

1. **Kolokwium pisemne** (zakres tematów VI-XI).
2. **Kolokwium praktyczne** (zakres tematów V-X; dwie tury - po połowie każdej grupy).

3. Przygotowanie wyciągów (ćwiczenie indywidualne):

10 mL napoju zawierającego alkaloidy purynowe rozcieńczyć do ok. 30 mL wodą i wytrząsać z 30 mL CHCl₃ lub CH₂Cl₂. Warstwę organiczną przesączyć przez watę lub bibułę (wg potrzeb), w razie potrzeby osuszyć bezwodnym Na₂SO₄. Odparować na wyparce próżniowej (student pod opieką prowadzącego/technika). Pozostałość rozpuścić w ok. 0,5 mL MeOH i wydobyć pasteurówką z kolby kulistej np. na szkiełko zegarkowe. W przypadku otrzymania **leku gotowego** (tabletki, drażetki, ew. proszek) – sproszkować, zalać w probówce nieznaną ilością 70% MeOH z dodatkiem kilku kropeł 5% HCl i wstawić na 10 min. do płuczki ultradźwiękowej.

Na płytkę do TLC nanosić **pasmo** ok. 2 kapilary wyciągu (25-50 pociągnięć kapilarą).

Reakcje mikrochemiczne wykonywać na pozostałej części wyciągu.

4. Analiza chromatograficzna: wykrywanie alkaloidów purynowych metodą TLC:

Nanieść wyciągi i wzorce (**kofeina, teobromina, teofilina**) na płytkę do TLC. Wsuszyć. Rozwinąć chromatogram:

Faza stała: żel krzemionkowy Si 60 F₂₅₄,

Faza ruchoma: (CH₃COOEt / MeOH / H₂O = 100 / 13,5 / 10). Ok. 20 min.

Odwiąć resztki fazy ruchomej suszarką. Chromatogram wysuszyć w 100-105°C. Analizować w świetle UV (254 nm). Spryskać kolejno odczynnikami (1) roztwór Lugola w MeOH, (2) 5% HCl w MeOH. Analizować w świetle widzialnym (porównanie R_f rozkładu plam i ich barw). Zapisać wnioski.

Dla wzorców zaobserwowano następujące parametry:

	R _f	barwa (UV ₂₅₄ , przed upochodnieniem)	barwa (VIS, po upochodnieniu)
kofeina			
teobromina			
teofilina			

W analizowanym napoju:zaobserwowano obecność następujących składników:

	R _f	barwa (UV ₂₅₄ , przed upochodnieniem)	barwa (VIS, po upochodnieniu)	intensywność	wniosek o tożsamości na podstawie TLC
substancja 1					
substancja 2					
substancja 3					

Wniosek:

5. Reakcja mureksydowa na obecność alkaloidów purynowych:

Zagęszczony wyciąg z napoju (wysuszyć w parownicze pozostałość z pkt. 3) zwilżyć kilkoma kroplami stężonego roztworu HCl, dodać szczyptę sproszkowanego KClO₃ i odparować do zaniku drażniącego zapachu (pod dygestorium !). Do pozostałości dodać nieco stężonego roztworu NH₃. W razie potrzeby ogrzać i dodać kolejną porcję stężonego roztworu NH₃.

Zaobserwowane zmiany zanotować.

Analizowany napój/substancja:

Schematyczny przebieg reakcji (*wskaz barwny produkt*):

Wynik reakcji mureksydowej wykonanej na wyciągu z badanej substancji:

Wniosek:

6. Mikrosublimacja kofeiny z substancji:

Mikrosublimację wykonuje się ze skrawka folii aluminiowej (trzymanej np. w drewnianej łąpie) na szkiełko podstawowe trzymane tuż nad folią. Mikrosublimację przeprowadza się na wysokości ok. 10 cm nad płomieniem palnika spirytusowego. Wykonać mikrosublimację dla wybranej spośród następujących substancji: *Coffeae semen*, *Cacao semen*, *Theae folium*.

Powstałe na szkiełkach naloty obejrzyć pod mikroskopem; w razie potrzeby odczekać, aż odparuje woda.

Na sublimaty z substancji dodać kroplę odczynnika wywołującego puryny (I_2 z KI w HCl). Zaobserwowane zmiany zanotować.

Analizowana substancja:

Obserwacje:

Wniosek:

7. Analiza mikroskopowa proszku roślinnego:

Preparat mikroskopowy należy wykonać na gorąco w odczynniku prześwietlającym.

– ziele konopi

roślina (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

8. Analiza chromatograficzna: oznaczanie zawartości alkaloidów purynowych metodą HPLC-DAD:

W przypadku wyboru kakao do tego celu korzystać wyłącznie z kakao odtłuszczonego.

Przygotowanie próbek. Odważyć dokładnie około 0,050 g (**m**) sproszkowanej substancji, przenieść do zakręcanej próbówki typu falcon i dodać 10,0 mL (**V**) wody pipetą jednomiarową, a następnie ekstrahować w płuczce ultradźwiękowej przez 15 minut. Przefiltrować wyciąg na lejku przez bibułę filtracyjną, a następnie część ekstraktu odwirować w próbówce typu Eppendorf przez 2-3 minuty. Supernatant ostrożnie zdekantować i przefiltrować z użyciem filtra strzykawkowego o porach 0,22 µm do zakręcanej fiolki do autosamplera. Fiolka powinna zawierać min. 0,5 mL klarownego roztworu bez widocznych zanieczyszczeń mechanicznych. W przypadku analizy gotowego napoju, roztwór należy odgazować (w płuczce ultradźwiękowej bądź przez podgrzanie) i przefiltrować jak wyżej.

Analiza HPLC-DAD. Analizować za pomocą zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z matrycą diodową w następujących warunkach: **faza stacjonarna:** kolumna Zorbax Eclipse (Agilent) – wypełnienie XDB-C18, wym. 100 mm × 4,6 mm, śr. ziarna: 1,8 µm; **faza ruchoma** A: 0,1% kw. mrówkowy w wodzie, B: 0,1% kw. mrówkowy w acetonitrylu temperatura: 45 °C, przepływ: 1,5 mL/min; program: 10% B przez 3 min., następnie płukanie i kondycjonowanie kolumny: wzrost do 90% B w 3,2 min., płukanie przez 2 min., obniżenie do 10% B w 4,4 min. i płukanie do 6 min.

Po analizie należy odczytać zawartość oznaczonych składników w wyciągu na podstawie krzywej (w programie) i przeliczyć na gram wyjściowej substancji, a także zanotować czasy retencji. Spróbować wyjaśnić zależność między strukturą a czasem retencji poszczególnych ksantyn.

	teobromina	teofilina	kofeina
czas retencji (R _T , w min.)			
główne maksimum absorpcji (w nm)			
dotatkowe maksimum absorpcji (w nm): wierzchołkowe (W) lub grzbietowe (G)			
długość analityczna fali (w nm)			
liczba punktów do przygotowania krzywej wzorcowej			
zakres stężeń krzywej wzorcowej (w mg/mL)	-	-	-
wzór krzywej wzorcowej			

W wyciągu z analizowanej substancji roślinnej (.....) zidentyfikowano obecność/zawartość (*wybierz*) i oznaczono ilościowo obecność/zawartość (*wybierz*) następujących alkaloidów purynowych:

....., R_T = min., stężenie /mL;
 , R_T = min., stężenie /mL;
 , R_T = min., stężenie /mL.

Obliczenie orientacyjnej zawartości poszczególnych alkaloidów purynowych w substancji roślinnej:
m =, **V** =, zatem 1 mL wyciągu odpowiada g substancji.

.....

kofeina, przybliżona zawartość mg/g czyli %;
teobromina, przybliżona zawartość mg/g czyli %;
teofilina, przybliżona zawartość mg/g czyli %.

Ponadto na chromatogramie HPLC-DAD zaobserwowano obecność następujących składników (proszę wybrać maksymalnie trzy sygnały/piki o największej intensywności):

	R _T (w min.)	główne maksimum absorpcji (w nm)	dodatkowe maksimum absorpcji (w nm): wierzchołkowe (W) lub grzbietowe (G)	przypuszczenie o tożsamości na podstawie widma UV
substancja 1				
substancja 2				
substancja 3				

9. Analiza chromatograficzna: podsumowanie obserwacji ogólnych.

W farmakopei analiza HPLC służy do głównie do stwierdzenia obecności/oznaczenia zawartości (*wybierz*) danego markera analitycznego w substancji roślinnej.

Wymień dwie inne metody używane do tego celu, wg. farmakopei:

1.
2.

W przeprowadzonej analizie HPLC-DAD zastosowano układ *normalny/odwrócony (wybierz)*, ponieważ faza stacjonarna była *bardziej/mniej (wybierz)* polarna niż faza ruchoma. Podczas analizy zastosowano elucję *izokratyczną/gradientową (wybierz)*.

W przeprowadzonej analizie HPLC-DAD tożsamość alkaloidów purynowych została potwierdzona poprzez porównanie następujących parametrów:

1.
2.

Dla określenia zawartości kluczowych składników roztworu badanego, rozdzielonych metodą HPLC, użyto porównania *wysokości/pól powierzchni (wybierz)* sygnałów/pików chromatograficznych w analizowanym wyciągu i na krzywej kalibracyjnej, przy określonej długości fali światła nadfioletowego.