

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA DRNOVŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA DRNOVŠEK

**PRILAGODITEV FITOKEMIJSKIH METOD IDENTIFIKACIJE IZBRANIH
RASTLINSKIH DROG ZA PEDAGOŠKE NAMENE**

**ADAPTATION OF PHYTOCHEMICAL SCREENING METHODS FOR
SELECTED HERBAL DRUGS FOR EDUCATIONAL PURPOSES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na katedri za Farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočevare Glavač, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Nini Kočevare Glavač, mag. farm., za vso pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na katedri za farmacevtsko biologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, sestri Kristini in vsem prijateljem za podporo med študijem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Nine Kočevare Glavač, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Sabina Drnovšek

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
SEZNAM SLIK	viii
SEZNAM PREGLEDNIC	viii
1 UVOD.....	1
1.1 Polisaharidi	1
1.1.2. Homogeni polisaharidi	1
1.1.2 Heterogeni polisaharidi	2
1.1.2.1 Sluzi.....	2
1.1.2.2 Gumiji.....	2
1.1.2.3 Pektini.....	3
1.2 Alkaloidi	3
1.3 Antrakinoni	5
1.4 Flavonoidi	6
1.5 Tanini	10
1.5.1. Hidrolizabilni tanini	10
1.5.2 Kondenzirani tanini	10
1.6 Dokazne reakcije.....	12
1.6.1 Identifikacijski test za arabski gumi.....	12
1.6.2 Test z jodovico	12
1.6.3 Vitali-Morinova reakcija	13
1.6.4 Bornträgerjeva reakcija	14
1.6.5 Shinodova reakcija	15
1.6.6 Metoda vanilin/HCl.....	16

1.7 Vsebnost.....	17
2 NAMEN DELA.....	18
3 MATERIALI	19
3.1 Rastlinski materiali	19
3.2 Kemikalije in reagenti.....	20
3.2.1 Polisaharidi.....	20
3.2.2 Gumiji.....	20
3.2.3 Alkaloidi.....	20
3.2.4 Flavonoidi.....	21
3.2.5 Tanini	21
3.2.6 Antrakinoni.....	21
3.3 Oprema.....	21
4 METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO	23
4.1 Identifikacija za arabski gumi	24
4.2 Identifikacija za polisaharide	24
4.3 Identifikacija za gumije	25
4.4 Identifikacija za alkaloide	26
4.5 Identifikacija za antrakinone.....	27
4.6 Identifikacijski test za flavonoide	28
4.7 Identifikacija za tanine	28
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	30
5.1 Rezultati testov	30
5.2 Test za identifikacijo arabskega gumija.....	33
5.3 Test za dokazovanje gumijev	34
5.4 Identifikacijski test za polisaharide.....	35
5.5 Identifikacijski test za alkaloide	36

5.6 Identifikacijski test za dokazovanje antrakinonov	37
5.7 Identifikacijski test za dokazovanje flavonoidov.....	37
5.8 Identifikacijski test za dokazovanje taninov	38
5.9 Izbor rastlinskih drog za pedagoške namene	40
5.10 Predlog poteka vaje pri Farmakognoziji II	41
6 SKLEPI.....	46
7 LITERATURA	48

POVZETEK

Rastlinske droge vsebujejo fenolne spojine, antrakinone, alkaloide, tanine in polisaharide, v različnih koncentracijah. Farmakopejske fitokemijske identifikacijske metode rastlinskih drog, ki smo jih izvajali, temeljijo na dokazovanju prisotnosti teh snovi.

Namen našega dela je bil preizkusiti različne fitokemijske metode identifikacije na izbranih rastlinskih drogh in nato metode prilagoditi, da bodo primerne za pedagoške namene. Po končanem eksperimentalnem delu smo izbrali šest različnih rastlinskih drog, ki bi bile primerne za identifikacijo pri vajah pri predmetu Farmakognozija II.

Za identifikacijske metode smo izbrali test za dokazovanje škroba z jodovico, test za dokazovanje gumijev, Shinodov test za dokazovanje flavonoidov, test vanilin/HCl za dokazovanje taninov, Vitali-Morinov test za dokazovanje alkaloidov in Bornträgerjevo reakcijo za dokazovanje antrakinonov. Vse identifikacijske metode, razen Shinodovega testa, so predpisane po Evropski farmakopeji.

Glede na dobljene rezultate smo za pedagoške namene izbrali naslednje rastlinske droge: tragakant, tapiokov škrob, zel navadne zlate rozge, korenino rabarbare, list volčje češnje in list čajevca. Določili smo tudi vrstni red izvajanja identifikacijskih metod, ki si sledijo v naslednjem vrstnem redu: test za dokazovanje gumijev, test za dokazovanje škroba z jodovico, Vitali-Morinov test za dokazovanje alkaloidov, Bornträgerjeva reakcija za dokazovanje antrakinonov, Shinodov test za dokazovanje flavonoidov in test vanilin/HCl za dokazovanje taninov.

Ključne besede: fitokemijske metode, identifikacija, rastlinske droge

ABSTRACT

Herbal drugs contain phenolic compounds, anthraquinones, alkaloids, tannins and polysaccharides in various concentrations. Pharmacopoeial phytochemical screening methods of herbal drugs that we have conducted are based on demonstrating the presence of these substances.

The purpose of our work is to test different phytochemical screening methods on selected herbal drugs, and consequently, adapt these methods to be suitable for educational purposes. After completion of the experimental work, six different herbal drugs were selected that would be suitable for practical screening work in the class Pharmacognosy II.

Iodine test for starch, test for gums, Shinoda's test for flavonoids, vanillin-HCl procedures for tannins, Vitali-Morin's test for alkaloids, and Bornträger's reaction for anthraquinones were used as the screening methods. All screening methods, except the Shinoda's test, are prescribed by the European Pharmacopoeia.

Given the results, the following herbal drugs have been selected for educational purposes: tragacanth, tapioca starch, common goldenrod, rhubarb root, leaf of *Atropa belladonna* and leaf of tea plant. The order of implementation of screening methods has been also determined as follows: test for gums, iodine test for starch, Vitali-Morin's test for alkaloids, Bornträger's reaction for anthraquinones, Shinoda's test for flavonoids, and vanillin-HCl procedures for tannins.

Keywords: phytochemical methods, screening, herbal drugs

SEZNAM OKRAJŠAV

Lat. - latinsko

SEZNAM SLIK

Slika 1: Strukturi amiloze in amilopektina (2)	2
Slika 2: Oksidacija in dimerizacija antrona–prirejeno po (9).....	6
Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (14)	7
Slika 4: Kemijska zgradba flavonoidnih aglikonov– prirejeno po (15)	9
Slika 5: Kondenzirajoči tanini–prirejeno po (18)	11
Slika 6: Kompleks amiloza-jod (21).....	12
Slika 7: Mehanizem Vitali-Morinove reakcije (23)	13
Slika 8: Mehanizem Bornträgerjeve reakcije (22).....	14
Slika 9: Mehanizem Shinodove reakcije (8).....	15
Slika 10: Reakcija med vanilinom in flavan-3-olom (28)	16
Slika 11: Ekstrakcija antrakinonov v liju ločniku–rdečevijoličasto obarvanje vodne faze.	28
Slika 12: Segrevanje na vodni kopeli pod refluksom	29
Slika 13: Prikaz rezultatov testa za dokazovanje gumijev pri bračiču (vzorec 1), alginatu (vzorec 2), tapiokovem škrobu (vzorec 3), koruznem škrobu (vzorec 4) in tragakantu (vzorec 5)	34
Slika 14: Prikaz rezultatov testa za dokazovanje škroba pri tapiokovem škrobu (vzorec 1), riževem škrobu (vzorec 2), koruznem škrobu (vzorec 3) ter listu sene (vzorec 4)	35
Slika 15: Pozitivna reakcija za volčjo češnjo pri Vitali-Morinovem testu	36
Slika 16: Pozitivni rezultat Bornträgerjeve reakcije za rabarbaro (vzorec 1) in krhliko (vzorec 2).....	37
Slika 17: Rezultati testa vanilin/HCl za šentjanževko (vzorec 1), rman (vzorec 2), brezo (vzorec 3) in ajdo (vzorec 4).....	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati identifikacijskih testov	30
---------------------------------------------------------	----

1 UVOD

1.1 Polisaharidi

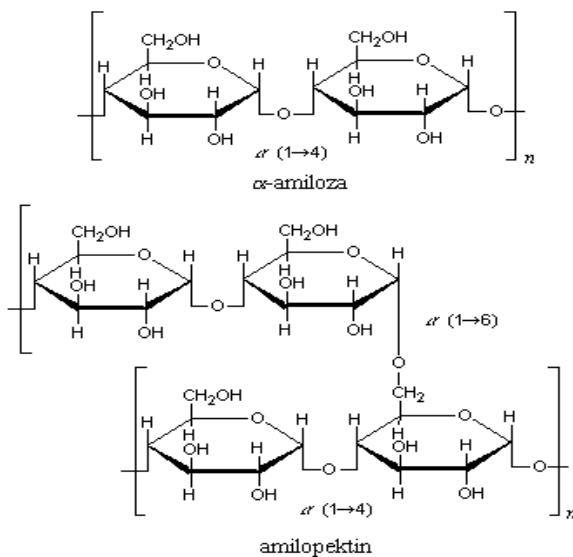
Polisaharidi ali glikani so naravne molekule, ki se nahajajo v živih organizmih. Sestavljeni so iz večjega števila monosaharnih molekul, ki so med seboj povezane z glikozidnimi vezmi. Polimeri so lahko linearni ali razvejeni. V živih organizmih imajo različne vloge; lahko so rezervna energija, ogrodni material in ščitijo tkiva pred dehidracijo (1).

Delitev polisaharidov:

- homogeni polisaharidi,
- heterogeni polisaharidi (1).

1.1.2. Homogeni polisaharidi

Homogene polisaharide sestavlja več enakih monosaharidov. V to skupino spadata škrob in celuloza. Škrob je sestavljen iz amiloze in amilopektina (slika 1). Amilozo gradijo D-glukozne enote, ki so med seboj povezane z glikozidnimi vezmi $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Večji delež škroba predstavlja amilopektin, ki je razvejen polimer iz D-glukoze, povezane z glikozidnimi vezmi $\alpha(1 \rightarrow 4)$ in vezmi $\alpha(1 \rightarrow 6)$. V hladni vodi zrnca škroba niso topna, sprejmejo pa veliko količino vode. Pri temperaturi 55 – 60 °C zrnca nabrekajo in tvorijo gel (1).



Slika 1: Strukturi amiloze in amilopektina (2)

1.1.2 Heterogeni polisaharidi

Heterogene polisaharide tvorijo različne monosaharidne enote. V to skupino spadajo sluzi, gumiji in pektini (1).

1.1.2.1 Sluzi

Najdemo jih pri skoraj vseh vrstah rastlin, navadno v majhnem deležu. Sestavljajo celične stene alg, medtem ko se pri višjih rastlinah nahajajo znotraj celic. V rastlinah predstavljajo rezervno hrano, pomagajo pri shranjevanju vode in kalitvi semen. Kemijsko so enostavnejše in čistejše kot gumiji. Z vodo dajejo nelepljive sluzave raztopine (1).

Sluzi uporabljamo v medicini kot odvajala in diuretike ter v kozmetiki kot zgoščevala (3).

1.1.2.2 Gumiji

Gumiji so rastlinski eksudati, ki nastanejo kot posledica bakterijskega ali glivičnega delovanja pri mehanski poškodbi rastlin (3). Večinoma so topni v vodi in tvorijo viskozne raztopine. Nekateri so popolnoma netopni in tvorijo gele. Razredčene raztopine gumijev se po dodatku etanola oborijo. Večina gumijev je delno metiliranih ali acetiliranih. Najdemo jih zlasti v naslednjih družinah: Mimosaceae (mimozoevke), Rosaceae (rožnice), Combretaceae (kombretovke), Burseraceae (mirovke) in Rutaceae (rutičevke). Primeri gumijev kot rastlinskih drog so arabski gumi, tragakant in gvarjev gumi (1).

1.1.2.3 Pektini

Pektini so rastlinski linearni polimeri, ki imajo osnovno verigo sestavljeno iz D-galakturonskih kislin, povezanih z glikozidnimi vezmi $\alpha(1\rightarrow4)$. Sestavlajo celične stene in prispevajo k njihovim številnim funkcijam; imajo naprimer vlogo pri ionskem transportu, zadrževanju vode in določajo velikost por v celičnih stenah (4).

Pektin je v vodi netopen, topnost pa mu pada z metiliranjem. Raztopine pektina so zelo viskozne (1).

V farmacevtski tehnologiji jih uporabljammo kot stabilizatorje vodne faze ali emulzije in gelirna sredstva (1).

1.2 Alkaloidi

Alkaloidi so heterociklične spojine z zapleteno sestavo, ki vsebujejo dušik ter lahko tvorijo soli, ki so topne v vodi (6, 7, 8). Njihova molekulska masa je od 100 do 900 (1). Najpogosteje so shranjeni v vakuolah ali mlečnih žlezah v perifernih tkivih (semenski ovojnici, zunanjih delih korenine ali skorji debla) (8). Običajno so v rastlinah v obliki vodotopnih soli (malatov, citratov, tartratov, benzoatov) ali v kombinaciji s tanini. Večina jih je v obliki kristalne nehlapne trdne snovi, topni so v dietiletru, etanolu, kloroformu, medtem ko so v vodi navadno netopni. Nekateri alkaloidi so tudi v tekoči obliki, na primer nikotin. Njihove značilne lastnosti so, da so grenkega okusa, brez barve in optično aktivni. Večina od njih je levosučnih (5).

Vlogo alkaloidov v rastlinah je težko opredeliti. Domnevajo, da so to strupene snovi, ki ščitijo rastline pred rastlinojedci in insekti, so končni produkti metabolizma, regulirajo rast in predstavljajo rezervo dušika (3).

Razvrstitev alkaloidov temelji na osnovi heterociklov, ki so prisotni v strukturi (na primer pirolidin, piperidin, pirol, indol, kinolin), ali na osnovi biosinteznega izvora alkaloidov (3).

Glede na biosintežni izvor jih delimo na:

- prave alkaloide,
- psevdoalkaloide,
- protoalkaloide (7).

Pravi alkaloidi nastajajo iz aminokislin in vsebujejo dušik, ki je del heterocikličnega sistema. Sem sodijo na primer atropin, kokain in hioscin (6). Psevdoalkaloidi ne nastajajo iz aminokislin. Predstavnika sta solanidin in akonitin (6). Večina jih spada med izoprenoide in jih imenujemo terpenoidni alkaloidi (1). Protoalkaloidi nastajajo iz aminokislin in so enostavni amini, kjer dušikov atom ni del heterocikličnega sistema (1, 7). Mednje uvrščamo meskalin, efedrin in muskarin (6). Določenih spojin, kot so recimo kolhicin ter purinski derivati (kofein, teofilin, teobromin), ne moremo uvrstiti v zgornje tri skupine, vendar jih kljub temu uvrščamo med alkaloide (8).

Alkaloidi so najpogosteje v kritosemenkah, in sicer v družinah: Amaryllidaceae (narcisovke), Liliaceae (lilijevke), Apocynaceae (pasjestrupovke), Rubiaceae (broščevke), Solanaceae (razhudnikovke), Loganiaceae (strihnovke), Papaveraceae (makovke), Ranunculaceae (zlatičnice), Lauraceae (lovrovke) in Fumariaceae (rosničevke) (8). Pri golosemenkah vsebujeta alkaloide le rodova *Cephalotaxus* in *Ephedra*, pri praprotnicah pa rod *Lycopodium* (8). Izjemoma so tudi v bakterijah in glivah (1).

Na centralni živčni sistem delujejo zaviralno (morphin, skopolamin) ali kot stimulanti (kofein, strihnin). Na avtonomni živčni sistem delujejo kot simpatomimetiki (efedrin), simpatolitiki (johimbin), ganglioplegiki (nikotin), parasimpatolitiki (atropin) in parasimpatomimetiki (pilocarpin, fizostigmin). Nekateri alkaloidi delujejo tudi lokalno-anestetično (kokain), protitumorno (vinblastin), antimalarično (kinin), amebicidno (emetin) in protibakterijsko (berberin) (1).

S kovinskimi ioni (bizmutovimi, živosrebrovimi ioni ter volframati) tvorijo netopne komplekse, s kislinami pa netopne soli (pikrinska ter taninska kislina). Kot obarjalna reagenta za alkaloide uporabljamo Mayerjev reagent (raztopina kalijevega jodida in živosrebrovega(II) klorida) ter Dragendorffov reagent (bizmutov nitrat in kalijev jodid), vendar omenjena reagenta nista specifična. Dragendorffov reagent na primer tvori netopne komplekse tudi s proteini, hidroksiflavoni in nekaterimi kumarini (1, 8). Za natančnejše

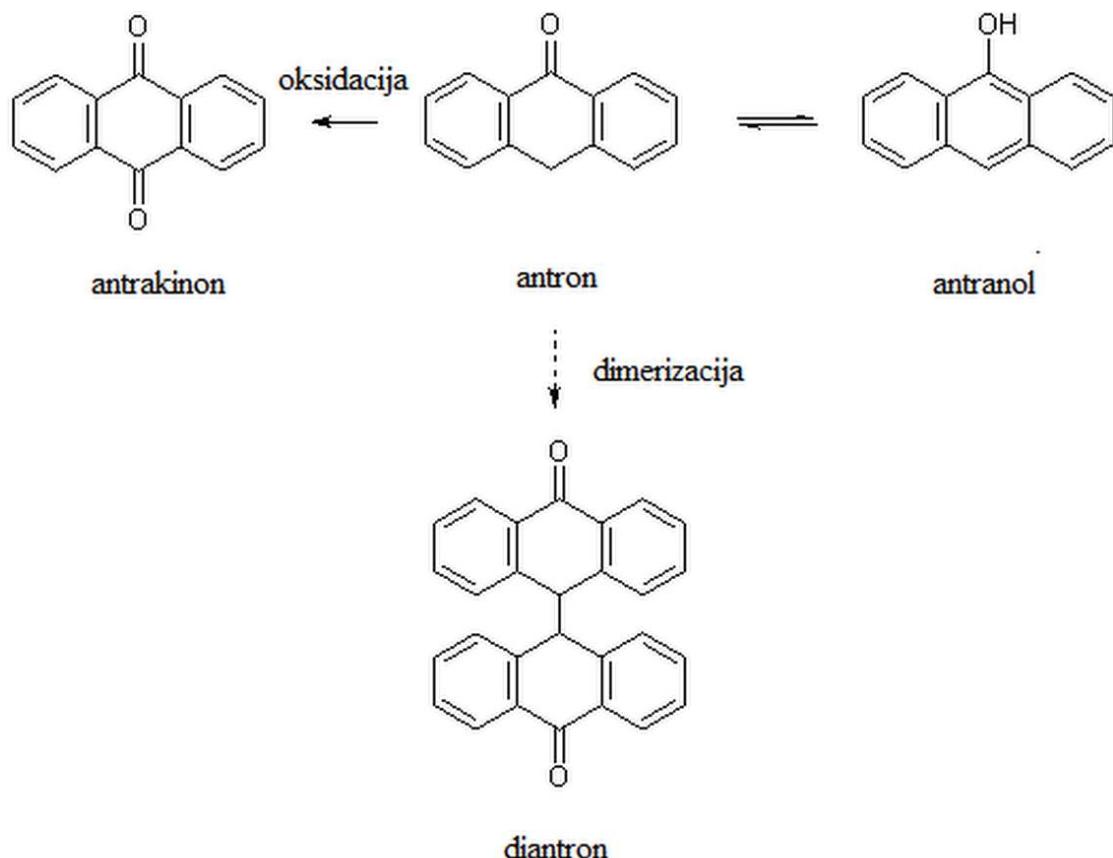
določevanje alkaloidov uporabljamo reagente, ki z alkaloidi tvorijo obarvane komplekse (naprimer Vitali-Morinova reakcija, ki jo uporabljamo za določevanje estrov tropa kisline) (8).

1.3 Antrakinoni

Antrakinoni so derivati 1,8-dihidroksiantrakinona. V rastlinah so v obliki glikozidov ali prostih antrakinonskih derivatov. Sladkorji, ki ponavadi sestavlajo glikozide, so glukoza, ramnoza in apioza (1). Ker so antroni nestabilni, so proste aglikonske oblike vedno v obliki antrakinonov. Večinoma so rumene barve, lahko pa so tudi oranžni, rdeči ali vijoličasti (8). Prisotni so v družinah: Liliaceae (lilijevke), Polygonaceae (dresnovke), Rhamnaceae (krhlikovke) in Caesalpinaceae (rožičevke) (1).

Antrakinoni imajo odvajalni učinek. Aglikoni so neaktivni, absorbirajo se v tankem črevesju in se izločajo z urinom. Rastlinske droge z antrakinoni so primerne za uporabo le po daljšem skladiščenju ali po ustrezni toplotni obdelavi, pri čemer se glikozidi monomernih antronov oksidirajo do antakinonov (slika 2) (1).

Sestava antrakinonskih spojin v svežih in suhih rastlinah je različna. V svežih rastlinah so predvsem glikozidi monomernih antronov. Med sušenjem rastlin pride do oksidacije, pri čemer se antroni pretvorijo v antrakinonske glikozide, ali pa do dimerizacije in nastanka diantronov (1).



Slika 2: Oksidacija in dimerizacija antrona–prirejeno po (9)

Antrakinoni so topni v organskih topilih in v alkoholnih raztopinah, v hladni vodi so zmerno topni. Z alkalno hidrolizo cepimo O-glikozide, C-glikozide pa ob prisotnosti železovega(III) klorida (1).

1.4 Flavonoidi

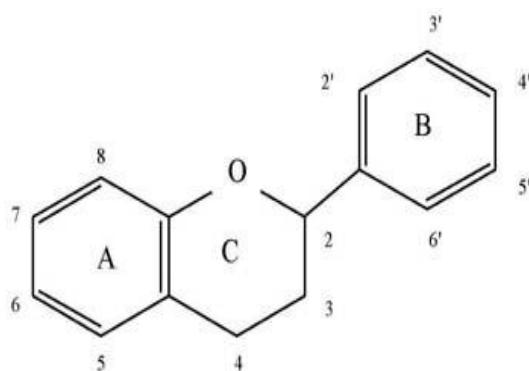
Flavonoidi so polifenolne spojine, ki nastajajo v rastlinah kot sekundarni metaboliti (10). V naravi se pojavljajo kot aglikoni, pogosteje pa so v obliki vodotopnih glikozidov z različnimi sladkorji, predvsem v cvetovih, listih in plodovih (11). V celicah so raztopljeni v vakuolah. Sladkorni del glikozidov je lahko sestavljen iz molekul glukoze, galaktoze, aloze, apioze, arabinoze, ramnoze, ksiloze, glukuronske ali galakturonske kisline. Najpogosteje so v obliki O-glikozida, kjer sta aglikon in sladkorna komponenta med seboj povezana preko hidroksilne skupine flavona na mestu C-7 ali C-3. V rastlinah so tudi C-

glykozidi, vendar so manj pogosti. Sladkorni del in aglikon sta v tem primeru povezana preko ogljika na mestu C-6 ali C-8 (12).

Večina flavonoidov je obarvanih in imajo v rastlinah vlogo pigmenta, nekateri pa so tudi brezbarvni (8). Njihova naloga je, da privabljajo opraševalce, ščitijo rastline pred škodljivimi insekti in pred žarki UV-B, uravnavajo rast in zavirajo delovanje različnih encimov (13).

Flavonoidi imajo številne pozitivne biološke učinke. Izkazujejo antioksidativno, protivnetno in protitumorno delovanje. Ugodno vplivajo na krvožilni sistem, saj zmanjšajo krhkost in prepustnost kapilar (13). V raziskavah so dokazali, da imajo pozitivne učinke pri hipertenziji, srčno-žilnih boleznih, slatkornih bolezni, astmi, alergiji, rakavih obolenjih, vnetjih, hiperholisterolemiji in vnetju (12). V terapevtske namene jih uporabljamo predvsem za zdravljenje insuficience venskih in limfnih žil ter akutnih hemoroidov in zmanjšanje krhkosti kapilar (8).

Uvrščamo jih med fenolne spojine. Zgrajeni so iz 15 ogljikovih atomov, ki so urejeni v difenilpropansko strukturo ($C_6-C_3-C_6$) (slika 3). Levi obroč v 2-fenilkromen-4-onski enoti označujemo z A, desnega z B, medtem ko je heterociklični obroč med njima obroč C (10) (slika 3).



Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (14)

Glede na strukturo aglikonskega dela (obroč C) jih delimo na (slika 4):

- flavone,
- flavanole (sem spadajo flavan-3-oli),
- flavonone,
- flavonole,
- izoflavone,
- halkone,
- antocianidine (12).

Flavoni imajo za osnovno molekulsko strukturo 2-fenilkromen-4-on, od flavonolov pa jih ločimo po tem, da na mestu 3 nimajo hidroksilne skupine; pri obojih se v obroču C med C₂ in C₃ nahaja dvojna vez (10).

Flavanoni in flavanonoli imajo v obroču C med C₂ in C₃ nasičeno vez, na mestu 4 pa je prisotna ketonska skupina. Flavanonoli se od flavanonov razlikujejo po tem, da imajo na mestu 3 substituirano hidroksilno skupino. Osnovna kemijska struktura flavanonolov je 3-hidroksi-2,3-dihidro-2-fenilkromen-4-on, flavanonov pa 2,3-dihidro-2-fenilkromen-4-on (10).

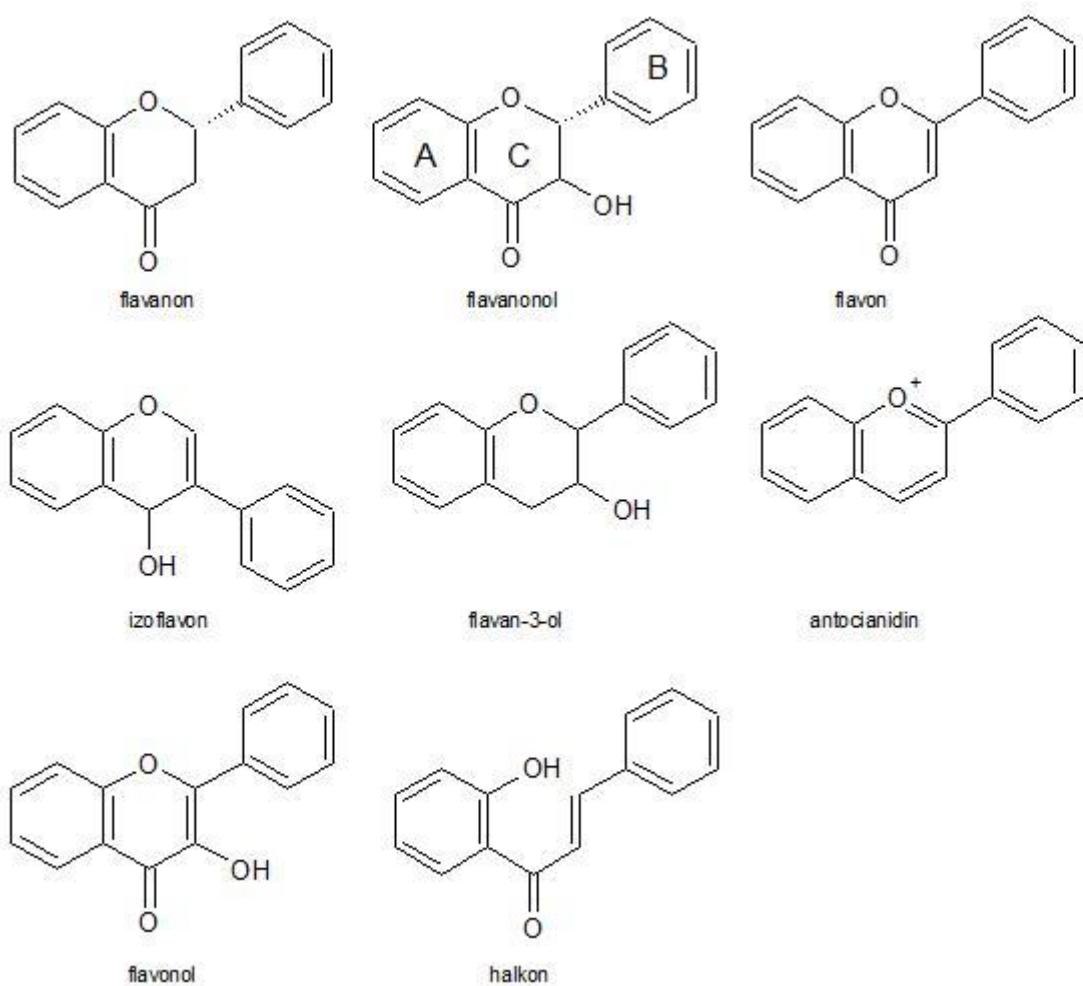
Antocianini so vodotopni pigmenti, ki so v vakuolahobarvanih delov rastlin. Dajejo jim rdečo, vijoličasto, modro ali rožnato barvo (1, 10). Lahko so v obliki glikozidov (antocianini) ali aglikonov (antocianidini) (10). Antocianidini izhajajo iz flavinijevega kationa ali 2-fenilkromenilija (1).

Halkoni so rumeni fenolni pigmenti. Zanje je značilna linearna veriga iz treh ogljikovih atomov in eno dvojno vezjo, ki povezuje dva benzenova obroča (slika 4). Znani so kot prekurzorji za večino flavonoidov (10).

Flavan-3-oli so flavonoidi z nasičeno vezjo med C₂ in C₃ v obroču C (10). Najbolj značilna predstavnika sta katehin in epikatehin (11). V naravi so v obliki aglikonov ali aglikonskih polimerov. Za razliko od ostalih flavonoidov se ne pojavljajo v obliki glikozidov (10).

Izoflavoni spadajo med izoflavonoide, ki imajo za osnovno strukturo skeleta 3-fenilkroman. Izoflavoni se v naravi pogosteje nahajajo kot aglikoni, redkeje pa kot glikozidi (O-glikozidi ali izjemoma C-glikozidi) (1).

Glikozidi flavonoidov so topni v vodi in alkoholih. Aglikoni so večinoma topni v nepolarnih organskih topilih. Aglikone najpogosteje ekstrahiramo pri visokih temperaturah, z mešanico vode in acetona ali alkoholov (etanola, metanola). Pri ekstrakciji s petroletrom odstranimo lipide in klorofil, z dietiletrom ekstrahirano proste aglikone, medtem ko etil acetat raztaplja večino polarnih glikozidov (1).



Slika 4: Kemijkska zgradba flavonoidnih aglikonov– prirejeno po (15)

1.5 Tanini

Tanini so polifenolne spojine z molekulsko maso od 500 do 3000, ki obarjajo alkaloide, želatino in druge proteine (1). Z beljakovinami (makromolekulami) se lahko povezujejo reverzibilno ali irreverzibilno. Njihov adstringentni učinek pojasnimo s tem, da se tanini na površini kože ali sluznice reverzibilno povezujejo z beljakovinami in tvorijo vodikove vezi ali hidrofobne interakcije. V primeru irreverzibilnih interakcij nastanejo stabilne kovalentne vezi, predvsem po oksidaciji fenolov do kinonov (1, 16). Njihov trpek okus je posledica obarjanja glikoproteinov v slini, ki izgubi svoje lubrikativne lastnosti (1). V celicah so skoncentrirani v vakuolah. Nahajajo se v listih, koreninah, lubju in drugih delih rastlin (1).

Pripravki iz rastlin, ki vsebujejo tanine, delujejo adstringentno. Notranje jih uporabljamo kot antidiarioike, zunanje pa kot antiseptike (8). Imajo šibko protibakterijsko in protigliivično delovanje, raziskovalci pa so opazili, da dobro zavirajo nekatere viruse (3).

Glede na kemijsko sestavo jih delimo v štiri skupine:

- hidrolizabilni tanini,
- kondenzirani tanini,
- mešani tanini in
- druge spojine (8).

1.5.1. Hidrolizabilni tanini

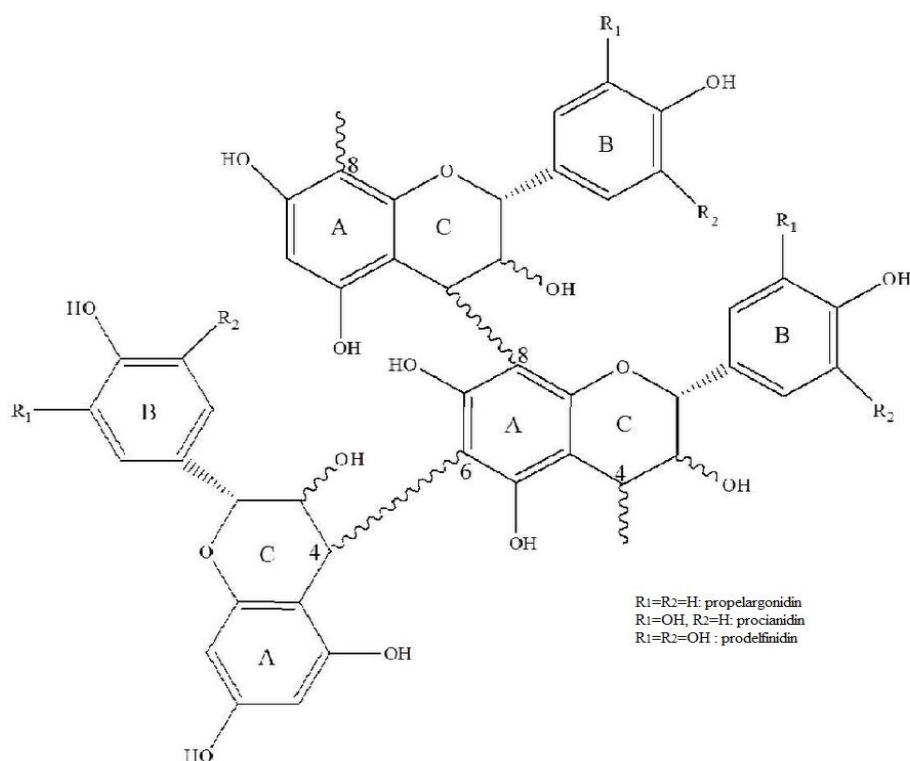
Hidrolizabilni tanini so zmesi estrov sladkorja in različnega števila molekul fenolnih kislin (8). Galotonini vsebujejo galno kislino, elagotanini pa heksahidroksidifensko kislino ali oksidirano obliko dehidroheksahidroksidifensko kislino (1).

1.5.2 Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini so sekundarni rastlinski metaboliti, ki jih imenujemo tudi proantocianidini. V naravi so bolj razširjeni kot hidrolizabilni tanini. Nastajanje oligomerov in polimerov izhaja iz flavan-3,4-diolov. Molekule so zelo reaktivne, zaradi -OH skupine na mestu 4, katera privede do nastanka karbokationa, ki nato reagira z nukleofilnim C-8 ali C-6 flavan-3-ola. Tako najprej nastane dimer, z nadaljno vezavo novih molekul pa oligomeri in polimeri (1, 3, 17).

Glede na to, kakšen antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju, kondenzirane tanine delimo na (slika 5):

- procianidine,
- prodelfinidine,
- propelargonidine (1).



Slika 5: Kondenzirajoči tanini–prirejeno po (18)

Z železovimi(III) solmi tvorijo galotanini in elagotanini modro obarvane komplekse, medtem ko dajejo kondenzirani tanini zelenorjave komplekse. Galotonini tvorijo s kalijevim jodatom(V) rožnato obarvan kompleks. Elagotanini se ob prisotnosti ocetne in dušikove(III) kisline obarvajo najprej rožnato, čez čas pa modro (1).

1.6 Dokazne reakcije

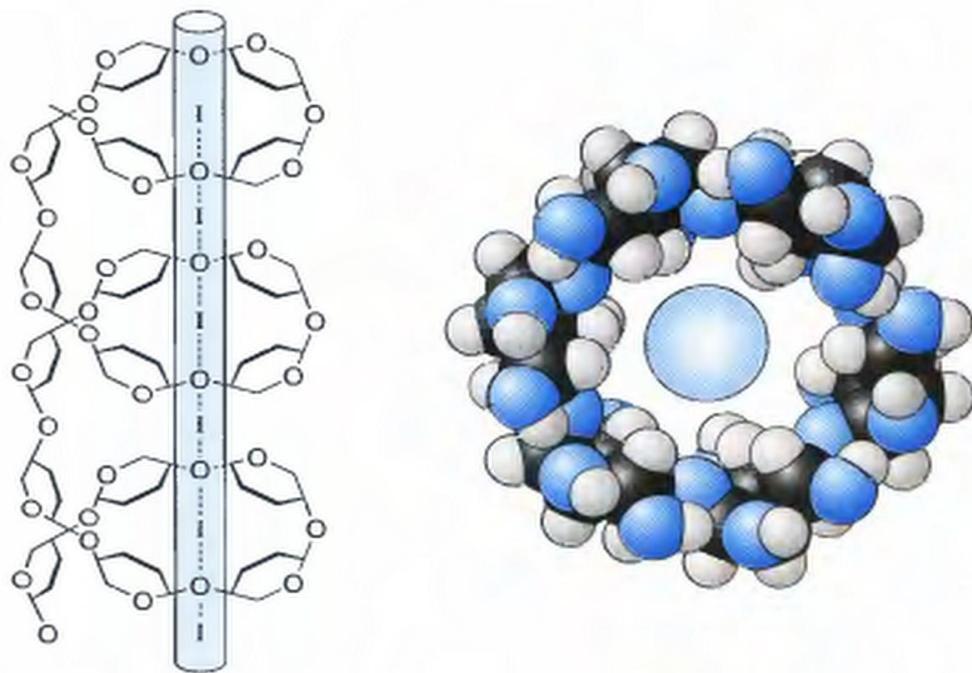
1.6.1 Identifikacijski test za arabski gumi

Arabski gumi je na zraku posušen izloček, ki ga pridobivajo iz drevesa *Acacia senegal* in drugih vrst akacie, tako da zarežejo v deblo ali veje drevesa. Drogo sestavljajo predvsem kalcijeve, kalijeve in magnezijeve soli arabinske kisline (1). V vodi se počasi raztoplja pri sobni temperaturi (19).

Kadar arabskemu gumiju dodamo alkohol ali alkoholno raztopino, ki predstavlja več kot 35 odstotkov celotnega volumna, nastane oborina (19).

1.6.2 Test z jodovico

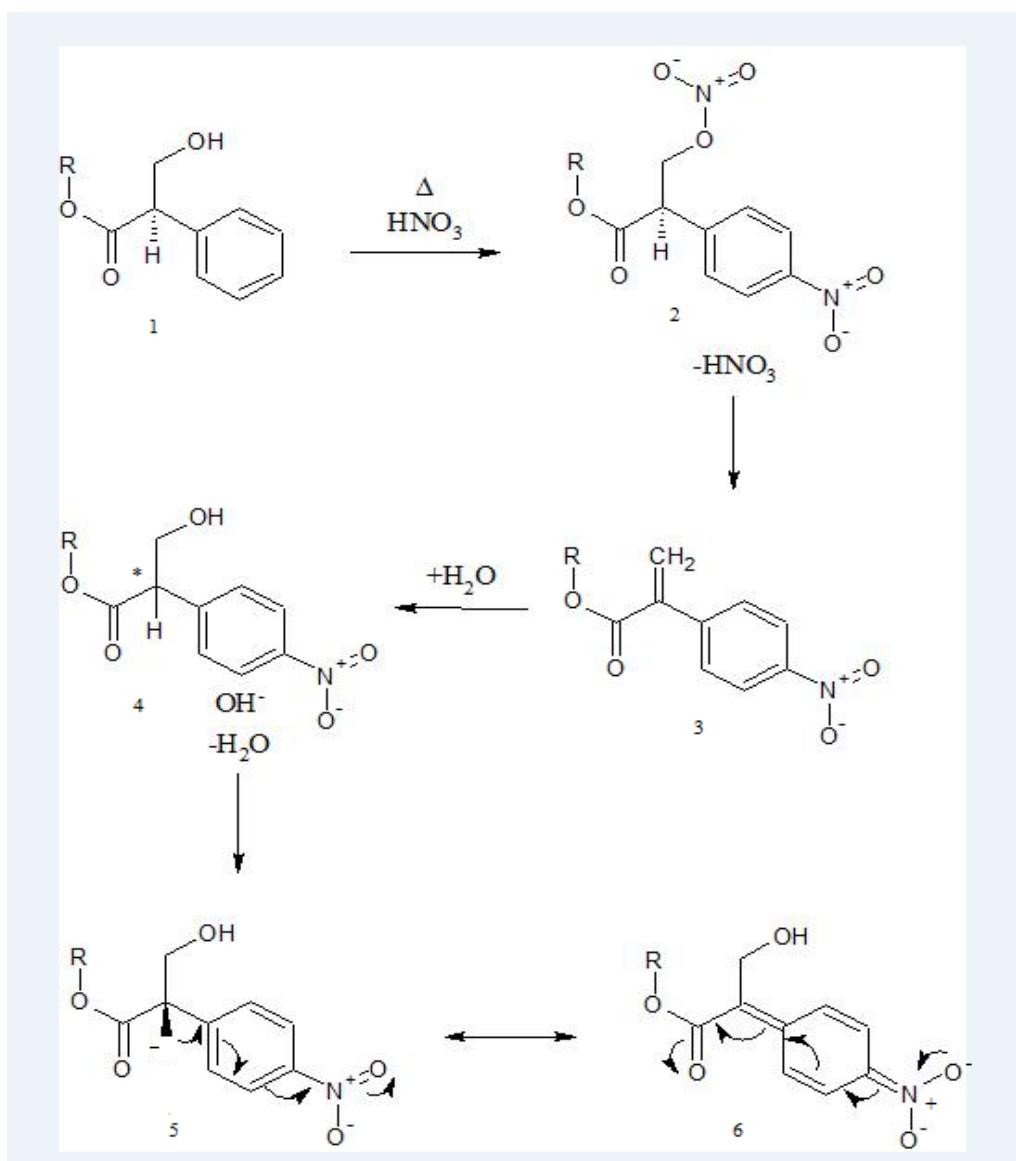
Prisotnost škroba v rastlinah dokazujemo z jodovico, in sicer pride do modrega obarvanja raztopine. Škrob je zgrajen iz amiloze in amilopektina. Modro obarvanje se pojavi samo v amilozi, kar je posledica vgraditve joda v vijačnico amiloze (slika 6). Amilopektin je visoko razvejena struktura in daje z jodom vijoličastordečo ali rjavordečo barvo. Na koncentracijo prostega joda vplivata temperatura in dolžina vijačnice (20, 21).



Slika 6: Kompleks amiloza-jod (21)

1.6.3 Vitali-Morinova reakcija

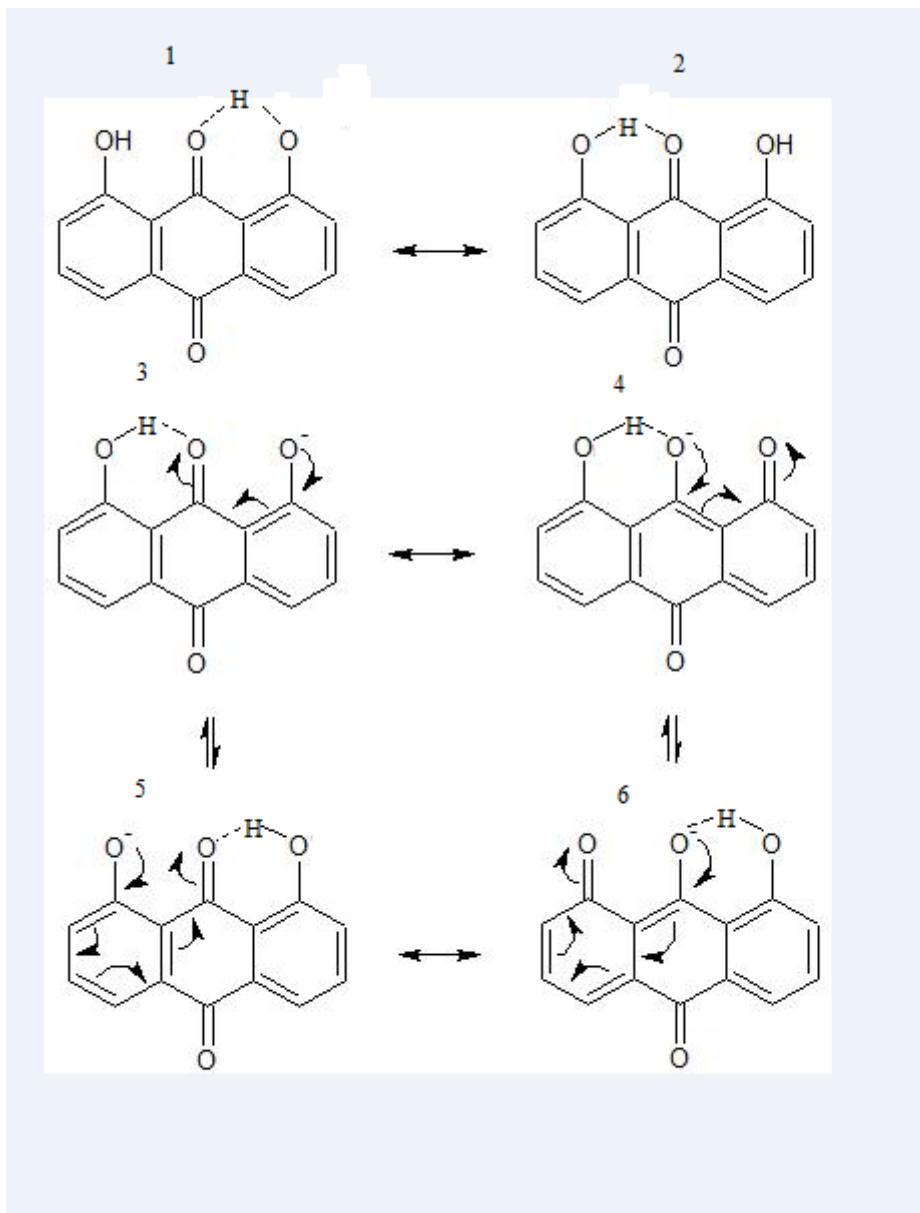
Vitali-Morinovo reakcijo uporabljamo za določitev alkaloidov oziroma estrov tropa kisline, vendar ni specifična. Njen mehanizem prikazuje slika 7. Pri izparevanju kadeče se dušikove(V) kisline pride na aromatskem obroču na mestu 4 do nitriranja in sočasno do zaestrenja hidroksilne skupine (nastane spojina 2). V vodni raztopini, predvsem v kislem okolju, je spojina 2 zelo nestabilna in se pretvori v spojino 3. V alkalni raztopini obda spojino 3 voda oziroma hidroksidni anion in nastane spojina 4. V alkalnem mediju se pojavi stabiliziran anion 5, ki se obarva vijoličasto. Barva lahko zaradi hidrolize estra zbledi (23).



Slika 7: Mehanizem Vitali-Morinove reakcije (23)

1.6.4 Bornträgerjeva reakcija

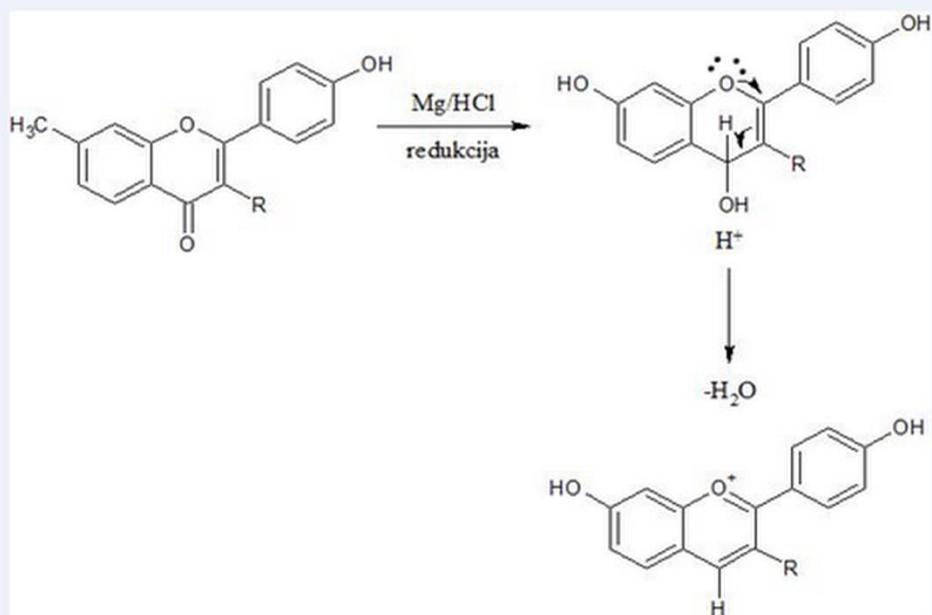
Z Bornträgerjevo reakcijo dokazujemo 1,8-dihidroksiantrakinonske derivate. Reakcija je pozitivna samo za proste oblike antrakinonov. V primeru prisotnosti glikozidov je potrebna hidroliza z razredčeno HCl. Kadar je kot aglikon prisoten antron, ga moramo oksidirati z železovim(III) kloridom. Pri keto obliki lahko zaradi intramolekularnih vodikovih vezi nastane dodatni navidezni obroč (spojini 1 in 2) (slika 8). Nevtralna raztopina je rumeno-oranžne barve. Ker v alkalni raztopini nastanejo stabilizirane mezomerne oblike fenolata, se raztopina obarva rdeče (spojine 3, 4, 5 in 6) (1, 23).



Slika 8: Mehanizem Bornträgerjeve reakcije (22)

1.6.5 Shinodova reakcija

Shinodov test je občutljiv barvni test za dokazovanje prisotnosti flavonoidov (24). Ko alkoholnemu izvlečku rastlinskega materiala dodamo elementarni magnezij in koncentrirano klorovodikovo kislino, se skoraj takoj pojavi rdeča, oranžna, škrlatna ali vijoličasta barva, ki nakazuje prisotnost flavonov, flavanonov, flavonolov in flavanonolov. Nekateri flavanoni lahko dajejo modro ali zeleno barvo (25). Razvoj barve je posledica reduksijske pretvorbe flavona v ustrezni antocianidni pigment (slika 9) (24). Intenzivnost obarvanja je deloma odvisna od koncentracije flavonoidov v izvlečku. Ponavadi flavoni dajejo oranžno do rdečo barvo, flavonoli rdečo do vijoličasto in flavanoni intenzivno rdečo do škrlatno (25). Namesto magnezija lahko uporabimo tudi elementarni cink, vendar v tem primeru flavanonoli dajo intenzivno rdečo barvo, flavanoni in flavonoli pa šibko rožnato do vijoličasto barvo ali se celo ne obarvajo (26).

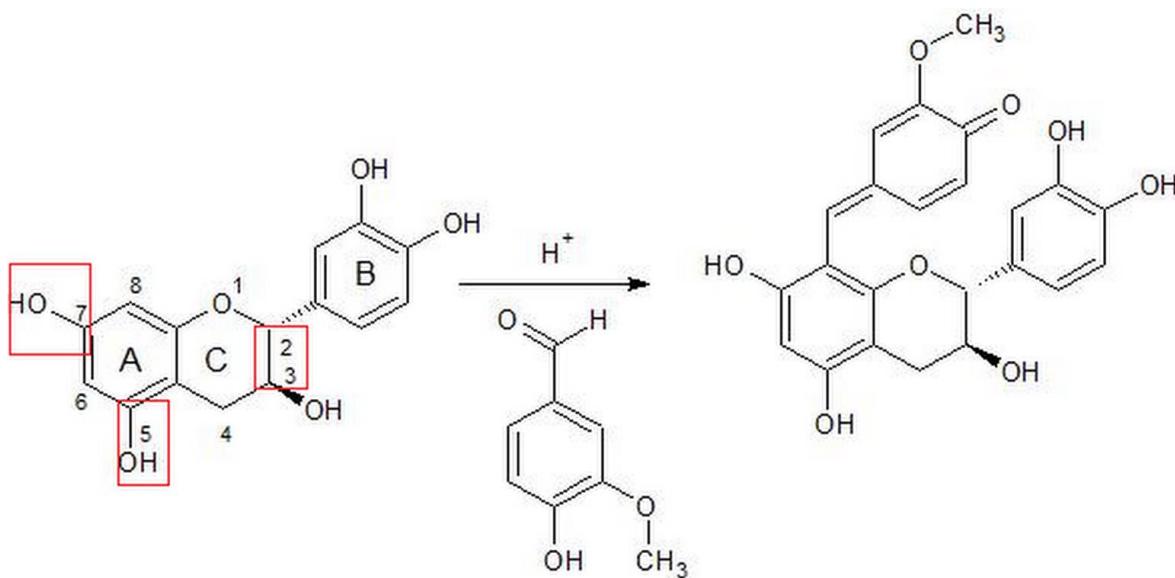


Slika 9: Mehanizem Shinodove reakcije (8)

1.6.6 Metoda vanilin/HCl

Metodo vanilin/HCl uporabljamo za določevanje proantocianidinov, vendar ni specifična (28). Vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid) se v kisli raztopini protonira in nastane šibko elektrofilni karbokation, ki reagira z *m*-substituiranim obročem flavanolov in tvori rdeče obarvan produkt (slika 10) (27).

Karbonilni kisik v aldehidu se v močno kislih raztopinah protonira, zato lahko tvori karbokatione. V benzaldehidu je elektrofilnost zmanjšana zaradi delokalizacije pozitivnega naboja. Ugotovili so, da dajejo pozitivno reakcijo flavonoidi z enojno C₂-C₃ vezjo, na mestu C₄ ne sme biti karbonilne skupine, na mestu C₇ mora biti prosta hidroksilna skupina, medtem ko mora biti v obroču A prosta hidroksilna skupina v *meta* položaju prosta. Hidrolizabilni polifenoli ne dajejo pozitivne reakcije, nekatere spojine pa dajejo lažno pozitivno reakcijo (29).



Slika 10: Reakcija med vanilinom in flavan-3-olom (28)

1.7 Vsebnost

Identifikacijski testi, ki smo jih izvedli, temeljijo na dokazovanju prisotnosti polisaharidov, gumijev, alkaloidov, antrakinonov, taninov in fenolnih spojin.

Med rastlinske droge, ki vsebujejo gumije, uvrščamo tragakant in arabski gumi. Sluzi vsebujejo laneno seme, steljka islandskega lišaja, alginat, agar in karagen, cvetovi lipe, listi sene. Škrob se nahaja v številnih rastlinskih drogah, v večjih količinah pa je v tapiokovem, riževem in koruznem škrobu, v steljki islandskega lišaja (1).

Antrakinoni so rastlinski sekundarni metaboliti, ki nastajajo le v določenih rastlinskih drogah. Med njimi so skorja krhlike, ki vsebuje 6–8% antrakinonskih glikozidov, listi sene, ki vsebujejo 3,5–5,5% antrakinonov in korenina rabarbare (2–5% antrakinonov) (1, 34). V literaturi je navedeno, da zel šentjanževke vsebuje 0,06–0,15% dimernih antrakinonov, ki jih imenujemo hipericini (1). Med rastlinske droge, ki vsebujejo antrakinone štejemo še alojin sok, ki vsebuje 15–40% hidroksiantrakinonskih derivatov, vendar pa ga v okviru našega magistrskega dela nismo uporabili (1).

Alkaloidi, se enako kot antrakinoni, nahajajo samo v določenih rastlinskih vrstah. Med rastlinskimi drogami, ki smo jih uporabili, jih vsebujeta list volče češnje (0,3–0,6%) in list navadnega kristavca (1).

Flavonoidi so polifenolni rastlinski pigmenti, ki so prisotni v številnih rastlinah. Po literaturnih podatkih je v zeli navadnega rmania 10,2% flavonoidov, v listih ginka 22–27%, v zeli zlate rozge 1,5–2,4%, zel navadne ajde vsebuje 2–10% rutina, ki spada med flavonoide. V nekaterih rastlinah so prisotni v malo manjših količinah, na primer v zeli šentjanževke je njihova vsebnost 0,3–1,6%, v listih breze 1–3%, v plodu pegastega badlja 1,5–3%, v korenini sladkega korena 0,65–2% in cvetu lipe 1%. Najdemo jih tudi v listih čajevca, listih sene, koreninah rabarbare, skorji krhlike in cvetovih ognjiča (1, 12, 35).

Skorja hrasta lahko vsebuje 8–20% taninov. Odstotek je odvisen od letnega časa in starosti drevesa. Tanine najdemo tudi v skorji virginijskega nepozebnika (do 12%), predvsem galotanine, v listih čajevca (30–45%) in v korenini rabarbare (4–11%). V listih šentjanževke je lahko 10–30 g taninov (na 100 g suhe snovi) (8, 36). Najdemo jih tudi v cvetu lipe, zeli zlate rozge in listu navadne breze (8).

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo prilagodili fitokemijske metode identifikacije različnih rastlinskih drog z namenom, da bodo uporabne za pedagoške namene pri predmetu Farmakognozija II.

Osredotočili se bomo na dokazovanje prisotnosti polisaharidov, alkaloidov, taninov, antrakinonov in fenolnih spojin, kot predpisuje Evropska farmakopeja. Če bo potrebno, bomo identifikacijske teste prilagodili, da bodo primerni za izvedbo v časovnem okvirju laboratorijskega dela študentov.

Identifikacijske metode bomo preizkušali z drogami alg, lišajev in rastlin, kot so bračič, islandski lišaj, akacija, lan, volčja češnja, kristavec, rman, ognjič, pegasti badelj, lipa, ginko, šentjanževka, breza, zlata rozga, sladki koren, hrast, čajevec, virginijski nepozebnik, rabarbara, krhlika, sena, ajda in kininovec, ter snovmi, kot so agar, karagen, tragakant, alginat, koruzni, rižev in tapiokov škrob. Glede na rezultate testov bomo med omenjenimi izbrali 6 različnih drog in snovi ter oblikovali primeren potek laboratorijske vaje kot tudi določili potrebne reagente, opremo in material za izvedbo vaje.

3 MATERIALI

3.1 Rastlinski materiali

Rastlinske vzorce, na katerih smo izvajali teste za dokazovanje prisotnosti polisaharidov, fenolnih spojin, alkaloidov, antrakinonov in alkaloidov, smo izbrali tako, da smo iz vsake skupine teh spojin zajeli po nekaj drog. Izbrali smo 30 različnih rastlinskih vzorcev:

- arabski gumi (*lat. Acaciae gummi*), Merck, Nemčija;
- tragakant (*lat. tragacantha*), Kemika, Jugoslavija;
- agar (*lat. Agar-agar*), Carl Roth, Nemčija;
- laneno seme (*lat. Lini semen*), Papaja d.o.o., Slovenija;
- steljka islandskega lišaja (*lat. Lichen islandicus*), Farmex, Slovenija;
- bračič (*lat. Focus vesiculosus*), Papaja d.o.o, Slovenija;
- karagen, irski lišaj (*lat. Chondrus crispus*), Dagmar Köhler, Nemčija;
- alginska kislina (*lat. Acidum alginicum*), Dagmar Köhler, Nemčija;
- koruzni škrob (*lat. Maydis amyllum*), Dagmar Köhler, Nemčija;
- rižev škrob (*lat. Orizae amyllum*), Dagmar Köhler, Nemčija;
- tapiokov škrob (*lat. Tapioca*), Dagmar Köhler, Nemčija;
- list volčje češnje (*lat. Belladonnae folium*), Farmex, Slovenija;
- list navadnega kristavca (*lat. Stramonii folium*), Farmex, Slovenija;
- zel navadnega rmana (*lat. Millefolii heba*), Farmex, Slovenija;
- cvet ognjiča (*lat. Calendulae flos*) , Farmex, Slovenija;
- plod pegastega badlja (*lat. Cardui mariae fructus*), Papaja d.o.o., Slovenija;
- cvet lipe (*lat. Tiliae flos*), Farmex, Slovenija;
- list ginka (*lat. Ginkgo folium*), Farmex, Slovenija;
- zel šentjanževke (*lat. Hyperici herba*), Farmex, Slovenija;
- list navadne breze (*lat. Betulae folium*), Farmex, Slovenija;
- zel navadne zlate rozge (*lat. Solidaginis virgureae herba*), DROGA, Slovenija;
- korenina sladkega korena (*lat. Liquiritiae radix*), Farmex, Slovenija;
- skorja hrasta (*lat. Quercus cortex*), Farmex, Slovenija;
- list čajevca (*lat. Thaeae folium*), Alnatura selection, Nemčija;

- skorja virginskega nepozebnika (*lat. Hamamelidis cortex*), Polichimica s. r. l., Italija;
- korenina rabarbare (*lat. Rhei radix*), Polichimica s.r.l., Italija;
- skorja navadne krhlike (*lat. Frangulae cortex*), Farmex, Slovenija;
- list sene (*lat. Sennae folium*), Farmex, Slovenija;
- zel navadne ajde (*lat. Fagopyri herba*), Dragonspiece Naturwaren, Nemčija;
- skorja kininovca (*lat. Cinchonae cortex*), Farmex, Slovenija.

3.2 Kemikalije in reagenti

3.2.1 Polisaharidi

- Demineralizirana voda,
- jod, p. a., Fluka, ZDA;
- kalijev jodid, p. a., Carlo Erba, Italija.

3.2.2 Gumiji

- Etanol, p. a., Carlo Erba, Italija
- barijev hidroksid, p. a., Merck, Nemčija
- demineralizirana voda.

3.2.3 Alkaloidi

- Žveplova kislina, p. a., Merck, Nemčija;
- amoniak, p. a., Merck, Nemčija;
- demineralizirana voda;
- dietileter, p. a., Carlo Erba, Italija;
- natrijev sulfat, p. a., Riedel-de Haen, Nemčija;
- dušikova kislina, p. a., Merck, Nemčija;
- aceton, p. a., Carlo Erba, Italija;
- kalijev hidroksid, p. a., Merck, Nemčija;
- etanol, p. a., Carlo Erba, Italija.

3.2.4 Flavonoidi

- Demineralizirana voda;
- petroleter, p. a., Carlo Erba, Italija;
- klorovodikova kislina, p. a., Carlo Erba, Italija;
- elementarni magnezij ali cink, p. a., Kemika, Jugoslavija.

3.2.5 Tanini

- Etanol, p. a., Carlo Erba, Italija;
- demineralizirana;
- vanilin, p. a., Merck, Nemčija;
- klorovodikova kislina, p. a., Carlo Erba, Italija.

3.2.6 Antrakinoni

- Klorovodikova kislina, p. a., Carlo Erba, Italija;
- dietileter, p. a., Carlo Erba, Italija;
- raztopina amoniaka 32 %, p. a., Merck, Nemčija.

3.3 Oprema

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili naslednjo opremo:

- tehnicka,
- čolniček,
- ultrazvočna kadička,
- čaše (50 mL),
- vodna kopel,
- povratni hladilnik,
- stojalo za povratni hladilnik,
- terilnica,
- spatula,

- steklena palčka,
- plastične epruvete,
- steklene epruvete,
- pipeta za odmerjanje (0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 10 mL),
- valj (5 mL, 10 mL, 25 mL, 30 mL),
- stojalo za epruvete,
- lij,
- lij ločnik,
- filter papir,
- porcelanasta posoda,
- kapalka,
- bučka (25 mL).

4 METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO

Ekstrakcija

Rastlinske droge vsebujejo učinkovine, ki jih lahko izoliramo z različnimi metodami ekstrakcije in izolacije. Ekstrakcija je proces izolacije, ki vključuje raztopljanje učinkovine v primernem ekstrakcijskem topilu (30).

Ločimo dve skupini ekstrakcijskih metod:

- ekstrakcijo trdno-tekoče, kjer je učinkovina v trdni obliki in jo ekstrahiramo z uporabo tekoče faze;
- ekstrakcijo tekoče-tekoče (31).

Ekstrakcija trdno-tekoče

Kot ekstrakcijsko topilo izberemo tisto, v katerem bo želena snov najbolj topna, najpogosteje so to različno polarna organska topila. Poznamo različne postopke, kot so maceracija, proniciranje, parna destilacija, ekstrakcija s Soxhletovim aparatom, ekstrakcija z ultrazvokom in ekstrakcija z refluksom (31).

Sušilna sredstva

Po stresanju vsebuje organska faza tudi nekaj vode, ki jo lahko odstranimo s sušilnimi sredstvi, ki jih nato odfiltriramo. Sušilna sredstva so brezvodne anorganske inertne soli, ki vežejo vodo in tvorijo hidrate. Imajo različne lastnosti in vežejo različne količine vode. Običajno uporabljajmo natrijev sulfat, magnezijev sulfat, kalcijev klorid, kalcijev sulfat in kalijev karbonat (31).

Brezvodni natrijev sulfat

Brezvodni natrijev sulfat je eno najpogosteje uporabljenih sredstev za sušenje organskih topil. Njegove prednosti so, da je poceni, relativno inerten, veže lahko veliko količino vode in da ga je možno reciklirati (32).

4.1 Identifikacija za arabski gumi

Identifikacijski test za arabski gumi smo izvedli po predpisu iz Evropske farmakopeje 8.0.

Natehtali smo 1 g arabskega gumija in ga v terilnici uprašili. Uprašeni arabski gumi smo prenesli v čašo in dodali 2 mL vode *R*. Drogo smo z mešanjem raztopljalji 2 uri, nato smo dodali 2 mL 96-odstotnega etanola *R*. Po stresanju je nastala bela želatinasta sluz, ki je postala po dodatku 10 mL vode *R* spet tekoča.

4.2 Identifikacija za polisaharide

V okviru identifikacije polisaharidov smo optimizirali test za identifikacijo islandskega lišaja, ki je zapisan v Evropski farmakopeji 8.0.

Optimiziran postopek:

Natehtali smo 1,0 g droge, jo v terilnici zdrobili in prenesli v plastične epruvete. Dodali smo 50 mL vode in segrevali 10 minut pri 80 °C v ultrazvočni kadički. Nato smo epruvete ohladili in v stekleno epruveto odpipetirali 1 mL sluzi ter dodali 0,1 mL 0,05 M raztopine joda *R*. Pri pozitivni reakciji je prišlo do temno modrega obarvanja, s čimer smo dokazali prisotnost škroba v drogi.

Priprava raztopine joda (jodovice): natehtali smo 63,5 mg joda in 0,3 g kalijevega jodida ter ju raztoplili v 50 mL destilirane vode. Pomembno je, da je jodovica pripravljena tik pred uporabo in da je zaščitena pred svetlobo.

Optimizacija metode: v Evropski farmakopeji je pri testu za identifikacijo islandskega lišaja zapisano, da drogo z vodo segrevamo 2 do 3 minute, mi pa smo ta čas podaljšali na 10 minut. Ko smo segrevali samo 2 do 3 minute pri nekaterih drogah, kjer smo pričakovali modro obarvanje zaradi prisotnosti škroba, do obarvanja ni prišlo. Zato smo tudi čas segrevanja podaljšali. V Evropski farmakopeji v predpisu tudi ni zapisano, da epruvete segrevamo v ultrazvočni kadički.

4.3 Identifikacija za gumije

V okviru identifikacije gumijev smo optimizirali test za identifikacijo tragakanta, ki je zapisan v Evropski farmakopeji 8.0.

Optimiziran postopek:

Natehtali smo 0,5 g rastlinske droge in jo v terilnici uprašili. Upršeno drogo smo prenesli v čaše ter dodali 1 mL etanola. Nato smo med mešanjem počasi dodajali 25 mL vode. Pustili smo stati 30 minut, da so droge v tem času nabrekale oziroma tvorile sluzi. Zatem smo v plastične epruvete odpipetirali po 2 mL sluzi, 2 mL vode in 1 mL raztopine barijevega hidroksida R. Epruvete smo v vodni kopeli segrevali 10 minut. Če je bila reakcija pozitivna, je prišlo do intenzivnega rumenega obarvanja.

Priprava raztopine barijevega hidroksida (47,3 g/L): natehtali smo 1,7 g barijevega hidroksida in ga raztopili v 35 mL vode.

Optimizacija metode: v Evropski farmakopeji je pri testu za identifikacijo tragakanta zapisano, da drogo prelijemo z 1 mL etanola, dodamo 50 mL vode in stresamo, dokler ne nastane homogena sluz. Pri prvem poskusu, ki smo ga izvajali, smo pustili droge nabrekati 30 minut. Po segrevanju se je tragakant obarval zelo svetlorumeno. Pri karagenu in alginatu do obarvanja ni prišlo, sta pa oba postala zelo sluzasta. Pri drugem poskusu so droge nabrekale 60 minut in izkazalo se je, da to vpliva na intenzivnost rumene barve pri tragakantu, saj smo dobili bolj intenzivno rumeno barvo. Pri tretjem poskusu smo zmanjšali količino vode na 25 mL in pustili 30-minutno nabrekanje. Ugotovili smo, da so

raztopine bolj sluzaste kot v prvem primeru, ko smo dodali 50 mL vode. Tudi barve so bolj intenzivne. Čas nabrekanja smo skrajšali na 30 minut, saj so študenti na vajah časovno zelo omejeni in morajo biti identifikacijski testi čim krajši. Optimizirali smo tudi pipetiranje, tako da smo v plastične epruvete odpipetirali samo 2 mL sluzi ter dodali 2 mL vode in 1 mL raztopine barijevega hidroksida. V originalnem predpisu je zapisano, da se odpipetira 5 mL sluzi, 5 mL vode in 2 mL raztopine barijevega hidroksida. To smo storili z namenom, da smo lahko uporabili manjše plastične epruvete in porabili smo manjšo količino reagentov.

4.4 Identifikacija za alkaloide

V okviru identifikacije alkaloidov smo izvedli test za identifikacijo volčje češnje (ali test za identifikacijo kristavca, ker sta testa enaka), ki je zapisan v Evropski farmakopeji 8.0.

Originalni postopek:

Natehtali smo 1,0 g droge in jo uprašili v terilnici. Prenesli smo jo v čašo in dodali 10 mL 0,05 M žveplove kisline. Potem smo filtrirali in filtratu dodali 1 mL koncentriranega amoniaka R in 5 mL destilirane vode. V liju ločniku smo filtrat previdno stresali s 15 mL dietiletra R ter počakali, da sta se vodna in etrna plast ločili. Vodno fazo smo zavrgli, medtem ko smo etrno sušili nad brezvodnim natrijevim sulfatom R. Zatem smo ponovno filtrirali in izparevali eter v porcelanasti posodi na vodni kopeli. Dodali smo 0,5 mL kadeče se dušikove(V) kisline in do suhosti izparevali na vodni kopeli. Nato smo dodali 10 mL acetona R in po kapljicah etanolno raztopino (96%, V/V) kalijevega hidroksida R. Razvila se je temnovijoličasta barva.

Postopka za identifikacijo alkaloidov nam ni bilo treba prilagajati.

Priprava 0,05 M žveplove kisline: v 250 mL destilirane vode dodamo 0,7 mL žveplove kisline.

Priprava 30 g/L raztopine kalijevega hidroksida in 96-odstotnega etanola: natehtali smo 0,6 g kalijevega hidroksida in ga raztopili v 20 mL 96-odstotnega etanola.

4.5 Identifikacija za antrakinone

Identifikacijski test za antrakinone smo izvedli po predpisih Evropske farmakopeje 8.0 za krhliko in rabarbaro.

Originalni postopek:

Natehtali smo 50 mg rastlinske droge, jo v terilnici zdrobili ter prenesli v bučko. Dodali smo 25 mL razredčene klorovodikove kisline *R* ter nato mešanico 15 minut segrevali na vodni kopeli (slika 12). Počakali smo, da se je ohladila in jo potem filtrirali. Filtrat smo prelili v lij ločnik in stresali z 20 mL dietiletra *R*. Ko sta se vodna in organska faza ločili, smo vodno fazo zavrgli. Etrno fazo smo zatem še enkrat stresali v liju ločniku z 10 mL razredčenega amoniaka *R1*. Vodna faza se je obarvala rdečevijoličasto (slika 11).

Postopka za identifikacijo antrakinonov nam ni bilo treba prilagajati. Uporabili smo enak identifikacijski test, kot je zapisan v Evropski farmakopeji.

Priprava razredčene klorovodikove kisline (73 g/L): 23 mL klorovodikove kisline smo razredčili s 572 mL vode.

Priprava razredčenega amoniaka (100 g/L): 82 ml koncentrirane raztopine amoniaka smo razredčili z 200 mL destilirane vode.



Slika 11: Ekstrakcija antrakinonov v liju ločniku–rdečevijoličasto obarvanje vodne faze

4.6 Identifikacijski test za flavonoide

Za identifikacijski test za flavonoide smo izvedli Shinodov test (33).

Originalni postopek:

Natehtali smo 1,0 g droge, jo uprašili, prenesli v čašo ter dodali 20 mL vode. Zatem smo najprej filtrirali, potem pa filtrat dvakrat stresali v liju ločniku, vsakič s po 25 mL petroletra. Organsko fazo smo zavrgli, medtem ko smo vodno uporabili za nadaljevanje postopka. V tri steklene epruvete smo odpipetirali po 3 mL vodne faze. V prvo smo dodali 0,5 mL koncentrirane HCl in 3 do 4 drobce elementarnega magnezija, v drugo 0,5 mL koncentrirane HCl, v tretji epruveti pa je bil slepi vzorec, torej samo izvleček rastlinske droge. V 10 minutah se je v prvi epruveti razvilo rdeče obarvanje raztopine, če so bile v rastlini prisotne flavonoidne spojine.

Postopka za identifikacijo flavonoidov nam ni bilo treba prilagajati.

4. 7 Identifikacija za tanine

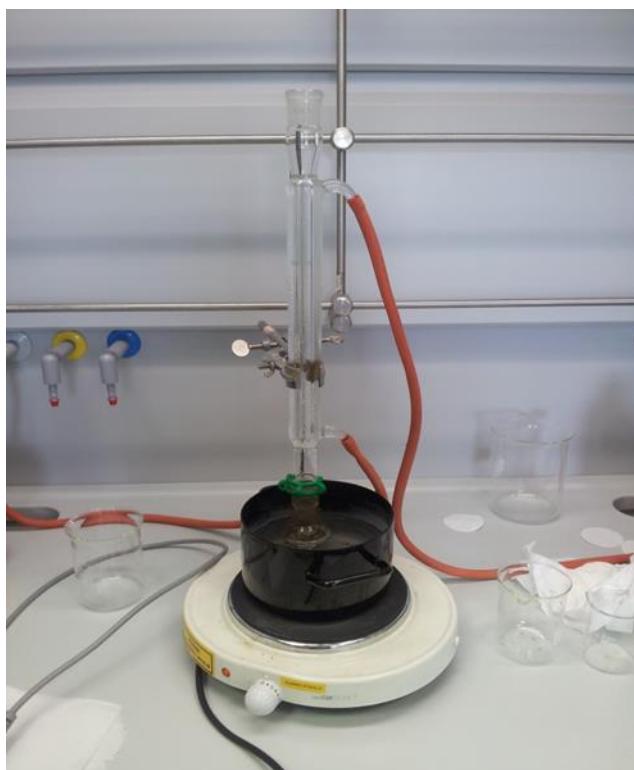
Identifikacijski test za tanine smo izvedli po predpisu Evropske farmakopeje 8.0.

Originalni postopek:

Natehtali smo 1,0 g droge in jo v terilnici uprašili. Prenesli smo jo v bučko in dodali 10 mL etanola *R* (30%, V/V) in zmes 30 minut segrevali na vodni kopeli pod refluksom (slika 12). Počakali smo, da se je bučka ohladila, nato pa smo izvleček filtrirali. K 1 mL filtrata smo dodali 2 mL raztopine vanilina *R* v klorovodikovi kislini *R* (10 g/L). V primeru prisotnosti taninov se je razvila rdeča barva.

Postopka za identifikacijo taninov nam ni bilo treba prilagajati.

Priprava raztopine vanilina v klorovodikovi kislini (10 g/L): natehtali smo 0,5 g vanilina in ga raztopili v 50 mL koncentrirane klorovodikove kisline.



Slika 12: Segrevanje na vodni kopeli pod refluksom

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Rezultati testov

V preglednici 1 so zbrani rezultati vseh šestih identifikacijskih testov, ki smo jih izvajali v okviru magistrske naloge. Test 1 predstavlja identifikacijski test za gumije, test 2 identifikacijski test za polisaharide, test 3 identifikacijski test za alkaloide, test 4 identifikacijski test za antrakinone, test 5 identifikacijski test za flavonoide in test 6 identifikacijski test za tanine. Pri nekaterih rastlinskih drogah nismo izvajali vseh identifikacijskih testov, kar je v preglednici označeno z znakom "-".

Preglednica 1: Rezultati identifikacijskih testov.

Steljka islandskega lišaja	Laneno seme	Agar	Tragakant	Arabski gumi	Rastlinska droga
Rahlo rumene barve	Motna raztopina	Rahlo rumene barve	Intenzivno rumena barva	Ne pride do rumenega obarvanja	Test 1
Svetlomodra	Siva barva	Svetlomodra	Svetlosiva	Ne obarva se modro	Test 2
-	-	-	-	-	Test 3
-	-	-	-	-	Test 4
-	-	-	-	-	Test 5
-	-	-	-	-	Test 6

Zel navadnega rmane	List navadnega kristavca	List volčje česnje	Tapiokov škrob	Rižev škrob	Koruzni škrob	Alginat	Karagen	Bračič
Svetlorumena	Svetlorumena	Svetlorumena	Motna siva usedlina	Brezbarvna (ni sprememb)	Brezbarvna (ni sprememb)	Fluorescen tno rumen na vrhu	Na sredini malo rumen	Rahlo rožnata kosmičasta oborina
Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Temnomodra	Svetlomodra	Temnomodra	Siva barva	Temnomodra	Siva barva
Rahlo rumena	Rožnato-vijoličasta po 2 kapljicah KOH	Rožnato-vijoličasta po 2 kapljicah KOH	-	-	-	-	-	-
Iz brezbarvne v rumeno	Iz brezbarvne v rumeno	Iz brezbarvne v rumeno	-	-	-	-	-	-
Svetlooranžna	Čajna barva	Svetlorjava barva	-	-	-	-	-	-
Rumeno rjava	Rjavo oranžna	Čajna barva	-	-	-	-	-	-

List čajevca	Skorja hrasta	Korenina sladkega korena	Zel navadne zlate rozge	List navadne breeze	Zel šentjanževke	List ginka	Cvet lipe	Plod pegastega badlja	Cvet ognjica
Rjavo-oranžen	Svetlojavoranžen	Rumena barva	Zelo svetlorumen na	Zelo svetlorume na	Rumena barva	Zelo svetlorumen	Zelo svetlooranž e barve	Postane motha	Rumena
Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve
Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve	Ni sprememb e barve
Iz brezbarvne v čajno	Iz brezbarvne v rumeno	Iz brezbarvne v rumeno	Iz brezbarvne v svetlo umeno	Iz brezbarvne v svetlorumen no	Iz brezbarvne v svetlozeleno	Iz brezbarvne v svetlorumeno (skoraj brezbarvna)	Iz brezbarvne v svetlorumeno (po 1minuti svetlo rumena)	Iz brezbarvne v svetlorumeno	Iz brezbarvne v rumeno (nato spet brezbarvna)
Svetlosivo -riave barve	Svetlorumen a barva	Rumena barva	Rdeča barva	Siva barva	Oranžno- rjava	Svetlooranžna	Svetlorumen a	Brezbarvna	Oranžna barva
Rdeča	Tennordeča	Oranžna	Zeleno- rjava	Rjavo rdeča	Rdeča	Rjavo zelena	Rdeča	Svetloorožata	Tennorjava

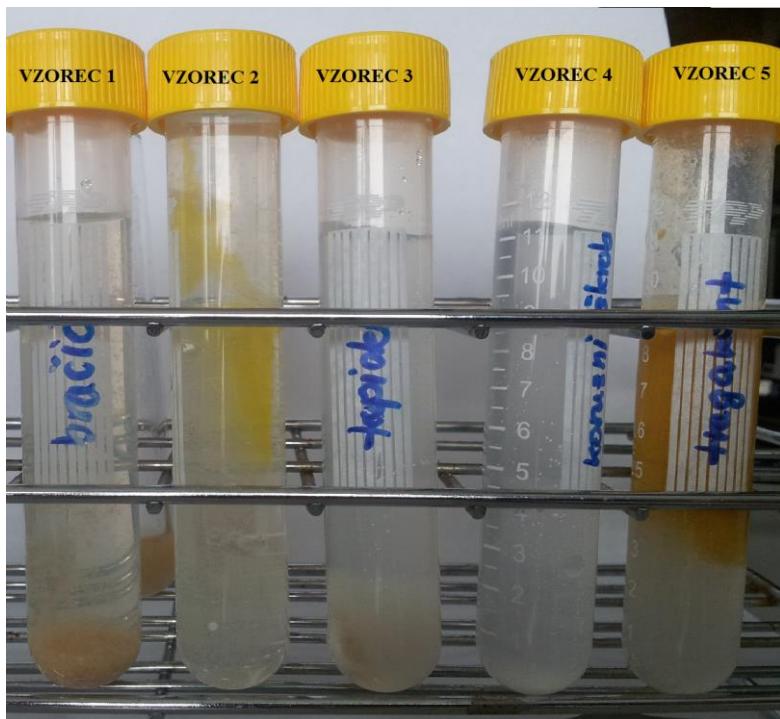
Skorja kininovca	Zel navadne ajde	List sene	Skorja navadne krhlike	Korenina rabarbare	Skorja virginijskega nepozabnika
Zelo svetlooranžno-rjave barve	Rumena barva	Oranžna barva	Rdeča barva	Čajna barva	Čajna barva
Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve	Ne spremeni barve
Ni spremembe barve	Ni sprememb e barve	Ni spremembe barve	Ni spremembe barve	Ni sprememb e barve	Ni spremembe barve
Iz brezbarvne v svet zeleno (po 1 minutu svetlo rumena, nato oranžna)	Iz brezbarvne v rumeno	Iz brezbarvne v svetlordečo	Iz rumene v svetlordečo	Iz oranžne v rdečo	Iz brezbarvne v svetloranžno
Oranžna barva	Oranžno-rdeča barva	Čajna barva	Oranžna barva	Čajna barva	Čajna barva
Rdeča	Oranžna	Oranžna	Rdeča	Rjavo-rdeča	Rdeče-rjava

5.2 Test za identifikacijo arabskega gumija

Test za identifikacijo (test 1) arabskega gumija smo izvedli samo na arabskem gumiju, tragakantu, agarju, alginatu in koruznem škrobu. Pozitivna reakcija je vidna samo pri arabskem gumiju, medtem ko je pri ostalih drogh po 2 urah prišlo samo do nabrekanja, po dodatku etanola pa se ni nič spremenilo ozioroma ni nastala oborina.

5.3 Test za dokazovanje gumijev

Rezultati testa za gumije so predstavljeni v preglednici 1 (test 1) in na sliki 13. Pozitiven rezultat za to reakcijo je intenzivno rumeno obarvanje raztopine izvlečka rastlinske droge. Do izrazitega rumenega obarvanja je prišlo pri tragakantu (vzorec 5). Pri alginatu (vzorec 2) se je pojavila enaka barva, vendar ne po celiem volumnu, pač pa samo od sredine proti vrhu. Pri bračiču smo opazili kosmičasto rožnato usedlino (vzorec 1). Pri tapiokovem škrobu je geliral, vendar je ostal prozoren, le na dnu epruvete se je pojavila rahlo sivo oborina (vzorec 3). Gelirala sta tudi karagen in rižev škrob. Če ju primerjamo med seboj, je rižev škrob bolj moten, karagen pa zelo rahlo rumen. Koruzni škrob (vzorec 4) je postal rahlo moten in je geliral. Pri vseh ostalih testiranih rastlinskih drogah ni prišlo do sprememb barve in dajejo negativni rezultat pri testu za dokazovanje gumijev.

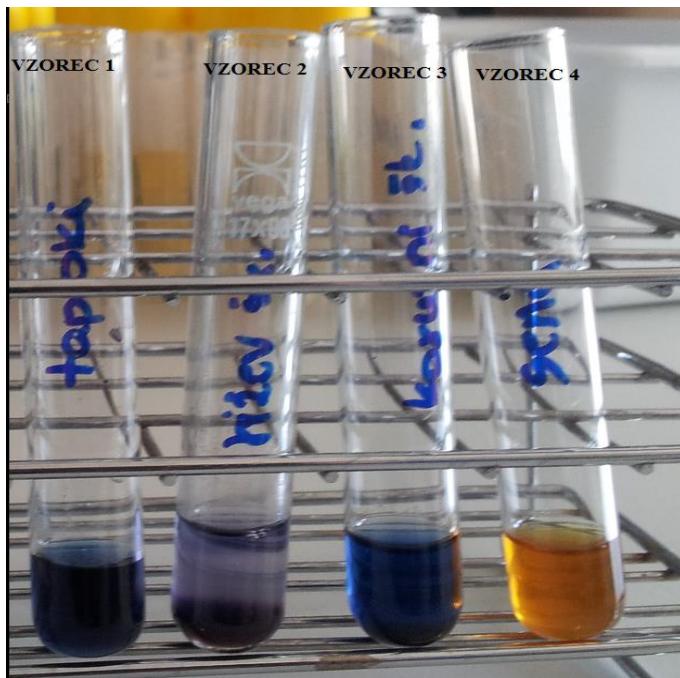


Slika 13: Prikaz rezultatov testa za dokazovanje gumijev pri bračiču (vzorec 1), alginatu (vzorec 2), tapiokovem škrobu (vzorec 3), koruznem škrobu (vzorec 4) in tragakantu (vzorec 5)

5.4 Identifikacijski test za polisaharide

Rezultati testa za polisaharide so prikazani v preglednici 1 (test 2) in na sliki 14. Pozitivno reakcijo dobimo pri naslednjih rastlinskih drogah: koruznem škrobu (vzorec 3), riževem škrobu (vzorec 2), tapiokovem škrobu (vzorec 1), tragakantu, karagenu, agarju in steljki islandskega lišaja (niso prikazani na sliki 14). Pri vseh ostalih testiranih drogah dobimo negativni rezultat za to reakcijo, saj ne pride do modrega obarvanja raztopine.

Škrob je sicer pogosta snov v vseh višjih rastlinah, vendar pri večini testiranih rastlinskih drog njegove prisotnosti nismo uspeli dokazati. Vzrok za to je verjetno v različni vsebnosti škroba, saj so se obarvale samo tiste rastlinske droge, v katerih škrob prevladuje.



Slika 14: Prikaz rezultatov testa za dokazovanje škroba pri tapiokovem škrobu (vzorec 1), riževem škrobu (vzorec 2), koruznem škrobu (vzorec 3) ter listu sene (vzorec 4)

Če medsebojno primerjamo tapiokov, rižev in koruzni škrob, opazimo, da se najmanj intenzivno modro obarva rižev škrob, najtemnejše barve pa je tapiokov škrob (slika 14). V

literaturi je sicer navedeno, da rižev in tapiokov škrob vsebuje približno 17% amiloze, medtem ko je njena vsebnost v koruznem škrobu 21 – 24% (37). Arabski gumi ne vsebuje škroba, zato se tudi ni obarval (38). Za agar in tragakant so navedeni podatki, da naj bi se pri testu za škrob obarvala olivnozeleno (38), vendar se je v našem primeru tragakant obarval svetlo sivo, agar pa svetlo modro.

5.5 Identifikacijski test za alkaloide

Rezultati identifikacijskega testa za alkaloide so prikazani v preglednici 1 (test 3). Pozitivno reakcijo smo dobili pri volčji češnji in kristavcu, kjer se je pojavilo rožnato-vijoličasto obarvanje po 2 dodanih kapljicah KOH (slika 15). Pri rmanu smo dobili rahlo rumeno obarvanje, pri vseh ostalih rastlinskih drogh pa ni prišlo do spremembe barve. Rezultati, ki smo jih dobili pri tem testu, so bili pričakovani, saj naj bi alkaloide vsebovala samo volčja češnja in kristavec. V literaturi je navedeno, da kristavec vsebuje 0,2–0,5% alkaloidov, medtem ko je njihova vsebnost v volčji češnji 0,3–0,6% (12). Pri rmanu je prišlo do rumenega obarvanja, kar bi lahko pripisali glikoalkaloidu ahileinu, ki ga vsebuje (12).



Slika 15: Pozitivna reakcija za volčjo češnjo pri Vitali-Morinovem testu

5.6 Identifikacijski test za dokazovanje antrakinonov

Rezultati identifikacijskega testa so prikazani v preglednici 1 (test 4). Pri Bornträgerjevi reakciji smo dobili pozitiven rezultat za naslednje testirane droge: skorjo navadne krhlike, list sene in korenino rabarbare (slika 16). Najbolj izrazito rdeče barve je bila rabarbara. Vse ostale testirane droge so dale negativni rezultat. Rezultati so bili pričakovani, saj so antrakinoni značilni le za določene rastlinske vrste in se v splošnem v rastlinah ne pojavljajo.



Slika 16: Pozitivni rezultat Bornträgerjeve reakcije za rabarbaro (vzorec 1) in krhliko (vzorec 2)

5.7 Identifikacijski test za dokazovanje flavonoidov

Rezultati identifikacijskega testa za dokazovanje flavonoidov so prikazani v preglednici 1 (test 5). Pri Shinodovem testu smo dobili pozitivni rezultat za zlato rozgo, ajdo, kininovec, krhliko, ognjič, ginko in rman. V literaturi je navedeno, da lahko štejemo za pozitivni rezultat rdeče, oranžno, škrlatno ali vijoličasto obarvanje. Rabarbara, sena, virginijski nepozebnik in kristavec dajejo čajno barvo, zato so nam povzročali težave pri odločanju,

ali jih štejemo med droge, ki dajejo negativni rezultat, ali med tiste, ki dajejo pozitivnega. Najbolj intenzivno rdeče obarvanje se je pojavilo pri zlati rozgi in ajdi. Za vse ostale rastlinske droge, ki smo jih uporabili pri testu, bi lahko rekli, da dajejo negativni rezultat pri testu za dokazovanje flavonoidov.

Pri plodu pegastega badlja, cvetu lipe in korenini sladkega korena smo dobili negativni rezultat, čeprav vemo, da te droge vsebujejo flavonoide. Vzrok za to bi lahko bil, da se v vodo ni izločilo dovolj flavonoidov zaradi prekratkega časa namakanja droge v vodi. Ali pa je vzrok napačna izbira topila za ekstrakcijo flavonoidov. V literaturi je sicer navedeno, da za ekstrakcijo glikozidov flavonoidov najpogosteje uporabljam mešanico alkohola (metanola, etanola) in vode. Možno pa je uporabiti tudi razlago, da nekatere droge vsebujejo premajhno količino flavonoidov, da bi jih lahko dokazali s Shinodovim testom. Pri plodu pegastega badlja in cvetu lipe je vsebnost flavonoidov približno 1%. Pri ginku, ki daje pozitiven rezultat pri Shinodovem testu, pa je vsebnost flavonoidov 22–27% (35). Rdečo barvo dobimo tudi pri zlati rozgi, kljub temu da so koncentracije flavonoidov zgolj malenkost višje (1,5–2,4%) kot pri pegastem badlju, lipi in sladkem korenini (35). Glede na dobljene rezultate bi lahko sklepali, da s Shinodovim testom ne moremo dokazati flavonoidov, katerih koncentracija v rastlinskih drogah je nižja od 1%. Pri korenini sladkega korena pa verjetno ne pride do pozitivne reakcije, ker droga vsebuje glabren, glabridin, formonetin ter likviritigenin in izolikviritigenin, ki sicer spadajo med flavonoide, vendar jih uvršamo v podskupino halkonov in izoflavonov, ki pa pri Shinodoven testu ne dajejo pozitivne reakcije (12).

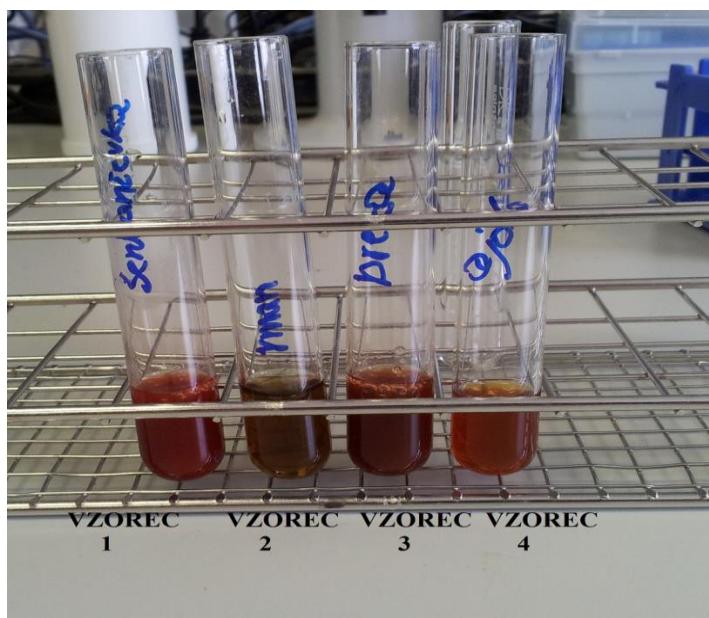
5.8 Identifikacijski test za dokazovanje taninov

Rezultati identifikacijskega testa za tanine so prikazani v preglednici 1 (test za tanine) in na sliki 17. Pri dokazni reakciji za tanine s testom vanilin/HCl smo dobili pozitivno reakcijo pri šentjanževki (vzorec 1), brezi (vzorec 3), pravemu čaju, hrastu, krhliki, lipi, in kininovcu (vzorci niso prikazani na sliki). Najbolj intenzivna rdeča barva se je pojavila pri pravem čaju.

Negativno reakcijo smo dobili pri naslednjih drogah: zel navadnega rmania (vzorec 2), zel navadne ajde (vzorec 4), list volčje češnje, skorja kristavca, cvet ognjiča, plod pegastega

badlja, list ginka, zel navadne zlate rozge, korenina sladkega korena, list sene, korenina rabarbare (vzorci niso prikazani na sliki).

Pri testu vanilin/HCl smo opazili, da težko določimo, kdaj je reakcija pozitivna, saj smo skoraj pri vseh uporabljenih rastlinskih drogah dobili podobne rdeče odtenke. Verjetno je razlog za to tudi dejstvo, da se tanini kot sekundarni metaboliti nahajajo v številnih rastlinskih vrstah. V literaturi je navedeno, da se vanilin/HCl test uporablja za določevanje kondenziranih taninov, vendar pa reakcija ni specifična. Vanilin je aromatski aldehyd, ki lahko reagira tudi s primarnimi amini, torej bi v izvlečkih rastlinskih drog lahko reagirali tudi z nekaterimi alkaloidi (na primer z meskalinom in katinonom) ali z aminokislinami, kar pa bi bil lahko tudi razlog za to, da smo dobili rdeče obarvanje pri večini drogah.



Slika 17: Rezultati testa vanilin/HCl za šentjanževko (vzorec 1), rman (vzorec 2), brezo (vzorec 3) in ajdo (vzorec 4)

5.9 Izbor rastlinskih drog za pedagoške namene

Namen naše magistrske naloge je bil, da bi na koncu izbrali 6 rastlinskih drog, ki bi bile primerne za uporabo pri vajah pri predmetu Farmakognozija II. Vajo naj bi zasnovali tako, da bi vsak študent (ali vsaka skupina študentov) dobil seznam 6 različnih rastlinskih drog, ki ne bi bile identificirane. S pomočjo testov, ki smo jih izvedli v okviru te magistrske naloge, bi morali te droge identificirati. Najbolj primerne bi bile droge, ki bi dale pozitivne rezultate samo pri enem od identifikacijskih testov, za ostale pa bile negativne, saj bi jih na ta način najbolj nedvoumno identificirali. Izkazalo se je, da dobimo pri nekaterih testih več pozitivnih rezultatov, saj nekatere droge hkrati vsebujejo flavonoide, antrakinone, alkaloide, polisaharide in tanine. Pogosti so tudi primeri, ko je za določene rastlinske droge težko opredeliti, ali dajejo pozitivni ali negativni rezultat.

Izbrane droge:

1. *tragakant,*
2. *tapiokov škob,*
3. *list čajevca,*
4. *list volčje češnje,*
5. *korenina rabarbare,*
6. *zel navadne zlate rozge.*

Ko smo izbirali rastlinske droge, ki bi bile primerne za uporabo v pedagoške namene, smo skušali izbrati tiste, ki dajejo najbolj očitne pozitivne reakcije pri določenih testih.

Za drogo, ki daje pozitiven rezultat pri testu za dokazovanje škroba, bi izbrali tapiokov škrob, ker se ta obarva najbolj intenzivno modro.

Po naši presoji bi bilo za testiranje za gumije smiselno izbrati tragakant, saj daje najbolj očitno pozitivno reakcijo pri testu za dokazovanje gumijev. Pri tem testu bi bilo študente potrebno opozoriti, da je pozitivna reakcija le intenzivna rumena barva, saj se izvlečki nekaterih rastlinskih drog, ki ne vsebujejo gumijev, prav tako obarvajo rumeno, vendar je v primerjavi s pozitivno reakcijo razlika v intenzivnosti barve zelo očitna.

Za drogo, ki bi dala pozitivni rezultat pri dokazovanju prisotnosti alkaloidov, bi izbrali list volčje češnje ali list navadnega kristavca, saj se obe raztopini obarvata očitno rožnato, medtem ko pri ostalih drogah ni spremembe barve, razen pri rmanu, ki pa se obarva rumeno. Volčja češnja daje pri testu vanilin/HCl čajno barvo in bi jo študenti lahko hitro zamenjali za pozitivni rezultat pri identifikaciji taninov. Študentom bi bilo torej smiselno poudariti, da je pri testu vanilin/HCl pozitivni rezultat tisti, ki daje najbolj intenzivno rdečo barvo. Pri testu za polisaharide in gumije daje volčja češnja negativni rezultat.

Med drogami, ki vsebujejo tanine, bi se odločili za pravi čaj, ker daje najbolj intenzivno rdeče obarvanje, ki je značilno za pozitivno reakcijo pri dokazovanju taninov s testom vanilin/HCl. Pri testu za dokazovanje antrakinonov daje pravi čaj čajno barvo, kar bi lahko študente zavedlo pri identifikaciji, zato bi bilo smiselno opozoriti, da je pri testu za antrakinone pozitivni rezultat izrazito rdeča barva in ne čajna barva.

Najbolj očitno pozitivni rezultat za identifikacijo antrakinonov pri Bornträgerjevi reakciji daje rabarbara, zato bi bila tudi najbolj primerna za uporabo pri vajah. Rabarbara pri testu za polisaharide in gumije ne spremeni barve in daje negativni rezultat. Tudi pri Vitali-Morinovem testu ne daje pozitivnega rezultata.

Pri Shinodovem testu smo ocenili, da daje najbolj očitno rdečo barvo oziroma pozitivni rezultat zlata rozga.

5.10 Predlog poteka vaje pri Farmakognoziji II

Vaje pri predmetu Farmakognozija II so časovno omejene na 4 ure oziroma 5 šolskih ur, zato bi predlagali, da študenti vajo izvajajo v skupinah (v vsaki skupini so po štiri študenti), saj bi bila sicer vaja preveč obsežna, da bi jo lahko opravil en sam študent.

Študenti dobijo protokol, na kateremu so opisani postopki izvedbe za vse identifikacijske reakcije, ki jih morajo izvesti. Poleg reakcije imajo tudi napisano, katera droga daje pri določeni reakciji pozitivni rezultat, vendar droge seveda niso identificirane. Ker vaje potekajo samo 4 ure, ni izvedljivo, da bi vseh 6 drog testirali z vsakim testom. Zato predlagamo, da se droge identificirajo pri vsakem testu sproti in nato izločijo iz nadaljnjega postopka preizkušanja.

Predlagamo, da študenti začnejo vaje s testom za gumije, ki ga izvedejo za vseh 6 drog. Rastlinske droge morajo pri tem postopku nabrekati 30 minut in v tem času lahko začnejo s testom za polisaharide. Tudi pri tem testu testirajo vseh 6 drog. Natehtajo rastlinske droge, jih po potrebi uprašijo, dodajo ustrezne reagente in nato segrevajo. Med segrevanjem dokončajo prvi postopek identifikacije, zatem pa še test za polisaharide. Po opravljenem testiranju sta identificirani dve drogi, ki ju zato v nadaljnjih testih ne uporabljamo več.

Delo nadaljujejo z Vitali-Morinovim testom za alkaloide, za vse preostale 4 droge. Predlagamo, da posamezna skupina študentov hkrati dela test za 2 drogi, sicer ne bodo dokončali vseh testov do zaključka vaj. Ko identificirajo še tretjo drogo, začnejo z Bornträgerjevo reakcijo za identifikacijo antrakinonov in testirajo vse tri preostale droge. Tudi pri tem testu je treba testirati vse tri droge hkrati. Predzadnji je Shinodov test za identifikacijo flavonoidov, ki daje pozitivni rezultat za zlato rozgo, tako da jim na koncu ostane samo še pravi čaj, za katerega opravijo še test vanilin/HCl za identifikacijo taninov.

Vrstni red identifikacijskih postopkov:

- 1. test za identifikacijo gumijev,**
- 2. test z jodovico za identifikacijo škroba,**
- 3. Vitali-Morinov test za identifikacijo alkaloidov,**
- 4. Bornträgerjeva reakcija za identifikacijo antrakinonov,**
- 5. Shinodov test za identifikacijo flavonoidov,**
- 6. test vanilin/HCl za identifikacijo taninov.**

Predlagamo, da so vsi reagenti, ki so potrebni za identifikacijske postopke, pripravljeni vnaprej, saj je vaja časovno zelo obsežna. Jodovica mora biti sveže pripravljena, zato jo pripravi eden od študentov za vse skupine na vajah.

5.11 Oprema, ki jo bodo študenti potrebovali pri vajah

Oprema za test za gumije:

- čaše (50 mL) – 6×,
- steklene palčke – 6×,
- plastične epruvete – 6×,
- pipeta za odmerjanje (2 mL) – 2×,
- pipeta za odmerjanje (1 mL) – 2×,
- valj (25 mL),
- tehnicka,
- terilnica,
- vodna kopel.

Oprema za test z jodovico:

- tehnicka,
- terilnica,
- UV kadička,
- čaše (50 mL) – 6×,
- plastične epruvete – 6×,
- steklene epruvete – 6×,
- pipeta za odmerjanje (1 mL) – 1×,
- pipeta za odmerjanje (0,1 mL) – 1×,
- valj (30 mL) – 1×,
- stojalo za epruvete.

Oprema za Shinodov test:

- tehnicka,
- terilnica,
- lij ločnik,

- valj (25 mL),
- čaša (50 mL) – 4×,
- steklena palčka,
- lij,
- filter papir – 4×,
- steklena epruveta – 12×,
- pipeta za odmerjanje (0,5 mL),
- pipeta za odmerjanje (3 mL),
- spatula,
- stojalo za epruvete.

Oprema za Bornträgerjevo reakcijo:

- tehnicka,
- valj (25mL),
- lij – 3×,
- steklena palčka,
- vodna kopal,
- bučka (25 mL) – 3×,
- stojalo,
- lij ločnik,
- valj (10 mL),
- valj (20 mL),
- čaša (25 mL) – 3×,
- filter papir – 3×.

Oprema za Vitali-Morinov test:

- tehnicka,
- terilnica,
- čaša (50 mL) – 2×,
- steklena palčka,

- filter papir – 2×,
- lij,
- pipeta za odmerjanje (0,5 mL),
- pipeta za odmerjanje (1 mL),
- pipeta za odmerjanje (10 mL),
- valj (5 mL),
- lij ločnik,
- porcelanasta posoda,
- vodna kopel,
- kapalka.

Oprema za test vanilin/HCl:

- tehnicka,
- terilnica,
- valj (10mL),
- bučka 25 mL,
- vodna kopel,
- povratni hladilnik,
- stojalo,
- filter papir,
- lij,
- steklena palčka,
- pipeta za odmerjanje (1 mL),
- pipeta za odmerjanje (2 mL),
- steklena epruveta.

6 SKLEPI

- Za dokazovanje polisaharidov, alkaloidov, antrakinonov in taninov smo uporabili identifikacijske teste iz Evropske farmakopeje. Za dokazovanje fenolnih spojin smo uporabili Shinodov test (33). Prilagoditve fitokemijskih metod so bile potrebne samo pri dokazovanju polisaharidov in gumijev, preostale metode so ostale takšne, kot jih določajo originalni predpisi.
- Glede na rezultate smo za pedagoške namene izbrali naslednje rastlinske droge: tragakant, list čajevca, korenino rabarbare, list volče češnje, tapiokov škrob in zel navadne zlate rozge.
- Predlog vrstnega reda izvajanja dokaznih reakcij je sledeči: test za identifikacijo gumijev, test z jodovico za identifikacijo škroba, Vitali-Morinov test za identifikacijo alkaloidov, Bornträgerjeva reakcija za identifikacijo antrakinonov, Shinodov test za identifikacijo flavonoidov in test vanilin/HCl za identifikacijo taninov.
- Ugotovili smo, da pri Shinodovem testu, ki smo ga uporabili za dokazovanje flavonoidov, zelo težko določimo, ali je reakcija pozitivna ali negativna. V literaturi je zapisano, da pri pozitivni reakciji lahko dobimo rdečo, oranžno ali vijolično barvo.
- Pri vanilin/HCl testu, s katerim smo dokazovali prisotnost taninov v izbranih drogah, je pozitivna reakcija, če se pojavi rdeče obarvanje raztopine. Pri tej metodi je težje določiti, ali je reakcija res pozitivna ali negativna, saj pri večini drog dobimo rdečo barvo, vendar v različnih odtenkih. Pri nekaterih nastane zelo izrazito intenzivna rdeča barva, pri nekaterih pa se pojavi čajna ali rjavkasta barva.
- Ugotovili smo, da so identifikacijski testi, ki smo jih izvajali časovno precej obsežni in da študentje v času, namenjenemu za vajo, ne bi uspeli izvesti vseh

testov na vseh drogah. Zato bodo študentje identificirane droge sproti izločali iz nadaljnega postopka identifikacije.

- Predlagamo, da so študenti razdeljeni v skupine (v vsaki skupini naj bodo štiri študenti), ker zaradi časovne omejitve en sam študent ne more opraviti vseh šestih testov.

7 LITERATURA

1. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*, 2nd Edition, Lavoisier Publishing, USA, 1999: 35, 36, 69, 70, 91, 318, 347, 355, 370 – 372, 378, 384, 420, 422 – 424, 784, 785, 788, 790, 791, 815.
2. <Http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=770> (dostopno na spletu 5. 6. 2015).
3. Hoffmann D., *Medical herbalism: The science and practice of herbal medicine. Inner Traditions / Bear & Co*, 2003: 49 – 52, 114 – 116, 120, 121.
4. Graham B. Seymour, J. Paul Knox: *Pectins and Their Manipulation*. Taylor & Francis, 2002: 1, 2.
5. Saxena P. B.: *Chemistry of alkaloids*. Discovery publishing house, New Delhi, 2007: 2.
6. Aniszewski T.: *Alkaloids – Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier, 2007: 6 – 10.
7. Cassiano, Nicole M.: *Alkaloids: Properties, Applications, and Pharmacological Effects*, New York, 2010: 1 – 4.
8. Doljak B., Kac J., Kreft S., Mlinarič A., Slanc P., Štrukelj B., Umek A.: *Vaje iz farmakognozije in farmacevtske biotehnologije*, založila Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 30 – 35.
9. <Http://herbierfrance.free.fr/Pharmacognosie/Hydroxy-antracenes.htm> (dostopno na spletu 27. 5. 2015).
10. Oven P., Vek V., Poljanšek I.: *Flavonoidi lesa in drevesne skorje*. Revija o lesu in pohištву: les, 2011, 11-12: 412 – 417.
11. Keller, Raymond B.: *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*, New York, 2009: 56.
12. Kreft S., Glavač N. K. *Sodobna fitoterapija, z dokazi podprtih uporab zdravilnih rastlin*. SDF. Ljubljana, 2013: 206, 243 – 245, 280, 511 – 518.
13. Kočevan N., Glavač I., Kreft S.: *Flavonoidi*. Farmacevtski vestnik 2007, 58: 145 – 148.

14. Kurek Górecka A., Rzepecka Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Świerczek Zięba G.: Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*, 2014, 19: 83.
15. Lago G. J. H., Toledo Arruda C. A., Mernak M., Barrosa H. Kaidu, Martins A. M., Tibério F. L. C. I., Prado M. C.: Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. *Molecules*, 2014, 19: 3571.
16. Petridis G. K.: w3. N. Y., Nova Science Publishers, 2011: 1.
17. Castro R. M., González Laredo F. R., Bae J., Kim K. J., Morre J., Karchesy J.: Characterization and Antioxidant Properties of the Condensed Tannins from Alaska Cedar Inner Bark. *ACG publications*, 2014: 218.
18. Polymerization Degrees, Molecular Weights and Protein-Binding Affinities of Condensed Tannin Fractions from a Leucaena leucocephala Hybrid, 7992.
19. Troy D. B., Beringer P., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 1072.
20. Hollo J., Szejli J.: The mechanism of starch-iodine reaction.
21. <http://knowledgepayback.blogspot.com/2012/04/iodimetric-iodometric-titration.html> (dostopno na spletu 27. 8. 2015).
22. [Http://www.webexhibits.org/causesofcolor/6AC.html](http://www.webexhibits.org/causesofcolor/6AC.html) (dostopno na spletu 14. 6. 2015).
23. Eger K., Troschütz R., Rote J. H.: Arzneistoffanalyse: Reaktivität-Stabilität-Analytik, Deutscher Apotheker Verlag, 1999, 4: 56, 138, 139.
24. Krishnaswamy R. N.: Chemistry of Natural Products: A Unified Approach. Universities Press, 1999: 197.
25. Abelson H. P., Barkemeyer H., Bernauer K.: Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles. Springer Science & Business Media, 2012: 13.
26. Sarker D. S., Latif Z., Gray I. A.: Natural products isolation. Springer Science & Business Media, 2005: 341.
27. Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y.: Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of Health Science*, 2003, 49: 45.

28. Vanillin assay: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf> (dostopno na spletu 27. 5. 2015).
29. Rahman A.: Bioactive Natural Products. Elsevier, 2000, 21: 519, 520.
30. Shah B., Seth A.: Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry. Elsevier Health Sciences, 2012.
31. Kasture V. A., Mahadik R. K.: Pharmaceutical Analysis, Nirali Prakashan, Mumbai, 2007, 1: 13.1.
32. Ledgard J.: The Preparatory Manual of Explosives. Lulu.com, 2007: 29.
33. Prakashan N.: Pharmacognosy, Nirali Prakashan, 2009: A.3.
34. Schulz V., Hänsel R., E. Tyler V. E.: Rational Phytotherapy. Springer Science & Business Media, 2001.
35. Rice Evans C. A., Packer L.: Flavonoids in Health and Disease, Second Edition, CRC Press, 2003: 39 – 41.
36. Kreft S., Germa M., Stibilj V., Gaberščik A., Kreft I.: Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels, Food chemistry, 2010: 473.
37. Pigman W. W.: Chemistry of The Carbohydrates. Elsevier, 2012: 568.
38. Whistler R.: Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives. Elsevier, 2012: 241.