

ROZDZIAŁ XXI. **ANALIZA JAKOŚCIOWA
I ILOŚCIOWA WYBRANYCH
METABOLITÓW WTÓRNYCH
W ROŚLINNYCH SUROWCACH
LECZNICZYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rośliny wytwarzają szeroką i różnorodną grupę związków organicznych określanych jako **metabolity wtórne (substancje swoiste)**, z których większość nie bierze bezpośredniego udziału we wzroście i rozwoju. Do najlepiej poznanych grup metabolitów wtórnych należą **alkaloidy, związki fenolowe i terpenoidy**. Synteza i gromadzenie metabolitów wtórnych są często ograniczone do wybranych komórek lub organów – procesy te następują w określonej fazie cyklu życiowego roślin. Wiele z tych związków ma znaczenie adaptacyjne w ochronie roślin przed patogenami, pełni funkcję atraktantów dla zapylaczy i zwierząt rozsiewających nasiona, a także czynników allelopatycznych, które wpływają na konkurencję między gatunkami roślin. Zainteresowanie metabolitami wtórnymi podyktowane jest głównie ich szerokim wykorzystaniem praktycznym. Związki te są stosowane jako barwniki, oleje, woski, środki aromatyzujące, perfumy i narkotyki. Intensywne badania metabolitów wtórnych wytwarzanych przez rośliny związane są z poszukiwaniem w tej grupie związków nowych leków roślinnych, antybiotyków, insektycydów i herbicydów. Często wykorzystuje się do tego celu metody biotechnologiczne i roślinne kultury *in vitro*.

Leki roślinne definiuje się jako użyteczne w medycynie wyroby, które zawierają jako składniki czynne wyłącznie rośliny, części roślin, substancje roślinne lub ich kombinacje w postaci przerobionej lub nieprzerobionej. Do produkcji leków roślinnych wykorzystuje się **roślinne surowce farmaceutyczne**, czyli substancje lub mieszaniny substancji pochodzenia roślinnego. Roślinne surowce lecznicze charakteryzują się złożonym składem chemicznym i tylko niektóre związki (substancje czynne surowca) wykazują wyraźne działanie biologiczne. Substancje te mogą mieć różną naturę chemiczną i aktywność biologiczną oraz wykazywać względem siebie działanie synergistyczne

(np. alkaloidy z liści pokrzyki wilcza jagoda, korzeni rauwolfii żmijowej) lub antagonistyczne. Otrzymywanie czystych i jednorodnych chemicznie substancji biologicznie czynnych z surowców roślinnych możliwe jest dzięki zastosowaniu złożonych procesów technologicznych i biotechnologicznych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Wykrywanie garbników w wybranych surowcach roślinnych według Farmakopei polskiej VI

Garbniki roślinne to związki polifenolowe o masie cząsteczkowej 500–3000, mające zdolność tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami. Garbniki w kontakcie z białkami koagulują je, stąd wynikają ich właściwości przeciwzapalne oraz zastosowanie zewnętrzne w stanach zapalnych błon śluzowych skóry, obrzmieniach i drobnych krwawieniach, a także wykorzystanie w procesie garbowania skór. Z uwagi na zdolność tworzenia połączenia kompleksowego z alkaloidami stanowią odtrutkę przy zatruciach tymi związkami.

Garbniki można podzielić na 2 grupy:

- 1) garbniki ulegające hydrolizie – tanoidy (**garbniki pirogalolowe**). Podczas hydrolizy następuje uwolnienie cukrów prostych i wielowodorotlenowych fenolokwasów. Do tej grupy garbników zaliczamy estry lub glikozydy kwasu galusowego i jego pochodne (galotaniny) oraz kwasu elagowego (elagotaniny).
- 2) garbniki nie ulegające hydrolizie (**garbniki pirokatechinowe**, skondensowane, katechinowe). Czynniki hydrolizujące przekształcają je w nierozpuszczalne w wodzie flobafeny (czerwienie garbnikowe). W ich cząsteczce występuje układ katechiny lub ketonu aromatycznego, a podczas suchej destylacji dają pirokatechinę.

Cel ćwiczenia

Wykrywanie garbników w korze roślin.

Zasada metody

Garbniki w alkoholowych lub wodnych wyciągach roślinnych można odróżnić na podstawie poniższych reakcji:

- 1) reakcja z solami żelazowymi – garbniki pirogalolowe dają zabarwienie niebieskie, zaś garbniki pirokatechinowe – zielone. Obecność obu typów garbników w tej reakcji daje zabarwienie granatowe, niewielka ilość garbników pirogalolowych maskuje zieloną barwę barwników pirokatechinowych.
- 2) reakcja z waniliną w kwasie siarkowym – garbniki pirokatechinowe dają zabarwienie czerwone. Obecność tylko garbników pirogalolowych nie daje zabarwienia.
- 3) reakcja z formaldehydem i kwasem solnym – podczas gotowania powstaje osad garbników pirokatechinowych.

Materiał

kora dębu, kasztanowca, brzozy, wierzby, kruszyny. Surowce powinny odpowiadać wymaganiom monografii farmakopealnej (np. kora młodych pni i gałęzi dębu szypułkowego lub dębu bezszypułkowego zebrana na wiosnę przed rozwojem liści i wysuszana w cieniu, w temperaturze nie wyższej niż 35°C; surowiec nie powinien zawierać mniej niż 4% garbników w przeliczeniu na pirogalol)

Odczynniki

50% wodny roztwór CH_3OH (do przygotowania wyciągu), mieszanina octan etylu–dichlorometan–99,9% CH_3OH –woda (60:40:17:5; v/v/v/v), 1% wodny roztwór FeCl_3 , metanolowy wzorcowy roztwór katechiny (1 mg cm^{-3}), wanilina w kwasie siarkowym (5,0 g waniliny rozpuścić w 100 cm^3 98% H_2SO_4)

Sprzęt laboratoryjny

płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym, lejek szklany, sączki z bibuły filtracyjnej, polipropylenowe probówki typu Falcon 50 cm^3 , probówki szklane, pipety (5 mm^3 –5 cm^3), komora chromatograficzna, waga laboratoryjna, łaźnia wodna, plastikowe pipety pasteurowskie, bibuła filtracyjna, rozpylacz, cylinder miarowy 50 cm^3 , suszarka

I.A. PRZYGOTOWANIE WYCIĄGU Z SUROWCÓW ZAWIERAJĄCYCH GARBNIKI

Surowiec (2 g) umieścić w probówkach typu Falcon i zalać (przy użyciu cylindra miarowego) 40 cm³ 50% CH₃OH, umieścić w łaźni wodnej i ogrzewać do wrzenia przez 2 minuty. Zawartość probówek ostudzić pod zimną bieżącą wodą, a następnie przesączyć do suchych probówek przy użyciu sączka z bibuły filtracyjnej.

I.B. WYKRYWANIE GARBNIKÓW

1. Wykrywanie garbników pirogalolowych

Do suchych szklanych probówek odmierzyć 2 cm³ każdego z wyciągów (por. pkt I.A), a następnie dodawać stopniowo przy użyciu plastikowej pipety pasteurowskiej 10 kropli 1% FeCl₃.

2. Wykrywanie garbników pirokatechinowych

UWAGA: *Reakcję wyrywania wykonać pod pracującym dygestorium.*

Do suchych szklanych probówek odmierzyć 2 cm³ każdego z wyciągów (por. pkt I.A), a następnie dodawać stopniowo 5 cm³ roztworu waniliny w kwasie siarkowym.

Opracowanie wyników

Zanotować wyniki reakcji wykrywania garbników dla poszczególnych surowców roślinnych. Porównać otrzymane wyniki.

I.C. BADANIE GARBNIKÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ (TLC)

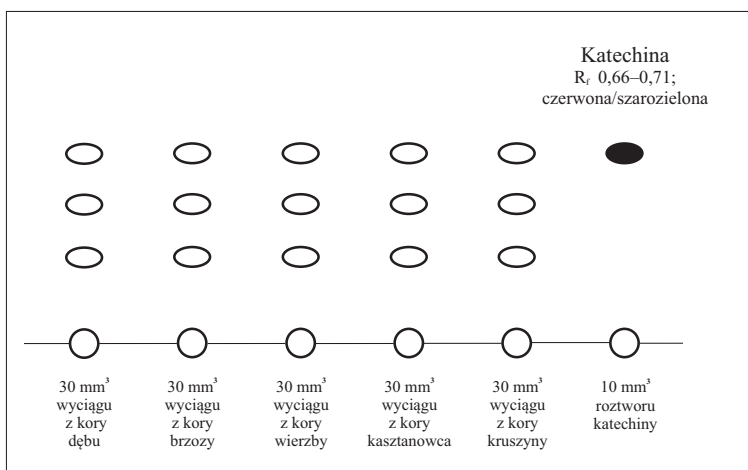
Wykonanie doświadczenia

UWAGA: *Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.*

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B).

1. Wykonać dwa identyczne chromatogramy (2 płytki), nanosząc na punkty startowe 30 μl wyciągu z odpowiedniego surowca (kroplami po 5 mm^3) oraz 10 mm^3 metanolowego roztworu porównawczego katechiny (por. rysunek 21.1).
2. Płytki umieścić w komorze chromatograficznej z fazą ruchomą o składzie: octan etylu–dichlorometan–99,9% CH_3OH –woda (60:40:17:5; v/v/v/v). Chromatogramy rozwijać przez 30 minut.
3. Po wyjęciu chromatogramów zaznaczyć czoło eluentu, a następnie wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Jeden chromatogram spryskać 1% FeCl_3 , a drugi roztworem waniliny w kwasie siarkowym. Detekcję przeprowadzać poprzez ułożenie płytki na arkuszu bibuły filtracyjnej i spryskanie jej odpowiednim odczynnikiem do detekcji za pomocą rozpylacza, w odległości minimum 20–30 cm od płytki.

Przeprowadzenie detekcji z waniliną i FeCl_3 pozwala na identyfikację na chromatogramie odpowiednio garbników pirokatechinowych i garbników pirogalolowych (rysunek 21.1).



Rysunek 21.1.

Schematyczny chromatogram wyciągów z badanych surowców roślinnych. Na schemacie zaznaczono R_f dla substancji porównawczej – katechiny (kolor katechiny zależy od wywoływacza użytego do detekcji)

Opracowanie wyników

Wyznaczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla katechiny. Porównać otrzymane wyniki pod względem obecności garbników w poszczególnych surowcach roślinnych.

Doświadczenie II

Identyfikacja wybranych alkaloidów glistnika jaskółcze ziele

Alkaloidy to duża grupa (ok. 15 000) zasadowych związków organicznych zawierających atom(y) azotu, głównie w pierścieniu heterocyklicznym. Alkaloidy wykazują bardzo silne działanie fizjologiczne o dużym spektrum zastosowania, np. cucące – analeptyczne (kofeina), rozkurczające mięśnie gładkie (papaweryna, chelidonina), rozszerzające źrenicę (atropina), miejscowo znieczulające (kokaina), obniżające ciśnienie (rezerpina), moczopędne (teobromina), przeciwastmatyczne (teofilina), przeciwbólowe (morfina), przeciwkaszlowe (kodeina), przeciwnowotworowe (winblastyna, winkrystyna, taksol), przeciwreumatyczne (kapsaicyna), żółciopędne i żółciotwórcze (boldyna). Systematyka alkaloidów oparta jest na budowie szkieletu, w którym wyróżnić można określony układ heterocykliczny, np. pirol, imidazol, indol, (izo)chinolinę, pirydynę i purynę.

Glistnik jaskółcze ziele jest gatunkiem powszechnie występującym w Polsce oraz innych krajach strefy umiarkowanej, wytwarza **alkaloidy izochinolinowe**. Sok mleczny glistnika był wykorzystywany do niszczenia brodawek z uwagi na obecność chelidoniny, działającej antymitotycznie. Wyciągi z tego surowca pobudzają skurcze macicy, podnoszą ciśnienie krwi, rozszerzają naczynia wieńcowe oraz wchodzi w skład preparatów przeciwkaszlowych.

Głównymi alkaloidami glistnika jaskółcze ziele są:

- 1) berberyna – wykazuje działanie żółciopędne i przeciwbakteryjne, stosowana w lekach przeciwbiegunkowych (rozkurcza mięśnie gładkie jelit);
- 2) chelidonina – działa na ośrodkowy układ nerwowy, podobnie jak morfina, ale słabiej;
- 3) chelerytryna – działa drażniąco na skórę i błonę śluzową, miejscowo działa znieczulająco;
- 4) sangwinaryna – jest inhibitorem esterazy acetylocholinowej, wykazuje słabe działanie narkotyczne.

Cel ćwiczenia

Identyfikacja wybranych alkaloidów glistnika jaskółcze ziele w surowcu farmaceutycznym „Ziele glistnika” (*Chelidonii herba*) oraz w materiale świeżym.

Zasada metody

Identyfikacja alkaloidów izochinolinowych glistnika jaskółcze ziele za pomocą analizy TLC, na podstawie fluorescencji i współczynników R_f w odniesieniu do substancji porównawczych alkaloidów.

Materiał

korzeń, łodyga i liście glistnika jaskółcze ziele (materiał świeży) oraz surowiec farmaceutyczny „Ziele glistnika” (materiał suszony); surowiec farmaceutyczny powinien odpowiadać wymaganiom monografii farmakopealnej (np. ziele glistnika jaskółcze ziele zebrane w okresie kwitnienia i wysuszone; surowiec nie powinien zawierać mniej niż 0,4% alkaloidów w przeliczeniu na chelidoninę)

Odczynniki

substancje porównawcze: chelerytryna, berberyna, chelidoni-na, sangwinaryna (2 mg w 10 cm³ C₂H₅OH), mieszanina 1-propanol–98% HCOOH–woda (90:1:9; v/v/v), 96% C₂H₅OH

Sprzęt laboratoryjny

lejek szklany, sączki z bibuły, polipropylenowe próbki typu Falcon 15 cm³, pipety (5 mm³–5 cm³), komora chromatograficzna, waga laboratoryjna, łaźnia wodna, moździerz, płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), lampa UV

II.A. PRZYGOTOWANIE WYCIĄGU Z SUROWCÓW

Homogenizować 1 g świeżego (0,5 g suchego) surowca w 5 cm³ alkoholu etylowego. Zawartość moździerza przenieść do próbki typu Falcon i ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze 40°C przez 15 minut. Następnie zawartość przesączyć do suchych próbek.

II.B. BADANIE AKALOIDÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Wykonanie doświadczenia

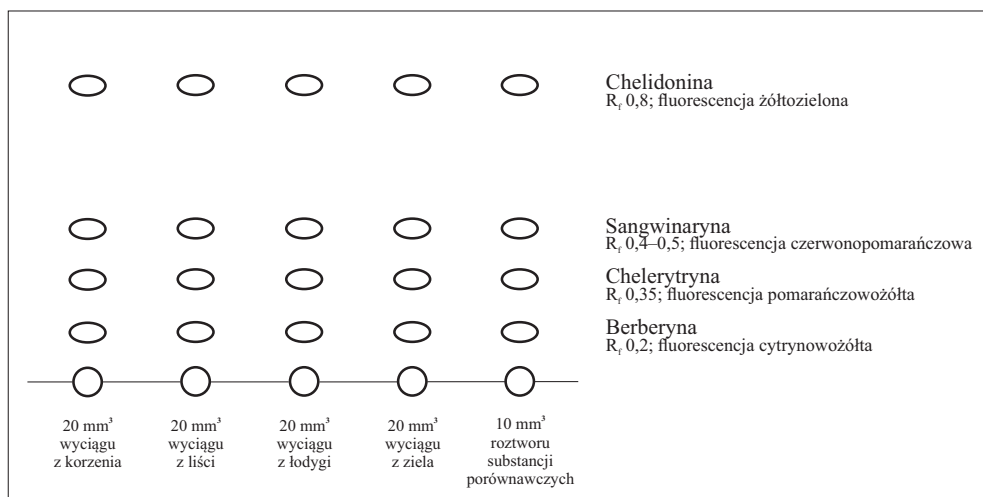
UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B).

1. Na punkty startowe nanieść 20 mm³ wyciągu z surowców i 10 mm³ substancji porównawczych – etanolowe roztwory chelerytryny, berberyny, chelidoniny, sangwinaryny (por. rysunek 21.2).
2. Chromatogram rozwijać w fazie ruchomej o składzie: 1-propanol–98% HCOOH–woda (90:1:9; v/v/v) przez 30 minut.
3. Po wyjęciu chromatogramu zaznaczyć czoło eluentu, a następnie wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Suchy chromatogram oglądać pod lampą UV w nadfiolecie (365 nm) – plamy alkaloidów wykazują żółtą, żółtozieloną, czerwonomarańczową fluorescencję (por. rysunek 21.2).

Rysunek 21.2.

Schematyczny chromatogram wyciągów z glistnika jaskółcze zielen. Na schemacie zaznaczono R_f dla substancji porównawczych wraz z kolorem fluorescencji obserwowanym w nadfiolecie



Opracowanie wyników

Wyznaczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla chelidoniny, berberyny, sangwinaryny i chelerytryny. Porównać otrzymane wyniki pod względem obecności badanych alkaloidów w poszczególnych organach i ziele glistnika.

Literatura

- Kohlmunzer S., *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa 2019.
- Kołodziejczyk A., *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2020.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lamer-Zarawska E., Kowalska-Gierczak B., Niedworok J., *Fitoterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa 2019.
- Wagner H., Bladt S., *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin 1996.