přípravě **Passiflorae extractum siccum – Mučenkový extrakt suchý (ČL 2009)**.

4.3.3.10. **Polygoni avicularis herba – Nat' rdesna ptačího (ČL 2009)**

Je to celá nebo řezaná, usušená kvetoucí nat' druhu *Polygonum aviculare* L. *sensu lato*, rdesno ptačí, Polygonaceae.

Obsah: Nejméně 0,30 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: K 1,0 g práškové drogy (355) se přidá 10 ml methanolu a zahřívá se 10 minut pod zpětným chladičem ve vodní lázni za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 2,5 mg hyperosidu a 1 mg kyseliny chlorogenové se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, kyseliny octové ledové, vody a ethyl-acetátu (7 : 7 : 14 : 72).

Nanášení: 20 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve vrchní části modře fluoreskující skvrna kyseliny kávové, uprostřed je žlutohnědě fluoreskující skvrna

hyperosidu a ve spodní části je světle modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní části modře fluoreskující skvrna kyseliny kávové, pod ní jsou jedna nebo dvě žlutozeleně fluoreskující skvrny, žlutohnědě fluoreskující skvrna a ve spodní části světle modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové na úrovni téže látky porovnávacího roztoku.

Stanovení obsahu flavonoidů:

Základní roztok: 0,800 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009], 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes vatu do 100ml baňky. Droga i vata se vaří pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes vatu a potom přes filtrační papír do odměrné baňky a zředí se acetonem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Spojené ethyl-acetátové vrstvy se protřepou dvakrát 50 ml vody, zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého (2,0 g chloridu hlinitého se rozpustí ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu) a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Porovnávací roztok: 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní kapaliny.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 425 nm

m – navážku zkoušené drogy v gramech

1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500.

4.3.3.11. Sambuci nigrae flos - Květ bezu černého (ČL 2009)

Je to usušený květ druhu *Sambucus nigra* L., bez černý, Adoxaceae (dříve Sambucaceae).

Obsah: musí obsahovat nejméně 0,80 % flavonoidů, vyjádřeno jako isokvercitrósíd, počítáno na vysušenou drogu. Dále jsou přítomné organické kyseliny, stopy glykosidu sambunigrinu, esterifikované triterpeny a triterpenové kyseliny, sliz, třísloviny.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
2. Důkaz flavonoidů chromatografií na tenké vrstvě:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí methanolem na 10 ml.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 1 mg kyseliny chlorogenové, 2,5 mg hyperosidu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

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

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině (v pořadí stoupajících hodnot R_f): oranžově fluoreskující skvrna rutosidu, světle modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové a oranžovožlutě nebo oranžovohnědě fluoreskující skvrna hyperosidu, v horní třetině je zelenomodře fluoreskující skvrna kyseliny kávové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní světle modře fluoreskující skvrna odpovídající kyselině chlorogenové, oranžově fluoreskující skvrna odpovídající rutosidu a v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou

hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku je oranžově fluoreskující skvrna odpovídající isokvercitosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je zelenomodře fluoreskující skvrna v poloze odpovídající poloze těsně pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné další slabě fluoreskující skvrny. V denním světle jsou zřetelné pouze oranžově fluoreskující skvrny odpovídající rutosidu a isokvercitosidu.

Stanovení obsahu flavonoidů:

Základní roztok: 0,600 g práškované drogy se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009], 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes vatou do 100ml odměrné baňky. Droga i vata se vaří pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes vatou a potom přes filtrační papír do téže odměrné baňky a zředí se acetonem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Spojené ethyl-acetátové vrstvy se protřepou dvakrát 50 ml vody, zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku chloridu hlinitého (2,0 g chloridu hlinitého se rozpustí ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu) a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako isokvercitosid se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 425 nm

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech

1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard

Specifická absorbance isokvercitrinu má hodnotu 500.

4.3.3.12. Solidaginis virgaureae herba – Nat' zlatobýlu obecného (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nat' druhu *Solidago virgaurea* L., zlatobýl obecný, Asteraceae.

Obsah: 0,5 až 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako hyperosid, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: K 0,75 g práškové drogy (355) se přidá 5 ml methanolu a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Ochladí se a zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1,0 mg kyseliny chlorogenové, 2,5 mg kvercitrinu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (6 : 6 : 18 : 30).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: 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. Nechá se stát 30 minut a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v pořadí vzrůstající hodnoty R_F žlutooranžově nebo hnědooranžově fluoreskující skvrny rutosidu, následuje modře fluoreskující skvrna kyseliny chlorogenové a nejvýše je žlutohnědě fluoreskující skvrna kvercitrinu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a fluorescencí látkám přítomným v porovnávacím roztoku. Zkoušený roztok vykazuje dále modrozeleně fluoreskující skvrnu pod čelem chromatogramu. Nevykazuje

oranžově fluoreskující skvrnu kvercitosidu v horní části chromatogramu. Na chromatogramu mohou být další fluoreskující skvrny.

Stanovení obsahu flavonoidů:

Základní roztok: 0,200 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l) [Methenaminum ČL 2009], 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové (70 g HCl 35% se zředí vodou na 100 ml) a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Tekutina se zfiltruje přes vatu do 100ml baňky. Droga i vata se vaří pod zpětným chladičem ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu. Po ochlazení na teplotu místnosti se zfiltruje přes vatu a potom přes filtrační papír do téže odměrné baňky a zředí se acetonem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml vody a protřepává se 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Horní vrstvy se spojí v dělicí nálevce a promyjí se dvakrát 50 ml vody, zfiltrují se přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50ml odměrné baňky a zředí se ethyl-acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok: K 10,0 ml základního roztoku se přidá 1 ml roztoku chloridu hlinitého (2,0 g chloridu hlinitého se rozpustí ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu) a zředí se roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako isokvercitosid se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 425 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

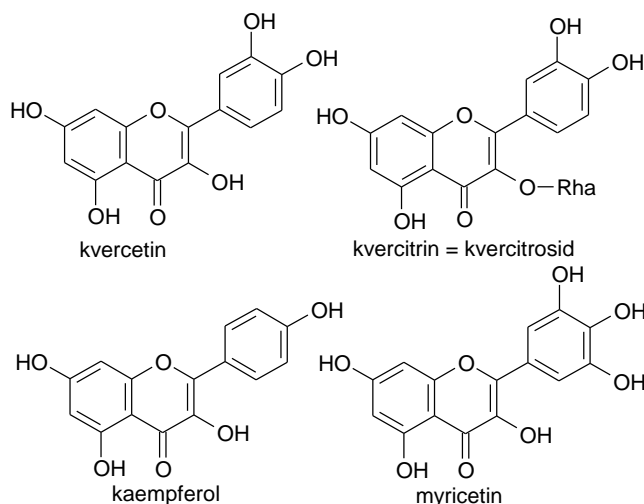
1,25 = přepočítávací koeficient dané drogy pro daný standard.

Specifická absorbance isokvercitosidu má hodnotu 500.

4.3.3.13. Tiliae flos – Lipový květ (ČL 2009)

Jsou to celá usušená květenství druhů *Tilia cordata* Mill., lípa malolistá, *Tilia platyphyllos* Scop., lípa velkolistá, *Tilia x vulgaris* Heyne, nebo jejich směs, Malvaceae (dříve Tiliaceae). Droga slabého aromatického pachu, nasládlé, slizovité chuti.

Obsahové látky: flavonoidy, zejména glykosidy kvercetinu, kempferolu a myricetinu, sliz, organické kyseliny, silice (farnesol a geraniol).



Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u Fagopyri herba.
2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy (355) se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 2,0 mg kyseliny kávové, 5 mg hyperosidu a 5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody, butan-2-onu a ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

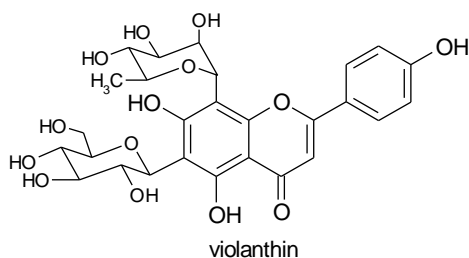
Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

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

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v pořadí vzrůstající hodnoty R_F žlutooranžově nebo hnědooranžově fluoreskující skvrny rutosidu a hyperosidu a zelenomodře fluoreskující skvrna kyseliny kávové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku fluoreskuje hlavní skvrna hnědožlutě nebo oranžově. Tato skvrna se nachází v poloze odpovídající poloze těsně nad skvrnou hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku. V denním světle tato skvrna zřetelně vyniká mezi ostatními jako hlavní skvrna. Skvrna odpovídající polohou R_F rutosidu fluoreskuje také hnědožlutě. Pod ní mohou být dvě žlutě fluoreskující skvrny. Mezi skvrnami rutosidu a hyperosidu jsou oranžově a žlutě fluoreskující skvrny. Mezi skvrnami hyperosidu a kyseliny kávové je až pět žlutě nebo oranžově fluoreskujících skvrn. Těsně pod skvrnou kyseliny kávové je skvrna fluoreskující modře.

4.3.3.14. **Violae herba cum flore – Violková nať kvetoucí (ČL 2009)**

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Viola arvensis* Murray, violka rolní a/nebo *Viola tricolor* L., violka trojbarevná, Violaceae.



Obsah: Nejméně 1,5 % flavonoidů, vyjádřeno jako violanthin, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

1. Provádí se zkoušky uvedené u *Fagopyri herba*.
2. Důkaz flavonoidů chromatografií na tenké vrstvě.

Stanovení obsahu:

Spektrofotometricky na violanthin.

4.3.3.15. **Propolis – Propolis**

Propolis je polykomponentní pryskyřičná látka, kterou včely *Apis mellifera* sbírají ze sekretů pupenů, pryskyřic a kůry některých listnatých a jehličnatých stromů. Včely

využívají propolis jako pomocnou stavební látku odpuzující vodu a jako konzervační prostředek. Hlavními složkami propolisu jsou flavonoidy, kyseliny hydroxyskořicové a jejich deriváty, vosky a silice. Složení obsahových látek kolísá podle doby sběru a složení rostlinného společenstva v místě sběru.

Zkoušky totožnosti:

1. Důkaz flavonoidů chromatografií na tenké vrstvě:

Zkoušený roztok: 0,5 g drogy se rozpustí v 10 ml methanolu za občasného protřepávání a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 2,5 mg chrysinu, 2,5 mg luteolinu, 2,5 mg rutosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

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

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

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Při 100 °C.

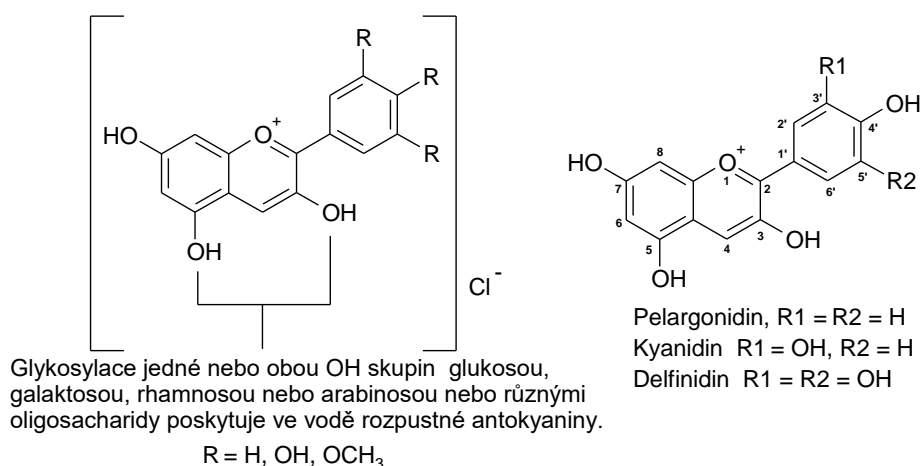
Detekce: Ještě horká vrstva se postříká roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a pak roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Suší se asi 30 minut na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm a 254 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je více žlutozeleně nebo oranžově fluoreskujících skvrn flavonoidů včetně těch, které odpovídají standardům porovnávacího roztoku.

4.4.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 Al₂O₃.

4.4.1. KVALITATIVNÍ REAKCE ANTOKYANŮ

4.4.1.1. 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. delphinidin a kyanidin.

4.4.1.2. 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
delphinidin-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

4.4.2. DROGY S OBSAHEM ANTHOKYANŮ

4.4.2.1. Cyani flos – Chrpový květ

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

Obsah: antokyan, saponiny, sliz.

Zkoušky totožnosti:

Tenkvrstvá chromatografie (viz výše).

4.4.2.2. 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 práškové 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.

4.4.2.3. 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.

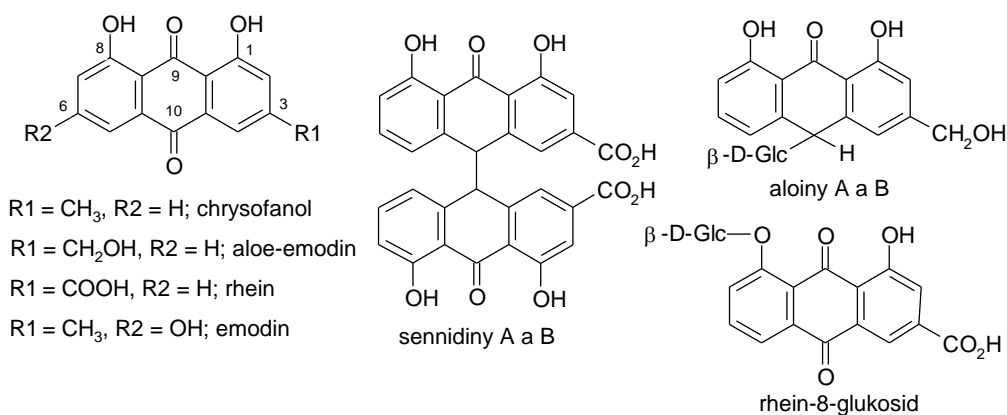
Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části střední třetiny oranžovočervená skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, v poloze odpovídající poloze pod skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou ve střední třetině dvě fialové skvrny; hlavní skvrna (6''-malonylmalvin)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

4.5. ANTHRACHINONOVÉ GLYKOSIDY

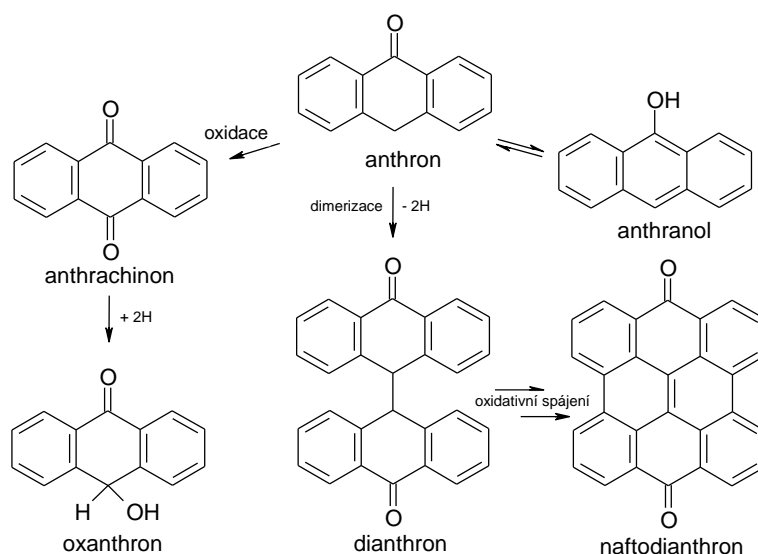
Anthrachinonové glykosidy jsou skupinou přírodních látek, jejichž aglykon je odvozený od anthrachinonu, jeho redukovaných forem, nebo od dianthronu. Základní skelet anthrachinonu je substituován dvěma i více hydroxylovými skupinami, které jsou rozmístěny tak, aby aspoň jedna z nich byla v poloze α (polohy 1, 4, 5, 8).

V poloze 3 bývá často další substituent – methylová nebo karboxylová skupina. Typickými zástupci aglykonů jsou např. chrysofanol, rhein, emodin (frangula-emodin) a aloe-emodin, z dianthronů např. sennidiny a rheidiny. Kromě volných a glykosidicky vázaných anthrachinonů se v rostlinách nachází také redukované deriváty – oxanthrony, anthrony, anthranoly. Mezi všemi skupinami aglykonů existují oxidoredukční vztahy. Deriváty anthrachinonu se vyskytují volně nebo glykosidicky vázané. Cukernou složkou je obvykle glukosa a/nebo rhamnosa.

Deriváty anthrachinonu vznikají cyklizací polyketosloučenin, méně často z kyseliny šikimové a aktivního isoprenu. Vzhledem k biosyntetické návaznosti jsou k jejich skupině přiřazeny také naftodianthrony, reprezentované skupinou hypericinů. U jednoděložných rostlin se deriváty anthrachinonů tvoří v čeledi Liliaceae ve formě *O*- a *C*-glykosidů. U dvouděložných rostlin jsou na anthrachinony bohaté čeledi Polygonaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Ericaceae a Fabaceae. Některé deriváty se vyskytují v určitých houbách a lišejnících a k jejich kumulaci dochází také u celé řady mikroorganismů. Drogy s obsahem anthrachinonových glykosidů se převážně používají jako laxativa.



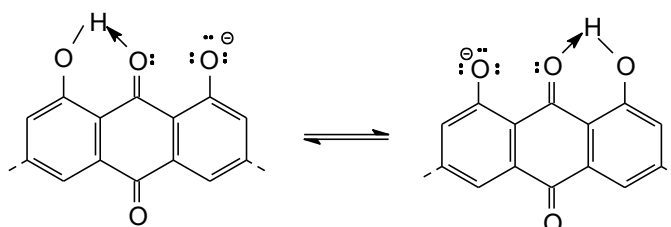
Oxidoredukční vztahy anthrachinonů:



4.5.1. KVALITATIVNÍ DŮKAZ ANTHRAGLYKOSIDŮ

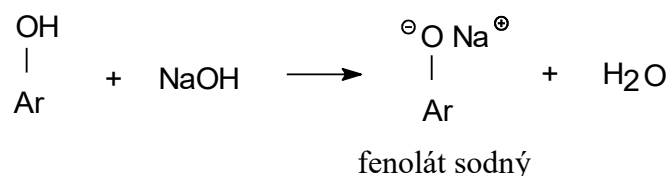
Důkaz anthraglykosidů v drogách vyžaduje rozštěpení glykosidické vazby nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou. Aglykony jsou nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v alkoholu, diethyletheru, chloroformu a benzenu za tvorby žlutě zbarvených roztoků. Anthrony jako čisté substance jsou nerozpustné v alkáliích, jejich izomery anthranoly dávají s alkáliemi silně zeleně fluoreskující roztoky.

Anthrachinonové deriváty mají dvě nebo více hydroxylových skupin vázaných na uhlík aromatických jader. Vůči silným bázím se chovají jako kyseliny a mohou odštěpit vodík hydroxylové skupiny. Vzniklý fenolátový iont je výrazně stabilizovaný, protože jeho náboj je delokalizován po aromatickém jádře.



Hraniční tautomerní formy fenolátového iontu

Při reakci s alkalickými hydroxidy je vodík nahrazen kovem a vzniklé soli, fenoláty, jsou rozpustné ve vodě za tvorby intenzivně červených roztoků.



Na tomto principu je založena Bornträgerova reakce sloužící k důkazu anthrachinonů. Tuto reakci dávají pouze volné, oxidované deriváty. Nereagují anthrony, anthranoly, dianthrony a jejich glykosidy. Pokud chceme touto reakcí zachytit i tyto deriváty, musíme je předem podrobit hydrolýze, popř. oxidaci.

C-glykosidy jsou silně rezistentní ke klasické hydrolýze, ale mohou být podrobeny oxidativní hydrolýze chloridem železitým. Při důkazu se postupuje tak, že se v droze přítomné anthraglykosidy několik minut hydrolyzují za tepla roztokem minerální kyseliny nebo hydroxidu. Anthracenové deriváty, které jsou v droze převážně ve formě glykosidů, se uvolní a deriváty anthronu a anthranolu se oxidují na anthrachinony. Aglykony jsou za tvorby fenolů rozpustné v alkalickém vodném roztoku, ze kterého se vytěsňují roztokem chlorovodíku a vytřepou do organického rozpouštědla. Tento roztok se dále vytřepává s alkalickým hydroxidem, vodná vrstva se pak vlivem tvorby fenolátů barví višňově červeně.

Bornträgerovu reakci lze využít i k mikrochemickému důkazu anthraglykosidů v rostlinném pletivu. Řezy se vystaví účinku par amoniaku nebo se pokápnou roztokem zředěného hydroxidu. Vzniklé zabarvení není někdy čistě červené, ale červenohnědé, což způsobují současně přítomné třísloviny.

K důkazu anthraglykosidů lze použít i mikrosublímaci. Mikrosublímací z práškované drogy vznikají žluté krystalky nebo kapičky anthrachinonových derivátů, které se barví roztokem hydroxidu červeně. Glykosidy, nacházející se v drogách, se za vyšších teplot částečně rozštěpí, a současně se anthrony i anthranoly oxidují na deriváty anthrachinonu. Tyto se dokazují v sublimátu již uvedenou Bornträgerovou reakcí.

Hydroxylové skupiny 1,8-dihydroxyanthrachinonů aktivují aromatické jádro, které snadno podléhá elektrofilní substituci. Proto je také můžeme dokázat pomocí čerstvě připravené bromové vody, se kterou tvoří podobně jako fenoly tribromfenoláty.

Velmi často se používá chromatografický důkaz anthraglykosidů, při kterém se na TLC nanáší ethanolový nebo methanolový výluh drogy. Detekce chromatogramu je založena opět na principu Bornträgerovy reakce.

4.5.2. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ANTHRAGLYKOSIDŮ

Kromě dnes již málo používaných gravimetrických a volumetrických metod můžeme anthrachinony stanovit zejména kolorimetricky. Lékopis uvádí kolorimetrické stanovení volných a vázaných anthrachinonů založené na dokonalé hydrolýze glykosidů, izolaci aglykonů diethyletherem a následném rozpuštění odparou v octanu hořečnatém. Vzniklé zabarvení má Fabsorbční maximum při 515 nm. Drogy s obsahem většího množství C-glykosidů musíme podrobit oxidační hydrolýze chloridem železitým. Protože železité ionty by rušily kolorimetrické stanovení, je potřeba je odstranit z diethyletherových extraktů vytřepáním vodou.

I kolorimetrické stanovení má své nedostatky. Do extraktu mohou přecházet vedlejší látky, které zbarvují roztoky anthrachinonů intenzivněji, než odpovídá jejich obsahu. Tvorba emulzí je rovněž na závadu měření.

4.5.3. DROGY S OBSAHEM ANTHRACHINONŮ

4.5.3.1. Aloe barbadensis – Aloe barbadoská (ČL 2009)

Je to zahuštěná a usušená šťáva z listů *Aloe barbadensis* Mill., aloe barbadoská, Xanthorrhoeaceae (dříve Aloaceae).

Obsahuje nejméně 28,0 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin (barbaloin), počítáno na vysušenou drogu.

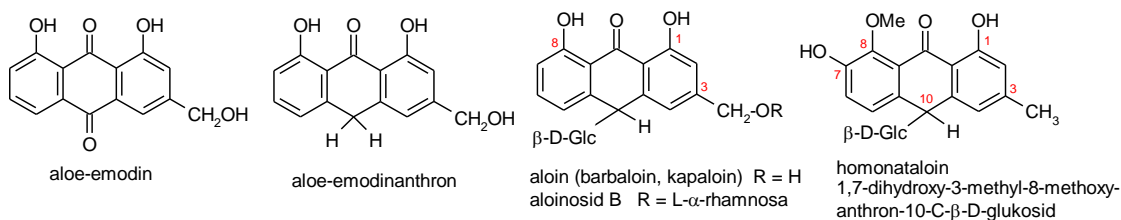
4.5.3.2. Aloe capensis – Aloe kapská (ČL 2009)

Je to zahuštěná a usušená šťáva listů některých druhů *Aloe*, zvláště *Aloe ferox* Mill., aloe kapská, Xanthorrhoeaceae (dříve Aloaceae), a jejich kříženců.

Obsahuje nejméně 18,0 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin, počítáno na vysušenou drogu.

Společné vlastnosti:

Tmavohnědá hmota nazelenalého lesku, lesklého lasturovitého lomu nebo zelenohnědý prášek. Hlavní obsahové látky: anthraglykosidy odvozené od aloe-emodinu a aloe-emodinantronu. Spolu s *O*-glykosidy se vyskytují také *C*-glykosidy.



Zkoušky totožnosti:

- 1 g práškované drogy se protřepává se 100 ml vroucí vody. Po ochlazení se přidá 1 g mastku a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g tetraboritanu sodného a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml vody. Roztok fluoreskuje žlutozeleně. Fluorescence je zvláště výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.
- 5 ml roztoku ze zkoušky 1) se smíchá s 1 ml čerstvě připravené bromové vody; vznikne hnědožlutá sraženina, supernatantní tekutina je zbarvena fialově (u Aloe capensis není).
- Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,25 g práškované drogy se smíchá s 20 ml methanolu a zahřeje se na vodní lázni k varu. Protřepává se několik minut a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

Porovnávací roztok: 25 mg aloinu se rozpustí v methanolu a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (13 : 17 : 100).

Nanášení: 10 μ l zkoušeného roztoku a 10 μ l porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se roztokem hydroxidu draselného (100 g/l) v methanolu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části žlutě fluoreskující skvrna (aloin), odpovídající svojí polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku a v dolní části je světle modře fluoreskující skvrna (aloesin).

Stanovení obsahu:

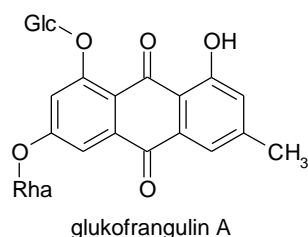
Spektrofotometricky na aloin.

Obě výše uvedené drogy slouží pro přípravu **Aloes extractum siccum normatum** – **Aloový extrakt suchý standardizovaný (ČL 2009)**. Obsahuje 19–21 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako aloin, počítáno na vysušený, je-li třeba upravený, extrakt.

4.5.3.3. Frangulae cortex – Krušinová kůra (ČL 2009)

Je to usušená kůra nebo její úlomky z kmenů a větví druhu *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* Mill.), krušina olšová, Rhamnaceae.

Obsah: Nejméně 7,0 % glukofrangulinů, vyjádřeno jako glukofrangulin A, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. Asi 50 mg práškované drogy se smíchá s 25 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné a směs se zahřívá 15 minut na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe s 20 ml diethyletheru a vodná vrstva se odstraní. Diethyletherová vrstva se protřepe 10 ml zředěného amoniaku; vodná vrstva se zbarví červenofialově.
2. Vnitřní strana kůry se pokápně 1 kapkou zředěného roztoku hydroxidu sodného, barví se tmavočerveně (anthrachinony).
3. Prášková droga dává mikrosublímáci při 150–160 °C žlutý sublimát, který se zvlhčením 1 kapkou zředěného roztoku hydroxidu draselného barví červeně.
4. Jiný mikrosublímát se provlhčí 10% roztokem chloridu železitého v 96% lihu. Vzniká zelené zabarvení (třísloviny).
5. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: K 0,5 g práškované drogy se přidá 5 ml ethanolu a zahřeje se k varu. Ochladí se a odstředí. Supernatantní tekutina se ihned slije a použije se do 30 minut.

Porovnávací roztok: 20 mg aloinu se rozpustí v methanolu 70% a zředí se jím na 10 ml, roztok frangula-emodinu (1,0 mg/ml v lihu 95%).

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (13 : 17 : 100).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu 5 minut.

Detekce: Postříká se roztokem hydroxidu draselného (50 g/l) v ethanolu 50% a suší se 15 minut při 100 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Zkouška na čistotu navazuje na předešlou tenkovrstvou chromatografií a týká se jiných druhů rodu *Rhamnus*. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části hnědožlutá skvrna odpovídající aloinu a v horní části chromatogramu skvrna frangula-emodinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna fluoreskující intenzivně žlutě nebo skvrna fluoreskující oranžově až načervenalé odpovídající polohou skvrně aloinu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Přítomnost popsaných skvrn signalizuje přítomnost jiných než lékopisných druhů r. *Rhamnus*.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině dvě oranžovohnědé skvrny (glukofranguliny) a v horní třetině dvě až čtyři červené skvrny (franguliny, které nejsou vždy zřetelně oddělené, a nad nimi frangula-emodin).

Stanovení obsahu:

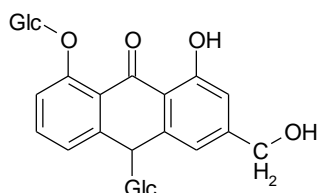
Spektrofotometricky na glukofrangulin A.

Droga se používá k přípravě **Frangulae corticis extractum siccum normatum – Extrakt z kůry krušiny suchý standardizovaný (ČL 2009)**. Obsahuje 15–30 % glukofrangulinů, vyjádřeno jako glukofrangulin A.

4.5.3.4. Rhamni purshianae cortex – Kůra řešetláku Purshova (ČL 2009)

Je to usušená kůra, nebo její úlomky druhu *Rhamnus purshianus* DC. (*Frangula purshiana* DC. A. Gray), řešetlák Purshův, Rhamnaceae.

Obsah: Nejméně 8,0 % hydroxyanthracenových glykosidů, z toho nejméně 60 % kaskarosidů, obojí vyjádřeno jako kaskarosid A, počítáno na suchou drogu.



kaskarosid A

Zkoušky totožnosti:

1. 0,2 g práškované drogy se 15 minut zahřívá s 50 ml vody na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 20 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové II a zahřívá se 15 minut na vodní lázni. Nechá se ochladit, převede se do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 20 ml diethyletheru. Vodná vrstva se uchová (roztok A). Tři diethyletherové vrstvy se spojí a protřepávají se 10 ml amoniaku zředěného; vodná vrstva se zbarví červenofialově.
2. Roztok A z předchozí zkoušky se v malé baňce smíchá s 5 g chloridu železitého a zahřívá se 30 minut na vodní lázni. Po ochlazení se převede do dělicí nálevky a protřepe se 15 ml diethyletheru. Diethyletherová vrstva se promyje 10 ml vody. Vodná vrstva se odstraní a diethyletherová vrstva se protřepe 5 ml amoniaku zředěného; vodná vrstva se zbarví červeně.
3. Prášková droga dává mikrosublímáci asi při 150–160 °C žlutý sublimát, který se zvlhčením 1 kapkou zředěného roztoku hydroxidu draselného barví červeně (anthrachinony).
4. Vnitřní strana kůry se pokápně 1 kapkou zředěného roztoku hydroxidu sodného, barví se višňově červeně (anthrachinony).

Droga se používá k přípravě **Rhamni Purshianae extractum siccum normatum – Extrakt z řešetláku Purshova suchý standardizovaný (ČL 2009)**.

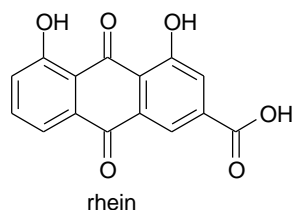
Jmenovitý obsah hydroxyanthracenových glykosidů je v rozmezí 8,0 % až 25,0 %, počítáno na vysušený extrakt.

4.5.3.5. **Rhei radix – Reveňový kořen (ČL 2009)**

Jsou to usušené celé nebo řezané kořeny a oddenky druhu *Rheum palmatum* L., reveň dlanitá, *Rheum officinale* Baill., reveň lékařská, Polygonaceae, kříženců obou druhů nebo jejich směs. Kořeny a oddenky jsou většinou rozřezané, zbavené stonku a zevní

vrstvy kůry s postranními kořínky.

Obsah: Nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových derivátů, vyjádřeno jako rhein, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. Asi 50 mg práškované drogy se smíchá s 25 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné a zahřívá se 15 minut na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 20 ml diethyletheru a vodná vrstva se odstraní. Diethyletherová vrstva se protřepe 10 ml amoniaku zředěného. Vodná vrstva se zbarví červeně až fialově.
2. Mikrosublímáci při 140–160 °C vzniká sublimát sestávající ze žlutých kapiček nebo jehličkovitých krystalků, jež se v kapce zředěného roztoku hydroxidu draselného rozpouštějí červeně.
3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 50 mg práškované drogy se smíchá s 1 ml kyseliny chlorovodíkové, 30 ml vody a zahřívá se 15 minut ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe s 25 ml diethyletheru. diethyletherová vrstva se vysuší síranem sodným bezvodým a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 0,5 ml diethyletheru.

Porovnávací roztok: 5 mg emodinu se rozpustí v 5 ml diethyletheru.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, ethyl-acetátu a petroletheru (1 : 25 : 75).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části oranžově fluoreskující skvrna (emodin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající skvrně emodinu; nad skvrnou emodinu jsou dvě stejně fluoreskující skvrny (fycion a chrysofanol v pořadí vzestupné hodnoty R_F); pod skvrnou emodinu jsou také dvě stejně fluoreskující skvrny (rhein a aloe-emodin v pořadí sestupné

hodnoty R_F). Vrstva se postříká roztokem hydroxidu draselného (100 g/l) v methanolu. Všechny skvrny se zbarví červeně až fialově.

Zkoušky na čistotu (*Rheum rhaponticum* auct, revěň bulharská) tenkovrstvou chromatografií:

Zkoušený roztok: 0,2 g práškové drogy se smíchá s 2 ml methanolu a vaří se 5 minut pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

Porovnávací roztok: 10 mg rhaponticinu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů methanolu a dichlormethanu (20 : 80).

Nanášení: 20 μ l každého roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 12 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Vrstva se postříká kyselinou fosfomolybdenovou.

Hodnocení: Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v blízkosti startu modrá skvrna (rhaponticin) v poloze odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

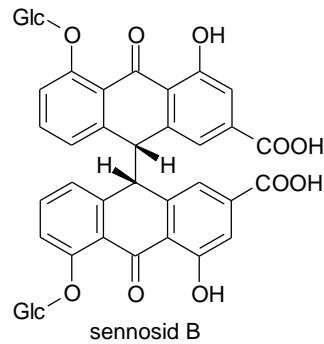
Stanovení obsahu

Spektrofotometricky na rhein.

4.5.3.6. Sennae folium - Sennový list (ČL 2009)

Jsou to usušené lístky druhu *Cassia senna* L. (*Cassia acutifolia* Delile), kassie ostrolistá, Fabaceae (dříve Caesalpiniaceae), podčeleď Caesalpinioideae, známého jako Alexandrijská nebo Chartúmská senna, nebo druhu *Cassia angustifolia* Vahl, kassie úzkolistá, známého jako Tinnevely senna, nebo směs obou druhů.

Obsah: Nejméně 2,5 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. Asi 25 mg práškované drogy se smíchá v kuželové baňce s 50 ml vody a 2 ml kyseliny chlorovodíkové a zahřívá se 15 minut na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml diethyletheru. Diethyletherová vrstva se oddělí a vysuší se nad síranem sodným bezvodým. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml amoniaku zředěného; vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 minuty na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.
2. Mikrosublímace při 160–180 °C vzniklý sublimát se po přidání 1 kapky zředěného roztoku hydroxidu draselného barví červeně.
3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškované drogy se zahřeje k varu s 5 ml směsí stejných objemových dílů ethanolu 96% a vody. Směs se odstředí a použije se supernatantní tekutina.

Porovnávací roztok: 10 mg sennového extraktu se rozpustí v 1 ml směsí stejných objemových dílů ethanolu 96% a vody (roztok obsahuje malý sediment).

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny octové ledové, vody, ethyl-acetátu a propan-1-olu (1 : 30 : 40 : 40).

Nanášení: 10 µl do proužků (20 mm × 2 mm).

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se roztokem kyseliny dusičné 20% a zahřívá se 10 minut při 120 °C, nechá se ochladit a postříká se roztokem hydroxidu draselného (50 g/l) v ethanolu 50% (V/V) do objevení skvrn.

Hodnocení: Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (sennosidy B, A, D a C v pořadí stoupajících hodnot R_F), zbarvením i

velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidů D a C může být patrná skvrna odpovídající rhein-8-glukosidu.

Stanovení obsahu (*Zkouška se provádí za chránění před přímým světlem*).

0,150 g práškové drogy se smíchá v 100ml baňce se 30,0 ml vody. Baňka se zváží a zahřívá se 15 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, zváží se a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost vodou. Odstředí se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné a protřepe se třikrát 15 ml chloroformu. Chloroformová vrstva se po oddělení vždy odstraní. Přidá se 0,10 g hydrogenuhličitanu sodného, 3 minuty se protřepává, pak se odstředí. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zabroušeným hrdlem, přidá se 20 ml chloridu železitého (105 g/l) a promíchá se. Směs se zahřívá 20 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml kyseliny chlorovodíkové 35% a znovu se zahřívá 20 minut ve vodní lázni za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml diethyletheru, předem použitého k promytí baňky. Tři diethyletherové vrstvy se spojí a promyjí se dvakrát 15 ml vody. Diethyletherová vrstva se převede do odměrné baňky a zředí se diethyletherem na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku octanu hořečnatého (5 g/l) v methanolu.

Měří se absorbance tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití methanolu jako kontrolní tekutiny.

Vypočítá se obsah hydroxyanthracenových glykosidů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B, podle vzorce:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

v němž značí

A – absorbanci při 515 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech;

Specifická absorbance sennosidu B má hodnotu 240.

Droga se používá k přípravě **Sennae folii extractum siccum normatum** – Sennový

extrakt suchý standardizovaný (ČL 2009).

Obsahuje 5,5 % až 8,0 % hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako sennosid B, počítáno na vysušený extrakt.

4.5.3.7. Chrysarobinum - Chrysarobin

Je to vyčištěný benzenový extrakt z dutin stromu *Andira araroba* Aguiar, andira brazilská a *Andira inermis* Kunth ex DC, andira lékařská, Fabaceae.

Je to žlutý až žlutohnědý prášek bez chuti a pachu, nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.

Obsahuje zejména anthranoly a anthrony: chrysofanol-anthron a chrysofanol-anthranol.

Zkoušky totožnosti:

1. 10 mg drogy se povaří s 5 ml vody a 5 kapkami roztoku hydroxidu draselného 6,5%. Po ochlazení se zfiltruje, filtrát se slabě okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a vytřepe se 10 ml benzenu. 5 ml oddělené benzenové vrstvy se vytřepe směsí 2,0 ml vody a 1,0 ml roztoku hydroxidu draselného zředěného. Vrchní benzenová vrstva se barví žlutě (kyselina chrysofanová), spodní vodná vrstva se barví červeně.

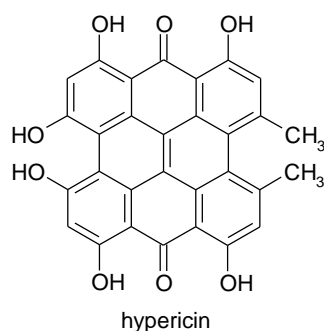
2. 5 mg se rozpustí v 5 ml kyseliny sírové koncentrované; vzniklý tmavočervený roztok se vlije do 50 ml vody; chrysarobin se vyloučí jako oranžově žlutá sraženina.

3. 2 mg drogy se smísí s 2 kapkami dýmavé kyseliny dusičné; červenohnědá směs se přidáním několika kapek roztoku amoniaku 15% zbarví fialově červeně (modifikovaná Bornträgerova reakce; dýmavá kyselina dusičná konvertuje redukované deriváty na anthrachinony).

4.5.3.8. Hyperici herba – Třezalková nat' (ČL 2009)

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Hypericum perforatum* L., třezalka tečkovaná, Hypericaceae, sklizené v době květu.

Obsah: Nejméně 0,08 % celkových hypericinů, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 0,5 g práškové drogy se míchá s 10 ml methanolu 10 minut ve vodní lázni při 60 °C a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 5 mg rutosidu a 5 mg hyperosidu se rozpustí v methanolu a zředí se jím na 5 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a ethyl-acetátu (6 : 9 : 90).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: 10 minut při 100 °C až 105 °C.

Detekce: Postříká se roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a pak roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Po 30 minut se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině skvrna rutosidu a nad ní skvrna hyperosidu, obě skvrny fluoreskují žlutooranžově. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině červenooranžově fluoreskující skvrny (rutosid a hyperosid) a v dolní části horní třetiny chromatogramu je skvrna pseudohypericinu a nad ní skvrna hypericinu, obě fluoreskují červeně. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další žlutě nebo modře fluoreskující skvrny.

Stanovení obsahu:

Zkoušený roztok: 0,800 g práškové drogy se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá se 60 ml směsí objemových dílů vody a tetrahydrofuranu (20 : 80) a vloží se

magnetické míchadlo. Směs se vaří 30 minut ve vodní lázni při 70 °C pod zpětným chladičem. Odstředí se (2 minuty při 700 g) a supernatantní tekutina se převede do 250ml baňky. Zbytek drogy se smíchá s 60 ml směsí objemových dílů vody a tetrahydrofuranu (20 : 80). Směs se opět zahřívá 30 minut pod zpětným chladičem. Odstředí se (2 minuty při 700 g) a supernatantní tekutina se převede do téže varné baňky. Spojené roztoky se odpaří do sucha. Zbytek se převede 15 ml methanolu do 25ml odměrné baňky za pomoci ultrazvuku. 250ml baňka se promyje methanolem; promývací tekutina se přidá k roztoku v odměrné baňce a spojené tekutiny se zředí methanolem na 25,0 ml. Opět se odstředí, 10 ml roztoku se zfiltruje přes stříkačku s filtrem ze slinutého skla (0,2 µm), první 2 ml filtrátu se odstraní. 5,0 ml filtrátu se převede do odměrné baňky a zředí se methanolem na 25,0 ml.

Kontrolní kapalina: Methanol.

Obsah celkových hypericinů v procentech, vyjádřeno jako hypericin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 125}{m \times 870}$$

v němž značí

A – absorbanci při 590 nm;

m – hmotnost drogy v gramech;

Specifická absorbance hypericinu má hodnotu 870.

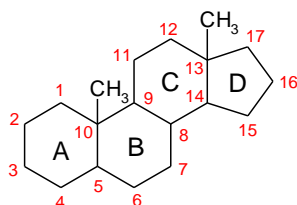
Droga se používá k přípravě **Hyperici herbae extractum siccum quantificatum – Extrakt z třezalkové natě suchý kvantifikovaný (ČL 2009).**

Obsah, počítáno na vysušený extrakt:

- celkové hypericiny, vyjádřeno jako hypericin 0,10 % až 0,30 %;
- flavonoidy, vyjádřeno jako rutosid nejméně 6 %;
- hyperforin nejvýše 6,0 % a ne více než obsah uvedený na obalu.

4.6. KARDIOAKTIVNÍ GLYKOSIDY

Kardioaktivní glykosidy jsou přírodní látky se specifickým účinkem na srdeční sval. Jejich aglykon se řadí do skupiny přírodních steroidů. Biogeneticky jsou odvozeny od kyseliny mevalonové a jejich tvorba vychází z biosyntézy triterpenů. Přímým prekurzorem kardioaktivních glykosidů je cholesterol. Nositel kardioaktivního účinku je aglykon, derivát cyklopentanoperhydrofenanthrenu, který má v polohách C-10 a C-13 methylové skupiny, další substituenty jsou na C-3, C-14 a C-17.

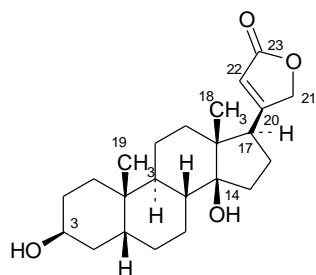


Pro farmakologickou účinnost musí aglykon splňovat několik požadavků:

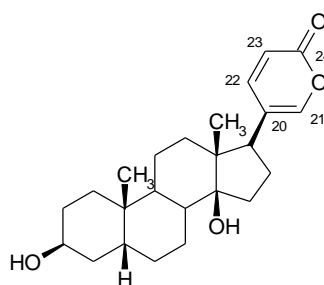
- *cis*-anelace kruhů A/B, *trans*-anelace kruhů B/C a *cis*-anelace kruhů C/D,
- hydroxylová skupina na C-3 a C-14 musí být orientovaná β ,
- nenasycený laktonový kruh na C-17 musí být orientovaný β .

Podle charakteru laktonového kruhu rozlišujeme dva typy kardioaktivních glykosidů:

1. Kardenolidy s pětičlenným nenasyceným laktonovým kruhem; nejčastěji se nachází v čeledích Liliaceae, Ranunculaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae a Plantaginaceae (digitalis dříve řazený do Scrophulariaceae).
2. Bufadienolidy se šestičlenným dvojnásobně nenasyceným laktonovým kruhem; jsou přítomné v *Urginea maritima* a v žlázách některých druhů ropuch rodu *Bufo*.



kard-20,22-enolid



bufa-20,22-dienolid

Cukerná složka (převážně oligosacharid) je obvykle vázána přes hydroxylovou skupinu na C-3. Vedle běžných monosacharidů D-glukosy a L-rhamnosy jsou přítomné cukry specifické pouze pro tyto glykosidy, např. D-digitoxosa, D-cymarosa, D-digitalosa. Sacharidová část molekuly ovlivňuje zejména rychlost účinku, toxicitu a kumulaci kardioaktivních glykosidů v organismu.

4.6.1. KVALITATIVNÍ REAKCE KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

Při důkazu kardioaktivních glykosidů je nutné vodné nebo ethanolové extrakty zbavit balastních látek jako je chlorofyl, třísloviny, saponiny a pod., které by ztěžovaly identifikaci. K tomu se používají tři základní postupy:

- adsorpční chromatografie;
- srážení tříslovin a barviv roztoky solí kovů;
- roztřepávání mezi nemísitelné fáze.

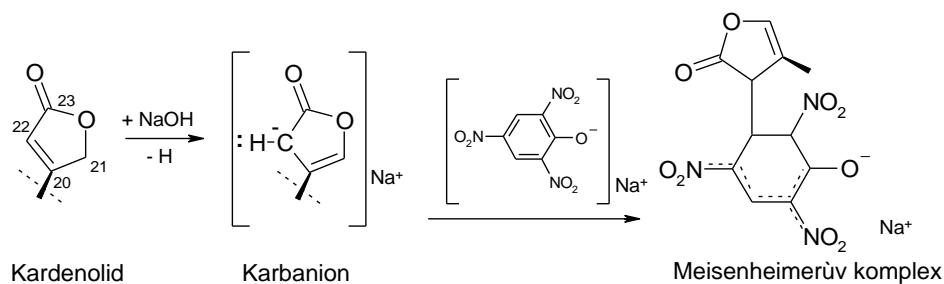
Reakce používané k identifikaci kardioaktivních glykosidů lze rozdělit do tří skupin:

4.6.1.1. Reakce typické pro kardenolidy

Jsou podmíněny přítomností dvojně vazby v laktonovém kruhu aglykonové části molekuly. Reakce probíhají v alkalickém prostředí a neposkytují je bufadienolidy. Řadíme sem tyto reakce:

Baljetova reakce

S alkalickým roztokem kyseliny pikrové vzniká světle oranžové až temně červené zabarvení. Vlivem hydroxidu dochází k odštěpení protonu na C-21 laktonového kruhu kardenolidů, přičemž se vytváří karbanion, který se nukleofilně aduje na kyselinu pikrovou. Vzniká Meisenheimerův barevný komplex, který má absorpční maximum při vlnové délce 491 nm, a proto můžeme reakci použít i ke kvantitativnímu stanovení. Reakci ruší přítomnost acetonu.



Raymondova reakce

Využívá místo kyseliny pikrové *m*-dinitrobenzen. Laktonový kruh kardenolidů reaguje v zásaditém prostředí s polynitroaromáty za vzniku již uvedeného Meisenheimerova komplexu. S *m*-dinitrobenzenem vzniká fialově modré zbarvení.

Keddeho reakce

Využívá kyselinu 3,5-dinitrobenzoovou v ethanolu za vzniku červenofialového komplexu.

Legalova reakce

S nitroprusidem sodným vzniká oranžově červené zbarvení. Tato reakce je založena na vzniku barevného komplexu při reakci nitroprusidu sodného s laktonovým kruhem.

4.6.1.2. Reakce vázané na cukernou složku

Při hydrolyze kyselinou dochází k uvolnění cukerné složky, která reaguje s některými zkoumadly (xanthidolem, vanilinem, anthronem, Fehlingovým zkoumadlem, *p*-dimethyl-aminobenzaldehydem) za vzniku barevných produktů.

Keller-Kilianiho reakce

Roztokem chloridu železitého a kyselinou sírovou se dokazují především 2-deoxycukry (D-digitoxosa, D-cymarosa), někdy též aglykon. Cukry se barví kyselinou sírovou modrozeleně až modře a aglykon tvoří hnědý prstenec. Mechanismus této reakce není zcela znám, pozitivní barevná změna nastane pouze v přítomnosti volné digitoxosy. Předpokládá se, že působením kyseliny cukr přejde na derivát furfuralu a působením železitých iontů se mění na malondialdehyd nebo acetaldehyd. Tím je umožněn kondenzační a polymerační průběh reakce.

Reakce s xanthidolem

S čerstvě připraveným roztokem xanthidolu reagují 2-deoxycukry za vzniku stabilního vínově červeného zbarvení. Reakce se používá i při kvantitativním stanovení kardioaktivních glykosidů.

4.6.1.3. Reakce charakteristické pro steroidy

Jsou založeny na dehydrataci aglykonu, jeho izomerizaci a vzniku barevných produktů.

Liebermann-Burchardova reakce (reagují také steroidy a triterpenoidy).

Reakce s anhydridem kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou. Vlivem kyseliny sírové dochází k dehydrataci a dehydrogenaci steroidního skeletu, vznikají karbeniové ionty a sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami. Zabarvení vzniklé ihned po reakci se může změnit vlivem izomerizace dvojných vazeb v molekule steroidu.

Rosenheimova reakce

Provádí se s 90 - 98% kyselinou trichloroocetovou. Tato reakce je charakteristická pro steroidy, jež ve své molekule mají systém konjugovaných dvojných vazeb nebo pro aglykony, které ho mohou vytvořit (bufadienolidy).

4.6.2. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

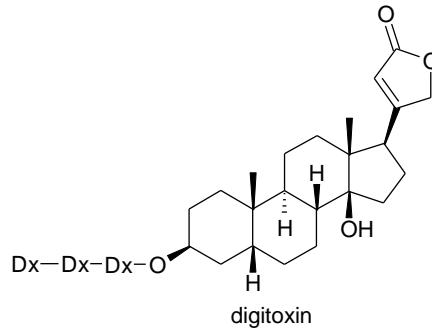
Pro kvantitativní vyhodnocení se v současnosti používá nejčastěji kolorimetrická metoda. Základem je izolace glykosidů a aglykonů vodou nebo ethanolem, přečištění extraktu a kyselá hydrolýza glykosidů. Aglykony se stanovují reakcí s kyselinou pikrovou (viz Baljetova reakce). Vzniklý barevný komplex má absorpční maximum při vlnové délce 491 nm a měří se proti Baljetovu zkoumadlu jako porovnávacímu roztoku.

4.6.3. DROGY S OBSAHEM KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

4.6.3.1. Digitalis purpureae folium – List náprstníku červeného (ČL 2009)

Je to usušený list druhu *Digitalis purpurea* L., náprstník červený, Plantaginaceae (dříve Scrophulariaceae).

Obsah: Nejméně 0,3 % kardenolidů, vyjádřeno jako digitoxin, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. 1 g práškované drogy se povaří s 15 ml vody a po vychladnutí se odvar zfiltruje vatou. Filtrát se rozdělí na 2 díly:
 - a) K prvnímu dílu se přidává po kapkách roztok octanu olovnatého, až nevzniká další sraženina. Zfiltruje se. K filtrátu se přidává roztok hydrogenfosforečnanu sodného tak dlouho, až nevzniká sraženina. Poté se zfiltruje a k filtrátu se přidá stejný objem čerstvě připraveného Baljetova zkoumadla (9,5 ml 1 % roztoku kyseliny pikrové se smíchá s 0,5 ml 10% roztoku NaOH. Před použitím se ředí s methanolem v poměru 1:1). Do 20 minut se roztok barví červenooranžově.
 - b) K druhému dílu se přidá 5 ml chloroformu, 1 ml diethyletheru a 1 ml ethanolu a protřepe se. Chloroformová vrstva se na porcelánové misce odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 1,5 ml koncentrované kyseliny octové, přidá se 1 kapka 0,1% roztoku chloridu železitého a ve zkumavce se podvrství 1,5 ml kyseliny sírové. Na styku obou vrstev se vytvoří barevný prstenec na spodině hnědočervený – digitaligeniny, v horní části zpočátku nazelenalý, později modrý (digitoxosa, Keller-Kilianiho reakce).
2. Důkaz steroidní složky: 0,5 g práškované drogy se 2 minuty vaří s 10 ml ethanolu 50% a 5 ml roztoku octanu olovnatého 10%. Po ochlazení se směs přefiltruje. Filtrát se vytřepe do 15 ml chloroformu, chloroformový roztok se vysuší bezvodým síranem sodným a přefiltruje. 3 ml chloroformového extraktu se odpaří do sucha. Ke zbytku se přidá 1ml směsi 50 ml anhydridu kyseliny octové a 1 ml koncentrované kyseliny sírové a protřepe se. Po několika minutách vzniká hnědošedé zbarvení (steroidní skelet, Liebermann-Burchardova reakce).
3. Důkaz cukerné složky: 0,5 g práškované drogy se smíchá s 5 ml čerstvě připraveného xanthydrolového zkoumadla. 3 minuty se zahřívá na vodní lázni a

potom se chladí 5 minut. Po dalších 10 minutách při pokojové teplotě se objeví vínově červené zabarvení (digitoxosa).

4. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 20 ml ethanolu 50% (V/V) a 10 ml octanu olovnatého. Vaří se 2 minuty, nechá se ochladit a odstředí se. Supernatantní tekutina se protřepe dvakrát 15 ml chloroformu; je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým a zfiltrují se. 10 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů chloroformu a methanolu.

Porovnávací roztok: 5 mg purpureaglykosidu A, 2 mg purpureaglykosidu B, 5 mg digitoxinu a 2 mg gitoxinu se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů chloroformu a methanolu a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (7,5 : 10 : 75).

Nanášení: 20 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Do odpaření rozpouštědel.

Detekce: Postříká se směsí objemových dílů roztoku chloraminu T (10 g/l) a roztoku kyseliny trichloroctové (250 g/l) v ethanolu 96% (2 : 8), pak se 10 minut zahřívá při 100 °C až 105°C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části světla modře fluoreskující skvrna (purpureaglykosid B), těsně nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (purpureaglykosid A), ve střední části chromatogramu světla modře fluoreskující skvrna (gitoxin) a nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (digitoxin). Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny (digitoxigenin a jeho glykosidy fluoreskují žlutě, gitoxigeniny a jeho glykosidy jasně modře a digoxigeniny a jeho glykosidy ocelově modře).

Stanovení obsahu:

0,250 g práškové drogy se protřepává 1 h s 50,0 ml vody. Pak se přidá 5,0 ml roztoku octanu olovnatého (150 g/l), protřepe se a po několika minutách se přidá

7,5 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (40 g/l), zfiltruje se přes skládaný filtr. 50,0 ml filtrátu se vaří 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni s 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (150 g/l HCl). Roztok se převede do dělicí nálevky; baňka se promyje dvakrát 5 ml vody; spojené tekutiny se protřepávají třikrát 25 ml chloroformu. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým a roztok se zředí chloroformem na 100,0 ml. 40,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 7 ml ethanolu 50% (V/V). Přidají se 2 ml kyseliny dinitrobenzoové a 1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l. Současně se připraví porovnávací roztok následujícím způsobem: 50,0 mg digitoxinu se rozpustí v ethanolu 96% a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí ethanolem 96% na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml vody a 3 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (150 g/l HCl). Vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni; dále se postupuje výše uvedeným způsobem. Absorbance obou roztoků se měří při 540 nm několikrát v průběhu 12 minut tak, aby bylo dosaženo maxima. Jako kontrolní tekutina se použije směs 7 ml ethanolu 50% (V/V), 2 ml kyseliny dinitrobenzoové a 1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l.

Z naměřených hodnot absorbancí a koncentrací roztoků se vypočítá obsah kardenolidů v procentech, vyjádřeno jako digitoxin.

4.6.3.2. Digitalis lanatae folium – List náprstníku vlnatého

Je to usušený list druhu *Digitalis lanata* L., náprstník vlnatý, Plantaginaceae (dříve Scrophulariaceae).

Obsah: Nejméně 0,5 % kardenolidů, vyjádřeno jako digitoxin, vyjádřeno na vysušenou drogu.

Stanovení obsahu:

4,00 g jemně práškové drogy se přelije (v předem zvážené) 250 ml zábrusové baňce 50 ml 70% horkého ethanolu a vaří pod zpětným chladičem 15 minut na vodní lázni. Nechá se ochladit na 20 °C. Doplní se 70% ethanolem na původní hmotnost. Přidá se 110 ml vody a promíchá se. Přidá se 50 ml 15% octanu olovnatého a znovu se řádně promíchá. Vzniklá sraženina se po krátkém usazení zfiltruje. Ke 160 ml čirého filtrátu (=3,2 g drogy) se přidá 48 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného 10%. Dobře se promíchá a opět se zfiltruje. 162,5 ml filtrátu (odpovídá 2,5 g drogy) se nalije do

dělicí nálevky na 300 ml. Postupně se vytřepává s 50, 40, 40 a 40 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se odpaří na rotační vakuové odparce do sucha. Odparek se postupně po částech rozpustí ve směsi chloroform-methanol (1:1) na celkový objem 25 ml. 2 ml tohoto extraktu (200 mg drogy) se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 35 ml methanolu. 5 ml methanolového roztoku se smíchá s 5 ml Baljetova zkoumadla. Po 30 minutách stání se měří absorbance barevného roztoku při 494 nm proti porovnávacímu roztoku (5 ml methanolu + 5 ml Baljetova zkoumadla). Procento celkového množství glykosidů, počítaných jako lanatosid C, se vypočítá podle vzorce:

$$\% = A \times 3,41$$

A – naměřená absorbance

Digitalis purpureae folium a **Digitalis lanatae folium** jsou surovinami pro izolaci strukturou definovaných kardioaktivních glykosidů:

4.6.3.3. **Digitoxinum – Digitoxin (ČL 2009), Digoxinum – Digoxin (ČL 2009)**

Zkoušky totožnosti jsou založeny:

1. na infračervené absorpční spektrofotometrii
2. na tenkovrstvé chromatografii a reakcích výše popsanych (s kyselinou dinitrobenzoovou v alkalickém prostředí a s chloridem železitým a kyselinou sírovou).

4.6.3.4. **Ouabainum octahydricum – Ouabain oktahydrát (ČL 2009) dříve: g-Strophantin**

Strukturou definovaný kardioaktivní glykosid, který se izoluje z drogy Strophanthi semen – Strofantové semeno.

Matečnou rostlinou je *Strophanthus gratus* (Wall. et Hook. ex Benth.) Baill., krutíkvět cenný, Apocynaceae. Je to stromovitá liana obsahující průzračný nebo bílý latex. Zploštělá semena jsou podobná semenům ovsa. Jsou opatřena charakteristickou pérovitou osinou.

Ouabain se získává také ze dřeva stromu *Acokanthera schimperi* Oliv., akokantera Schimperova, Apocynaceae, rostoucího v jihovýchodních oblastech Afriky.

Zkoušky totožnosti:

1. K 1 g práškové drogy (Strophanti semen) se přidá 10 ml vody, povaří se a odvar se po vychladnutí zfiltruje. Chromatograficky na tenké vrstvě silikagelu G porovnáním se standardem. Vyvíjí se po dráze 13 cm směsí objemových dílů vody, methanolu, dimethylsulfoxidu a chloroformu (4 : 15 : 15 : 70). Vrstva se suší 30 minut v odvětrávané sušárně při 140 °C. Nechá se ochladit. Postříká se kyselinou sírovou v ethanolu a zahřívá se 15 minut při 140 °C. Posuzuje se poloha a zbarvení skvrn.
2. 2 mg ouabainu se rozpustí ve 2 ml kyseliny sírové; vzniká růžové zbarvení, které rychle přechází v červené. Roztok má v ultrafialovém světle zelenou fluorescenci.
3. Asi 1 mg ouabainu se rozpustí v 1 ml dinitrobenzenu a přidá se 0,2 ml hydroxidu sodného zředěného; vzniká intenzivní modré zbarvení.
4. 0,1 g se rozpustí v 5 ml roztoku kyseliny sírové (150 g/l) a několik minut se vaří. Roztok zežloutne a zakalí se. Zfiltruje se. K filtrátu se přidá 5 ml roztoku hydroxidu sodného (120 g/l), 3 ml vinanu měďnatého a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

4.6.3.5. **Convallariae herba – Konvalinková nat'**

Usušené celé nebo řezané eliptické dlouze řapíkaté listy druhu *Convallaria majalis* L., konvalinka vonná, Convallariaceae (dříve Liliaceae).

Obsah: Nejméně 0,2 % konvallatoxinu.

Zkoušky totožnosti

2 g drogy se povaří s 25 ml vody, odvar se po vychladnutí zfiltruje vatou.

1. K 10 ml filtrátu se přidá 10 ml chloroformu, 2 ml diethyletheru a 2 ml ethanolu 95% a důkladně se protřepe. Chloroformová vrstva se odpaří na porcelánové misce do sucha, odparek se rozpustí ve 3 ml kyseliny octové koncentrované, přidá se 1 kapka 0,1% roztoku chloridu železitého a roztok se ve zkumavce navrství na 3 ml kyseliny sírové. Na styku obou vrstev se vytvoří červenohnědý prstenec, vrstva kyseliny octové se barví zeleně.
2. K 10 ml filtrátu se přidává po kapkách roztok octanu olovnatého, až nevzniká další sraženina a pak se zfiltruje. K filtrátu se po kapkách přidává roztok

hydrogenfosforečnanu sodného, až nevzniká sraženina a opět se zfiltruje. K filtrátu se přidá stejný objem čerstvě připraveného trinitrofenolátu sodného (Baljetovo zkoumadlo). Do 30 minut se roztok zbarví červeně oranžově.

Stanovení obsahu:

3,00 g jemně práškované drogy se přelije 50 ml ethanolu 70% a vaří se pod zpětným chladičem 15 minut na vodní lázni. Nechá se 15 minut stát a pak se ochladí na 20 °C. Přidá se 70 ml vody a 20 ml octanu olovnatého 20% a řádně se promíchá. Vzniklá sraženina se po krátkém usazení zfiltruje. Ke 100 ml čirého filtrátu se přidá 25 ml hydrogenfosforečnanu sodného 10%. Dobře se promíchá a opět zfiltruje. 100,0 ml filtrátu (odpovídá 2,0 g drogy) se vpraví do dělicí nálevky na 200 ml. Postupně se vytřepává 60 ml a třikrát 35 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se odpaří na rotační vakuové odparce do sucha při teplotě nepřesahující 50 °C. Odparek se rozpustí v 10 ml methanolu a roztok se přefiltruje. 1 ml roztoku se doplní methanolem na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se smíchá s 5 ml Baljetova zkoumadla. Po 15 minutách stání se měří absorbance barevného roztoku při 494 nm proti porovnávacímu roztoku (5 ml methanolu + 5 ml Baljetova zkoumadla). Procento celkového množství glykosidů, počítaných jako konvallatoxin se vypočítá podle vzorce

$$\% = A \times 0,625$$

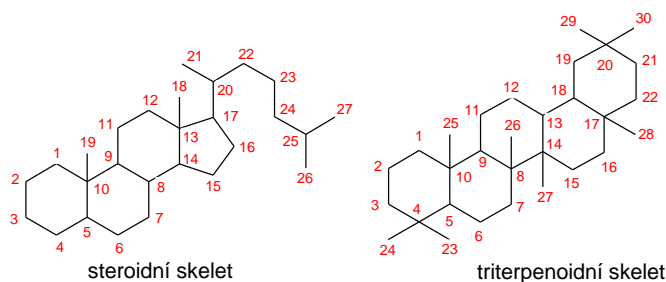
A - naměřená absorbance

4.7.SAPONINY

Saponiny jsou přírodní látky, které dostaly název podle toho, že při protřepávání s vodou silně pěň. Povrchová aktivita a srážení s bílkovinami a cholesterolem jsou také pravděpodobně příčinou jejich hemolytických vlastností, které znemožňují parenterální podání. Terapeuticky se využívají hlavně jako expektorancia a diuretika.

Saponiny se nacházejí v rostlinném materiálu jako glykosidy, které mohou být hydrolyzovány na lipofilní aglykon – sapogenin a cukernou složku. Tuto tvoří vedle glukosy, rhamnosy, galaktosy a xylosy také uronové kyseliny. Cukry (převážně jako oligosacharidy) jsou vázány nejčastěji přes hydroxyl v poloze C-3. Biogeneticky je sapogenin odvozen od kyseliny mevalonové, přičemž důležitým prekurzorem je skvalen.

Podle typu aglykonu lze saponiny dělit na steroidní a triterpenoidní.



V přírodě jsou, co do počtu, častější triterpenoidní saponiny. Nalézají se v rostlinách čeledí Fabaceae, Asteraceae, Araliaceae a v mnoha dalších. Steroidní saponiny jsou v přírodě méně rozšířené a nacházejí se u jednoděložných rostlin, zejména v čeledích Liliaceae, Dioscoreaceae, Agavaceae aj.

Základní skelet steroidních saponinů tvoří cyklopentanoperhydrofenanthren, čímž je dána příbuznost s dalšími nativními steroidy (steroidní hormony, žlučové kyseliny a kardioaktivní glykosidy).

Steroidní saponiny jsou rozpustné ve vodě a dalších polárních rozpouštědlech. Vliv stereochemie na aktivitu saponinů není tak důležitý, jako např. u kardioaktivních glykosidů. Přírodní sapogeniny se liší pouze v konfiguraci na C-3, C-5 a C-25. Podle bočního řetězce rozlišujeme spirostanový a furostanový typ steroidních saponinů.

Jsou velmi důležitým zdrojem látek se steroidním skeletem, užívaných pro výrobu steroidních hormonů.

Pentacyklické triterpenoidní saponiny, na rozdíl od steroidních saponinů, se velmi vzácně vyskytují v jednoděložných rostlinách, ale jsou běžné u dvouděložných Polygonaceae, Primulaceae, Hippocastanaceae a Caryophyllaceae. Jsou nerozpustné ve vodě, mírně v ethanolu za tepla. Triterpenoidní sapogeniny mohou být zařazeny do tří skupin: β -amyrinové, α -amyrinové a lupeolové.

4.7.1. KVALITATIVNÍ REAKCE SAPONINŮ

K důkazu saponinů se používají dva základní typy reakcí: srážecí a barevné. Nevýhodou těchto reakcí je, že nejsou specifické pouze pro saponiny. Poskytují je i ostatní triterpeny a steroidy přítomné v droze. Proto je nutné saponiny z drogy nejdříve vyizolovat.

4.7.1.1. Srážecí reakce

Saponiny tvoří komplexní sloučeniny s cholesterolem a srážejí se hydroxidem hořečnatým, hydroxidem barnatým, solemi mědi a olova a Nesslerovým zkoumadlem (tetrajodortuťnatan draselný $K_2[HgI_4]$).

4.7.1.2. Barevné reakce

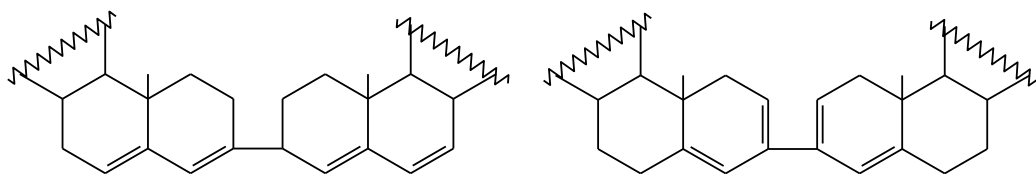
Nejčastěji se používají koncentrované kyseliny, zejména kyselina sírová nebo její směs s 96% ethanolom. Při těchto reakcích dochází většinou k dehydrogenaci, k vytvoření dalších dvojných vazeb a tím ke vzniku barevných sloučenin. Sloučenina se jeví barevná, jestliže z bezbarvého světla, které na ni dopadá, jednu část pohltí a druhou odrazí. A právě tato odražená část, která už neobsahuje paprsky všech vlnových délek, protože byly pohlceny sloučeninou, vyvolává v našem oku na sítnici barevný vjem. Pokud byla např. pohlcena oranžová složka bezbarvého světla, bude se nám sloučenina jevit v doplňkové barvě modrozelené. Zejména sloučeniny s vazbami $C=C$, $C=N$, $C=O$ a $N=N$, dále pak sloučeniny s konjugovaným systémem dvojných vazeb nebo s připojenými aromatickými kruhy mají schopnost pohlcovat určitou složku na ně dopadajícího světla a tak se jevit v doplňkové barvě.

Salkowského reakce

S koncentrovanou kyselinou sírovou poskytuje mikrosublimát rozpuštěný v chloroformu žluté zbarvení, které přechází do různých barevných odstínů v závislosti od použité drogy.

Liebermann-Burchardova reakce

S anhydridem kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou vznikají různé barevné odstíny v závislosti na použitém mikrosublimátu.



Barevné produkty Liebermann-Burchardovy reakce podle Watanabeho

Rosenthalerova reakce

S 1% roztokem vanilinu v koncentrované kyselině chlorovodíkové po mírném zahřátí vznikají různé barevné odstíny červené a fialové.

Lafonsova reakce

Provádí se přímo na řezu kůrou, nebo kořenem saponinové drogy. Po navlhčení řezu směsí koncentrované kyseliny sírové a 96% ethanolu (1:1) vzniká v buňkách pletiva červené zbarvení, které přechází do fialova.

Pro důkaz saponinů lze využít také jejich specifickou vlastnost hemolyzovat červené krvinky. Hemolytické působení není zcela výsadní vlastností saponinů, přestože v mnoha případech je jediným vodítkem pro jejich důkaz a kvantitativní hodnocení. Ve styku se saponiny se červené krvinky porušují, dochází k uvolnění hemoglobinu a k hemolýze. Hemolýzu lze provádět na krevní želatíně nebo na krevním agaru. Saponiny extrahované z drogy ve styku s krevní želatinou nebo krevním agarem vytvářejí tzv. hemolytický dvůrek, tj. difundují do želatiny nebo agaru a způsobují hemolýzu krvinek, což se projeví zjasněním červené barvy agaru.

4.7.2. KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ SAPONINŮ

Při stanovení saponinů v drogách se používaly metody fyzikální (stanovení čísla pěnovosti), metody chemické (např. titrační stanovení kyseliny glycyrrhizové) a metody biologické (stanovení hemolytického indexu – stanovení množství hemolytických jednotek). Dnes se často využívají metody kapalinové chromatografie.

4.7.2.1. Stanovení čísla pěnovosti podle Koflera

Jednou z nejvýznamnějších vlastností saponinů, jimiž se liší od ostatních glykosidů, je povrchová aktivita. Saponinové roztoky mají proti vodě značně snížené povrchové napětí a vyznačují se silnou pěnovostí. Povrchová aktivita jejich roztoků klesá s koncentrací a je značně závislá na průvodních složkách. Proto lze hodnocení saponinových drog podle povrchového napětí jejich extraktů použít jen omezeně, v relativním měřítku. Číslo pěnovosti je hodnota, kterou můžeme zhruba vyjádřit kvalitu saponinových drog. Číslo pěnovosti udává největší zředění výluhu drogy, který po protřepání vytvoří ve zkumavce prstenec pěny vysoký 1 cm.

4.7.3. DROGY S OBSAHEM SAPONINŮ

4.7.3.1. Primulae radix – Prvosenkový kořen (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek s kořeny druhu *Primula veris* L., prvosenka jarní, nebo *Primula elatior* (L.) Hill., prvosenka vyšší, Primulaceae. Droga hořké chuti.

Obsah: 5 – 10 % triterpenoidních pentacyklických saponinů, jejichž aglykony jsou deriváty priverogeninu A a B (*Primula veris*) a protoprimulageninu A (*Primula elatior*).

Zkoušky totožnosti:

1. 0,1g práškové drogy se smíchá s 5 ml teplé vody a po vychladnutí se protřepe. Vytvořená pěna je patrná ještě po hodině (saponiny).
2. 0,5 g práškové drogy se ve zkumavce protřepává s 5 ml acetonu 5 minut, po 30 minutách stání se výluh přefiltruje. K filtrátu se přidá stejný objem koncentrované kyseliny chlorovodíkové a zahřeje se k varu. Roztok se musí barvit cihlově červeně.
3. Důkaz saponinů na krevním agaru viz *Saponariae radix*.

4.7.3.2. **Saponariae radix – Kořen mydlice lékařské**

Jsou to usušené podzemní části druhu *Saponaria officinalis* L., mydlice lékařská, Caryophyllaceae.

Obsah: 2,5 – 5 % směsi saponinů označovaných jako saporubin, dále triterpenové saponasidy A, B, C, D, jejichž aglykony jsou gypsogenin a kyselina gypsogeninová.

Zkoušky totožnosti:

1. Příčný řez drogou navlhčíme 96% kyselinou sírovou, vzniká žluté zbarvení, které přechází přes pomerančovou až do růžovofialové (saponiny, modifikovaná Salkowského reakce).
2. Důkaz saponinů na krevním agaru: 1,0 g práškové drogy se zahřeje k varu s 10,0 ml izotonického fosfátového pufru. Po ochlazení se směs zfiltruje. V agarové plotně se korkovrtem vyřežou otvory o průměru asi 10 mm. Tyto se naplní filtrátem z drogy. Saponin difunduje do krevního agaru a vytvoří v něm hemolytický dvůrek. Jeho velikost se vyhodnotí po 2 až 24 hodinách.

4.7.3.3. **Polygalae (Senegae) radix – Senegový kořen (ČL 2009)**

Jsou to usušené kořeny druhu *Polygala senega* L., vítod senega, Polygalaceae.

Obsah: 6 až 12 % triterpenoidních saponinů, hlavně senegasaponiny A, B, C, D, lišící se v cukerné složce; hlavní aglykony jsou presenegin a tenuifolin.

Zkoušky totožnosti:

1. K práškové droze se přidá několik kapek koncentrované kyseliny sírové, vznikne žluté zbarvení, které po 30 minutách přechází do růžové (saponiny, Salkowského reakce).
2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz *Saponariae radix*.
3. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok. 1,0 g práškové drogy (355) se vaří 15 minut pod zpětným chladičem s 10 ml ethanolu 70% (V/V), zfiltruje se a nechá se ochladit.

Porovnávací roztok. 10 mg escinu se rozpustí v ethanolu 70% (V/V) a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze. Horní vrstva směsi objemových dílů kyseliny octové ledové, vody a butan-1-olu (10 : 40 : 50).

Nanášení. 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl a 40 µl porovnávacího roztoku, do proužků 20 mm × 3 mm.

Vyvíjení. Po dráze 12 cm.

Sušení. Při 100 °C až 105 °C.

Detekce A. Postříká se anisaldehydem a znovu se zahřívá při 100 °C až 105 °C, dokud se na chromatogramu zkoušeného roztoku neobjeví červené skvrny (saponiny).

Hodnocení A. V dolní a střední části chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři až pět červeně zbarvených skvrn odpovídajících polohou šedofialovým skvrnám escinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B. Vrstva se posřiká asi 10 ml roztoku kyseliny fosfomlybdenové v ethanolu bezvodém a zahřívá se při 100 °C až 105 °C, dokud se skvrny saponinů nezbarví modře.

Hodnocení B. Intenzita a velikost skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku se pohybuje mezi intenzitou a velikostí proužků escinu na chromatogramech po nanesení 10 a 40 µl porovnovacího roztoku.

4.7.3.4. Verbasci flos – Diviznový květ (ČL 2009)

Je to usušená květní koruna druhů *Verbascum thapsus* L., divizna malokvětá, *Verbascum densiflorum* Bertol. (syn. *V. thapsiforme* Schrad), d. velkokvětá a *Verbascum phlomoides* L., d. sáповitá, Scrophulariaceae.

Obsah: kyselé a neutrální saponiny, flavonoidy a iridoidy.

Zkoušky totožnosti:

1. Důkaz saponinů na krevním agaru viz Saponariae radix.
2. 1,0 g práškové drogy se vaří 1 minutu s 15 ml vody. Zfiltruje se. Filtrát se smíchá s 1 ml kyseliny chlorovodíkové 35% a vaří se 1 minutu; vzniká zelenomodré zbarvení a po několika minutách se tvoří zákal a pak černá sraženina (iridoidy).
3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut ve vodní lázni při 60 °C za míchání. Po ochladnutí se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 1 mg kyseliny kávové, 2,5 mg hyperosidu a 2,5 mg rutosidu se rozpustí v methanolu a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé, butan-2-onu, ethyl-acetátu (10 : 10 : 30 : 50).

Nanášení: 30 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C.

Detekce: Horká vrstva 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 a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem žlutohnědě fluoreskující skvrna (rutosid), nad ní další žlutohnědě fluoreskující skvrna (hyperosid) a ve vrchní části zelenomodře fluoreskující skvrna (kyselina kávová).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je nejvýše žlutě až žlutozeleně fluoreskující skvrna a pod ní jsou patrné další namodrale nebo nazelenale fluoreskující skvrny (flavonoidy nebo fenylypropanoidy).

4.7.3.5. Herniariae herba – Průtržníková nať

Je to celá nebo řezaná sušená nať druhu *Herniaria glabra* L., průtržník lysý, a *Herniaria hirsuta* L., průtržník chlupatý, Caryophyllaceae (nově Ilecebraceae).

Obsah: 3 – 9 % neutrálních saponinů, 0,4 % kyselých saponinů, kumarin methylumbelliferon (herniarin).

Zkoušky totožnosti:

1. Mikrosublímáci asi při 100 °C vzniká sublimát, který se rozpustí ve vodě a přidá se 1 kapka zředěného roztoku amoniaku. Roztok ve filtrovaném záření rtuťové výbojky modře fluoreskuje (methylumbelliferon).
2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz *Saponariae radix*.

4.7.3.6. **Ononidis radix – Jehlicový kořen (ČL 2009)**

Je to celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Ononis spinosa* L., jehlice trnitá, Fabaceae.

Obsah: saponiny, flavonoidy, silice.

Zkoušky totožnosti:

1. Mikrosublímáci při přibližně 100 °C vzniká sublimát, sestávající se z hvězdicovitě uspořádaných jehlic, které se kapkou lihového roztoku vanilinu po chvíli zbarví modrofialově (onokol).

2. Příčný řez kořenem se navlhčí kapkou zředěného roztoku amoniaku, barví se žlutě.

3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 15 ml methanolu a vaří se 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 10 mg resorcinolu a 50 mg vanilinu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethanolu 96%, dichlormethanu a toluenu (10 : 45 : 45).

Nanášení: 20 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm.

Hodnocení A: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem skvrna patrná při 254 nm (resorcinol) a blízko čela chromatogramu je skvrna viditelná při 254 nm (vanilin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní modrá skvrna viditelná při 365 nm, lokalizovaná jako resorcinol porovnávacího roztoku. Jsou ještě patrné další méně intenzivně zbarvené skvrny.

Detekce B: Vrstva se postříká anisaldehydem (v následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml anisaldehydu, 10 ml kyseliny octové ledové, 85 ml methanolu a 5 ml kyseliny sírové 96%), zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je nad startem červená skvrna (resorcinol), blízko čela je šedofialová skvrna (vanilin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v poloze nad resorcinolem fialová skvrna (onokol).

2. Důkaz saponinů na krevním agaru viz *Saponariae radix*.

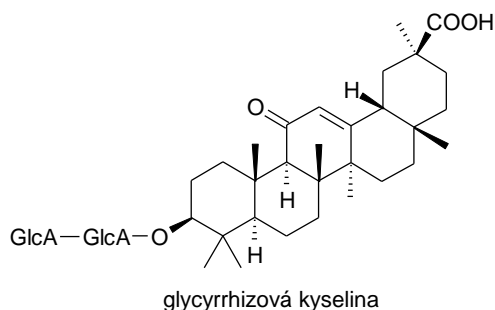
Extrahovatelné látky. Nejméně 15 %; 2,00 práškované drogy (250) se smíchají se směsí 8 g vody a 12 g ethanolu 96% a nechá se 2 h stát za častého protřepávání, zfiltruje se a 5 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek po odpaření se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek po vysušení váží nejméně 75 mg.

4.7.3.7. *Liquiritiae radix* – Lékořicový kořen (ČL 2009)

Je to usušený neloupaný nebo loupaný, celý nebo řezaný kořen a výběžky druhu *Glycyrrhiza glabra* L., lékořice lysá a/nebo *Glycyrrhiza inflata* Bat., l. nadmutá a/nebo *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., l. uralská, Fabaceae.

V označení na obalu se uvede, zda je droga loupaná nebo neloupaná.

Obsah: Nejméně 4,0 % kyseliny glycyrrhizové, počítáno na vysušenou drogu. Dále jsou přítomné flavonoidy a chalkony.



Zkoušky totožnosti

1. 0,5 g práškované drogy se povaří s 5 ml vody a po vychladnutí se zfiltruje, filtrát třepáním pěni a pěna je do 1 hodiny ještě patrná (saponiny).
2. K 0,05 g práškované drogy se přidá 5 ml koncentrované kyseliny sírové, droga i kyselina se zbarví oranžově, později červeně (glycyrrhizin).
3. 3. Důkaz saponinů na krevním agaru viz *Saponariae radix*.
4. 0,02 g práškované drogy se polije 2,0 ml roztoku kyseliny sírové 50%. Kyselina se zbarví intenzivně oranžově žlutě (flavonoidní glykosid liquiritin).

5. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,50 g práškové drogy se v 50ml baňce s kulatým dnem smíchá se 16,0 ml vody a 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové (250 g/l HCl 35%), zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. Filtr a baňka se suší 60 minut při 105 °C. Filtr se vloží zpět do baňky, přidá se 20,0 ml diethyletheru a zahřívá se 5 minut na vodní lázni při 40 °C pod zpětným chladičem, po ochlazení se zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml diethyletheru.

Porovnávací roztok: 5,0 mg kyseliny glycyrrhetové a 5,0 mg thymolu se rozpustí v 5,0 ml diethyletheru.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů amoniaku 26%, vody, ethanolu 96% a ethylacetátu (1 : 9 : 25 : 65).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu, 5 minut.

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

Hodnocení A: Na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku je v dolní polovině skvrna zhášející fluorescenci (kyselina glycyrrhetová).

Detekce B: Postříká se anisaldehydem (v následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml anisaldehydu, 10 ml kyseliny octové ledové, 85 ml methanolu a 5 ml kyseliny sírové 96%), zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová skvrna (kyselina glycyrrhetová) a v horní třetině červená skvrna (thymol).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v dolní polovině fialová skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny glycyrrhetové na chromatogramu porovnávacího roztoku a v horní třetině žlutá skvrna (isoliquiritigenin) v poloze odpovídající poloze thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Stanovení obsahu kyseliny glycyrrhizové titračně:

2,0 g drogy se smísí ve varné baňce na 100 ml s 20 ml 3% roztoku kyseliny dusičné v acetonu a zahřívá se na vodní lázni, jejíž teplota nesmí překročit 60 °C, pod

zpětným chladičem 10 minut. Ochlazený extrakt se zfiltruje na Büchnerově nálevce. Extrakce acetonovým roztokem kyseliny dusičné na vodní lázni se opakuje ještě třikrát. Droga se potom promývá ještě takovým množstvím acetonu, aby celkový objem acetonových extraktů byl 100 ml. Pak se tento extrakt vlije do kádinky o objemu 200 ml. Přidá se 40 ml ethanolu 60% a za stálého míchání se po kapkách přidává 10 ml 25% amoniaku. Po smíchání směs ochladíme ledem na 15 °C. Vznikající sraženina (amonná sůl kyseliny glycyrrhizové), kterou zachytíme na dvojitěm skládaném filtru, se odsaje a promývá se acetonem, dokud není protékající aceton bezbarvý (50-100 ml). Sraženina se nechá na filtru vysušit na vzduchu a potom se dosuší v sušárně při 60 °C. Poté se sraženina kvantitativně rozpustí v 50,0 ml vody a k vodnému roztoku se přidá 20 ml neutrálního formaldehydu. Nechá se 1 hodinu stát a pak se titruje 0,1 M roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein do červeného zabarvení. Současně se provádí slepý pokus. 1 ml 0,1 M roztoku hydroxidu sodného udává 0,0273 mg kyseliny glycyrrhizové.

Stanovení obsahu kapalinou chromatografií:

Zkoušený roztok: 1,000 g práškové drogy (180) se ve 150ml zabroušené kuželové baňce smíchá se 100,0 ml roztoku amoniaku 17,5% RS (8 g/l) a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Část supernatantní tekutiny se odstředí a 1,0 ml se zředí amoniakem 17,5% RS (8 g/l) na 5,0 ml. Roztok se zfiltruje přes filtr 0,45 µm a filtrát se použije jako zkoušený roztok.

Roztok A. 0,130 g amonium-glycyrrhizátu pro HPLC CRL se rozpustí v amoniaku 17,5% RS (8 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 5,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 10,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 15,0 ml roztoku A se zředí roztokem amoniaku 17,5% RS (8 g/l) na 100,0 ml.

Kolona. Stacionární fáze: silikagel oktadecylsilylovaný.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů roztoku kyseliny octové ledové R, acenonitrilu R a vody R (6 + 30 + 64).

Průtoková rychlost. 1,5 ml/min.

Detekce. Spektrofotometrický detektor, 254 nm.

Nástřik. 10 µl.

Sestrojí se kalibrační křivka za použití koncentrací porovnávacích roztoků (g/100 ml) na ose x a odpovídajících ploch píků na ose y. Za použití retenčních časů a ploch píků na chromatogramech porovnávacích roztoků se identifikuje a stanoví plocha píku kyseliny glycyrrhizové na chromatogramu zkoušeného roztoku. Obsah kyseliny glycyrrhizové se vypočítá podle vzorce

$$A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{822}{840}$$

V němž značí:

A - koncentraci amonium-glycyrrhizátu ve zkoušeném roztoku odečtenou z kalibrační křivky v g/ 100 ml;

B - deklarovaný obsah amonium-glycyrrhizátu pro HPLC CRL v procentech;

m - hmotnost zkoušené drogy v gramech;

822 - molekulovou hmotnost kyseliny glycyrrhizové;

840 - molekulovou hmotnost amonium-glycyrrhizátu (bezvodého).

Droga se používá pro přípravu:

Liquiritiae extractum fluidum ethanolic normatum (ČL 2009) – **Lékořicový extrakt tekutý ethanolický standardizovaný**. Obsah – 3,0 – 5,0 % kyseliny glycyrrhizové.

Liquiritiae extractum siccum ad saporandum (ČL 2009) – **Lékořicový extrakt suchý pro aromata**. Obsah – 5,0 – 7,0 % kyseliny 18β-glycyrrhizové.

4.8. HOŘČINY

Hořčiny neboli amara tvoří strukturně i biogeneticky pestrou skupinu přírodních látek, jejichž společnou vlastností je hořká chuť. Působí na chuťové receptory v ústech, čímž stimulují zvýšení sekrece žaludečních šťáv. Nemají jiný výraznější terapeutický účinek.

Podle struktury, biosyntézy a výskytu lze hořčiny rozdělit do skupin:

1. hořčiny terpenoidní, odvozené od kyseliny mevalonové:
 - a) iridoidové a sekoiridoidové hořčiny, vyskytující se volné nebo glykosidicky vázané, např. aukubin, loganin, gentianin, gentiopikrin, amarogentin (hořčiny Gentianaceae);
 - b) hořčiny terpenoidní povahy (některé hořčiny Asteraceae), seskviterpeny (absinthin), diterpeny (pikrosalvin), triterpeny (quassiin, kukurbitaciny), steroidní (konduranginy).
2. hořčiny neterpenoidní: (neohesperidin, naringin, humulon, lupulon).

4.8.1. KVALITATIVNÍ DŮKAZ HOŘČIN

Pro kvalitativní důkaz hořčin v drogách se v současnosti nejvíce využívá tenkovrstvá chromatografie.

4.8.2. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HOŘČIN

Obsah hořčin v drogách nebo v přípravcích z nich se hodnotí chuťovou zkouškou, stanovení čísla hořkosti.

4.8.2.1. Stanovení čísla hořkosti (ČL 2009)

Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění sloučeniny, tekutiny nebo extraktu, které chutná ještě hořce. Stanoví se porovnáním s chinin-hydrochloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000.

Postup stanovení:

a) Stanovení korekčního faktoru

Je vhodné, aby zkoušku prováděla skupina nejméně šesti osob. Před ochutnáváním si

musí vypláchnout ústa vodou.

Je třeba stanovit korekční faktor pro každého člena skupiny tak, aby byly odstraněny individuální rozdíly vnímání hořké chuti.

Základní roztok: 0,100g chinin-hydrochloridu se rozpustí ve vodě a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 100,0 ml.

Porovnávací roztoky: Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 3,6 ml základního roztoku a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí pitnou vodou na 10,0 ml.

Určí se roztok s nejnižší koncentrací, který chutná ještě hořce. 10,0 ml tohoto roztoku se převaluje v ústech 30 sekund tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka; jestliže roztok nechutná hořce vyplivne se a po 1 minutě se ústa vypláchnou vodou. Po 10 minutách se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor k se vypočítá pro každého člena skupiny podle vzorce:

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

v němž značí:

n – počet mililitrů základního roztoku o nejnižší koncentraci, který chutnal ještě hořce.

Osoba, které porovnávací roztok připravený z 5,8 ml základního nechutná hořce, je ze zkoušení vyloučena.

b) Příprava vzorku

Je-li třeba, zkoušená droga se upráškuje. K 1,00 g se přidá 100 ml vroucí vody a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 minut na vodní lázni. Po ochlazení se zředí vodou na 100 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, první 2 ml filtrátu se odstraní. Filtrát se označí C-1 a jeho zředovací faktor (DF) je 100.

c) Stanovení čísla hořkosti:

Zkoušené roztoky:

10,0 ml roztoku C-1 se zředí vodou na 100 ml: C-2 (DF = 1000)

10,0 ml roztoku C-2 se zředí vodou na 100 ml: C-3 (DF = 10 000)

20,0 ml roztoku C-3 se zředí vodou na 100 ml: C-3A (DF = 50 000)

10,0 ml roztoku C-3A se zředí vodou na 100 ml: C-4 (DF = 100 000)

Každý zkoušející hodnotí nejprve roztok C-4 a pokračuje tak dlouho, dokud některý z roztoků neshledá hořký. Tento roztok se označí D. Zředovací faktor (DF) roztoku D se označí jako Y.

Za použití roztoku D se připraví řada roztoků s následujícím postupným zředěním:

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 se objem roztoku D v mililitrech, který po zředění vodou na 10,0 ml chutná ještě hořce (X).

Vypočítá se číslo hořkosti pro každou ze zkoušejících osob podle vzorce:

$$\frac{Y \times k}{X \times 0,1}$$

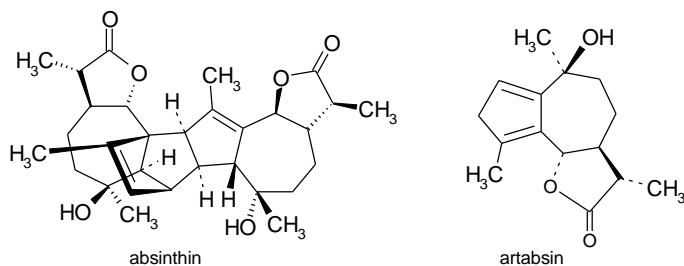
Číslo hořkosti zkoušené látky se vyjádří jako průměrná hodnota zjištěná všemi zkoušejícími osobami.

4.8.3. DROGY S OBSAHEM HOŘČIN

4.8.3.1. Absinthii herba - Pelyňková nat' (ČL 2009)

Jsou to usušené celé nebo řezané přízemní listy nebo kvetoucí málo olistěné vrcholky druhu *Artemisia absinthium* L., pelyněk pravý, Asteraceae.

Obsah: neprchavé seskviterpenické hořké laktony absinthin a artabsin a dále silice, nejméně 2 ml/kg vysušené drogy. Silice obsahuje thujon, thujylalkohol, felandren, kadinen aj.



Zkoušky totožnosti:

1. Asi 0,3 g práškované drogy se v baňce se zábrusem protřepává 5 minut s 15,0 ml chloroformu a získaný výluh se zfiltruje malým chomáčkem vaty. Filtrát se odpaří na vodní lázni na objem asi 1,0 ml, přidá se 5,0 ml roztoku dimethylaminobenzaldehydu v kyselině octové a fosforečné a zahřívá se 5 minut na vodní lázni. Roztok se zbarví modrozeleně až tmavě zeleně (artabsin).

2. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 2 g práškované drogy se smíchají s 50 ml vroucí vody a nechají se stát 5 minut za občasného protřepávání. Po ochlazení se přidá 5 ml roztoku octanu olovnatého (100 g/l), promíchá se a zfiltruje. Baňka a zbytek na filtru se promyjí 20 ml vody. Filtrát se protřepe s 50 ml dichlormethanu, organická vrstva se oddělí a vysuší se nad síranem sodným bezvodým, zfiltruje se a filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml ethanolu 96%.

Porovnávací roztok: 2 mg červeně methylové a 2 mg resorcinolu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů acetonu, kyseliny octové ledové, toluenu a dichlormethanu (10 : 10 : 30 : 50).

Nanášení: 10 μ l do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Postříká se acetanhydridem v kyselině sírové a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení A: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (artabsin) v poloze odpovídající poloze těsně nad červenou skvrnou (červeň methylová) na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B: Vrstva se zahřívá 5 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině červená skvrna (červeň methylová) a pod ní světle růžová skvrna (resorcinol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní červená nebo hnědočervená skvrna (absinthin) s hodnotou R_F odpovídající skvrně resorcinolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny, které jsou méně intenzivní než skvrna absinthinu.

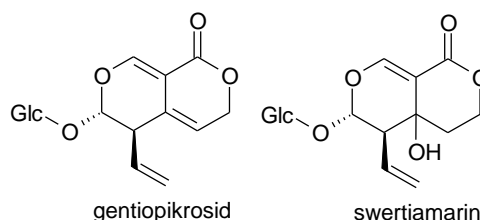
Stanovení obsahu:

Číslo hořkosti: Nejméně 10 000.

4.8.3.2. Centaurii herba – Zeměžlučová nať (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Centaurium erythraea* Rafn. *sensu lato*, včetně druhů *Centaurium majus* (H. et L.) Zeltner a *Centaurium suffruticosum* Ronn. (syn. *Erythraea centaurium* Persoon); *Centaurium umbellatum* Gilibert; *Centaurium minus* Gars., zeměžluč okolíkatá, z. menší, Gentianaceae.

Obsah: hořčiny swertiamarin, swerosid, gentiopikrosid, amarogentin, flavonoidy.



Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 25 ml methanolu a po 15 minutách protřepávání se zfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku při teplotě nepřesahující 50 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v malém množství methanolu tak, aby výsledný objem roztoku byl 5 ml, roztok může obsahovat sediment.

Porovnávací roztok: 1 mg rutosidu a 1 mg swertiamarinu se rozpustí v methanolu a zředí se jím na 1 ml.

Stacionární fáze: Vrstva s deskou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé a ethylformiátu (4 : 8 : 88).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: V nenasycené komoře, po dráze 12 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Porovnávací roztok poskytuje dvě skvrny, zhášející fluorescenci. V horní části je to swertiamarin a v dolní části rutosid. Zkoušený roztok vykazuje skvrnu swertiamarinu, intenzivně zháší fluorescenci.

Detekce B: Postříká se anisaldehydem a zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až

105 °C; pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Porovnávací roztok poskytuje v horní části chromatogramu hnědou skvrnu swertiamarinu, níže žlutou skvrnu rutosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je hnědá skvrna swertiamarinu, nad ní může být patrná slabě žlutohnědá skvrna gentiopikrosidu. Ve spodní části chromatogramu jsou patrné další hnědošedé, žluté a šedé skvrny.

Stanovení obsahu:

Číslo hořkosti: Nejméně 2 000.

4.8.3.3. Gentianae radix – Hořcový kořen (ČL 2009)

Jsou to usušené úlomky kořenů a oddenků druhu *Gentiana lutea* L., hořec žlutý, Gentianaceae.

Droga má charakteristický pach a přetrvávající výrazně hořkou chuť.

Obsahové látky: sekoiridoidové hořčiny gentiopikrosid, amarogentin, žluté xanthy gentisin, gentiosid a cukry – trisacharid gentianosa, disacharid gentiobiosa.

Zkoušky totožnosti:

Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 25 ml methanolu a po 15 minutách protřepání se zfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku při teplotě nepřesahující 50 °C do sucha. Odparek se rozpustí v malém množství methanolu tak, aby výsledný objem roztoku byl 5 ml, roztok může obsahovat sediment.

Porovnávací roztok: 5 mg fenazonu a 5 mg hyperosidu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Vrstva s deskou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: směs objemových dílů vody, kyseliny mravenčí bezvodé a ethylformiátu (4 : 8 : 88).

Nanášení: 20 µl do proužků.

Vyvíjení: V nenasyčené komoře, po dráze 8 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Porovnávací roztok poskytuje dvě skvrny, zhášející fluorescenci, v horní části fenazon a v dolní části hyperosid. Zkoušený roztok vykazuje nejvýše (nad

fenazonem porovnávacího roztoku) výraznou zhášející skvrnu, níže je slabá zhášející skvrna (amarogentin) a na úrovni skvrny hyperosidu porovnávacího vzorku je u zkoušeného vzorku výrazně zhášející skvrna (gentiopikrosid).

Detekce B: Postříká se roztokem hydroxidu draselného (100 g/l) a pak čerstvě připraveným roztokem modři pravé B R (2 g/l) ve směsi stejných objemových dílů ethanolu bezvodého a vody a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve spodní části patrná hnědočervená skvrna hyperosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní části výrazná tmavě fialová skvrna, pod ní je fialovočervená skvrna amarogentinu a na úrovni hyperosidu je slabá světle hnědá skvrna gentiopikrosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Stanovení obsahu

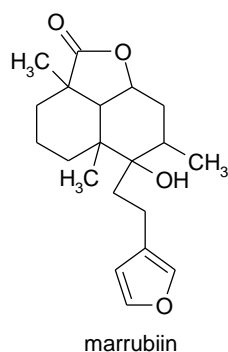
Číslo hořkosti: Nejméně 10 000.

Droga *Gentianae radix* – Hořcový kořen (ČL 2009) je surovinou pro přípravu ***Gentianae tinctura* – Hořcová tinktura (ČL 2009).**

4.8.3.4. ***Marrubii herba* – Jablečnicková nat' (ČL2009)**

Je to usušená celá kvetoucí nat' druhu *Marrubium vulgare* L., jablečnick obecný, Lamiaceae, nebo její úlomky.

Obsah: Nejméně 0,7 % marrubiinu (diterpenová hořčina), počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok (a): 1,0 g práškované drogy se smíchá se 2 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné a 8 ml methanolu a zahřívá se 30 minut na vodní lázni pod

zpětným chladičem. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

Zkoušený roztok (b): 1,0 g práškované drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 30 minut pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 10 mg cholesterolu a 10 mg guajazulenu se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů methanolu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 20 µl zkoušených roztoků (a) a (b) a 10 µl porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se roztokem vanilinu (5 g/l) ve směsi objemových dílů ethanolu 96% a kyseliny sírové (20 : 80); zahřívá se 5 až 10 minut při 130 °C a ihned se pozoruje v denním světle.

Hodnocení:

Na chromatogramu je u zkoušených roztoků přítomna v horní části modrofialová skvrna odpovídající svým retenčním faktorem guajazulenu z porovnávacího roztoku. Ve střední části zkoušených roztoků najdeme intenzivní modro až červenofialovou skvrnu marrubiinu, retenční faktor odpovídá cholesterolu z porovnávacího roztoku. Skvrna marrubiinu je na chromatogramu zkoušeného roztoku a) intenzivnější než na chromatogramu zkoušeného roztoku b). V průběhu extrakce kyselinou chlorovodíkovou a methanolem dochází k přeměně premarrubiinu na marrubiin a ke zvýšení intenzity zbarvení. Pod skvrnou marrubiinu je přítomna fialová skvrna premarrubiinu. Na chromatogramu mohou být i další, méně intenzivní modrofialové skvrny.

Stanovení obsahu marrubiinu:

Spektrofotometricky pomocí kapalinové chromatografie.

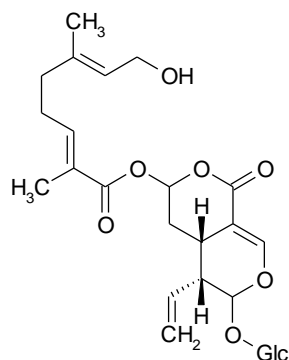
4.8.3.5. Trifolii fibrini folium – Vachtový list (ČL2009)

Podle Ph. Eur. 7 *Menyanthidis trifoliatae folium*.

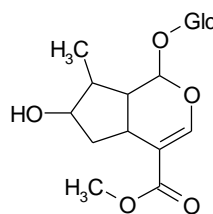
Je to celý usušený list druhu *Menyanthes trifoliata* L., vachta trojlístá, Menyanthaceae, nebo jeho úlomky. Droga má velmi hořkou chuť, která dlouho

přetrvává.

Obsah: sekoiridoidové glykosidní hořčiny, např. foliamenthin, menthiafolin, dále iridoidový glykosid loganin, flavonoidy.



foliamenthin



loganin

Zkoušky totožnosti:

Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 10 ml methanolu a zahřívá se 5 minut při 60 °C ve vodní lázni za míchání. Nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku ve vodní lázni při teplotě 60 °C do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2,0 ml methanolu.

Porovnávací roztok: 5 mg loganinu se rozpustí v 15 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

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

Nanášení: 30 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se zkoumadlem vanilinovým a suší se 10 minut v sušárně při 100 °C. Pozoruje se v denním světle. [Vanilinové zkoumadlo: Ke 100,0 ml roztoku vanilinu v lihu 96% (10 g/l) se opatrně přidají po kapkách 2,0 ml koncentrované kyseliny sírové. Použitelné 48 hodin od přípravy].

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího i zkoušeného roztoku jsou patrné šedofialové skvrny loganinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné intenzivně fialové až tmavě modré skvrny (foliamenthin, menthiafolin, dehydrofoliamenthin) v pořadí od čela mobilní fáze směrem dolů – fialová skvrna, intenzivní modrá skvrna, fialová až šedofialová skvrna, šedá až šedomodrá skvrna a nahnědlá skvrna.

Stanovení obsahu:

Číslo hořkosti: Nejméně 3 000.

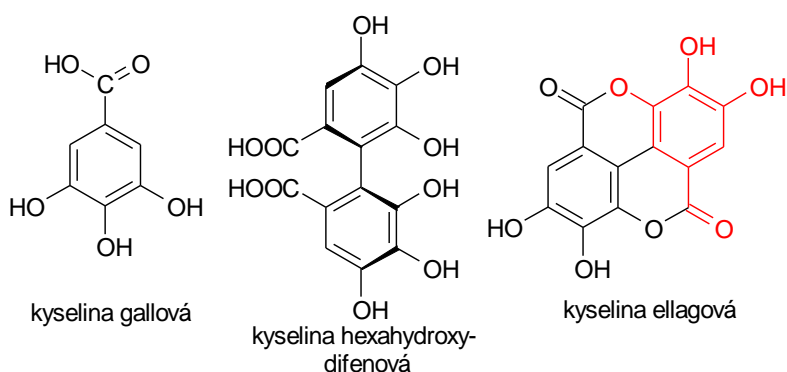
4.9. TRÍSLOVINY

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.

4.9.1. HYDROLYZOVATELNÉ TRÍSLOVINY

Podléhají hydrolyze 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.

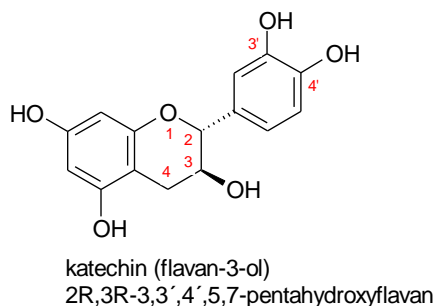
Skupina hydrolyzovatelných tříslovin se dělí na dva typy, na gallotaniny (rozdělují se na polyestery kyseliny fenolkarboxylové s glukosou a nesacharidové estery fenolkarboxylových kyselin) a ellagotaniny. Ellagová kyselina (depsid kyseliny gallové) může vzniknout laktonizací kyseliny hexahydroxydifenové v průběhu chemické hydrolyzy 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.

4.9.2. 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.



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*.

4.9.3. 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 čeledi 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 pentagalloyl-glukosidy 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.

4.9.4. 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.

4.9.4.1. 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 želatinou: 0,5 - 1,0% roztok tříslovin sráží 1% roztok želatinou obsahující 10% NaCl. Pseudotaniny sráží roztok želatinou 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 želatinou. 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 zbarvení.

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 srážejí 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*.

4.9.4.2. 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

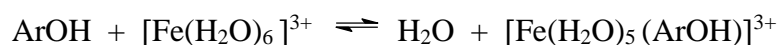
ostatní látky fenolového charakteru. Další barevnou reakcí, užívanou pro důkaz tříslavin, je reakce s kyselinou fosfowolframovou v alkalickém prostředí, kdy vzniká intenzivní modré zbarvení (wolframová modř).

Reakce tříslavin se železitými solemi

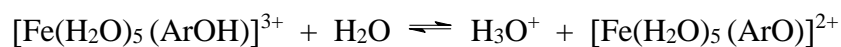
Přidá-li se k 2-3 ml neutrálního roztoku tříslavin několik kapek 1% roztoku kamence železitého, vznikne za přítomnosti pyrokatecholových tříslavin zelenočerné zbarvení, kdežto pyrogallolové tříslaviny se barví do modra. Při stejném množství obou druhů tříslavin ve směsi je zbarvení do modra intenzivnější.

Reakce tříslavin se železitými solemi je velmi citlivá v neutrálním prostředí. V kyselém prostředí přechází zbarvení i u pyrogallolových tříslavin 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 tříslavin s koncentrovanou kyselinou sírovou

K 2 ml roztoku tříslavin 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 tříslaviny význačná. Když se roztok protřepe a zředí destilovanou vodou, přejde ve většině případů zbarvení prstence do roztoku. K této reakci se nejlépe hodí roztoky tříslavin 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.

4.9.5. 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.

4.9.6. 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.

4.9.7. DROGY S OBSAHEM TŘÍSLOVIN

4.9.7.1. *Agrimoniae herba* – Řepíková nat' (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 práškované 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 práškované drogy.

4.9.7.2. 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 práškované 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 práškované drogy.

4.9.7.3. 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. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách; použije se 1,000 g práškované drogy.

4.9.7.4. 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 zbarvení.

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 ethylformiátu (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. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,750 g práškové drogy.

4.9.7.5. 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 práškové 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. Provede se stanovení tříslovin v rostlinných drogách s 0,700 g práškové drogy.

4.9.7.6. 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 práškové 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 modři 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 práškové drogy.

4.9.7.7. Zkoušky totožnosti

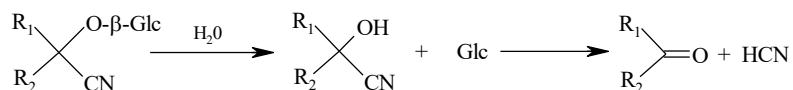
Pro kvalitativní zkoušky tříslovin se používá 1% vodný výluh tříslovinných drog, který se připraví povařením drogy s vodou po dobu 15 minut a přefiltrováním. Výsledky (zabarvení resp. tvorba sraženiny) uveďte v tabulce.

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

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

4.10. KYANOGENNÍ GLYKOSIDY

Kyanogenní sloučeniny v rostlinách jsou glykosidy 2-hydroxynitrilů, jejichž hydroxylová skupina je glykosidicky vázána na monosacharid. Jsou velmi nestabilní, rozkládají se na aldehyd nebo keton a kyanovodík působením β -glykosidas a hydroxynitril-lyas při fyzikálním poškození pletiv nebo houbové infekci, kdy dojde ke kontaktu vakuolárních glykosidů s cytoplazmatickými enzymy.



Prekuzory kyanogenních sloučenin jsou aminokyseliny fenylalanin, tyrozin, leucin, isoleucin a valin. Důležitými reakcemi jejich biogeneze je dekarboxylace a *N*-hydroxylace. K nejrozšířenějším glykosidům patří amygdalin, prunasin a sambunigrin přítomné v čeledích Rosaceae, Fabaceae, Poaceae, Araceae, Euphorbiaceae a Passifloraceae.

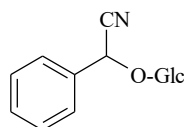
Identifikace kyanogenních glykosidů se provádí pomocí proužku filtračního papíru impregnovaného reagenčním zkoumadlem dávajícím barevnou reakci s hydrokyanovou kyselinou.

Kvantitativní stanovení kyanogenních glykosidů se provádí titračně. Drogu suspendovanou v okyselené vodě destilujeme s vodní parou, destilát obsahující kyselinu hydrokyanovou titrujeme dusičnanem stříbrným. Velmi často se pro stanovení používá plynová chromatografie.

4.10.1.1. Laurocerasi folium - Bobkovišňový list

Prunus laurocerasus, Rosaceae

Obsahové látky: 1,2-1,8% kyanogenních glykosidů (prunasin, syn. (-)-(R)-mandelonitril- β -D-glukosid)



prunasin

Zkoušky totožnosti:

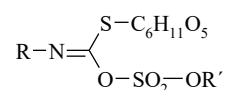
Rozdrcenou drogu dáme do zkumavky, zvlhčíme vodou a do ústí zkumavky vložíme proužek filtračního papíru impregnovaného pikrátem sodným. Pozorujeme přechod

žlutého zbarvení v temně červené (isopurpurát sodný).

4.11. THIOGLYKOSIDY

Thioglykosidy neboli glukosinoláty tvoří skupinu glukosidů, ve kterých se molekula glukosy váže na aglykon prostřednictvím síry. Vyskytují se v rostlinných čeledích brukvovité (Brassicaceae), resedovité (Resedaceae), kaparovité (Capparidaceae), a lichořečičnicovité (Tropeolaceae). Jejich hydrolytické produkty - isothiokyanáty - mají charakteristický štiplavý zápach a nežádoucí účinky na zažívací trakt, navíc mohou vyvolat projevy strumy.

Z hlediska struktury se odvozují od obecného vzorce



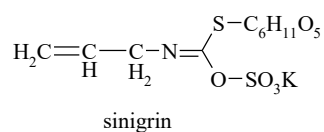
kde R značí alifatický nebo aromatický radikál a R' je alkalický kov nebo esterově vázaný fenolový derivát. Biosyntéza thioglykosidů vychází z aminokyselin.

4.11.1.1. Sinapis semen - Semeno černochořčice

Brassica nigra, Brassicaceae

Obsahové látky: olej, glukosinolát sinigrin, hořčičná sílice, proteiny, sliz, stopy hydrosíranu sinapinu

Dle ČL97 se používá pouze umělá hořčičná sílice (*Sinapis etheroleum artificiale*).



Zkoušky totožnosti:

1. 0,5 g práškového semene se na misce rozetře s 1 ml vody, po chvíli je cítit zápach hořčičné sílice.
2. 1 g práškového semene se mírně zahřeje s 1,5 ml vody, odvar se vychlazení vytřepe s 10 ml diethyletheru, diethyletherová vrstva se přefiltruje a na porcelánové misce se odpaří do sucha. K odparku se přidá ethanolový amoniakální roztok dusičnanu stříbrného, roztok po chvíli ztmavne od vyloučeného sulfidu stříbrného.

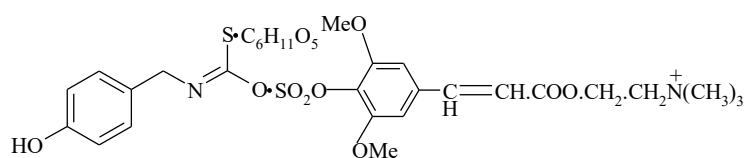
Zkoušky na čistotu:

1. Vodný výluh drogy (1 : 10) s patnácti kapkami Millonova zkoumadla nesmí zčervenat (sinalbin).
2. Odvar drogy se nesmí přidáním několika kapek roztoku jódu zbarvit modře (škroby).

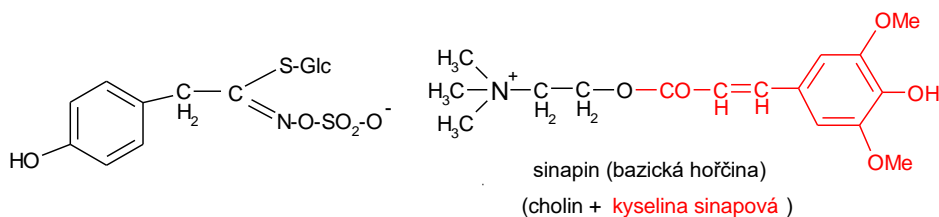
4.11.1.2. Sinapis albae semen - Semeno bílé hořčice

Sinapis alba, Brassicaceae

Obsahové látky: glukosinolát sinalbin, olej, proteiny



sinalbin



sinapin (bazická hořčina)
(cholin + kyselina sinapová)

Zkoušky totožnosti:

1. Vodný výluh drogy (1 : 10) se po přefiltrování extrahuje petroletherem, který se nechá samovolně odpařit, odparek se barví Millonovým zkoumadlem po mírném zahřátí červeně (sinalbin).
2. Řez drogou nebo prášek se barví konc. kyselinou dusičnou žlutočerveně (sinalbin).
3. Řez drogou nebo prášek se barví 13% KOH červenooranžově, po mírném zahřátí červenohnědě (sinalbin).

5. SILICE

Silice představují skupinu obsahových látek rostlinného (zřídka živočišného) původu, z hlediska chemického velmi heterogenní. Vyznačují se těmito vlastnostmi:

- mají specifickou fyziologickou vlastnost – dráždí čich a projevují se vůní;
- jsou za pokojové teploty tekuté, prchavé;
- jejich hustota je převážně nižší než voda (výjimkou je např. skořicová silice);
- v čerstvém stavu jsou bezbarvé, výjimkou je např. nativní žlutá silice heřmánková, jejíž barva hydrodestilací přechází na modrou;
- skladováním lehce oxidují, pryskyřičnatí → tmavnou, houstnou;
- neobsahují glyceridy a proto netvoří s alkáliemi mýdla;
- jsou lipofilní, rozpouštějí se v bezvodém ethanolu, v diethyletheru, v chloroformu, v benzenu a v olejích; ve vodě se téměř nerozpouštějí;
- silice přirozeného původu jsou na rozdíl od syntetických zpravidla opticky aktivní;
- použití nalézají v parfumerii, při aromatizaci a konzervaci potravin a jako suroviny pro syntézu dalších sloučenin;
- vykazují biologickou aktivitu, pro kterou se používají v prevenci a v terapii.

Silice se vyskytují převážně ve vyšších rostlinách, zejména v čeledích Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, aj. Bývají lokalizovány na povrchu nebo blízko povrchu rostlinného orgánu ve specifických útvarech, jako jsou siličné buňky, sekreční kanálky a dutiny, žláznaté trichomy. Mohou se koncentrovat v určitém rostlinném orgánu (např. jen v květech nebo listech) nebo prostupují celou rostlinu (např. u jehličnanů). Jejich výskyt můžeme zaznamenat téměř ve všech rostlinných orgánech – nejčastěji v květech (*Rosa*, *Lavandula*), listech (*Melissa*, *Mentha*), plodech (*Foeniculum*) či semenech (*Myristica*), ale také v kořenech (*Petroselinum*), kůře (*Cinnamomum*) a dřevu (*Juniperus*). Silice se uplatňují v rostlinných interakcích (alelopatické působky, inhibitory růstu), v interakcích rostlina – živočich, rostlina – hmyz (ochrana proti predátorům, resp. zdroj hmyzem využívaných látek) a hrají určitou roli v komunikaci mezi organismy.

Systematika siličných drog (silic) může vycházet buď z chemického charakteru hlavní složky, nebo z hlediska biogenetického. Silice lze potom dělit na základě obsahu níže uvedených skupin:

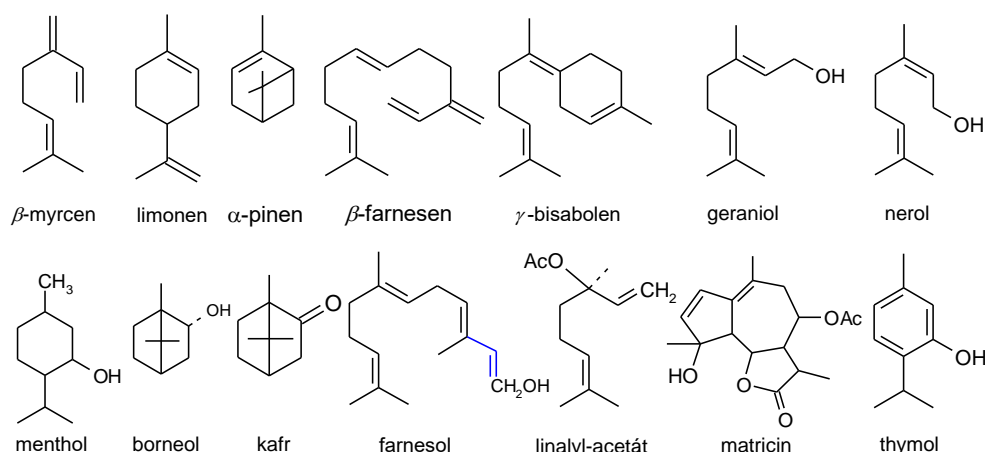
1. silice s převahou terpenoidní složky (původ mevalonátový);
2. silice s převahou derivátů fenylypropanu (původ šikimátový);
3. součástí silic jsou další látky, převážně nasycené a nenasycené alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a estery, dotvářející pach silice.

Z terpenických látek jsou to zejména monoterpeny a seskviterpeny. Ty se mohou vyskytovat ve formě acyklických nebo cyklických uhlovodíků a jejich kyslíkatých derivátů. Monoterpenické uhlovodíky mohou být acyklické (myrcen), monocyklické (limonen), bicyklické (pineny), seskviterpenické uhlovodíky mohou být acyklické, např. (farneseny), monocyklické (bisabolen) nebo vícecyklické. Častěji se vyskytují kyslíkaté deriváty, zvláště monoterpenické acyklické alkoholy (geraniol, nerol, linalool), monocyklické alkoholy (menthol), bicyklické alkoholy (borneol), seskviterpenické acyklické alkoholy (farnesoly a nerolidol), cyklické alkoholy (bisabololy) a diterpenické acyklické alkoholy (geranylinalool). Některé z terpenických alkoholů se v rostlinách nacházejí jako estery převážně s kyselinou octovou (linalyl-acetát, menthyl-acetát, bornyl-acetát). Významný je bicyklický keton kafr. Farmaceuticky významné jsou seskviterpenické laktony (matricin, artabsin, santonin). Aromatické monoterpeny jsou zastoupeny thymolem.

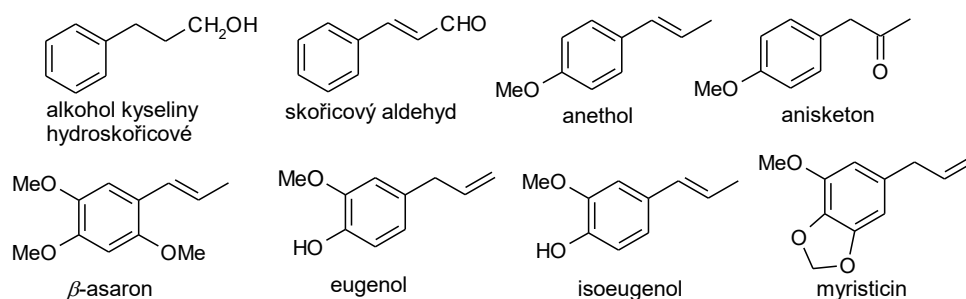
Deriváty fenylypropanu sestávající z C₆-C₃ jednotky se mezi sebou liší přítomností a polohou dvojně vazby na trojúhelníkatém řetězci a dále substitucí aromatického kruhu. Jako příklad lze uvést alkoholy (anethol, koniferylalkohol), aldehydy (skořicový aldehyd), ketony (anisketon) a myristicin, asaron a fenikulin.

Různorodost složek silic dokumentují vybrané příklady, uvedené na následujícím obrázku:

Terpenoidní složky silic:



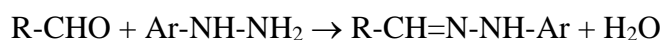
Příklady derivátů fenylpropanu:



5.1.1. KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ SILIC

Různorodost látek tvořících silice neumožňuje uplatnit „skupinový“ přístup při jejich důkazu. Pro kvalitativní hodnocení silic, se zaměřením na jejich jednotlivé složky, se používá plynová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě silikagelu. Posledně jmenovaná metoda je popsána u většiny siličných drog uvedených v ČL 2009. Vedle extraktu z drogy se v některých případech používá jako výchozí vzorek silice získaná destilací s vodní párou (kvantitativní stanovení silic). Pro hodnocení officinálních silic (Etherolea) se používá plynová chromatografie, která umožňuje určit nejen přítomnost, ale i procentuální zastoupení jednotlivých složek přítomných v silici.

Pro důkaz silice obsahující aldehydy nebo ketony lze využít reakci s hydrazinem. Jedná se o reakci s různými deriváty hydrazinu (např. *p*-nitrofenylhydrazin, dinitrofenylhydrazin, aj.) rozpuštěnými v 15-30% roztoku kyseliny octové. Tato zkoumadla citlivě reagují s karbonylovými sloučeninami, s nimiž tvoří krystalické sraženiny definovaného bodu tání.



Mikrochemická zkouška se provádí obvykle v mikrokelímku, do kterého se vloží malé množství zkoumané drogy, kelímeček se přikryje skleněnou destičkou, obsahující na spodní straně visutou kapku zkoumadla (derivát hydrazinu). Mikrokelímeček se mírně zahřívá, přičemž vystupující páry silice obsahující aldehydy nebo ketony okamžitě reagují s hydrazinovým zkoumadlem za vzniku krystalů. Ty se vysuší a stanoví se jejich bod tání, který je charakteristický pro tu kterou silici.

5.1.2. ZKOUŠKY NA ČISTOTU

Ze zkoušek na čistotu siličných drog předepisuje ČL 2009 obvyklé zkoušky na (1) Cizí příměsi, (2) Vodu, (3) Celkový popel a (4) Popel nerozpustný v HCl (viz obecná část, Farmakognostické metody).

U silic (Etherolea), převážně získaných destilací s vodní párou, se dle ČL 2009 provádí zkoušky na čistotu, uvedené u příslušného článku. Zkoušky na čistotu jsou zaměřené především na přítomnost látek, které slouží k falšování silic. Patří sem:

- relativní hustota;
- index lomu;
- optická otáčivost;
- voda v silicích;
- cizí estery v silicích;
- mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích;
- pach a chuť silic;
- zbytek po odpaření silic;
- rozpustnost silic v ethanolu;
- stanovení cineolu v silicích.

5.1.3. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ SILIC

Silice se z drogy získávají většinou destilací s vodou nebo s vodní párou. Při destilaci drogy s vodou se vhodně upravená droga zahřívá v baňce s určitým množstvím vody, přičemž uniká s vodní párou. Při destilaci drogy s vodní párou není droga v přímém styku s vodou. Bývá umístěna tak, aby unikající vodní páry drogou procházely a strhávaly s sebou těkající silici.

U drog, jejichž siličné složky se při destilaci rozkládají, se silice získávají lisováním. Tento způsob je zvláště vhodný u drog, které obsahují silice ve značném množství a tyto jsou lokalizovány hlavně v povrchových částech, např. v oplodí citrusových plodů. Vylisovaná tekutina však obsahuje směs silice, vody a dalších složek (např. pektiny), je tedy nezbytné takto získaný produkt dále přečistit.

Pro stanovení obsahu jednotlivých složek silice se provádí plynová chromatografie (dle příslušného článku). Obsah složek silice v % se stanoví metodou normalizace.

5.1.3.1. Stanovení obsahu silic v rostlinných drogách

Stanovení obsahu silic v rostlinných drogách se provádí destilací s vodní párou na zvláštním přístroji za dále uvedených podmínek. Destilát se jímá v kalibrované trubici, silice se zachycuje v xylenu; vodná fáze se automaticky vrací zpět do destilační baňky. Bez přídavku xylenu se stanovuje obsah silic u drog: Rosmarini folium, Serpylli herba a Thymi herba.

Přístroj se skládá z následujících částí:

- a) vhodné destilační baňky s kulatým dnem a krátkým zabroušeným hrdlem na širším konci o vnitřním průměru 29 mm; (používají se baňky o objemu 250-1000 ml, dle požadavků příslušného článku)
- b) kondenzační části (viz obrázek), která přiléhá k destilační baňce zábrusem tak, že spolu tvoří jednolitý celek; použité sklo má nízký koeficient roztažnosti;
 - zátka *K'* je odvětrávací, trubice *K* má otvor o průměru asi 1 mm, shodný s odvětrávacím otvorem zátky; širší konec trubice *K* o vnitřním průměru 10 mm je ze zabroušeného skla;
 - hruškovitě rozšířená část *J* o objemu 3 ml;
 - trubice *JL* je dělena po 0,01 ml;
 - kulovitá část *L* o objemu asi 2 ml;
 - trojcestný kohout *M*;
 - ústí trubice *B* je o 20 mm výše než horní značka dělení na trubici;
- c) vhodného tepelného zdroje umožňujícího přesné nastavení teploty;
- d) svislého stojanu s kruhem pokrytým izolačním materiálem.

Postup dle ČL 2009

Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoušené drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu a připojí se kondenzační část. Nálevkou *N* se vlije do přístroje voda tak, aby její hladina dosáhla bodu *B*. Vyjme se zátka *K'* a pipetou, jejíž konec se dotýká spodní části trubice *K*, se přidá předepsané množství xylenu. Zátka *K'* se uzavře; otvor v zátce odpovídá polohou otvoru v trubici *K*. Kapalina v baňce se zahřeje k varu a není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu.

Určí se destilační rychlost; během destilace se sníží pomocí trojcestného kohoutu hladina kapaliny tak, aby odpovídala polohou spodní značky (a) (viz obrázek Přístroj na stanovení silic podle ČL 2009). Kohout se uzavře a změří se čas potřebný k tomu, aby hladina dosáhla horní značky (b). Kohout se otevře a pokračuje se v destilaci, destilační rychlost se upraví vhodným zahříváním. Destiluje se 30 minut. Pak se zahřívání přeruší a po nejméně 10 minutách se odečte objem xylenu v dělené trubici.

Do baňky se převede předepsané množství drogy a pokračuje se v destilaci výše uvedeným způsobem po předepsanou dobu a předepsanou rychlostí. Pak se zahřívání ukončí a po 10 minutách se odečte objem kapaliny v dělené trubici, od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem xylenu. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů v 1 kg drogy.

Má-li být silice použita pro další analytické účely, oddělí se její bezvodá část s xylenem následujícím způsobem. Vyjme se zátka *K'* a přidá se 0,1 ml roztoku *fluoresceinu sodné soli* (1 g/l) a 0,5 ml vody. Pomocí trojcestného kohoutu se vypustí směs xylenu a silice do kulovité části *L* a po 5 minutách stání se vypouští pomalu tak, až hladina klesne na úroveň kohoutu *M*. Kohoutem se otočí zprava doleva tak, aby vytekla voda ze spojovací trubice *BM*. Pomocí nálevky *N* promyjeme trubici *acetone* *R* a malým množstvím *toluenu R*. Kohoutem se otočí zprava doleva a směs xylenu a silice se vypustí do vhodné baňky.

Postup dle ČsL 4

Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoušené drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu (varné kaménky) a připojí se

kondenzační část. Trubice GLM se naplní vodou, až voda v místě M přetéká do baňky. Pipetou se přidá do postranní trubice předepsané množství xylynu a trubice (GH) se uzavře smotkem vaty.

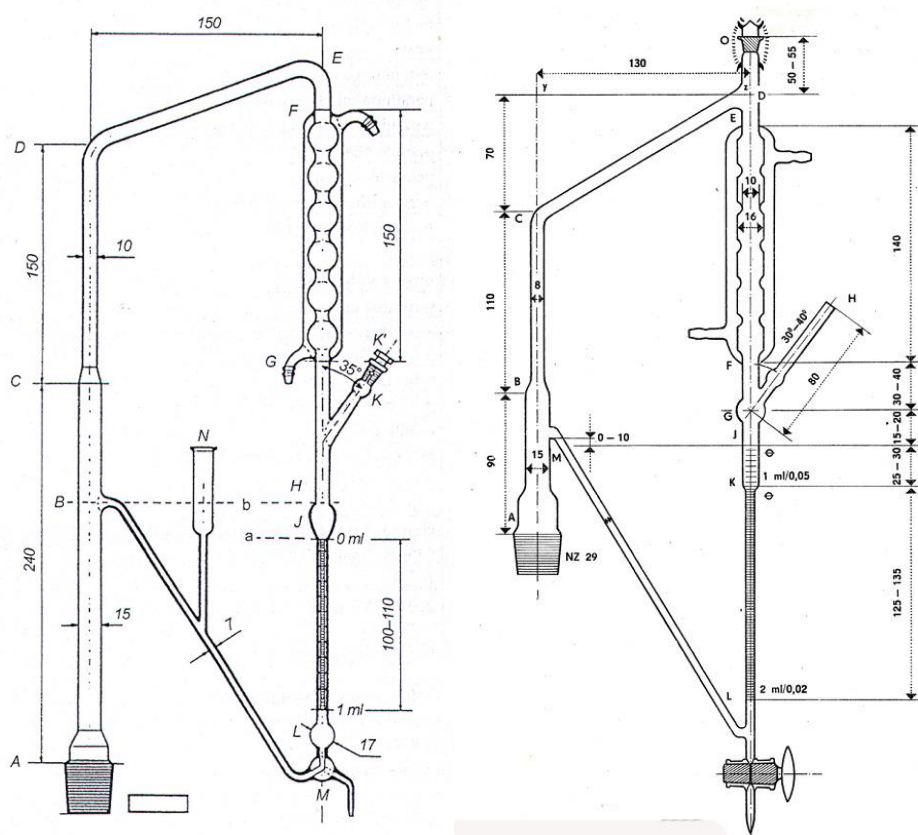
Kapalina v baňce se zahřeje k varu a není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu. Destilační rychlost se upraví vhodným zahříváním. Destiluje se 30 minut. Pak se zahřívání přeruší a po nejméně 10 minutách se odečte objem xylynu v dělené trubici.

Do baňky se převede předepsané množství drogy a pokračuje se v destilaci výše uvedeným způsobem po předepsanou dobu a předepsanou rychlostí. Pak se zahřívání ukončí a po 10 minutách se odečte objem kapaliny v dělené trubici, od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem xylynu. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů silice v 1 kg drogy.

Přístroj na stanovení silic v rostlinných drogách (rozměry v milimetrech) podle

ČL 2009

ČsL 4



Požadavky na obsah silice v drogách podle ČL 2009 a podmínky stanovení

Droga	Navážka (g)	Stupeň rozdrobnění drogy	Destilační tekutina - voda (ml)	Xylen (ml)	Doba destilace (hod)	Obsah silice nejméně ml/kg vysu- šené drogy celé / řezané
Absinthii herba	50,0	řezaná	500	0,5	3	2
Anisi fructus ³	10,0	upráškovaná před použitím	100	0,5	2	20
Aurantii amari pericarpium	15,0	upráškovaná (710)	200	0,5	1,5	20
Carvi fructus	10,0	upráškovaná (710)	200	0,5	1,5	30
Caryophylli flos ¹⁾	5,0	rozetřená s křemelinou	100	0,5	2	150
Cinnamomi cortex ²⁾	20,0	upráškovaná (710)	200	0,5	3	12
Chamomillae romanae flos	20,0	nerozdrobněná	250	0,5	3	7
Coriandri fructus	30,0	upráškovaná před stanovením	200	0,5	2	3
Eucalypti folium ³⁾	10,0	čerstvě řezaná	200	0,5	2	20 / 15
Foeniculi amari fructus	5,0	rozdrcená (1400)	200	0,5	2	40
Foeniculi dulcis fructus	10,0	rozdrcená (1400)	200	0,5	2	20
Juniperi fructus	20,0	rozdrcená před stanovením	200	0,5	1,5	10
Lavandulae flos	20,0	neupravuje se	500	0,5	2	13
Matricariae flos ⁷	30,0	neupravuje se	300	0,5	4	4
Menthae piperitae folium	20,0	rozdrcená	200	0,5	2	12 / 9
Millefolii herba ⁴⁾	20,0	řezaná	500	0,2	2	2
Rosmarini folium	25,0	rozdrcená	300	0	3	12

Salviae officinalis folium	20,0	čerstvě řezaná	250	0,5	2	15 / 10
Salviae trilobae folium	20,0	je-li třeba rozdrobněná těsně před stanovením	250	0,5	2	18 / 12
Serpylli herba	50,0	řezaná	500	0	2	3
Thymi herba	30,0	neupravuje se	400	0	2	12

1) 5,0 g drogy se rozeře s 5,0 g křemeliny na jemný homogenní prášek. 4,0 g této směsi se ihned použije k vlastnímu stanovení.

2) destilační tekutinou je 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkové;

3) destilační tekutinou je 200 ml vody a 100 ml glycerolu;

4) destilační tekutinou je směs objemových dílů vody a ethylenglykolu (1 + 9).

5.1.4. DROGY S OBSAHEM SILIC

5.1.4.1. Absinthii herba – Pelyňková nat' (ČL 2009)

Jsou to usušené celé nebo řezané přízemní listy nebo kvetoucí málo olistěné vrcholky druhu *Artemisia absinthium* L., pelyněk pravý, Asteraceae, nebo jejich směs.

Obsah silice: nejméně 2 ml/kg vysušené drogy.

Obsahové látky silice: mono a seskviterpeny: α - a β -thujon, thujylalkohol, cineol, artabsin, absinthin, aj. Dále obsahuje hořčiny, flavonoidy, fenolové kyseliny.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 2 g práškované drogy se smíchají s 50 ml vroucí vody a nechají se stát 5 minut za občasného protřepávání. Po ochlazení se přidá 5 ml roztoku octanu olovnatého (100 g/l), promíchá se a zfiltruje. Baňka a zbytek na filtru se promyjí 20 ml vody. Filtrát se protřepe s 50 ml dichlormethanu, organická vrstva se oddělí a vysuší se síranem sodným bezvodým, zfiltruje se a filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml ethanolu 96%.

Porovnávací roztok: 2 mg červeně methylové a 2 mg resorcinolu se rozpustí v 10,0 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů acetonu, kyseliny octové ledové, toluenu a dichlormethanu (10 : 10 : 30 : 50).

Nanášení: 10 μ l do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Postříká se acetanhydridem v kyselině sírové a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení A: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (artabsin) v poloze odpovídající poloze těsně nad červenou skvrnou (červeň methylová) na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B: Vrstva se zahřívá 5 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině červená skvrna (červeň methylová) a pod ní světle růžová skvrna (resorcinol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní červená nebo hnědočervená skvrna (absinthin) s hodnotou R_F odpovídající skvrně resorcinolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny, které jsou méně intenzivní než skvrna absinthinu.

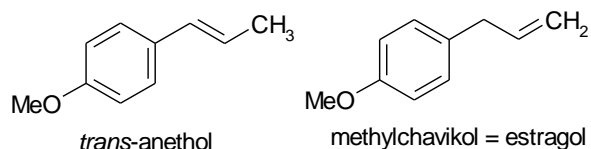
5.1.4.2. Anisi fructus – Anýzový plod (ČL 2009)

Je to celá usušená dvojnážka druhu *Pimpinella anisum* L., bedrník anýz, Apiaceae.

Obsah silice: Nejméně 20 ml/kg drogy.

Vlastnosti: Droga má charakteristický pach po anetholu. Je to obvykle celá dvojnážka, často s malým zbytkem tenké tuhé lehce zakřivené stopky.

Obsahové látky silice: *trans*-anethol, methylchavikol (= estragol), anisaldehyd. Dále olej, bílkoviny, sacharidy.



Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,10 g práškované drogy se protřepává 15 minut se 2 ml dichlormethanu. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 3 µl anetholu a 40 µl oleje olivového se rozpustí v 1 ml toluenu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Toluén.

Nanášení: 2 µl a 3 µl zkoušeného roztoku a 1 µl, 2 µl a 3 µl porovnávacího roztoku, odděleně ve 2 cm vzdálenostech.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Ve střední části chromatogramů je skvrna zhášející fluorescenci (anethol) na světlém pozadí.

Detekce B: Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem kyseliny fosfomolybdenové (200 g/l) v ethanolu 96% (použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm × 200 mm) a zahřívá se 5 minut při 120 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Skvrny odpovídající anetholu jsou zbarveny modře na žlutém pozadí. Skvrna anetholu na chromatogramu zkoušeného roztoku při nanášení 2 µl převyšuje velikostí a intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášení 1 µl a nepřevyšuje velikostí a intenzitou skvrnu porovnávacího roztoku při nanášení 3 µl. Na chromatogramech zkoušeného roztoku je v dolní třetině modrá skvrna (triacylglyceroly) odpovídající polohou a zbarvením skvrně v dolní třetině na chromatogramech porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje).

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 10,0 g drogy upráškované těsně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2,5 ml/minutu až 3,5 ml/minutu v 250ml baňce se 100 ml vody. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,2 ml.

5.1.4.3. Aurantii amari pericarpium – Oplodí hořkého pomeranče (ČL 2009)

Syn. Aurantii amari epicarpium et mesocarpium

Je to usušené oplodí zralého plodu *Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium* (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* Engl.), citroník pomerančový, Rutaceae, částečně zbavené bílé houbovité tkáně (albeda).

Obsah silice: Nejméně 20 ml/kg bezvodé drogy.

Obsahové látky silice: (+)-limonen, terpenické alkoholy (linalool, terpineol), aldehydy. Dále flavonoidy (rutosid, hesperidin, naringin, neohesperidin), methylester kyseliny anthranilové, kumariny, hořčiny, karotenoidy.

Vlastnosti: Droga má aromatický pach a kořenitě hořkou chuť.

Tenkovrstvá chromatografie:

Důkaz je zaměřený na přítomnost flavonoidů (naringenin).

Extrahovatelné látky. Nejméně 6 %.

Ke 2,000 g práškové drogy se přidá směs 3 ml vody a 7 ml ethanolu 96%, nechá se stát 2 h za častého protřepávání a pak se zfiltruje. 2,000 g filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a pak se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad oxidem fosforečným se zvaží. Hmotnost zbytku po vysušení je nejméně 120 mg.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Droga se upráškuje těsně před použitím. 15,0 g drogy se destiluje 90 minut rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 500ml baňce s 200 ml vody. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu.

Minimální obsah silice je 0,3 ml.

5.1.4.4. Balsamum peruvianum – Peruánský balzám (ČL 2009)

Je to balzám získaný z popáleného a poraněného kmene druhu *Myroxylon balsamum* (L.) Harms var. *pereirae* (Royle) Harms, vonodřev balzámový, Fabaceae.

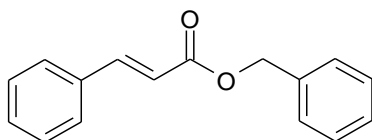
Obsah: 45,0 % až 70,0 % esterů, zejména benzylester kyseliny benzoové a benzylester kyseliny skořicové (cinnamein).

Vlastnosti:

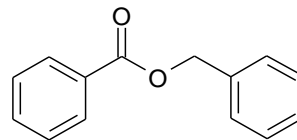
Vzhled: Tmavě hnědá viskózní tekutina, v tenké vrstvě průhledná a žlutohnědá; není lepivá, nevysychá ani se nitřovitě netáhne.

Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu bezvodém, nemísitelný s mastnými oleji s výjimkou ricinového oleje.

Zkoušky
totožnosti:



benzylester kyseliny skořicové



benzylester kyseliny benzoové

0,20 g

balzámu se rozpustí v 10 ml ethanolu 96%. Přidají se 0,2 ml chloridu železitého; vzniká zelené až žlutozelené zbarvení.

Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,5 g se rozpustí v 10 ml ethyl-acetátu.

Porovnávací roztok: 4 mg thymolu, 30 mg benzyl-cinnamátu a 80 μ l benzyl-benzoátu se rozpustí v 5 ml ethyl-acetátu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny octové ledové, ethyl-acetátu a hexanu (0,5 : 10 : 90).

Nanášení: 10 μ l, do proužků (20 mm \times 3 mm).

Vyvíjení: Dvakrát po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; skvrny se označí.

Hodnocení A: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v horní třetině dvě skvrny zhášející fluorescenci, z nichž horní odpovídá benzyl-benzoátu a dolní benzyl-cinnamátu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny zhášející fluorescenci odpovídající polohou a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B: Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem kyseliny fosfomolybdenové (200 g/l) v ethanolu 96% (použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm \times 200 mm) a suší se 5 až 10 minut při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Skvrny odpovídající benzyl-benzoátu a benzyl-cinnamátu jsou zbarveny modře na žlutém pozadí. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je přibližně uprostřed fialovošedá skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna (nerolidol) v poloze odpovídající polohou těsně pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pod skvrnou nerolidolu není žádná modrá skvrna zhášející fluorescenci v ultrafialovém světle při 254 nm (kalafuna). V horní a dolní části chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další slabě modře zbarvené skvrny.

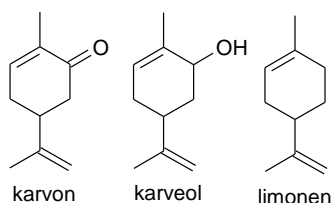
5.1.4.5. Carvi fructus – Kmínový plod (ČL 2009)

Je to usušená nažka druhu *Carum carvi* L., kmín kořenný, Apiaceae.

Obsah silice: Nejméně 30 ml/kg bezvodé drogy.

Vlastnosti: Droga má charakteristický pach po karvonu.

Obsahové látky silice: D-karvon, D-limonen, dihydrokarvon, karveol, dále je přítomný mastný olej a kumariny.



Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,5 g práškované drogy se protřepává 2 až 3 minuty s 5,0 ml ethylacetátu a zfiltruje se přes 2 g síranu sodného bezvodého.

Porovnávací roztok: 2 µl karvonu a 5 µl olivového oleje se rozpustí v 1,0 ml ethylacetátu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethylacetátu a toluenu (5 : 95).

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

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Ve střední části chromatogramu zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku je skvrna karvonu zhášející fluorescenci na světlém pozadí.

Detekce B: Vrstva se postříká anisaldehydem RS (v následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml anisaldehydu R, 10 ml kyseliny octové ledové R, 85 ml methanolu R a 5 ml kyseliny sírové R) a zahřívá se 2 minuty až 4 minuty při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Skvrny odpovídající karvonu jsou tmavě oranžovohnědé. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku je nad skvrnou karvonu fialová skvrna (triacylglyceroly) odpovídající polohou skvrně chromatogramu porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje). Na čele mobilní fáze chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialová skvrna (terpenické uhlovodíky) a v dolní části chromatogramu jsou další slabě fialovošedé nebo nahnědlé skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 10,0 g drogy upráškované těsně před použitím se v 500ml baňce destiluje 90 minut rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu s 200 ml vody. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,3 ml.

5.1.4.6. Caryophylli flos – Hřebíčkovcový květ (ČL 2009)

Je to celé poupě druhu *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry (*Eugenia caryophyllus* (C. Spreng) Bull. et Harr.), hřebíčkovec kořený, Lauraceae, sušené tak dlouho, dokud nezíská červenohnědou barvu.

Obsah silice: Nejméně 150 ml/kg suché drogy.

Vlastnosti: Droga má charakteristický aromatický pach.

Obsahové látky: eugenol, acetyleugenol, β -karyofylen.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,1 g práškované drogy se protřepává 15 minut se 2 ml dichlormethanu. Zfiltruje se, filtrát se odpaří opatrně na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 20 μ l eugenolu se rozpustí ve 2 ml toluenu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Toluenu.

Nanášení: 10 μ l porovnávacího roztoku a 20 μ l zkoušeného roztoku, oddělené do proužků (20 mm \times 3 mm).

Vyvíjení: Dvakrát v nenasycené komoře po dráze 10 cm; mezi oběma vyvíjeními se suší 5 minut na vzduchu.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a skvrny zhášející fluorescenci se označí.

Hodnocení A: Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části skvrna zhášející fluorescenci (eugenol) odpovídající polohou skvrně zhášející fluorescenci na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod skvrnou eugenolu může být i méně intenzivní skvrna zhášející fluorescenci odpovídající polohou skvrně acetyeugenolu.

Detekce B: Postříká se anisaldehydem RS, použije se asi 10 ml na vrstvu 200 mm × 200 mm a zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Skvrna eugenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku je intenzivně hnědofialová a skvrna acetyeugenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialovomodrá. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další zbarvené skvrny; zejména červenofialová skvrna odpovídající karyofylenu v horní části a dále slabě červená skvrna v dolní části chromatogramu.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 5,0 g drogy se rozetře s 5,0 g křemeliny na jemný homogenní prášek. 4,0 g této směsi se ihned použije k vlastnímu stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2,5 ml/minutu až 3,5 ml/minutu v 250ml baňce se 100 ml vody jako destilační tekutinou; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,6 ml.

5.1.4.7. Chamomillae romanae flos – Květ heřmánku římského (ČL 2009)

Je to usušený úbor plnokvětých kulturních odrůd druhu *Chamaemelum nobile* (L.) All. (*Anthemis nobilis* L.), rmenec sličný (římský heřmánek), Asteraceae.

Obsah silice: Nejméně 7 ml/kg vysušené drogy.

Vlastnosti: Úbory jsou bílé nebo žlutošedé, polokulovité, jednotlivé. Na kuželovitém plném lůžku jsou jednotlivé květy, každý s průsvitnou plevinou. Droga výrazného charakteristického pachu.

Tenkvrstvá chromatografie:

Důkaz je zaměřený na přítomnost flavonoidů (apigenin, apigenin-7-glukosid).

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20,0 g nerozdrobněné drogy se destiluje 3 h rychlostí 3 ml/minutu až 3,5 ml/minutu v 500ml baňce s kulatým dnem s 250 ml vody; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu.

5.1.4.8. Cinnamomi cortex – Skořicovníková kůra (ČL 2009)

Je to usušená kůra mladých větví, zbavená zevní vrstvy korku a parenchymu kůry druhu *Cinnamomum zeylanicum* Ness (*Cinnamomum verum* J. S. Presl), skořicovník cejlonský, Lauraceae.

Obsah silice: Nejméně 12 ml/kg drogy.

Vlastnosti: Droga charakteristického, aromatického pachu.

Obsahové látky silice: skořicový aldehyd, eugenol a terpenické uhlovodíky.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,1 g práškové drogy se protřepává 15 minut se 2 ml dichlormethanu. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří na vodní lázni téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,4 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 50 µl skořicového aldehydu (cinnamaldehydu) a 10 µl eugenolu se rozpustí v toluenu a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Dichlormethan.

Nanášení: 10 µl, do proužků (20 mm × 3 mm).

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrny zhášející fluorescenci se označí, potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm a fluoreskující skvrny se označí.

Hodnocení A: V ultrafialovém světle při 254 nm je na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku ve střední části zhášející skvrna (skořicový aldehyd), těsně nad ní méně intenzivní zhášející skvrna (eugenol).

V ultrafialovém světle při 365 nm je na chromatogramu zkoušeného roztoku světle modře fluoreskující skvrna (*o*-methoxycinnamaldehyd) a těsně pod ní skvrna odpovídající skořicového aldehydu.

Detekce B: Vrstva se postříká floroglucinolem a prohlíží se v denním světle.

Hodnocení B: Skvrna odpovídající cinnamaldehydu je žlutohnědá, skvrna *o*-methoxy-

cinnamaldehydu je fialová.

Stanovení obsahu:

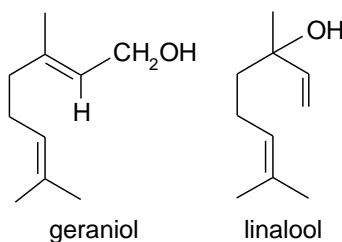
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20,0 g drogy se upráškuje těsně před použitím. Destiluje se 3 h rychlostí 2,5 ml/minutu až 3,5 ml/minutu v 500ml baňce s 200 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l jako destilační kapaliny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu.

5.1.4.9. Coriandri fructus – Koriandrový plod (ČL 2009)

Je to usušená dvounažka druhu *Coriandrum sativum* L., koriandr setý, Apiaceae.

Obsah silice: Nejméně 3 ml/kg vysušené drogy.

Obsahové látky silice: linalool, geraniol, geranyl-acetát, borneol a terpenické uhlovodíky.



Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 0,50 g čerstvě práškové drogy se smíchá s 5,0 ml hexanu, protřepává se 2 až 3 minuty a pak se zfiltruje přes 2 g síranu sodného bezvodého.

Porovnávací roztok: 15 µl linaloolu a 25 µl olivového oleje se těsně před použitím rozpustí v 5,0 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

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

Vyvíjení: Dvakrát po dráze 10 cm. Před druhým vyvíjením vrstvu silikagelu vysušit.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině fialová nebo šedofialová skvrna (linalool), v horní polovině modrofialová skvrna

(triacylglyceroly).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny, které odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; mezi startem a skvrnou odpovídající linaloolu jsou fialově šedé nebo nahnědlé skvrny, z nichž jedna odpovídá geraniolu a mezi skvrnou odpovídající linaloolu a skvrnou triacylglycerolů mohou být slabě fialově šedé skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. V 500ml baňce s kulatým dnem s 30,0 g čerstvě práškové drogy a 200 ml vody jako destilační tekutiny. Do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu. Minimální obsah silice je 0,09 ml.

5.1.4.10. *Eucalypti folium* – Blahovičnickový list (ČL 2009)

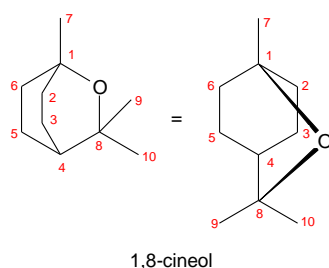
Je to celý nebo řezaný usušený list ze starších výhonků druhu *Eucalyptus globulus* Labill., blahovičnick kulatoplodý, Myrtaceae.

Obsah silice, počítáno na bezvodou drogu:

- nejméně 20 ml/kg neřezané drogy;
- nejméně 15 ml/kg řezané drogy.

Obsahové látky silice: 1,8-cineol (= eukalyptol), malé množství piperitonu a felandrenu.

Vlastnosti: Droga má aromatický pach po cineolu.



Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,50 g čerstvě práškové drogy se smíchá s 5,0 ml toluenu, protřepává se 2 až 3 minuty a pak se zfiltruje přes asi 2 g síranu sodného bezvodého.

Porovnávací roztok: 50 µl cineolu se rozpustí v toluenu a zředí se jím na 5 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (10 : 90).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna odpovídající cineolu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v blízkosti čela mobilní fáze intenzivní fialová skvrna (uhlovodíky) a mohou být přítomny další slabší skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 10,0 g čerstvě řezané drogy se v 500ml baňce s kulatým dnem destiluje 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu se směsí 200 ml vody a 100 ml glycerolu jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,15 ml.

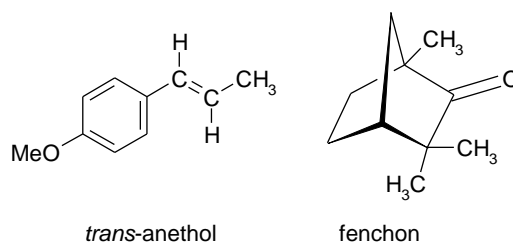
5.1.4.11. **Foeniculi amari fructus – Plod fenyklu obecného pravého (ČL 2009)**

Je to usušená dvojnažka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *vulgare*, fenykl obecný hořký, Apiaceae.

Obsah:

- silice: nejméně 40 ml/kg bezvodé drogy;
- anethol: nejméně 60,0 % v silici;
- fenchon: nejméně 15,0 % v silici.

Obsahové látky silice: anethol, fenchon, anisaldehyd.



Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,3 g čerstvě práškové drogy se protřepává 15 minut s 5,0 ml dichlormethanu. Zfiltruje se, filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C a zbytek se rozpustí v 0,5 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 50 µl anetholu a 10 µl fenchonu se rozpustí v 5,0 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu *GF₂₅₄* pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů hexanu a toluenu (20 : 80).

Nanášení: 10 µl do proužků (20 mm × 3 mm).

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Ve střední části chromatogramů je skvrna anetholu zhášející fluorescenci.

Detekce B: Vrstva se postříká kyselinou sírovou a zahřívá se 5 minut až 10 minut při 140 °C, dokud se v dolní třetině chromatogramů neobjeví žlutá skvrna fenchonu.

Hodnocení B: Ve střední části chromatogramů je fialová skvrna anetholu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině červenohnědá skvrna (terpeny).

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Droga se rozdrtí na hrubý prach a 5,0 g se ihned použije ke stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 500ml baňce s kulatým dnem s 200 ml vody jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylynu. Minimální obsah silice je 0,20 ml.

Anethol a fenchon se stanoví plynovou chromatografií.

5.1.4.12. *Foeniculi dulcis fructus* – Plod fenyklu obecného sladkého (ČL 2009)

Je to usušená dvojnažka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung, fenykl obecný sladký, Apiaceae.

Obsah:

- silice: nejméně 20 ml/kg bezvodé drogy;
- anethol: nejméně 80,0 % v silici;

Obsahové látky silice: anethol, anisaldehyd, fenchon.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,3 g čerstvě práškové drogy se 15 minut protřepává s 5,0 ml dichlormethanu. Zfiltruje se, filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni a zbytek se rozpustí v 0,5 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 60 µl anetholu se rozpustí v 5,0 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu *GF₂₅₄* pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů hexanu a toluenu (20 : 80).

Nanášení: 10 µl do proužků (20 mm × 3 mm).

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je ve střední části skvrna zhášející fluorescenci, odpovídající anetholu.

Detekce B: Vrstva se postříká kyselinou sírovou, zahřívá se 5 minut při 140 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení B: Na chromatogramech je ve střední části fialová skvrna odpovídající anetholu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině červenohnědá skvrna (terpeny).

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Droga se rozdrťí na hrubý prach a 10,0 g se ihned použije ke stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 500ml baňce s kulatým dnem s 200 ml vody jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,20 ml.

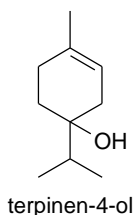
Anethol se stanoví plynovou chromatografií.

5.1.4.13. Juniperi fructus – Jalovcový plod (ČL 2009)

Je to zralý usušený nepravý plod (galbulus) druhu *Juniperus communis* L., jalovec obecný, Cupressaceae.

Obsah silice: Nejméně 10 ml/kg bezvodé drogy.

Obsahové látky silice: terpinen-4-ol, cineol a desítky dalších monoterpenů a seskviterpenů. Jalovcová silice patří co do počtu složek mezi nejbohatší.



Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: Směs silice a xylenu ze Stanovení obsahu se zředí hexanem na 5,0 ml.

Porovnávací roztok: 4,0 mg guajazulenu a 50 μ l cineolu se rozpustí v 10 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 20 μ l zkoušeného roztoku a 10 μ l porovnávacího roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS, zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní polovině červená skvrna (guajazulen) a v dolní polovině hnědofialová nebo šedofialová skvrna (cineol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní fialová skvrna (monoterpeny a seskviterpeny) v poloze odpovídající polohou skvrně guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku, červenofialová skvrna v poloze odpovídající polohou těsně nad skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku, šedofialová skvrna (terpinen-4-ol) v poloze odpovídající poloze těsně pod skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně pod ní modrá skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být slabě fialová skvrna polohou odpovídající cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné další skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20 g drogy rozdrcené těsně před stanovením se destiluje 90 minut rychlostí 3 ml/minutu až 4 ml/minutu v 500ml baňce s kulatým dnem s 200 ml vody jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá

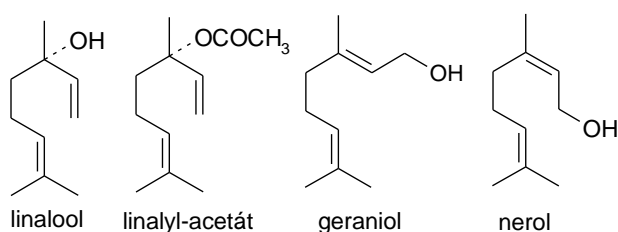
0,50 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,20 ml.

5.1.4.14. Lavandulae flos – Levandulový květ (ČL 2009)

Je to usušený květ druhu *Lavandula angustifolia* P. Mill (*Lavandula officinalis* Chaix), levandule lékařská, Lamiaceae.

Obsah silice: Nejméně 13 ml/kg bezvodé drogy.

Obsahové látky silice: linalyl-acetát, linalool, malé množství nerolu, geraniolu a karyofylenu.



Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 0,5 g práškové drogy se smíchá s 5 ml hexanu, protřepává se 5 minut a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok: 10 μ l linaloolu a 10 μ l linalyl-acetátu se rozpustí v 5 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 10 μ l do proužků (20 mm \times 3 mm).

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS a zahřívá se 5 minut až 10 minut při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině šedomodrá skvrna (linalool) a ve střední třetině šedomodrá skvrna (linalyl-acetát). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny v poloze odpovídající poloze skvrn linaloolu a linalyl-acetátu a mezi těmito skvrnami je červenofialová skvrna (epoxydihydrokaryofylen). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou ještě další skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 1000ml baňce s kulatým dnem s 500 ml vody jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,26 ml.

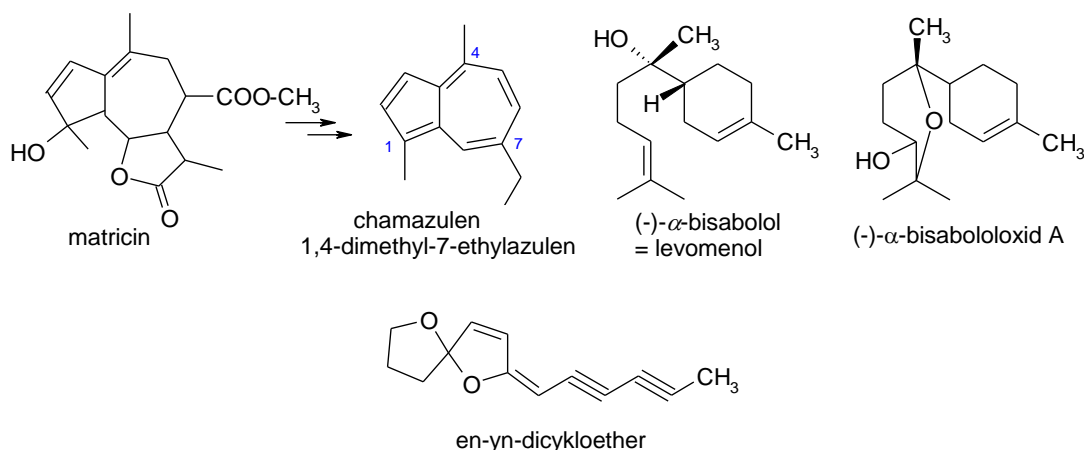
5.1.4.15. *Matricariae flos* – Heřmánkový květ (ČL 2009)

Je to usušený úbor druhu *Matricaria recutita* L. [*Chamomilla recutita* (L.), Rauschert], heřmánek lékařský, Asteraceae.

Obsah, počítáno na vysušenou drogu:

- modře zbarvená silice: nejméně 4 ml/kg;
- celkový apigenin-7-glukosid: nejméně 0,25 %.

Obsahové látky: matricin → chamazulen, bisabolol, bisabololoxid A a B, polyyny, farnesen, kumariny, flavonoidy, slizy.



Zkoušky totožnosti:

1. Několik úborů se rozdrtí, přelije se ve zkumavce 5 ml diethyletheru a během 5 minut se občas protřepává. Diethyletherový výluh se zfiltruje do malé porcelánové misky, vyluhovadlo se na vodní lázni odpaří a odparek se opět na vodní lázni zahřívá 5 minut se 3 ml roztoku *p*-dimethyl-aminobenzaldehydu v kyselině octové a fosforečné. Roztok se zbarví modře až zelenomodře (proazulen).

2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 50 μ l silice získané ze Stanovení obsahu se zředí xylenem na 1 ml.

Porovnávací roztok: 2 μ l chamazulenu, 5 μ l levomenolu a 10 mg bornyl-acetátu se rozpustí v 5 ml toluenu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 10 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS, zahřívá se 5 až 10 minut při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní třetině červená nebo červenofialová skvrna (chamazulen), přibližně uprostřed je žlutohnědá skvrna (bornyl-acetát) a ve spodní části je červenofialová nebo modrofialová skvrna (levomenol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomné skvrny v sestupném pořadí: 1 nebo 2 modrofialové skvrny (farnesen), červená nebo červenofialová skvrna (chamazulen), žlutohnědá skvrna (bornyl-acetát) přítomná není, hnědá skvrna (en-yn-dicykloether), červenofialová nebo modrofialová skvrna (levomenol = α-bisabolol).

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Použije se 30,0 g nerozdrobněné drogy, 1000ml baňka, 300 ml vody jako destilační tekutiny a 0,50 ml xylenu v dělené trubici. Destiluje se 4 h rychlostí 3 ml/minutu až 4 ml/minutu. Ke konci této doby se uzavře přívod vody k chladiči, ale pokračuje se v destilaci, dokud se spodní konec chladiče nenaplní modrým dýmem těkavých sloučenin. Ihned se obnoví průtok vody chladičem, aby se zabránilo přehřátí separačního prostoru. Destilace se ukončí po dalších 10 minutách. Minimální obsah silice je 0,12 ml.

Výše uvedená droga slouží pro přípravu **Matricariae etheroleum – Heřmánková silice (ČL 2009)** a **Matricariae extractum fluidum – Heřmánkový extrakt tekutý (ČL 2009)**. Obsahuje 0,30 % modré zbytkové silice.

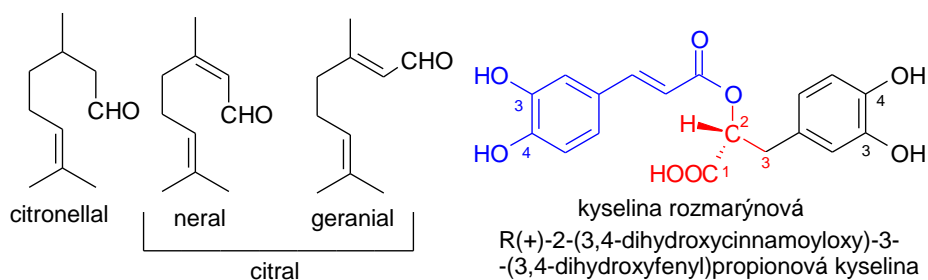
5.1.4.16. Melissae folium – Meduňkový list (ČL 2009)

Je to usušený list druhu *Melissa officinalis* L., meduňka lékařská, Lamiaceae.

Obsah: Nejméně 4,0 % celkových hydroxyskořicových derivátů, vyjádřeno jako

kyselina rozmarýnová, počítáno na vysušenou drogu. Droga obsahuje 0,01-0,25 % silice, která se pro malé množství nestanovuje. V silici jsou citronellal, citral, geranial, citronelol, linalool, geraniol.

Vlastnosti: Droga má charakteristický pach po citronu.



Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 2,0 g práškové drogy se v 250ml baňce s kulatým dnem smíchají se 100 ml vody a destilují se 1 h za použití destilačního přístroje pro Stanovení silic v rostlinných drogách, do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu. Po ukončení destilace se organická fáze převede pomocí malého množství xylenu, jímž se promyje dělená trubice, do 1ml odměrné baňky a zředí se jím na 1,0 ml.

Porovnávací roztok: 1,0 μ l citronellalu a 10,0 μ l citralu se rozpustí v 25 ml xylenu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a hexanu (10 : 90).

Nanášení: 10 μ l porovnávacího roztoku a 20 μ l zkoušeného roztoku do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se anisaldehydem RS a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 10 minut až 15 minut při 100 °C až 105 °C.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině zelenofialová nebo modrofialová skvrna (citral) a nad ní je šedá nebo šedofialová skvrna (citronellal). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku a mezi nimi je červenofialová skvrna (epoxykaryofylen). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další skvrny.

Stanovení obsahu:

Základní roztok: K 0,200 g práškové drogy se přidá 190 ml ethanolu 50%, vaří se 30 minut ve vodní lázni pod zpětným chladičem, nechá se ochladit a zfiltruje se. Filtr se promyje 10 ml ethanolu 50%. Filtrát a promývací tekutina se spojí v odměrné baňce a zředí se ethanolem 50% na 200,0 ml.

Zkoušený roztok: K 1,0 ml základního roztoku se ve zkumavce přidají 2 ml kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l, 2 ml roztoku připraveného rozpuštěním 10 g dusitanu sodného a 10 g molybdenanu sodného ve 100 ml vody, pak se přidají 2 ml hydroxidu sodného zředěného, zředí se vodou na 10,0 ml a promíchá se.

Kontrolní roztok: Ve druhé zkumavce se k 1,0 ml základního roztoku přidají 2 ml kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l, 2 ml hydroxidu sodného zředěného, zředí se vodou na 10,0 ml.

Měří se ihned absorbance zkoušeného roztoku při 505 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah celkových hydroxyskořicových derivátů v procentech, vyjádřeno jako kyselina rozmarýnová, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \times 5}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 505 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance kyseliny rozmarýnové má hodnotu 400.

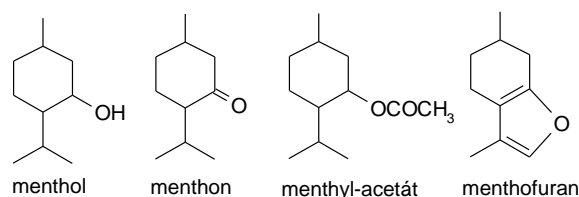
5.1.4.17. Menthae piperitae folium – List máty peprné (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Mentha x piperita* L., máta peprná, Lamiaceae. Droga má charakteristický a pronikavý pach a charakteristickou aromatickou chuť.

Obsah silice, počítáno na vysušenou drogu:

- nejméně 12 ml/kg neřezané drogy;
- nejméně 9 ml/kg řezané drogy.

Hlavní obsahové látky: menthol (30-55 %), (-)-menthon (14-32 %), menthyl-acetát (2,8-10 %), menthofuran (1-9 %), malé množství isomenthonu, pulegonu, piperitonu, cineolu, limonenu, jasmonu.



Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,2 g drogy se upráškuje těsně před použitím, protřepává se několik minut s 2 ml dichlormethanu a pak se zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha při teplotě nepřesahující 40 °C, zbytek se rozpustí v 0,1 ml toluenu.

Porovnávací roztok: 50 mg mentholu, 20 µl cineolu, 10 mg thymolu a 10 µl menthyl-acetátu se rozpustí v toluenu a zředí se jím na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu GF₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

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

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu, do odpaření rozpouštědla.

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

Hodnocení A. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být slabé skvrny zhášející fluorescenci (karvon, pulegon) v poloze odpovídající poloze pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Detekce B. Vrstva se postříká anisaldehydem a pozoruje se v denním světle za současného zahřívání 5 až 10 minut při 100 až 105 °C.

Hodnocení B.

Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou tyto skvrny (podle vzestupných hodnot R_F): v dolní třetině chromatogramu tmavomodrá nebo fialová skvrna (menthol), fialovomodrá nebo hnědá skvrna (cineol), růžová skvrna (thymol) a modrofialová skvrna (menthyl-acetát). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je velmi intenzivní skvrna v poloze odpovídající poloze mentholu a slabě zbarvená skvrna v poloze odpovídající poloze cineolu; v poloze vymezené skvrnami cineolu a thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku mohou být světle růžové, modrošedé nebo zelenošedé skvrny (karvon, pulegon, isomenthon); ve střední části chromatogramu je modrofialová skvrna (menthyl-acetát), těsně pod ní je zelenomodrá skvrna (menthon); v blízkosti čela mobilní fáze je intenzivní červenofialová skvrna (uhlovodíky); na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další,

méně intenzivně zbarvené skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Použije se 20,0 g rozdrčené drogy, 500ml baňka, 200 ml vody jako destilační tekutiny a 0,50 ml xylenu v dělené trubici. Destiluje se 2 h rychlostí 3 ml/minutu až 4 ml/minutu. Minimální obsah silice je 0,18 ml.

5.1.4.18. Millefolii herba – Řebříčková nat' (ČL 2009)

Jsou to celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Achillea millefolium* L., řebříček obecný, Asteraceae.

Obsah, počítáno na vysušenou drogu:

- silice: nejméně 2 ml/kg;
- proazulen, vyjádřeno jako chamazulen: nejméně 0,02 %.

Zkoušky totožnosti:

2,0 g práškované drogy se protřepávají 5 minut s 25 ml ethyl-acetátu a pak se zfiltrují. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml toluenu. 0,1 ml roztoku se smíchá s 2,5 ml roztoku 3 ml roztoku *p*-dimethylaminobenzaldehydu v kyselině octové a fosforečné a zahřívá se 2 minuty na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 5 ml petroletheru a směs se silně protřepe. Vodná vrstva se zbarví modře nebo zelenomodře.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: použije se roztok v toluenu získaný v předchozí zkoušce totožnosti.

Porovnávací roztok: 10 mg cineolu a 10 mg guajazulenu se rozpustí ve 20 ml toluenu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 20 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce A: Postříká se anisaldehydem RS, zahřívá se 5 až 10 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní části červená skvrna

(guajazulen) a ve střední části modrá nebo šedomodrá skvrna (cineol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je fialová skvrna v poloze odpovídající poloze mírně nad skvrnou guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku; pod ní následují červenofialová skvrna a pod ní jedna nebo dvě nepříliš zřetelně oddělené šedofialové nebo našedlé skvrny, v poloze odpovídající poloze mírně nad skvrnou cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další málo výrazné skvrny.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách v 1000ml baňce s kulatým dnem s 20,0 g řezané drogy a 500 ml směsi objemových dílů vody a ethylenglykolu (1 : 9) jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,2 ml xylenu. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu.

Po ukončení destilace se přeruší chlazení a v destilaci se pokračuje, dokud modře zbarvená silice nedosáhne spodního konce chladiče, pak se ihned opět zapne chlazení tak, aby nedošlo k přehřátí separačního prostoru. Destiluje se 5 minut, pak se 1000ml baňka s kulatým dnem nahradí 250ml baňkou s kulatým dnem se směsí 0,4 ml xylenu a 50 ml vody a destiluje se 15 minut. 10 minut po ukončení destilace se odečte celkový objem destilátu. Provede se slepá zkouška se směsí 0,4 ml xylenu a 50 ml vody, do dělené trubice se přidá 0,2 ml xylenu, destiluje se 15 minut. Minimální obsah silice je 0,04 ml.

Proazulený. Modře zbarvená směs silice a xylenu ze zkoušky stanovení obsahu se převede za použití malých dávek xylenu do 50ml odměrné baňky tak, aby byla znečištěna co nejmenším množstvím vody. Dělená trubice se promyje xylenem a roztok v baňce se zředí xylenem na 50 ml. Změří se absorbance roztoku při 608 nm za použití xylenu jako kontrolní kapaliny.

Vypočítá se obsah proazulenů v procentech, vyjádřeno jako chamazulen podle následujícího vzorce:

$$\frac{A \times 2,1}{m}$$

v němž značí:

A – absorbanci při 608 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance chamazulenu má hodnotu 23,8.

5.1.4.19. Rosmarini folium – Rozmarýnový list (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Rosmarinus officinalis* L., rozmarýn lékařský, Lamiaceae.

Obsah (počítáno na bezvodou drogu):

- nejméně 12 ml silice v 1 kilogramu drogy;
- nejméně 3 % celkových hydroxyskořicových derivátů, vyjádřený jako kyselina rozmarýnová.

Vlastnosti: Droga má výrazný aromatický pach.

1. Tenkovrstvá chromatografie silice:

Zkoušený roztok: 20 µl silice získané ze stanovení obsahu se rozpustí v 1 ml hexanu.

Porovnávací roztok: 5 mg borneolu, 5 mg bornyl-acetátu a 10 µl cineolu se rozpustí v 1 ml hexanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 10 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Vrstva se postříká anisaldehydem RS, zahřívá se 10 minut při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle.

Hodnocení:

Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve vrchní části nažloutle hnědá skvrna (bornyl-acetát), uprostřed je fialová skvrna (cineol) a ve spodní části je fialovohnědá skvrna (borneol).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny stejné barvy a stejného umístění (ale nižší intenzity) jako na chromatogramu porovnávacího roztoku. Jsou přítomné další skvrny nízké barevné intenzity.

2. Tenkovrstvá chromatografie hydroxyskořicových kyselin:

Zkoušený roztok: 1,0 g drogy se rozetře v 10 ml methanolu a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 5,0 mg kyseliny rozmarýnové a 1,0 mg kyseliny kávové se rozpustí v 10 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, acetonu a dichlormethanu (8,55 : 25 : 85).

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

Vyvíjení: Po dráze 8 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramech porovnávacího roztoku i zkoušeného roztoku jsou patrné dvě světle modře fluoreskující skvrny: kyselina kávová (u zkoušeného roztoku je fluorescence nízké intenzity) a níže položená je kyselina rozmarýnová. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní části růžově fluoreskující skvrna, případně další skvrny nízké intenzity.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 25,0 g rozdrčené drogy se destiluje 3 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 1000ml baňce se 300 ml vody jako destilační tekutiny. Minimální obsah silice je 0,3 ml.

5.1.4.20. *Salviae officinalis folium* – List šalvěje lékařské (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Salvia officinalis* L. šalvěj lékařská Lamiaceae.

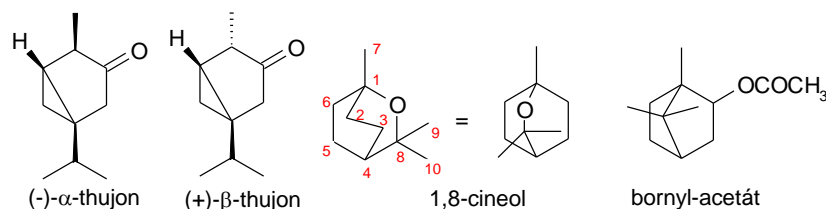
Obsah silice (počítáno na bezvodou drogu):

- nejméně 15 ml/kg neřezané drogy;
- nejméně 10 ml/kg řezané drogy.

Vlastnosti: Silice druhu *Salvia officinalis* L. obsahuje velké množství thujonu.

Obsahové látky silice: thujon, borneol, bornyl-acetát, cineol, terpenické uhlovodíky.

Dále kyselina rozmarýnová a diterpenické hořčiny.



Tenkvrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,50 g čerstvě upráškované drogy se 5 minut protřepává s 5 ml

ethanolu bezvodého a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 20 μ l thujonu a 25 μ l cineolu se rozpustí ve 20 ml ethanolu bezvodého.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 20 μ l, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Vrstva se postříká roztokem kyseliny fosfomolybdenové (200 g/l) v ethanolu bezvodém a 10 minut se zahřívá při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou 2 růžové skvrny (α -thujon a β -thujon) a pod nimi modrá skvrna cineolu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacím. Mohou být přítomny další modré skvrny poblíž startu a čela chromatogramu.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20,0 g čerstvě řezané drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 500ml baňce s 250 ml vody jako destilační kapaliny; do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,2 ml.

5.1.4.21. Salviae trilobae folium – List šalvěje trojlaločné (ČL 2009)

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Salvia fruticosa* Mill. (*Salvia triloba* L.), šalvěj trojlaločná, Lamiaceae.

Obsah silice (počítáno na bezvodou drogu):

- nejméně 18 ml/kg neřezané drogy;
- nejméně 12 ml/kg řezané drogy.

Vlastnosti: Droga má po rozetření kořeněný pach po eukalyptové silici.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,3 g čerstvě práškované drogy se protřepává 5 minut s 5,0 ml ethanolu bezvodého a zfiltruje se.

Porovnávací roztok: 20 μ l thujonu a 25 μ l cineolu se rozpustí ve 20 ml ethanolu

bezvodého.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů ethyl-acetátu a toluenu (5 : 95).

Nanášení: 20 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

Detekce: Postříká se roztokem kyseliny fosfomolybdenové (200 g/l) v ethanolu bezvodém a 10 minut se zahřívá při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části modrá skvrna (cineol) a v horní části růžovomodrá skvrna (thujon). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná skvrna cineolu. Skvrna odpovídající thujonu není patrná, nebo je jen velmi slabě růžovomodře zbarvená. Mohou být přítomny další šedé skvrny poblíž startu a čela chromatogramu.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 20,0 g drogy, je-li třeba rozdrobněné těsně před stanovením, se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 500ml baňce s 250 ml vody jako destilační kapaliny; do dělené trubice se přidá 0,5 ml xylenu. Minimální obsah silice je 0,36 ml, resp. 0,24 ml u řezané drogy.

5.1.4.22. Serpylli herba – Mateřídoušková nať (ČL 2009)

Je to celá nebo řezaná usušená kvetoucí nať druhu *Thymus serpyllum* L. *sensu lato*, mateřídouška úzkolistá, Lamiaceae.

Obsah: Nejméně 3,0 ml silice v 1 kilogramu drogy, počítáno na vysušenou drogu.

Obsahové látky silice: thymol, karvakrol, *p*-cymol a linalool.

Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se smíchá s 5 ml dichlormethanu, protřepává se 3 minuty. Zfiltruje se přes asi 2 g síranu sodného bezvodého.

Porovnávací roztok: 5 mg thymolu a 10 µl karvakrolu se rozpustí v 10 ml dichlormethanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Dichlormethan.

Nanášení: 20 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části patrná skvrna zhášející fluorescenci (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna zhášející fluorescenci, odpovídající polohou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad ní i pod ní jsou další výrazné skvrny zhášející fluorescenci.

Detekce B: Postříká se anisaldehydem RS (10 ml na desku o délce strany 200 mm) a suší se 10 minut při 100 °C až 105 °C.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě skvrny (podle vzestupných hodnot R_F): ve střední třetině chromatogramu světle fialová skvrna (karvakrol) a výše je hnědorůžová skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a zbarvením thymolu a karvakrolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině další skvrny. Intenzita skvrn thymolu a karvakrolu na chromatogramu zkoušeného vzorku závisí na chemotypech zkoušené drogy.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. Použije se 50,0 g řezané drogy, 1000ml baňka s kulatým dnem, 500 ml vody jako destilační tekutiny. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu bez přídavku xylenu v dělené trubici. Minimální obsah silice je 0,15 ml.

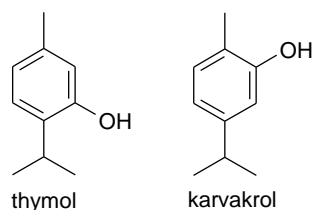
5.1.4.23. Thymi herba – Tymiánová nat' (ČL 2009)

Jsou to usušené celé listy a květy druhů *Thymus vulgaris* L., mateřídouška tymián (tymián obecný), nebo *Thymus zygis* L., mateřídouška (tymián) jařmová, Lamiaceae, nebo směsí obou druhů, oddělené od stonků.

Obsah:

- silice: nejméně 12 ml/kg (počítáno na bezvodou drogu),
- thymol a karvakrol, součet obsahů nejméně 40 % v silici.

Vedle thymolu a karvakrolu malé množství 1,8-cineolu, borneolu, geraniolu, linaloolu, linalyl-acetátu a thymolmethyletheru.



Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované drogy se protřepává 3 minuty s 5 ml dichlormethanu a zfiltruje se přes asi 2 g síranu sodného bezvodého.

Porovnávací roztok: 5 mg thymolu a 10 μ l karvakrolu se rozpustí v 10 ml dichlormethanu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC.

Mobilní fáze: Dichlormethan.

Nanášení: 20 μ l, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 15 cm.

Sušení: Na vzduchu.

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

Hodnocení A: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední třetině patrná skvrna zhášející fluorescenci (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna zhášející fluorescenci, odpovídající polohou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad ní i pod ní jsou další skvrny zhášející fluorescenci.

Detekce B: Postříká se anisaldehydem RS, použije se 10 ml na čtvercovou desku o straně 200 mm a zahřívá se 10 minut při 100 °C až 105 °C.

Hodnocení B: Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou ve střední části dvě skvrny: světle fialová skvrna (karvakrol) a výše je hnědorůžová skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a zbarvením thymolu a karvakrolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v dolní třetině další skvrny. Podle vzestupných hodnot R_F je intenzivní fialová skvrna, šedohnědá skvrna (borneol), fialová skvrna (cineol a linalool) a další šedorůžová skvrna. Intenzita skvrn thymolu a karvakrolu závisí na chemotypech zkoušené drogy.

Stanovení obsahu:

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách. 30,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/minutu až 3 ml/minutu v 1000ml baňce s kulatým dnem se 400 ml vody jako destilační kapaliny. Destiluje se bez přídavku xylenu v dělené trubici.

Minimální obsah silice je 0,15 ml.

5.1.4.24. Valerianae radix - Kozlíkový kořen (ČL 2009)

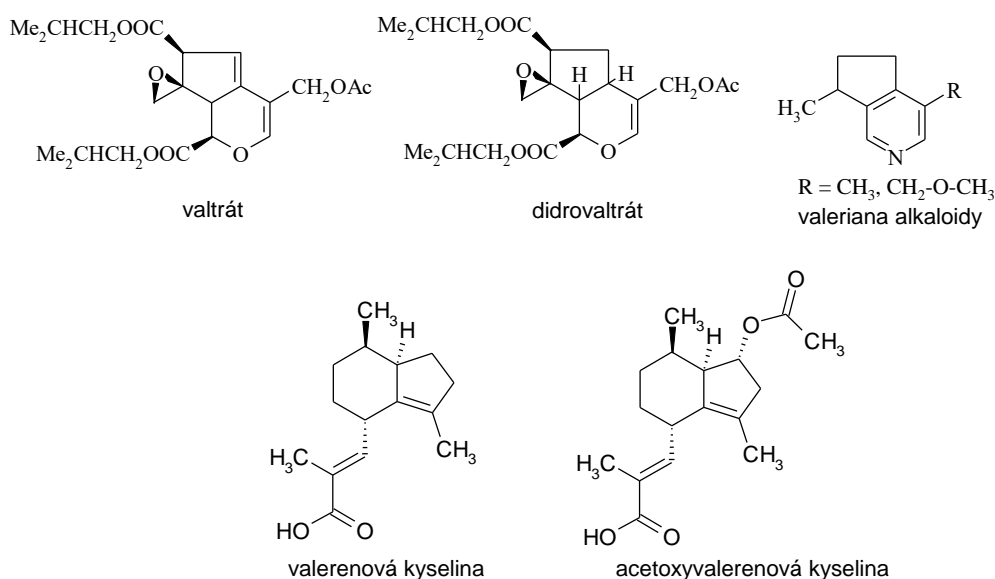
Jsou to usušené oddenky, kořeny a výběžky druhu *Valeriana officinalis* L. *sensu lato* Valerianaceae nebo jejich úlomky.

Obsahové látky: silice (obs. estery: hl. bornyl-isovalerát, eugenyl-isovalerát, bornyl-acetát, alkoholy: hl. eugenol; terpeny a seskviterpeny: pineny, silvestren, kadinen, limonen; anisaldehyd, felandren), epoxyridoidní estery tzv. valepotriáty (valtrát, didrovaltrát, acevaltrát), alkaloidy.

Obsah:

Celá droga nebo její úlomky, počítáno na vysušenou drogu:

- silice: nejméně 4 ml/kg;
- seskviterpenové kyseliny: nejméně 0,17 %, vyjádřeno jako kyselina valerenová.



Tenkovrstvá chromatografie (valerenové kyseliny):

Zkoušený roztok: 1 g práškované drogy se suspenduje v 10 ml methanolu a ponechá se 10 minut v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (0,45 µm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

Porovnávací roztok: 5 mg kyseliny acetoxyvalerenové a 5 mg kyseliny valerenové se rozpustí ve 20 ml methanolu.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Vyvíjecí soustava: kyselina octová ledová : ethyl-acetát : cyklohexan (2 : 38 : 60)

Detekční zkoumadlo: anisaldehyd RS

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 µl obou roztoků a vyvíjí se dvakrát po dráze 15 cm. Vrstva postříká detekčním zkoumadlem, suší se 5 až 10 minut při 100-105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v horní polovině zřetelně oddělené fialové skvrny kyseliny valerenové a acetoxyvalerenové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou vidět skvrny odpovídající polohou a zabarvením kyselině valerenové a acetoxyvalerenové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomné pod skvrnami kyselin další slabé fialové skvrny.

Tenkovrstvá chromatografie (valepotriáty, ČL 1997):

Zkoušený roztok: 1 g práškové drogy se suspenduje v 10 ml methanolu a ponechá se 10 minut v ultrazvukové lázni. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes membránový filtr (0,45 µm). Filtrát se použije jako zkoušený roztok.

Porovnávací roztok: 5 mg valtrátu a 5 mg acevaltrátu se rozpustí v 5 ml methanolu).

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Vyvíjecí soustava: toluen : ethyl-acetát (3 : 1).

Detekční zkoumadlo: konc. HCl : kyselina octová ledová (2 : 8).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 µl obou roztoků a vyvíjí se dvakrát po dráze 15 cm. Vrstva postříká detekčním zkoumadlem, suší se 10 minut při 100-105 °C a pozoruje se při denním světle nebo pod UV při 365 nm.

6. ALKALOIDY

Alkaloidy jsou organické zásadité látky obsahující atom dusíku převážně zabudovaný v heterocyklu. V naprosté většině jsou produkty sekundárního metabolismu vyšších rostlin. Malý počet alkaloidů produkují nižší houby a někteří obojživelníci.

Z hlediska šíře farmakologických účinků jsou alkaloidy nejdůležitější sekundární metabolity. Jejich fyziologický účinek se často projevuje vysokou toxicitou. Mnohé z nich mají v subletálních dávkách terapeuticky výhodné farmakologické vlastnosti a užívají se jako léčiva.

V rostlině bývá obvykle alkaloidů více (hlavní a vedlejší), liší se odlišnými substituenty. Jsou uloženy ve vakuole ve formě hydrofilních solí s organickými kyselinami (např. s kyselinou vinnou, citronovou, šťavelovou, jablečnou, akonitovou, chelidonovou, mekonovou). Výjimečně se nacházejí jako nerozpustné sloučeniny s tříslovinami.

Vlastnosti alkaloidů: Baze alkaloidů jsou lipofilní, ve vodě málo rozpustné až nerozpustné, většinou pevné bezbarvé látky. Snadno se rozpouštějí v organických rozpouštědlech (diethylether, chloroform, benzen). S kyselinami tvoří většinou bezbarvé krystalické soli hořké chuti, snadno rozpustné ve vodě. Mezi barevné alkaloidy patří např. žlutý berberin a chelidonin, červený sanguinarin. Několik alkaloidů ve formě baze je tekutých (nikotin, koniin, spartein) a snadno se izolují z rozdrcené zalkalizované rostlinné suroviny destilací s vodní párou.

Většina alkaloidů se tvoří z aminokyselin ornithinu, lysinu, fenylalaninu, tyrosinu, tryptofanu a histidinu. Základem nebo součástí některých alkaloidů je terpenoidní skelet (hemi-, mono-, di-, triterpeny a steroidy). Výjimečně jsou alkaloidy tvořeny inkorporací dusíku do polyketidového skeletu, např. koniin.

Traduje se dělení na:

- alkaloidy pravé, odvozené od aminokyselin, atom dusíku mají zabudovaný ve formě heterocyklu (např. morfin, chinin, hyoscyamin, strychnin aj.);
- protoalkaloidy, odvozené od aminokyselin, atom dusíku není součástí heterocyklu; jsou to jednoduché aminy bazického charakteru (efedrin, meskalin, psilocybin, kolchicin);

- pseudoalkaloidy, mají charakter pravých alkaloidů, ale nejsou odvozeny od aminokyselin. Většina z nich jsou isoprenoidního původu a označují se jako terpenoidní alkaloidy, např. diterpenoidní akonitin. Výjimečně mají původ acetátový, např. koniin.

Vzhledem k vazbě dusíku v heterocyklech má většina alkaloidů charakter terciárních, méně sekundárních, výjimečně pak kvartérních bazí. Bazický charakter alkaloidů je však poměrně slabý. Příslušné disociační konstanty se pohybují v rozmezí hodnot 10^{-6} až 10^{-8} , s výjimkou purinových bazí, jejichž disociační konstanty jsou řádu 10^{-14} . Alkaloidy se dvěma atomy dusíku mohou tvořit dvě řady solí o různých disociačních konstantách, např. chinin s roztokem kyseliny chlorovodíkové $K_1 = 10^{-6}$, $K_2 = 10^{-10}$.

6.1.1. KVALITATIVNÍ REAKCE ALKALOIDŮ

Z analytického hlediska jsou si alkaloidy podobny jen obecným charakterem organických bazí. Tato skutečnost tvoří podklad četných skupinových reakcí, které možno rozdělit na reakce srážecí a barevné.

6.1.1.1. Srážecí reakce

Jako **bazická** srážedla alkaloidů se používají jednak roztoky hydroxidů a uhličitánů alkálií, jednak roztoky amoniaku. Je však třeba pamatovat na to, že silnější baze, hlavně alkalické hydroxidy mohou tvořit s alkaloidy, jež obsahují volné fenolové skupiny, rozpustné fenoláty.

Mezi skupinová zkoumadla, obsahující v aniontu komplex s těžkým kovem, patří lékopisné Mayerovo zkoumadlo, obsahující neutrální roztok tetrajodortuřnatanu $[\text{HgI}_4]^{2-}$, nebo analogické zkoumadlo Dragendorffovo, obsahující roztok tetrajodobismutitanu $[\text{BiI}_4]^-$.

Sraženiny alkaloidů vznikající s Mayerovým zkoumadlem v roztocích slabě okyselených zředěnou kyselinou sírovou, jsou špinavě nazelenalé barvy. Některé alkaloidy, např. slabě bazické puriny a kolchicin, tvoří sraženiny až ve větších koncentracích. Složení vzniklé sraženiny se mění v závislosti na podmínkách srážení, lze jí však přisoudit přibližné složení $\text{baze}_{1-2}[\text{HgI}_4]$.

Sraženiny alkaloidů s Dragendorffovým zkoumadlem jsou nejčastěji oranžově červené barvy a odpovídají struktuře baze $[BiI_4]$. Dragendorffovo zkoumadlo patří mezi zkoumadla ČL 2009 pro důkaz alkaloidů.

K těmto dvěma zkoumadlům možno přiřadit též Lugolův roztok, obsahující roztok polyjodidů $[I_3]^-$.

Ze zkoumadel, která mají charakter heteropolykyselin možno uvést kyselinu fosfowolframovou $[P(W_3O_{10})_4]^{3-}$, kyselinu fosfomolybdenovou a jiné. Tato zkoumadla tvoří v kyselém nebo neutrálním prostředí sraženiny v poměru baze k aniontu 1:1 až 1:5. Kyselina fosfomolybdenová tvoří žlutou sraženinu, časem se barví modře – redukce na molybdenovou modř. Kyselina fosfowolframová tvoří špinavě bílou, později krystalizující sraženinu.

Nerozpustné sraženiny s alkaloidy tvoří též některé organické kyseliny, z nichž se používá např. roztok taninu, který tvoří křukaté sraženiny béžové barvy. Kyselina pikrová tvoří s alkaloidy krystalické soli o definované teplotě tání.

Mají-li tyto skupinové reakce sloužit jako podklad pro důkaz totožnosti, je nutné je spojovat např. s mikroskopickým posouzením krystalických soustav sraženin nebo s určováním teploty tání definovaných derivátů.

6.1.1.2. Barevné reakce

Jako zkoumadel, která slouží k vyvolání charakteristických barevných reakcí alkaloidů, se používá zpravidla silných anorganických kyselin, např. koncentrované kyseliny sírové, kyseliny dusičné, popřípadě jejich směsí nebo silných anorganických kyselin s příměsí některých kondenzačních, oxidačních nebo redukčních zkoumadel.

Erdmannovo zkoumadlo je kyselina sírová se stopou kyseliny dusičné. Význam kyseliny dusičné jako základního zkoumadla na alkaloidy je dán především velmi dobrou schopností rozpouštět organické látky, zejména látky bazického charakteru. Tyto látky se při rozpuštění současně často mění, přičemž vzniklé produkty jsou někdy charakteristicky zbarveny. To platí pro kyselinu dusičnou, která dává například s brucinem oranžové zbarvení, s kolchicinem fialové. Vlivem kyseliny sírové na alkaloid může někdy dojít jen k sulfonaci, jindy jsou tyto zásahy hlubší, takže může dojít k přeskupení celé molekuly. Barevné produkty vzniklé při reakcích s kyselinou

sírovou jsou značně nestálé za přítomnosti vody – vzniklé soli slabých bazí se snadno hydrolyzují.

Do skupiny zkoumadel složených ze směsi silné minerální kyseliny (hlavně kyselina sírová) a vedle toho různá oxidační, redukční nebo kondenzační zkoumadla patří např. zkoumadlo Marquisovo, což je roztok formaldehydu v kyselině sírové. Marquisovo zkoumadlo je vhodné pro důkaz alkaloidů s fenolovými a fenoletherovými skupinami (alkaloidy isochinolinové skupiny, hlavně skupina alkaloidů opiových, dále kolchicin a skopolamin). Při reakci dochází pravděpodobně ke vzniku difenylmethanových derivátů, jejichž molekula se může zvláště za přítomnosti většího množství formaldehydu zvětšovat na vysokomolekulární útvary, což se projevuje vznikem amorfních sraženin. Pokud látky reagují pozvolna nebo teprve za tepla, skýtají obyčejně sled zbarvení, v němž se uplatňuje často červenofialová, popřípadě červená barva. Látky, které reagují příliš rychle, poskytují temně hnědé roztoky, protože uhelnatí. Z dalších zkoumadel je třeba jmenovat zkoumadlo Mandelinovo (roztok metavanadičnanu sodného v kyselině sírové), které poskytuje pozitivní reakce s efedrinem, kokainem, cinchoninem, strychninem a pilokarpinem (působí oxidačně za vzniku často charakteristicky zbarvených produktů); a dále Frödeho zkoumadlo (kyselina molybdensírová) a Wasického zkoumadlo (roztok *p*-dimethylaminobenzaldehydu v kyselině sírové).

Jednotlivá zkoumadla poskytují barevné reakce obyčejně s větším počtem alkaloidů. I když bývají tyto reakce někdy barevně dost rozrůzněny, přece jen obyčejně u většího počtu alkaloidů jsou stejné, nebo alespoň značně podobné. Některé z nich přesto mají na rozdíl od reakcí srážecích v určitých případech charakter reakcí selektivních. S použitím jediného zkoumadla nelze ovšem ve většině případů alkaloid identifikovat a získat informace o jeho charakteru bývá takto dost obtížné. Pro účely orientačního rozlišení alkaloidů používá se však s úspěchem zpravidla více zkoumadel a výsledky barevných reakcí se navzájem srovnávají. Popis zbarvení a sled jejich změn je obtížně vystižitelný a příslušné hodnocení může být subjektivně různé a proto se doporučuje, aby byl dodržován přesný návod při provádění kvalitativních reakcí a aby výsledky byly porovnávány se známou drogou, užívanou jako "standard".

6.1.2. 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 zabarvení 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.

6.1.2.1. 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 bází 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*).

6.1.2.2. 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 práškovaný 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.

6.1.2.3. 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 methylčerveň, 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 methylčerveň 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 methylčerveň.

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 vyluhu alkaloidů se používá některých zkoumadel používaných rovněž k jejich důkazu, např. Mayerova zkoumadla, kyseliny fosfowolframové, kyseliny pikrové aj.

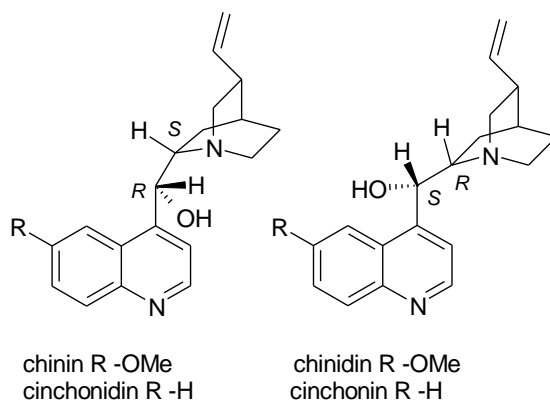
Posledních 10-15 let zasáhla podstatně i do kvantitativního stanovení alkaloidů chromatografie, spojená s některou fyzikálně chemickou metodou detekce, nejčastěji s UV spektrofotometrií. Tento způsob je vhodný především proto, že umožňuje stanovení jednoho nebo více (chromatografií oddělených) alkaloidů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

6.1.3. DROGY S OBSAHEM CHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ

6.1.3.1. Cinchonae cortex – Chinovníková kůra (ČL 2009)

Je to usušená celá nebo nařezaná kůra druhu *Cinchona pubescens* Vahl (*Cinchona succirubra* Pavon.), chinovník červený, *Cinchona calisaya* (Weddell), chinovník kalisájový, *Cinchona ledgeriana* (Moens ex Trimen), chinovník Ledgerův, Rubiaceae, nebo jejich odrůd nebo kříženců.

Obsah: Nejméně 6,5 % celkových alkaloidů, z toho 30-60 % alkaloidů chininového typu, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

1. 0,2 g drogy se zahřívají ve vodorovně položené suché zkumavce, vyvíjejí se fialové páry, jež se kondensují na chladnějších místech zkumavky v tmavě fialově červený dehet. Lihový roztok dehtu fluoreskuje pod UV lampou světla modře.

2. 0,1 g práškové drogy se 1 minutu protřepává s 5 ml 15% kyseliny sírové a zfiltruje se. Filtrát se použije také ke zkoušce 3. K 1 ml filtrátu se přidá několik kapek Mayerova zkoumadla, ihned vzniká žlutobílá sraženina (alkaloidy).

3. 1 ml filtrátu ze zkoušky 2) i po zředění 10 ml vody pod UV lampou intenzivně modře fluoreskuje. Přidáním několika kapek koncentrované kyseliny chlorovodíkové fluorescence ihned mizí.

4. K 5 ml tekutiny z titračního stanovení obsahu se přidává po kapkách bromová voda, pokud se vznikající sraženina třepáním rozpouští a ihned se přidá nadbytek zředěného amoniaku, vylučuje se modrozelená sraženina (chinin, chinidin) (ČsL 3).

Je to tzv. reakce talleiochinová. Místo bromové vody lze použít i jiných oxidačních činidel (peroxid vodíku, roztoky chlornanů). Při reakci dochází pravděpodobně k odštěpení methylu a k oxidaci jak na jádře, tak i ve vinylové skupině. Vzniklé zelené barvivo se nazývá talleiochin. Přidá-li se k zelenému roztoku kyselina sírová zředěná, barví se obsah do červena. Do chloroformu přechází talleiochin modrofialově. Podmínkou vzniku talleiochinu je současná přítomnost jádra chinolinového a chinuklidinového, jakož i methoxyl v poloze 6. Cinchonin a cinchonidin, které methoxyl neobsahují, nedávají talleiochinovou reakci. V poslední době bylo zjištěno, že kromě talleiochinu vzniká při reakci další látka konjugací dvou chinolinových jader, vykazující stejné barevné vlastnosti jako talleiochin.

5. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,10 g práškové drogy se ve zkumavce smíchá s 0,1 ml amoniaku 26% a 5 ml dichlormethanu. Občas se silně protřepe a po 30 minutách se zfiltruje. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml ethanolu bezvodého.

Porovnávací roztok: 17,5 mg chininu, 2,5 mg chinidinu, 10 mg cinchoninu a 10 mg cinchonidinu se rozpustí v 5 ml ethanolu bezvodého.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů diethylaminu, ethyl-acetátu a toluenu. (10 : 20 : 70).

Nanášení: 10 µl do proužků.

Vyvíjení: Dvakrát po dráze 15 cm.

Sušení: Při 100 °C až 105 °C, nechá se vychladnout.

Detekce A: Postříká se kyselinou mravenčí bezvodou, nechá se na vzduchu usušit a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení A: Pozorujeme modře fluoreskující skvrny chininu a chinidinu ve srovnání se standardy. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny ještě další fluoreskující skvrny.

Detekce B: Postříká se zkoumadlem jodoplaticitým. Pozorujeme ve viditelném světle.

Hodnocení B: pozorujeme v sestupném pořadí cinchonin (fialová skvrna, která přechází do fialovošedé), chinidin (fialová skvrna, která přechází do fialovošedé), cinchonidin (intenzivní tmavomodrá skvrna), chinin (fialová skvrna, která přechází do fialovošedé). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přítomny ještě další skvrny.

Stanovení obsahu:

1. Stanovení obsahu alkaloidů titračně

1,250 g práškované drogy se smísí se 2,0 ml kyseliny mravenčí a 15 ml vody a zahřívá se na vodní lázni 30 minut. Po vychladnutí se přidá 20,0 g chloroformu, 40,0 g diethyletheru a po silném protřepání 3,5 ml koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného. 10 minut se silně protřepává a potom se za častého protřepávání nechá stát dalších 30 minut. Po této době se přidají 2 g práškovaného tragantu a protřepává se do vyjasnění. Téměř čirý roztok se zfiltruje suchým filtrem. 48,0 ml filtrátu (odpovídajících 1,0 g drogy) se odváží do titrační baňky a rozpouštědlo se na vodní lázni odpaří. Zbytek v baňce se mírným zahřátím rozpustí v 10 ml lihu 95%, přidá se 10 ml vody prosté kysličníku uhličitého, 10 kapek roztoku methylčerveně a titruje se z mikrobyrety 0,1 N roztokem kyseliny chlorovodíkové do začínající změny zbarvení. Potom se přidá dalších 50 ml vody prosté oxidu uhličitého a dotitruje se do červeného zbarvení. 1 ml 0,1 N roztoku kyseliny chlorovodíkové odpovídá 0,03094 g alkaloidů, počítáno na chinin a cinchonin.

2. Stanovení obsahu alkaloidů gravimetricky podle Frommeho

2,5 g práškované drogy se 10 minut zahřívá na vodní lázni se směsí 2,5 g roztoku chlorovodíku 25% a 20 g vody. Po jedné hodině stání se přidá k roztoku 25 g chloroformu, 50 g diethyletheru a po protřepání 5 g 10% roztoku hydroxidu sodného.

Směs se 10 minut dobře protřepává. Pak se přidá 1,5 g rozpráškovaného tragantu, protřepe se a zfiltruje. 60,0 g diethyletherového filtrátu se v dělicí nálevce protřepává postupně s 20 ml, 10 ml a 10 ml zředěného roztoku chlorovodíku, kyselý výluh se zfiltruje do dělicí nálevky, filtr se promyje 10 ml vody a ke spojeným filtrátům se přidá 15 ml chloroformu a 5 ml amoniaku a protřepe se. Chloroformový výluh se po oddělení zfiltruje hladkým filtrem do odvážené Erlenmayerovy baňky, vodná vrstva se znovu protřepe dvakrát s 10 ml chloroformu a chloroform se tímž filtrem zfiltruje. Pak se chloroform odpaří, odparek se přelije 5-10 ml ethanolu, roztok se odpaří a zbytek se suší při 100 °C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Váha zbytku násobená padesáti udává obsah alkaloidů v procentech.

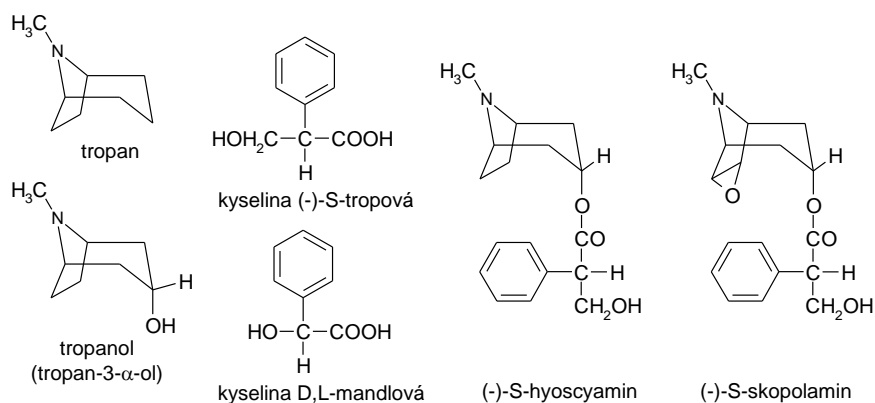
Droga se používá k přípravě:

Cinchonae extractum fluidum normatum – Chinovníkový extrakt tekutý standardizovaný (ČL 2009). Obsah: 4,0 % až 5,0 % celkových alkaloidů, z toho 30 % až 60 % alkaloidů chininového typu.

Quinidini sulfas dihydricus – Chinidin-sulfát dihydrát (ČL 2009) a Quinini hydrochloridum dihydricum – Chinin-hydrochlorid dihydrát (ČL 2009).

6.1.4. DROGY S OBSAHEM TROPANOVÝCH ALKALOIDŮ

Tropanové alkaloidy je skupinové označení pro baze založené na pyrrolidin-piperidinovém neboli tropanovém skeletu. Estery 3- α -tropanolu (tropinu) s kyselinou tropovou jsou základem (-)-hyoscyaminu a skopolaminu. Ester 3- β -tropanolu (pseudotropin) je základem kokainu. Vyskytují se v rostlinách čeledi lilkovité – Solanaceae, v rodech rulík – *Atropa*, durman – *Datura*, blín – *Hyoscyamus*, pablen – *Scopolia*, duboizie – *Duboisia*.



6.1.4.1. **Belladonnae folium – Rulíkový list (ČL 2009)**

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Atropa belladonna* L., rulík zlomocný, Solanaceae.

Obsah: Nejméně 0,3 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin, počítáno na vysušenou drogu. Alkaloidy tvoří především hyoscyamin s malým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Droga se používá k přípravě:

Belladonnae folii extractum siccum normatum – Extrakt z rulíkového listu suchý standardizovaný (ČL 2009). Obsah: 0,95 až 1,05 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin, počítáno na vysušenou látku.

Belladonnae folii tinctura normata – Tinktura z rulíkového listu standardizovaná (ČL 2009). Obsah: 0,027 až 0,033 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin. Alkaloidy se skládají hlavně z hyoscyaminu doprovázeného malým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Belladonnae pulvis normatus – Rulíkový list práškový standardizovaný (ČL 2009). Obsah: 0,28 až 0,32 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako hyoscyamin, počítáno na vysušenou drogu.

6.1.4.2. **Belladonnae radix – Rulíkový kořen**

Kořen druhu *Atropa belladonna* L., rulík zlomocný, Solanaceae. Je tvořen válcovitými, často podélně rozpůlenými kusy kořenů až 2 cm silnými, zevně téměř hladkými, na povrchu světle šedohnědými, uvnitř téměř bílými.

Obsah: okolo 0,5 % tropanových alkaloidů, počítáno na vysušenou drogu. Slouží jako

surovina pro jejich izolaci.

6.1.4.3. Hyoscyami folium – Blínový list

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími vrcholky *Hyoscyamus niger* L., blín černý, Solanaceae.

Obsah: 0,045 - 0,14 % hyoscyaminu a skopolaminu v poměru přibližně 1:1, počítáno na vysušenou drogu.

6.1.4.4. Stramonii folium – Durmanový list (ČL 2009)

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Datura stramonium* L., durman obecný, Solanaceae.

Obsah: Nejméně 0,25 % celkových alkaloidů vyjádřeno jako hyoscyamin, počítáno na vysušenou drogu. Alkaloidy jsou zastoupeny zejména hyoscyaminem provázeným proměnlivým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Používá se k přípravě:

Stramonii folii pulvis normatus – Durmanový list práškovaný standardizovaný (ČL 2009)

Zkoušky totožnosti pro drogy s obsahem tropanových alkaloidů:

1. 1,0 g práškované drogy se protřepává 3 minuty s 3 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a 5 ml vody a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá několik kapek Mayerova zkoumadla, vzniká šedobílá sraženina (alkaloidy).
2. 1 g práškované drogy se protřepává 2 minuty s 10 ml kyseliny sírové 0,05 mol/l a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml amoniaku 26% a 5 ml vody. Opatrně se protřepává 15 ml diethyletheru prostého peroxidických látek tak, aby se netvořila emulze. Diethyletherová vrstva se oddělí a vysuší síranem sodným bezvodým. Zfiltruje se a diethylether se odpaří v porcelánové misce. Ke zbytku se přidá 0,5 ml kyseliny dusičné dýmové a odpaří se do sucha na vodní lázni. K odparku se přidá 10 ml acetonu a po kapkách roztok hydroxidu draselného (30 g/l) v ethanolu 96%; vznikne tmavofialové zbarvení. Tato reakce bývá označována jako Vitalliho reakce. Dávají ji estery kyselin, jejichž struktura je obdobná kyselině tropové. Působením kyseliny dusičné dochází k nitraci fenylového zbytku. Alkoholický

louh podmiňuje vznik chinoidní struktury příslušného nitroderivátu. Přítomnost tropanového jádra není pro průběh reakce nezbytná, přispívá ke stálosti zbarvení. Vitalliho reakcí lze rozlišit tropanové alkaloidy atropinového typu od alkaloidů kokainového typu. Stejný průběh Vitalliho reakce jako u atropinu je též u skopolaminu, v jehož molekule nacházíme příslušné strukturní seskupení. Naproti tomu homatropin, který je esterem kyseliny mandlové a tropinu, nespĺňuje shora uvedenou strukturní podmínku a dává při Vitalliho reakci výsledné zbarvení oranžově žluté.

3. Prášková droga se extrahuje amoniakálním chloroformem na porcelánové misce. Po odpaření vyluhovadla na vodní lázni se droga odstraní. Odparek se pokápne Wasického zkoumadlem a mírně se zahřeje. Vznikne slabě fialové zbarvení (důkaz hyoscyaminu a hyoscinu).

4. Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušený roztok: 1 g práškové drogy (180) se protřepává 15 minut s 15 ml kyseliny sírové 0,05 mol/l, zfiltruje se a filtr se promývá kyselinou sírovou 0,05 mol/l do získání 25 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml amoniaku 26% a protřepává se dvakrát 10 ml diethyletheru prostého peroxidických látek, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené diethyletherové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým, zfiltrují se a odpaří se do sucha na vodní lázni. Odparek se rozpustí v 0,5 ml methanolu.

Porovnávací roztok: 50 mg hyoscyamin-sulfátu se rozpustí v 9 ml methanolu, 15 mg skopolamin-hydrobromidu se rozpustí v 10 ml methanolu. Smíchá se 3,8 ml roztoku hyoscyamin-sulfátu a 4,2 ml roztoku skopolamin-hydrobromidu a zředí se methanolem na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou Silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů amoniaku 26%, vody a acetonu (3 : 7 : 90).

Nanášení: 10 μ l a 20 μ l, odděleně do proužků (20 mm \times 3 mm) se vzdáleností 1 cm mezi jednotlivými proužky.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: 15 minut při 100 °C – 105 °C, nechá se ochladit.

Detekce A: Postříká se jodobismutitanem draselným (Dragendorffovo zkoumadlo) do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí; použije se asi 10 ml na desku 200 \times 200 mm.

Hodnocení A: Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacích roztoků při nanášení shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné vedlejší skvrny v střední části chromatogramu při nanášení 20 μ l zkoušeného roztoku nebo v blízkosti startu při nanášení 10 μ l zkoušeného roztoku.

Detekce B: Vrstva se postříká dusitanem sodným tak, aby byla průsvitná, a pozoruje se po 15 minutách.

Hodnocení B: Hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Stanovení obsahu podle ČL 2009:

- a) Ztráta sušením: 2,000 g práškové drogy (180) se suší v sušárně při 105 °C.
- b) 10,00 g práškové drogy (180) se navlhčí směsí složenou z 5 ml amoniaku 17,5%, 10 ml ethanolu 96% a 30 ml diethyletheru prostého peroxidických látek a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h macerovat. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů chloroformu a diethyletheru prostého peroxidických látek (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v kyselině sírové 0,25 mol/l a nepřítomnost alkaloidů se ověří tetrajodortu'natanem draselným. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí diethyletheru prostého peroxidických látek tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1 násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml kyseliny sírové 0,25 mol/l, je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené dolní kyselé vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se amoniakem 17,5% a vytřepávají se třikrát 30 ml chloroformu. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g síranu sodného bezvodého a nechá se stát 30 minut za občasného protřepávání. Pak se chloroform slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml chloroformu. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 minut v sušárně při 100 °C až

105 °C. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech chloroformu, přidá se 20,0 ml kyseliny sírové 0,01 mol/l a chloroform se odstraní odpařením na vodní lázni. Přidá se červeň methylová směsný indikátor a titruje se hydroxidem sodným 0,02 mol/l. Celkový obsah alkaloidů v procentech, vyjádřeno jako hyoscyamin, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{57,88 \times (20 - n)}{(100 - d) \times m}$$

v němž značí:

d – ztrátu sušením v procentech

n – spotřebu hydroxidu sodného 0,02 mol/l v mililitrech

m – hmotnost drogy v gramech.

Drogy s obsahem tropanových alkaloidů slouží jako surovina pro izolaci:

Atropinum – Atropin (ČL 2009)

Atropini sulfas monohydricus – Atropin-sulfát monohydrát (ČL 2009)

Scopolaminum – Skopolamin, syn. Hyoscinum (ČL 2009)

Scopolamini hydrobromidum trihydricum – Skopolamin-hydrobromid trihydrát (ČL 2009)

6.1.5. DROGY S OBSAHEM ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ

6.1.5.1. Ipecacuanhae radix – Hlavěnkový kořen (ČL 2009)

Jsou to usušené úlomky kořene a oddenku druhu *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich., hlavěnka dávivá, obchodního označení Matto Grosso ipecacuanha, nebo druhu *Cephaelis acuminata* Karsten, hlavěnka hrotitá, obchodního označení Costa Rica ipecacuanha, Rubiaceae, nebo směs obou druhů. Hlavními alkaloidy jsou emetin a cefaelin.

Obsah: Nejméně 2,0 % alkaloidů, vyjádřeno jako emetin, počítáno na vysušenou drogu.

Zkoušky totožnosti:

0,5 g práškové drogy se protřepává 5 minut s 5,0 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové a ještě za horka se zfiltruje. K 1 ml filtrátu se přidá 5 kapek roztoku

tetrajodortu'natanu draselného (Mayerovo zkoumadlo); vznikne žlutobílá sraženina alkaloidů.

Droga se používá k přípravě:

***Ipecacuanhae extractum fluidum normatum* – Hlavěnkový extrakt tekutý standardizovaný (ČL 2009)**

Je to tekutý standardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Ipecacuanhae radix*.

Obsah: 1,80 % až 2,20 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin.

***Ipecacuanhae pulvis normatus* – Hlavěnkový kořen práškovaný standardizovaný (ČL 2009)**

Je to práškovaný kořen hlavěnky, jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo práškované drogy s nižším obsahem alkaloidů.

Obsah: 1,9 % až 2,1 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin, počítáno na vysušenou drogu.

***Ipecacuanhae tinctura normata* – Hlavěnková tinktura standardizovaná (ČL 2009)**

Je to tinktura vyrobená z drogy *Ipecacuanhae radix*.

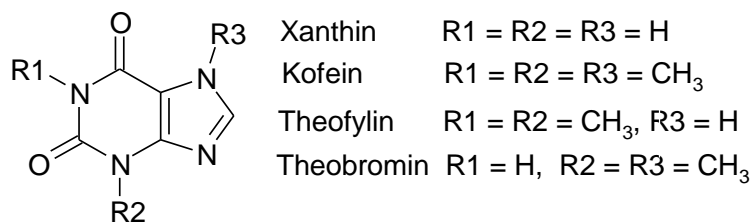
Obsah: 0,18 % až 0,22 % celkových alkaloidů, vyjádřeno jako emetin.

***Emetini dihydrochloridum heptahydricum* – Emetin-dihydrochlorid heptahydrát (ČL 2009)**

***Emetini dihydrochloridum pentahydricum* – Emetin-dihydrochlorid pentahydrát (ČL 2009)**

6.1.6. 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.



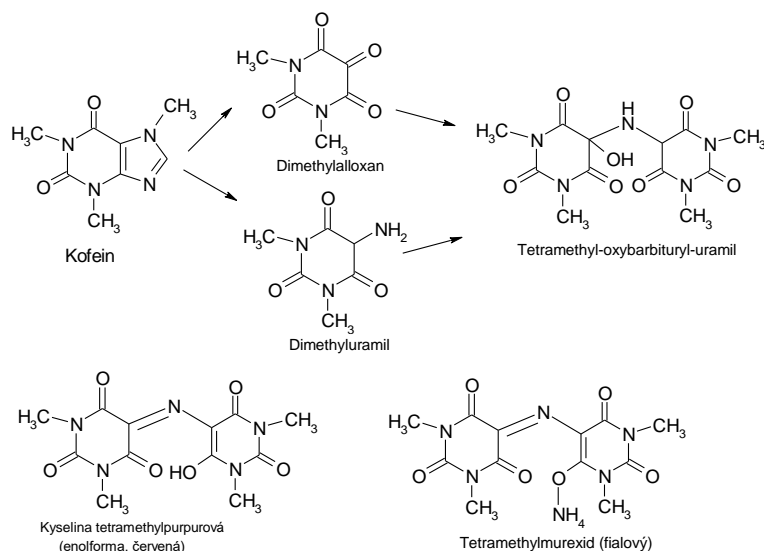
6.1.6.1. Colae semen – Kolové semeno (ČL 2009)

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 trísloviny.

Zkoušky totožnosti:

- 0,5 g práškové drogy se zahřeje k varu s 5,0 ml roztoku kyseliny sírové zředěné (98 g/l H₂SO₄). Směs se ještě za horka zfiltruje. K filtrátu se přidá 5 ml roztoku amoniaku zředěného (100 g/l NH₃) a 10 ml chloroformu. Po důkladném protřepání se chloroformová vrstva prefiltruje 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.
- Mikrosublimate. Droga poskytuje bezbarvý sublimát, skládající se z dlouhých jehlic (kofein), které dávají pozitivní murexidovou reakci.



3. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškované 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 F₂₅₄ 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 zhášejíci 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 práškové 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 přídavkem 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 práškové 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:

- A₁ – plochu píku kofeinu na chromatogramu zkoušeného roztoku;
- A₂ – plochu píku kofeinu na chromatogramu porovnávacího roztoku;
- m₁ – hmotnost zkoušené drogy v gramech;
- m₂ – hmotnost kofeinu v porovnávacím roztoku v gramech.

6.1.6.2. 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.

6.1.6.3. 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.

6.1.6.4. Maté folium – List cesmíny paraguayské (Yerba maté)

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

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

6.1.7. ALKALOIDY OPIA A SOUVISEJÍCÍ DROGY

6.1.7.1. **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 práškové standardizované (ČL 2009)

Je to surové opium práškové 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.

6.1.7.2. 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

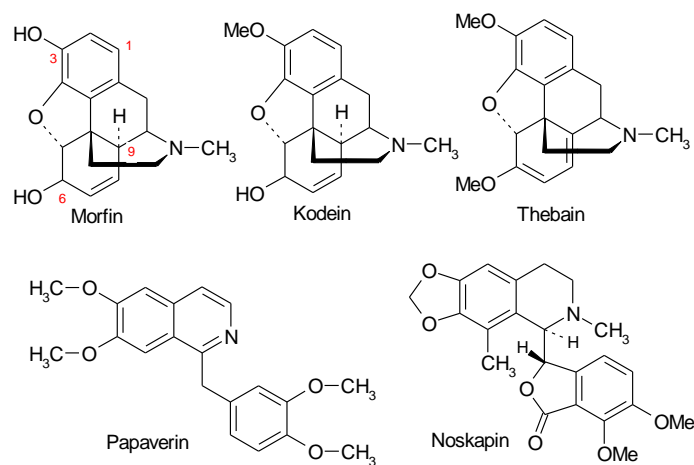
Morphini hydrochloridum trihydricum – Morfin-hydrochlorid trihydrát

Morphini sulfas pentahydricus – Morfin-sulfát pentahydrát

Noscapini hydrochloridum monohydricum – Noskapin-hydrochlorid monohydrát

Noscapinum – Noskapin

Papaverini hydrochloridum – Papaverin-hydrochlorid



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

2. Tenkovrstvá chromatografie na silikagelu:

Zkoušený roztok: 5 g vysušené práškové 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_2O_3 až na pH 6–7 (přibližně 10 g). Suspenze se odstředí na centrifuze 3 minuty při 3000 ot/minutu. Supernatant se slijí 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:

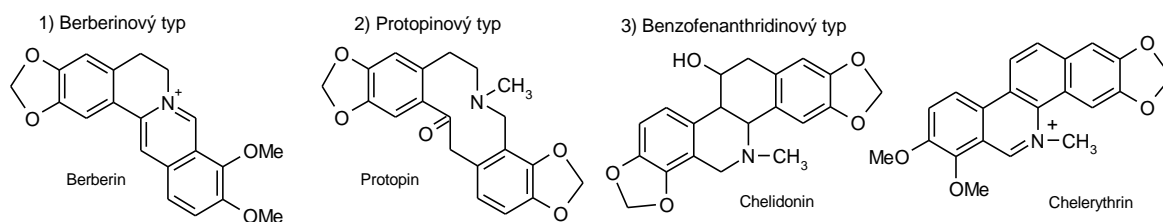
Chloroformový extrakt ze zkoušky 2) naředíme 10 ml chloroformu, kvantitativně převedeme do odměrné baňky na 25 ml a doplníme chloroformem po značku. Změříme absorbanci při 420 nm oproti čistému chloroformu a obsah morfinu vypočteme z kalibrační křivky.

6.1.7.4. 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:

a) k 1 ml se přidá 5 kapek roztoku tetrajodortuřnatanu draselného (Mayerovo zkoumadlo). Vznikne šedá sraženina.

b) k 1 ml se přidá 5 kapek roztoku tetrajodobismutitanu draselného

(Dragendorffovo zkoumadlo). Vznikne oranžová sraženina.

2. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 0,4 g práškované 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.

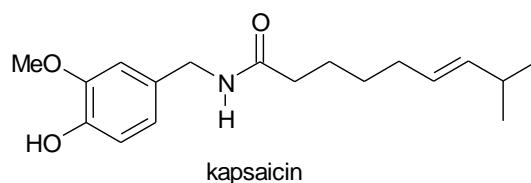
Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je přibližně uprostřed šedohnědá skvrna (papaverin) a nad ní červená skvrna (červeň methylová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v sestupném uspořádání dvě hnědé skvrny, šedohnědá skvrna na úrovni papaverinu a pod ní další dvě hnědé skvrny. Na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

6.1.8. DALŠÍ TESTOVANÉ ALKALOIDNÍ DROGY

6.1.8.1. 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.



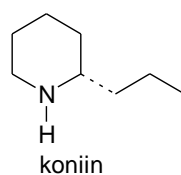
Zkoušky totožnosti

1. 0,2 g práškové 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 práškové 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 práškové drogy se na porcelánové misce nasype na koncentrovanou kyselinu sírovou. Prášek se zbarví modrozeleně, později hnědozeleně (kapsanthin).

6.1.8.2. Conii fructus – Bolehlavový plod

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

Obsahuje alkaloid koniin, olej.



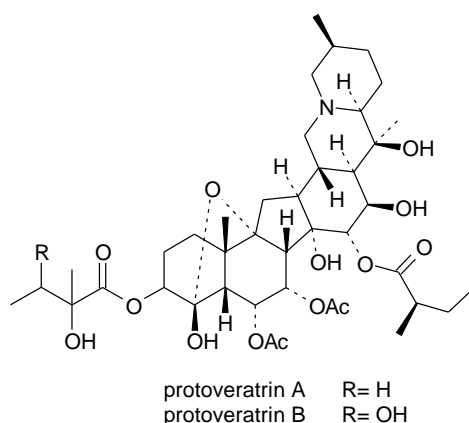
Zkoušky totožnosti:

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

6.1.8.3. Veratri albi radix – Kořen kýchavice bílé

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

Hlavní obsahové látky: steroidní alkaloidy.



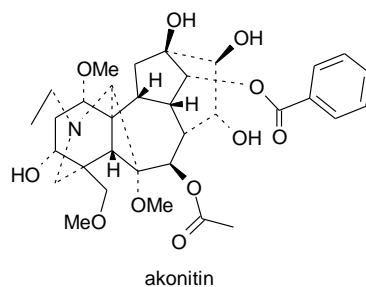
Zkoušky totožnosti:

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).

6.1.8.4. 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:

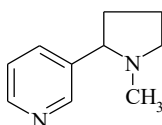
0,2 g práškované drogy se povaří se směsí 5 ml vody a 5 kapek roztoku zředěné kyseliny chlorovodíkové a odvar se zfiltruje. Filtrát se rozdělí na dvě části:

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).

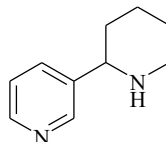
6.1.8.5. Nicotianae folium - Tabákový list

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.

Použitá literatura:

Český lékopis 2009. 2009. ISBN 978-80-247-2994-7. Grada Publishing a. s.

Český lékopis 2005. 2005. ISBN 80-247-1532-5. Grada publishing a. s.

Český lékopis 2002. 2002. ISBN 80-247-0464-1. Grada Publishing a. s.

Český lékopis 1997. 1997. ISBN: 80-7169-625-0. Grada Publishing a. s.

Československý lékopis 4. 1987. ISBN. Avicenum.

Autoři:	Suchý Václav, Daňková Iva, Dvorská Margita, Hrazdilová Eva, Kubínová Renata, Šmejkal Karel, Špačková Věra, Žemlička Milan
Název:	Praktická cvičení z farmakognozie
Ústav:	Ústav přírodních léčiv
Počet stran:	256
Vydání:	1
Vydavatel:	VFU Brno

ISBN 978-80-7305-659-9