



Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 4

Wyodrębnianie i wykrywanie arbutyny
w surowcach roślinnych

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2013

1. Wprowadzenie

Wiele naturalnych surowców roślinnych zawiera różnorodne metabolity wtórne wykazujące aktywność biologiczną, które znalazły zastosowanie w lecznictwie. Pod pojęciem surowca roślinnego należy rozumieć dowolną część rośliny używaną do celów leczniczych, natomiast lekiem roślinnym mogą być, oprócz samego surowca, wyciągi płynne lub suche z surowca albo też izolowane czyste związki chemiczne.

Ustawa „Prawo farmaceutyczne” z dnia 6 września 2001 r., Dziennik Ustaw z 2008 r. Nr 45 poz.271 w rozdz. 1 Art. 2 p. 33a m. in. wyjaśnia pojęcia: „produkt leczniczy roślinny”, „substancja roślinna” czy „przetwór roślinny” następujący sposób:

„33a) **produktem leczniczym roślinnym** - jest produkt leczniczy zawierający jako składniki czynne jedną lub więcej substancji roślinnych albo jeden lub więcej przetworów roślinnych albo jedną lub więcej substancji roślinnych w połączeniu z jednym lub więcej przetworami roślinnymi, przy czym:

- a) **substancją roślinną** - są wszystkie, głównie całe, podzielone na części lub pocięte rośliny, części roślin, glony, grzyby, porosty nieprzetworzone, zazwyczaj ususzone lub świeże; niektóre wydzieliny, które nie zostały poddane określonemu procesowi, mogą być uznane za substancje roślinne; substancje roślinne są szczegółowo definiowane przez użytą część rośliny i nazwę botaniczną,
- b) **przetworem roślinnym** - jest przetwór otrzymany przez poddanie substancji roślinnych procesom takim, jak: ekstrakcja, destylacja, wyciskanie, frakcjonowanie, oczyszczanie, zagęszczanie i fermentacja; przetworami są w szczególności rozdrobnione lub sproszkowane substancje roślinne, nalewki, wyciągi, olejki i wyciśnięte soki;”...

W związku z dużym podobieństwem pojęć substancja roślinna i naturalny surowiec roślinny w dalszej części opracowania będzie używane to ostatnie.

1.1. Zainteresowanie naturalnymi surowcami roślinnymi - krótki rys historyczny

Papirusowy opis z XVI w. p.n.e. z Egiptu oraz materiały ze Starożytnych Chin i Indii świadczą o zainteresowaniu roślinnymi surowcami leczniczymi. Większe opracowanie naukowe, zawierające charakterystykę kilkuset surowców roślinnych pochodzi z Grecji z 77 r. n.e. (Dioskorydes), z Rzymu z II w. n.e. - Celsus i Galen. Później wiedzę w Europie o surowcach roślinnych rozwinęli Arabowie. W XVI w. Szwajcar Paracelsus jako pierwszy zauważa obecność substancji czynnych w tych surowcach. W okresie odkryć geograficznych

(XV i XVI w.) sprowadzono do Europy egzotyczne rośliny, uprawiane w ogrodach botanicznych. W XVIII w. Linneusz wprowadził podstawy botanicznego systemu klasyfikacyjnego roślin będących źródłem surowców leczniczych. Pierwszego wyodrębnienia z roślin związków czynnych dokonano na początku XIX w.: Sertürner – izoluje morfinę z makowca, a Dersone – narkotyne, Pelleiter i Caventou – strychninę z nasion kulczyby a chininę – z kory chinowej.

Pisemne wzmianki nt. leczniczego wykorzystania mącznicy lekarskiej sięgają XII wieku (Walia). Pierwszy jej opis o charakterze naukowym pochodzi z 1601 r. (Clusius). Na początku II połowy XVIII w. mącznica była zalecana do użytku leczniczego przez Gerarda z Berlina. W 1788r. w Farmakopei Londyńskiej zamieszczono na jej temat monografię. Roślina ta była też od 1820 r. oficjalnym surowcem Farmakopei Amerykańskiej.

Na uwagę zasługują też prace dotyczące glikozydów fenolowych. Leroux wyodrębnił inny glikozyd fenylu - salicynę z kory wierzbowej (1830 r.). Oesterlen (1861 r.) opisuje mącznicę lekarską (*Arctostaphylos uva ursi*) jako surowiec bogaty m. in. w arbutynę. W 1891 r. Pentzold wyjaśnia działanie arbutyny wyodrębnionej z liścia mącznicy oraz jej budowę chemiczną. W tym czasie arbutynę uzyskaną z tego surowca roślinnego stosowano już do celów leczniczych w postaci krystalicznej.

Budową anatomiczną oraz morfologiczną, zawartymi związkami chemicznymi, ich wyodrębnianiem i budową, kierunkami biosyntezy substancji czynnych i właściwościami farmakologicznymi surowców roślinnych potwierdzającymi ich zastosowanie lecznicze zajmuje się farmakognozja. Obecnie zdecydowanie zmniejszyło się zainteresowanie surowcami roślinnymi jako lekami na rzecz wykorzystania ich jako źródło, z którego można izolować konkretne substancje czynne – lecznicze.

1.2. Pochodzenie surowców roślinnych

Surowce roślinne pozyskuje się ze zbioru niektórych gatunków roślin dziko rosnących w zasobach krajowych, uwzględniając ochronę środowiska przyrodniczego. Do nich można zaliczyć m. in.: dziką różę (*Rosa canina*), pokrzywę zwyczajną (*Urtica dioica*), jałowiec pospolity (*Juniperus communis*), brzozę (*Betula pubescens*, *Betula verrucosa*), krwawnik pospolity (*Achillea millefolium*), mniszek pospolity (*Taraxacum officinale*).

Intensywne zbiorczy w Polsce (teren województw pn.-wsch.) oraz zanieczyszczenie środowiska emisjami przemysłowymi spowodowały zmniejszenie lub wyniszczenie stanowisk niektórych roślin. Do nich należą m. in. gatunki: rumianek pospolity (*Chamomilla*

recutita), dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*), mącznica lekarska (*Arctostaphylos uva-ursi*), rdest ptasi (*Polygonum aviculare*), skrzyp polny (*Equisetum arvense*), mydlnica lekarska (*Saponaria officinalis*).

Obecnie uprawy roślin zawierających surowce farmakognostycznych są ich bardzo istotnym źródłem. W Polsce do najczęściej uprawianych gatunków roślin należą: mięta pieprzowa (*Mentha piperita*), kminek zwyczajny (*Carum carvi*), rumianek pospolity (*Chamomilla recutita*), dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*), szalwia lekarska (*Salvia officinalis*), len zwyczajny (*Linum usitatissimum*) i wiele innych.

Innym źródłem uzyskiwania substancji biologicznie czynnych jest biotechnologia roślinna. Obejmuje ona hodowle komórek i tkanek roślinnych *in vitro*, a także inżynierię genetyczną.

Hodowlę tkankową *in vitro* charakteryzuje wiele zalet. Pozwala ona na:

- uzyskanie metabolitów wielu gatunków roślin, w tym również niewystępujących na określonym obszarze,
- prowadzenie procesów w dowolnym miejscu i czasie,
- pozyskanie jednorodnego materiału roślinnego (mikrorozmnażanie),
- śledzenie wpływu prekursorów czy elicytorów na proces biosyntezy

Jednak tylko nieliczne opracowania laboratoryjne zostały wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym. Przyczynami tego są m.in.:

- najczęściej za małą wydajność biosyntezy metabolitów,
- przesłanki ekonomiczne (duże koszty),
- nie do końca zbadane i nie zawsze przewidywalne blokady biochemiczne w tych procesach

Mimo tego znane są przykłady wykorzystania hodowli tkankowej roślinnych substancji czynnych, charakteryzujące się znaczną wydajnością, produkowanych w skali przemysłowej. Do takich substancji m. in. należy taksol lek przeciwnowotworowy (jajniki, płuca, gruczoł krokowy) wcześniej wyizolowany z kory cisu zachodniego (pacyficznego) (*Taxus brevifolia*) a w Polsce z cisu pospolitego (*Taxus baccata*) czy polisacharydy występujące w jeżówce pospolitej (*Echinacea pupurea*), które stymulują makrofagi i granulocyty. W biotechnologii roślinnej istotną pozycję zajmuje wykorzystanie bakterii w inżynierii genetycznej.

Na wartość surowca roślinnego bardzo istotnie wpływają warunki:

- uprawy,
- zbioru,
- suszenia,

– przechowywania

Decydują one o składzie jakościowym i ilościowym substancji biologicznie czynnych. Surowce roślinne wykorzystywane w lecznictwie muszą odpowiadać określonym standardom zgodnym z wymaganiami farmakopei. W ich standaryzacji wykorzystuje się następujące metody badań: makroskopowe (tożsamość botaniczna i czystość), mikroskopowe, chromatograficzne, chemiczne i biologiczne.

Surowcami naturalnymi mogą być następujące części rośliny: korzeń, kłącze, łodyga, liść, kwiat, owoc, nasienie, kora lub ziele stanowiące zwykle części nadziemne rośliny w stadium kwitnienia.

2. Występowanie i charakterystyka wybranych roślin – surowców arbutynowych

Głównymi surowcami arbutynowymi są: z rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*) – liść mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva ursi*), liść borówki brusznicy (*Vaccinium vitis idaea*), z rodziny skalnicowatych (*Saxifragaceae*) - liść bergenii grubolistnej (*Bergenia crassifolia*), z rodziny różowatych (*Rosaceae*) – liść gruszy (*Pyrus communis*), z rodziny przewiertniowatych (*Caprifoliaceae*) – liść kaliny (*Viburnum opulus*), z rodziny jasnowatych (*Lamiaceae*) – ziele majeranku (*Majorana hortensis*) oraz ziele lebiodki (*Origanum vulgare*) i inne. W opracowaniu zostaną scharakteryzowane jedynie dwa pierwsze, będące materiałem do analizy w tym ćwiczeniu.

2.1. Mącznica lekarska (*Arctostaphylos uva ursi*)

2.1.1. Występowanie i charakterystyka botaniczna

Zimozielona roślina występuje na półkuli północnej w Europie, Azji i Ameryce. W Polsce jest pod ochroną; bardziej rozpowszechniona na północy, rośnie w lasach sosnowych. Największe zbiorowisko mącznicy lekarskiej w Polsce i jednocześnie w Europie Środkowo-Wschodniej porasta obszar 260 ha i rozsięga się na powierzchni ok. 500 ha. Występuje 50 km na północny wschód od Warszawy, na wsch. i zach. wzdłuż linii kolejowej W-wa – Wyszaków – Ostrołęka.

Roślinę charakteryzują osiągające do 1 m płożące gałązki, liście skórzaste (6x12 mm). Kwitnie w maju/czerwcu białymi lub bladonoróżowymi dzbaneczkowymi kwiatami. Owoce – jagody są czerwone, mączyste. Do celów leczniczych zbiera się, późną jesienią, liście.

2.1.2. Związki czynne i ich właściwości lecznicze

Liście mącznicy zawierają:

- glikozydy fenolu - arbutynę (nie mniej niż 6%) i metyloarbutynę,
- ester arbutyny z kwasem galusowym,
- garbniki hydrolizujące (6 - 19 %),
- piceozyd (glukozyd z aglikonem wywodzącym się od p-hydroksybenzoesanu metylu),
- flawonoidy,
- flawonoidy (m. in. izokwercytyna, hiperozyd – łącznie do 1,5%),
- kwasy fenolowe,
- triterpeny

Surowiec działa dezynfekująco na drogi moczowe. Wiąże się to z uwalnianiem w organizmie z arbutyny hydrochinonu (z metyloarbutyny - metylohydrochinonu) pod wpływem enzymów. Jednak po uwolnieniu tych dwóch produktów, dalej wchodzi w reakcję m. in. z kwasem glukuronowym. Hydrochinon i metylohydrochinon ponownie ulegają hydrolizie w moczu o odczynie zasadowym (wywołanym obecnością bakterii), wykazując właściwości przeciwbakteryjne. Wyciąg z liści tego surowca wchodzi w skład preparatu Urosept.

2.2. Borówka brusznica (*Vaccinium vitis idaea*)

2.2.1. Występowanie i charakterystyka botaniczna

Brusznica występuje na dość ubogich siedliskach, najczęściej w suchych lasach sosnowych lub świerkowych pod prześwietlonym drzewostanem, a także w zaroślach i na wrzosowiskach. W Polsce porasta na niżu i w górach. Jej występowanie świadczy o kwaśnym odczynie i jałowości gleby. Liście borówki jako surowiec zielarski zbiera się w czasie lub w początkach kwitnienia albo podczas pozyskiwania owoców.

Jest to krzewinka (do 60 cm wysokości) o skórzastych zimotrwałych liściach. Charakteryzuje się białoczerwonymi kwiatami w kształcie małych dzwoneczków. Kwitnie od maja do lipca a owocuje w sierpniu. Owoce – jędrne czerwone jagody zbierane są do celów spożywczych. W niektórych regionach Polski (na południu i południowym zachodzie) owocuje po raz drugi – od września do listopada.

2.2.2. Związki czynne i ich właściwości lecznicze

W skład liści borówki brusznicy wchodzi następujące substancje czynne:

- arbutyna – główny składnik (5-7%),
- pirozyd (reszta Glc zacetylowana w pozycji 6),

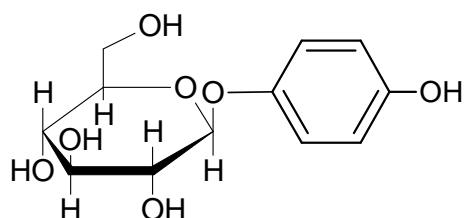
- kawoiloarbutyna (pochodna arbutyny i kwasu kawowego),
- hydrochinon (jako produkt hydrolizy arbutyny do 1%),
- flawonoidy (m. in. hiperozyd i glikozydy kwercetyny),
- garbniki katechinowe (do ok. 10%),
- kwas ursolowy (składnik triterpenowy),
- witaminy

Podobnie, jak liść mącznicy liść borówki brusznicy służy do dezynfekcji dróg moczowych. Zawarte zaś w surowcu garbniki, posiadające właściwości ściągające, stosowane są jako przeciwbiegunkowy preparat – Idalbina.

3. Wybrane glikozydy fenolowe surowców roślinnych

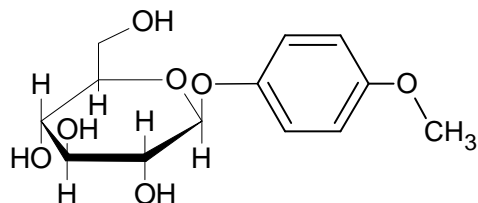
Do związków, będących pochodnymi sacharydów i fenoli – należą glikozydy fenolowe. Większość z nich łatwo rozpuszcza się w wodzie. Ulega hydrolizie w roztworach o charakterze kwaśnym i zasadowym a także z udziałem enzymów. Do ważniejszych *O*-glikozydów czyli związków chemicznych zbudowanych z reszty sacharydu (glikonu) i reszty fenoli (aglikonu), które są składnikami surowców roślinnych należą:

- arbutyna – β -D-glukopiranozyd 4-hydroksyfenylu; jej występowanie w materiale roślinnym przedstawiono wcześniej (p. 2). Strukturę arbutyny przedstawia Rys. 1

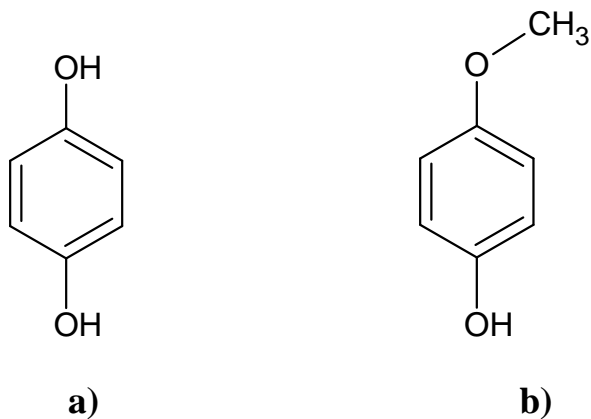


Rysunek 1. Struktura arbutyny - β -D-glukopiranozydu 4-hydroksyfenylu

- metyloarbutyna - β -D-glukopiranozyd 4-metoksyfenylu – (liść mącznicy lekarskiej, zawierający tę substancję nie czernieje tak, jak liść zawierający arbutynę) (Rys. 2.).

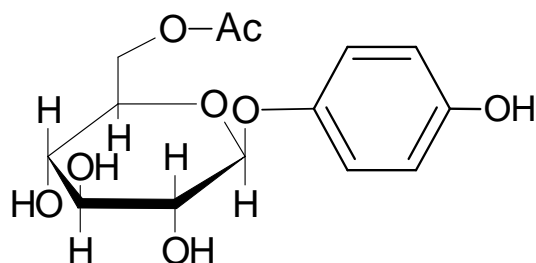


Rysunek 2. Struktura metyloarbutyny - β -D-glukopiranozydu 4-metoksyfenylu



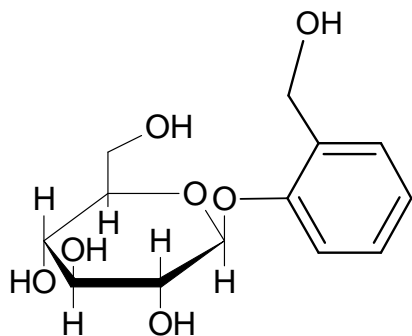
Rysunek 3. Struktury: hydrochinonu – a) i 4-metoksyfenolu – b).

- pirozyd - β -D-6-O-acetyloglukopiranozyd 4-hydroksyfenylu – Rys.4 (liść borówki brusznicy).



Rysunek 4. Struktura pirozyny - β -D-6-O-acetyloglukopiranozydu 4-hydroksyfenylu

- salicyna - β -D-glukopiranozyd saligeniny (alkoholu salicylowego) – występuje w: korze wierzb *Salix sp.*, wierzbowate (*Salicaceae*), kaliny *Viburnum sp.* (*Caprifoliaceae*) i innych (Rys. 5.).



Rysunek 5. Struktura salicyny - β -D-glukopiranozydu saligeniny (alkoholu salicylowego).

3.1. Właściwości arbutyny

Arbutyna jest białą krystaliczną substancją (krystalizuje w postaci igieł) o temperaturze topnienia 195-198 °C (analogiczna substancja z grupą α -D-glukopiranozylową ma temperaturę topnienia 203-207 °C). Dobrze rozpuszcza się w gorącej wodzie 50 mg/ml. Słabiej rozpuszcza się

w zimnej wodzie, metanolu, etanolu i acetonie. Jest nierozpuszczalna w eterze dietylowym, chloroformie, benzenie. W widmie IR wykazuje charakterystyczne pasma: 1515 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} . Arbutyna jest lewoskrętna, jej skręcalność właściwa w temperaturze $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wynosi $[\alpha]_{\text{D}} \sim -65^{\circ}$. Jej pochodna metylowa β -D-glukopiranozyd 4-hydroksyfenylu tworzy bezbarwne igły; jest też substancją optycznie czynną (lewoskrętna). Obydwie ulegają kwasowej i enzymatycznej (emulsyna) hydrolizie, dając D-glukozę i odpowiednio hydrochinon lub 4-hydroksyfenol. (Rys. 3 a i 3 b). W materiale roślinnym garbniki – pochodne kwasu galusowego hamują hydrolizę arbutyny.

3.2. Właściwości lecznicze arbutyny

Arbutyna (metyloarbutyna) jest substancją dobrze wchłanianą z przewodu pokarmowego człowieka, ale wykazuje działanie bakteriobójcze dopiero po hydrolizie do hydrochinonu (4-metoksyfenolu). Detoksykacja tego produktu rozszczepienia następuje w wątrobie, gdzie tworzy się jego pochodna z kwasem glukuronowym, która dostaje się do dróg moczowych. W środowisku obojętnym lub kwaśnym nie ulega on rozkładowi do hydrochinonu a jego działanie przeciwbakteryjne jest słabe. W infekcji dróg moczowych niektóre bakterie alkalizują mocz, co powoduje uwalnianie silnie bakteriobójczego hydrochinonu, nawet względem szczepów opornych na antybiotyki.

Arbutyna ma właściwości wybielające przebarwień skóry. Stosuje się ją też w leczeniu trądzika (kremy, żele). Sądzono, że wynika to z właściwości hydrochinonu wytworzonego z hydrolizy ($\text{pH} \geq 7,5$) arbutyny. Ten glukozyd hydrochinonu działa jako inhibitor tyrozynazy. Wiąże się on z tym enzymem. Z tego powodu nie zachodzi reakcja przemiany tyrozyny do 3-(3,4-dihydroksyfenilo)-alaniny, co nie pozwala na wytworzenie barwnika skóry – melaniny. Dziesięciokrotnie silniejsze działanie jako inhibitor wykazuje anomer α tego glukozydu.

Arbutyna jest też naturalnym filtrem zatrzymującym promieniowanie UV (A, B, C).

4. Metodyka badań surowców arbutynowych

Identyfikację surowców arbutynowych prowadzi się na podstawie reakcji, którym ulegają albo glikozydy, albo uzyskane po hydrolizie aglikony.

4.1. Badania jakościowe

W wyciągach z surowców roślinnych obecność arbutyny i metyloarbutyny można stwierdzić za pomocą reakcji chemicznych, na sproszkowanych surowcach i skrawkach – przy

pomocy reakcji histochemicznych. W badaniach jakościowych ważne miejsce zajmują też metody chromatograficzne.

Często stosowanymi w barwnych reakcjach chemicznych identyfikujących surowce arbutynowe są następujące odczynniki:

- odczynnik Tunmanna (rozcieńczony H_2SO_4 i HNO_3)- barwi wyciągi na pomarańczowo,
- odczynnik Jungmanna (10% roztwór kwasu fosfo(V)molibdenowego(VI), zalkalizowany NH_3 .) daje produkt o zabarwieniu szaroniebieskim,
- roztwór chlorku żelaza(III) zabarwia materiał na granatowoniebiesko,
- woda bromowa powoduje powstanie błękitnej fluorescencji

4.1.1. Identyfikacja arbutyny

a) metody chemiczne

Sproszkowany surowiec roślinny ogrzewa się do wrzenia w mieszaninie metanol/woda. W przesączu wytrąca się garbniki octanem ołowiu(II). Przesącz bada się na obecność arbutyny, wykorzystując powyższe odczynniki (p.4.1.).

b) metody histochemiczne

Odtłuszczony i pozbawiony chlorofilu sproszkowany surowiec albo skrawki wprowadza się do kropli kwasu azotowego(V) – komórki zawierające arbutynę zabarwiają się na pomarańczowo.

Pod wpływem roztworu siarczanu(VI) tytanu(IV) w kwasie siarkowym(VI) arbutynowe komórki barwią się na czerwono.

c) mikrosublimacja

Sproszkowany surowiec albo skrawki ogrzewa się z kilkoma kroplami kwasu chlorowodorowego ($160\text{ }^\circ\text{C}$). Powstały po hydrolizie nalot - sublimat hydrochinonu, w reakcji z azotanem(V) srebra daje czarny osad.

4.1.2. Analiza chromatograficzna

a) chromatografia cienkowarstwowa

Zarówno w chromatografii bibułowej jak i na płytkach pokrytych cienką warstwą fazy stacjonarnej (TLC) można uzyskać zadawalające rozdzielenie mieszaniny glikozydów i aglikonów. W barwnych reakcjach trudno jest wykryć obecność metyloarbutyny (obie grupy hydroksylowe związane), stąd wykonuje się hydrolizę surowca i analizuje jej produkty. Współczynnik opóźnienia R_f hydrochinonu ma niższą wartość niż p-metoksyfenolu. Obydwa związki różnią się nieco barwą plam po wizualizacji (wywołaniu) chromatogramu.

Chromatograficznie, wykorzystując TLC na żelu krzemionkowym G, można analizować:

- produkt mikrosublimacji – hydrochinon po naniesieniu jego roztworu w metanolu równolegle z wzorcowym roztworem hydrochinonu,
- wyciąg (MeOH/H₂O) ze sproszkowanego surowca roślinnego po usunięciu kwasów organicznych (CaCO₃) i garbników, flawonów oraz innych substancji balastowych (octan ołowiu(II)), wraz z substancjami wzorcowymi,
- eterowy (Et₂O) ekstrakt produktów (głównie – hydrochinon i 4-metoksyhydrochinon) zawartych w wyciągu po kwasowej hydrolizie (6 M HCl, 100 °C, 0,5 h) wraz ze wzorcowym hydrochinonem i p-metoksyfenolem,

Chromatogram rozwija się kolejno w dwóch fazach:

- faza A – octan etylu/metanol/woda – 100v:17v:13v – rozwijanie chromatogramu na drodze 5 cm, suszenie płytki, ponowne rozwijanie chromatogramu na drodze 5 cm i suszenie,
- faza B – chloroform/metanol – 95v:5v – rozwijanie chromatogramu i suszenie.

Do wizualizacji stosuje się:

- roztwór kwasu fosfo(V)molibdenowego(VI) w acetonie
hydrochinon barwi się granatowo, arbutyna i metylohydrochinon w parach NH₃ – na granatowo; metyloarbutyna nie daje reakcji barwnej,
- diazowany kwas sulfanilowy
po wysuszeniu chromatogramu spryskanego diazowanym kwasem sulfanilowym spryskuje się go roztworem KOH w etanolu – związki fenolowe barwią się na kolor czerwono-fioletowy,
- roztwór 4-aminoantypiryny i roztwór cyjanożelazianu(III) potasu
chromatogram spryskuje się roztworem pierwszym a następnie drugim i umieszcza się w parach amoniaku – arbutyna barwi się na czerwono.
- roztwór azotanu(V) srebra
daje plamy szaroczarne

b) wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC

Wysokosprawną chromatografię cieczową można wykorzystać w analizie jakościowej i ilościowej składników arbutynowych zawartych w wyciągach surowców roślinnych. Szczególnie przydatna jest ona w jednoczesnym oznaczaniu, niewiele strukturalnie różniących się, arbutyny i pirozydu. Rozdzielanie prowadzi się gradientowo w odwróconym

układzie faz z zastosowaniem rozcieńczonego roztworu wodnego kwasu fosforowego(V) i metanolu. Używa się tu detektora UV ($\lambda=289$ nm).

c) wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas LC MS

Znane jest też wykorzystanie techniki LC MS w analizie arbutyny (również ilościowej) zawartej w surowcach roślinnych. W wysokosprawnej chromatografii cieczowej prowadzonej w temperaturze 45 °C w odwróconym układzie faz (C18), stosuje się rozcieńczony wodny roztwór octanu sodu jako fazę ruchomą. Wyeluowana arbutyna z kolumny chromatografu cieczowego połączonej ze spektrometrem mas ulega jonizacji poprzez rozpylanie jej roztworu (w fazie ruchomej) w polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym (ESI). Detekcję prowadzono metodą monitorowania pojedynczego jonu (SIM), analizując jony dodatnie. W ten sposób wykonano oznaczenie arbutyny metanolowo-wodnych ekstraktów liści bergenii grubolistnej (*Bergenia crassifolia*).

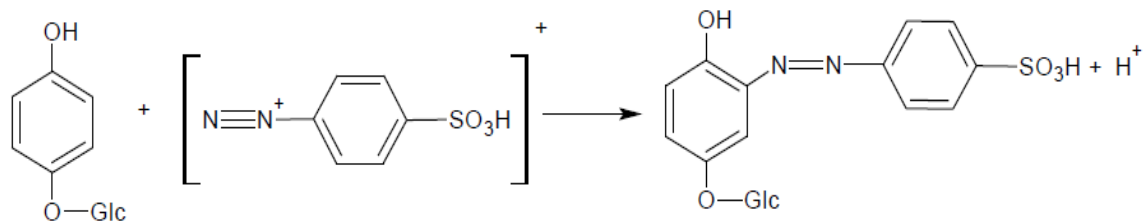
4.2. Metody ilościowe

W oznaczeniach ilościowych “składników arbutynowych” wymagane jest usunięcie garbników, flawonów oraz innych substancji balastowych, wykorzystując do ich wytrącenia octan ołowiu(II). Nadmiar tej soli z kolei strąca się wodorofosforanem(V) sodu.

Stosuje się następujące metody ilościowe oznaczania arbutyny:

- oksydymetryczne – przeprowadza się hydrolizę składników wyciągu a wytworzony hydrochinon jest ilościowo utleniany (m. in. jodem, dichromianem(VI) potasu) do chinonu.
- polarymetryczne – bezpośrednio można oznaczyć sumę glikozydów lub pośrednio sacharyd uwolniony po hydrolizie glikozydów. Te metody wymagają całkowitego usunięcia z wyciągu wszystkich substancji optycznie czynnych i uzyskania klarownych jasnych roztworów.
- kolorymetryczne – wykorzystują barwne reakcje chemiczne, którym ulegają fenole z różnymi odczynnikami. Metyloarbutyna nie posiada wolnej grupy hydroksylowej (obie grupy hydroksylowe związane chemicznie) i jedynie po hydrolizie (powstaje 4-metoksyfenol) może być oznaczona pośrednio.

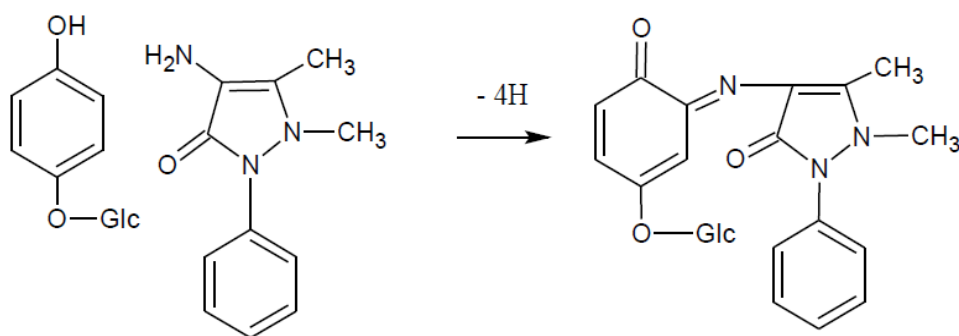
W reakcjach barwnych jako substrat używany jest diazowany kwas sulfanilowy, który barwi arbutynę na czerwono (schematyczne równanie reakcji przedstawia Rys.6.).



Rysunek 6. Przebieg reakcji arbutyny ze zdiazowanym kwasem sulfanilowym

Wyniki ilościowe są zawsze zawyżone (wyższe wartości absorbancji; odczynnik reaguje też z innymi pochodnymi fenoli).

W oznaczaniu ilościowym arbutyny stosuje się także reakcję barwną Emmersona z 4-aminoantypiryną zachodzącą w środowisku alkalicznym w obecności heksacyjanożelazianu(III) potasu jako utleniacza (produkt o zabarwieniu czerwonym). Schematyczny przebieg reakcji ilustruje rysunek 7.



arbutyna 4-aminofenazon

Rysunek 7 Przebieg reakcji arbutyny z 4-aminofenazonem (środowisko alkaliczne) w obecności $K_3Fe(CN)_6$ – reakcja Emmersona.

Zastosowanie znalazł też kwas fosfo(V)molibdenowy(VI) w środowisku alkalicznym (barwi arbutynę na niebiesko).

We wszystkich metodach kolorymetrycznych wyniki ilościowe uzyskuje się z krzywej kalibracyjnej wykreślonej ze sporządzonej serii roztworów wzorcowych.

5. Część doświadczalna

Celem ćwiczenia jest: identyfikacja arbutyny i jej pochodnych, hydrochinonu i p-metoksyfenolu, rozdzielenie metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) składników obecnych w wyciągach surowców arbutynowych (liściach mącznicy lekarskiej i borówki

brusznicy) i ich hydrolizatach oraz wyznaczenie współczynników opóźnienia rozdzielonych substancji.

5.1. Wykonanie ćwiczenia

5.1.1. Otrzymywanie wyciągów arbutynowych

Do zakręcanej buteleczki (4 ml), zaopatrzonej w dotatkową zewnętrzną uszczelkę teflonową, wprowadzić: ~400 mg sproszkowanych liści mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva ursi*), ~25 mg węglanu wapnia (zobojętnia kwasy organiczne) i 2,5 ml 50% (v/v) roztworu metanolu w wodzie i ogrzewać przez 20 min w bloczku grzejnym w temperaturze 95-97 °C. Po schłodzeniu, zawartość buteleczki przelać do probówki wirówkowej. Pozostałość z buteleczki przemyć dwiema porcjami po 0,5 ml roztworu MeOH/H₂O (1v:1v) i przenieść do probówki wirówkowej. Przygotować drugą probówkę wirówkową i napełnić ją taką objętością wody, aby posiadała identyczną masę jak pierwsza. Umieścić probówki w gniazdach wirówki vis-à-vis. Wirówkę zamknąć pokrywą, włączyć zasilanie, ustalić czas - 5 min i szybkość wirowania, ustawiając na urządzeniu do sterowania wskaźnik na górnej skali w pozycji 9.

Ze względu na bezpieczeństwo, po wyłączeniu się zasilania należy bezwzględnie odczekać i dopiero po ustaniu wirowania można zdjąć pokrywę wirówki i wyjąć probówkę wirówkową z oddzielonym wyciągiem od osadu.

Roztwór z osadu przenieść pipetą do kolejnej probówki wirówkowej, a następnie dodać 60 mg octanu ołowiu(II) w celu wytrącenia garbników, flawonów i innych substancji balastowych obecnych w wyciągu. Całość wymieszać, odczekać do opadnięcia osadu. Roztwór od osadu oddzielić przez wirowanie w identyczny sposób, jak opisano wyżej. Z tego pobrać pipetą 0,4 ml roztworu do zakręcanej buteleczki (2ml) niezbędnego do reakcji na wykrywanie arbutyny i analizy składu wyciągu metodą TLC na żelu krzemionkowym. Drugą część roztworu 2 ml przenieść pipetą do zakręcanej buteleczki (4 ml). Składniki arbutynowe tej części wyciągu zostaną poddane reakcji hydrolizy.

Według identycznej procedury należy postępować podczas otrzymywania wyciągu z liści borówki brusznicy.

5.1.2. Identyfikacja surowców arbutynowych

Do identyfikacji arbutyny w wyciągach z surowców arbutynowych – liści mącznicy lekarskiej i borówki brusznicy, zostaną wykorzystane* :

- a) wodny roztwór chlorku żelaza (III) – z arbutyną uzyskuje się produkt o granatowoniebieskim zabarwieniu,
- b) woda bromowa (3 ml bromu w 100 ml wody) – powstaje substancja o błękitnej fluorescencji,
- c) odczynnik Jungmanna (10 g kwasu fosfo(V)molibdenowego(VI) $H_3[P(Mo_3O_{10})_4] \cdot H_2O$ rozpuścić w 40 ml acetonu i uzupełnić wodą do 50 ml) – pod wpływem odczynnika, po alkalizowaniu amoniakiem wytwarza się z arbutyną produkt o zabarwieniu szaroniebieskim.

* do wyboru przez osobę prowadzącą ćwiczenia

Do buteleczki (2 ml) wprowadzić: ok. 0,2 ml roztworu wyciągu i pipetą Pasteur`a po kropli odczynnika do zmiany barwy roztworu.

5.1.3. Hydroliza wyciągów z liścia mącznicy lekarskiej i borówki brusznicy

Do każdego wyciągu metanolowego (1,8 ml) z liści mącznicy lekarskiej i borówki brusznicy z doświadczenia z p. 6.1.1. umieszczonego w buteleczce (4 ml) dodać 1 ml 6 M roztworu HCl. Buteleczkę szczelnie zamknąć (zakrętka z dodatkową zewnętrzną uszczelką teflonową) i ogrzewać w bloczku grzejnym przez 30 min w temperaturze 95 °C. Całość schłodzić, dodać 1,5 ml eteru dietylowego i wytrząsać. Warstwę górną - eterową zebrać do buteleczki (4 ml). Do hydrolizatu dodać kolejne 1,5 ml eteru, przeprowadzić ekstrakcję, wyodrębnić warstwę organiczną połączyć z poprzednim ekstraktem. Eterowy roztwór wysuszyć bezwodnym siarczanem(VI) sodu, następnie przesączyć do kolbki okrągłodennej (5 ml). Eter dietylowy odparować w temperaturze pokojowej na wyparce obrotowej. Do suchej pozostałości dodać 0,2 ml metanolu i pozostawić do analizy metodą TLC na żelu krzemionkowym.

5.1.4. Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym G

Przygotować płytki do cienkowarstwowej chromatografii pokryte żelem krzemionkowym G o wymiarach 47 x 65 mm. W odległości 5 mm od jednego końca płytki ołówkiem delikatnie oznaczyć linię startu a w odległości 3 mm od drugiego – linię czoła fazy ruchomej. Długość drogi na płytce, na której będzie rozwijany chromatogram, podzielić na dwie równe części.

Na jedną płytkę, w równych odległościach, za pomocą szklanej kapilary, nanieść kolejno:

- wzorcowy roztwór hydrochinonu (20 μ l),
- wzorcowy roztwór 4-metoksyfenolu (20 μ l),
- wzorcowy roztwór arbutyny (20 μ l),

- roztwór wyciągu z mącznicy lekarskiej (25 µl),
- roztwór wyciągu z borówki brusznicy (25 µl)

Na drugą płytkę, za pomocą szklanej kapilary, nanieść kolejno:

- wzorcowy roztwór hydrochinonu (20 µl),
- wzorcowy roztwór p-metoksyfenolu (20 µl),
- wzorcowy roztwór arbutyny (20 µl),
- roztwór hydrolizatu wyciągu z mącznicy lekarskiej (25 µl),
- roztwór hydrolizatu wyciągu z borówki brusznicy (25 µl)

Uwaga: roztwory należy nanosić na płytkę w niewielkich porcjach objętościowych, każdorazowo susząc plamki za pomocą suszarki.

Wcześniej do komory chromatograficznej wlać fazę ruchomą do wysokości słupa cieczy ok. 3 mm. Płytkę wprowadzić ostrożnie do komory i rozwijać chromatogram jak opisano niżej.

Rozwijanie chromatogramu prowadzić następująco:

- rozwijanie chromatogramu z zastosowaniem fazy ruchomej A na ½ drogi migracji,
- przerwanie rozwijania i wysuszenie płytki,
- ponowne rozwijanie chromatogramu z zastosowaniem fazy ruchomej A na ½ drogi migracji, i suszenie,
- rozwijanie chromatogramu z zastosowaniem fazy ruchomej B na całej drodze zaznaczonej na płytce a następnie wysuszenie jej.

Wcześniej do TLC przygotować dwie fazy ruchome:

- faza A – octan etylu/metanol/woda – 100v:17v:13v,
- faza B – chloroform/metanol – 95v:5v

Uwaga: po wykonaniu ćwiczenia komór do chromatografii nie wstawiać do mocno nagrzaney suszarki.

Wizualizację chromatogramu przeprowadzić z wykorzystaniem reakcji barwnej Emmersona z 4-aminoantypiryną zachodzącą w środowisku alkalicznym w obecności heksacyjanożelazianu(III) potasu. Spryskać płytkę roztworem 4-aminoantypiryny, wysuszyć, spryskać roztworem heksacyjanożelazianu(III) potasu, wysuszyć i wprowadzić do par amoniaku nad wodą amoniakalną.

Uwaga: spryskiwanie płytek bezwzględnie wykonać pod sprawnie działającym dygestorium.

Wyznaczyć współczynniki opóźnienia R_f substancji wzorcowych, substancji w analizowanych wyciągach mącznicy lekarskiej i borówki brusznicy oraz w ich hydrolizatach.

Na tej podstawie porównać skład jakościowy tych dwóch analizowanych surowców roślinnych. Wyniki umieścić w tabeli 1.

Tabela 1

Nazwa surowca lub wzorca		Wartości współczynników opóźnienia R_f			
Mącznica lekarska	wyciąg				
	hydrolizat wyciągu				
Borówka brusznica	wyciąg				
	hydrolizat wyciągu				
hydrochinon					
p-metoksyfenol					
arbutyna					

Metanolowe roztwory substancji wzorcowych (hydrochinon, p-metoksyfenol, arbutyna) posiadają stężenie 2-5 mg/ml.

5.1.5. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- metanol destylowany (200 ml) i roztwór MeOH/H₂O (1v:1v) – 150 ml,
- węglan wapnia cz.d.a. – 5 g,
- octan ołowiu(II) – 10 g,
- stężony kwas chlorowodorowy (100 ml) i 6 M roztwór HCl – 100 ml,
- chlorek żelaza (III) i 10% wodny roztwór FeCl₃ – 50 ml,
- aceton destylowany – 100ml,
- octan etylu destylowany – 200 ml,
- chloroform destylowany – 200 ml,
- woda amoniakalna (25% roztwór) – 200 ml,
- eter dietylowy destylowany – 100 ml,
- bezwodny siarczan(VI) sodu - 50 g,
- woda bromowa (3 ml Br₂ w 100 ml wody),
- woda dejonizowana – 100 ml,

- roztwór fazy ruchomej A – octan etylu/metanol/woda – 100v:17v:13v – 150 ml,
- roztwór fazy ruchomej B – chloroform/metanol – 95v:5v – 100 ml,
- arbutyna – 2g,
- 4-metoksyfenol – 2g,
- hydrochinon – 5 g,
- liście mącznicy lekarskiej – 5 g,
- liście borówki brusznicy – 5 g,
- moździerz – 1 szt.,
- buteleczka (4 ml) z zakrętką z dwiema uszczelkami (silikonowa i teflonowa) – 7 szt.,
- buteleczka (2 ml) z zakrętką z uszczelką silikonową – 8 szt.,
- pipeta (1 ml) – 7 szt.,
- pipeta (2 ml) – 5 szt.,
- pipeta (5 ml) – 3 szt.,
- pipeta Pasteur`a z gumką – 4 szt.
- kolbka okrągłodenna (5 ml) – 2 szt.,
- kolba stożkowa (250 ml) – 5 szt.,
- kolba stożkowa (100 ml) – 6 szt.,
- kolba stożkowa (50 ml) – 4 szt.,
- kolba okrągłodenna (5 ml) NS29 – 4 szt.
- krystalizator \varnothing 7,5-10 cm – 1 szt,
- zlewka (100 ml) – 2 szt.,
- zlewka (250 ml) – 2 szt.,
- lejek - \varnothing ok. 5 cm z krótką nóżką – 1 szt.,
- komora chromatograficzna – 4szt.,
- kapilary szklane – 12 szt.,
- łopatka stomatologiczna – 1 szt.,
- probówka wirówkowa (5 ml) z korkiem – 5 szt.,
- wirówka – 1szt.,
- regulator mocy – 1 szt.,
- bloczek grzejny z przewodem elektrycznym – 1szt.,
- suszarka – 1szt.,
- termometr (do 150 °C) – 1 szt.,
- statyw do probówek wirówkowych – 1 szt.,
- rozpylacz szklany połączony wężykiem z „gruszką” gumową – 1szt.

6. Zagadnienia do przygotowania

- Źródła surowców roślinnych
- Surowce arbutynowe (ze szczególnym uwzględnieniem mącznicy lekarskiej i borowki brusznicy), ich skład (substancje czynne) oraz właściwości lecznicze
- Glikozydy fenolowe z uwzględnieniem ich struktury
- Właściwości arbutyny i jej właściwości lecznicze
- Metody chemiczne i chromatograficzne identyfikacji arbutyny i jej pochodnych
- Metody ilościowe oznaczania arbutyny ze szczególnym uwzględnieniem metod kolorymetrycznych (Spektrofotometria UV/VIS)
- Procedury otrzymywania wyciągów roślinnych, hydrolizy ich składników z uwzględnieniem analizy TLC (chromatografia TLC, informacje dot. żelu krzemionkowego i faz ruchomych, treści dot. chromatografii adsorpcyjnej)

Sprawozdanie powinno zawierać: krótki wstęp związany z materiałem badanym i metodami analizy, dokładny schemat z części doświadczalnej oraz wyniki i wnioski.

7. Literatura

1. Cisowski W., Dębińska-Migas W., Gill S., Łuczkiwicz R., *Analiza fitochemiczna*, Akademia Medyczna, Gdańsk, 1995.
2. Kohlmünzer S., Farmakognozja, *Podręcznik dla studentów farmacji*, PZWŁ, Warszawa, 2003.
3. Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Malinowski J., Walewska E., *Chemiczne metody badania surowców leczniczych*, PZWŁ, Warszawa, 1987,
4. Wiśniewski A., Madaj J., *Podstawy chemii cukrów*, AGRA-ENVIRO Lab., Poznań – Gdańsk, 1997.
5. Rychlińska I., Gudej J., *Acta Pol. Pharm.*, **60**, 309, 2003.
6. Pop C., Vlaste M., Tomas M., *Not. Hort. Agrobot. Cluj*, **1**, 129, 2009.
7. Sugimoto K., Nishimura T., Momura K., Sugimoto K., Kuriki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 510, 2004.