

LUCRARE DE LABORATOR NR. 2 (07-11 septembrie 2020)
ÎNSUȘIREA METODELELOR DE ANALIZĂ FARMACOGNOSTICĂ
(analiză chimică)

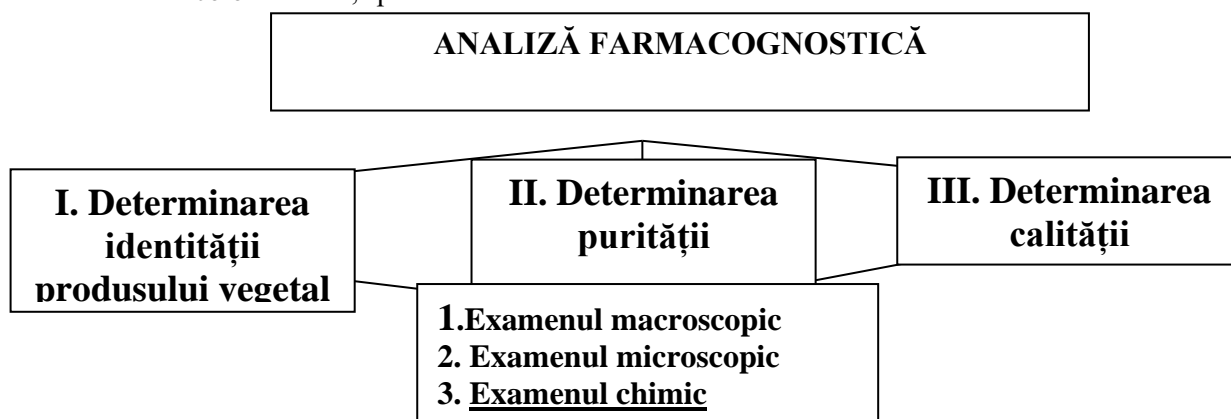
I. De studiat:

1. Noțiuni de principii active (alcaloizi, saponozide, derivați ai antracenului, substanțe tanante, etc).
2. Extragerea principiilor active din produse vegetale.
3. Reacții de identificare pentru unele grupe de principii active.

Cunoașterea unui produs vegetal înseamnă caracterizarea acestuia din punct de vedere macroscopic, microscopic **și chimic**, ceea ce conduce la stabilirea identității lui, urmată de determinarea purității și a calității. Determinările menționate se efectuează prin multiple procedee metodice cu o succesiune concretă și constituie metoda de analiza farmacognostică.

Privită în ansamblu, analiza farmacognostică cuprinde două compartimente distincte – *analiza calitativă și analiza cantitativă a produsului vegetal*.

- Analiza farmacognostică calitativă, a cărei finalitate este determinarea identității unui produs vegetal, cuprinde examenul macroscopic, examenul microscopic (prin aplicarea reacțiilor cito- și histo-chimice) și cel chimic.
- Analiza farmacognostică cantitativă prevede determinarea purității produselor vegetale și a conținutului de principii active prin diferite metode: gravimetrică, volumetrică, colorimetrică, spectrofotometrică etc



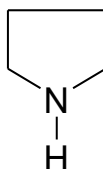
Reacții de identificare pentru unele grupe de principii active:

I. REACȚII DE IDENTIFICARE PENTRU ALCALOIZI

Alcaloizii sunt produși ai metabolismului secundar și prezintă substanțe organice heterociclice azotate, de origine vegetală, cu caracter bazic, derivate biogenetic din aminoacizi (excepție pseudoalcaloizii), care în doze determinate posedă acțiune fiziologică asupra organismului, iar în doze mari sunt toxice.

În funcție de structura ciclului carbon-azot de bază sau de poziția azotului în moleculă alcaloizii se clasifică:

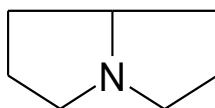
Alcaloizi derivați ai pirolidinei



pirolidina

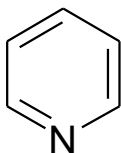
Derivați simpli ai pirolidinei: ghigrina, cusghigrina.

Derivați ai pirolizidinei (sistem biciclic condensat, format din două cicluri de pirolidină): platifilina, senecifilia, saracina extrase din spălăcioasă.

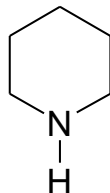


pirolizidina

Alcaloizi derivați ai piridinei și piperidinei



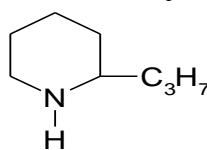
piridina



piperidina

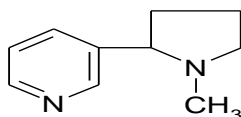
Alcaloizii acestui grup se împart în:

Derivați simpli ai piridinei și piperidinei. Ca exemplu servește coniina, lobelina.



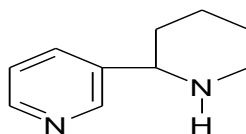
coniina

Derivați ai sistemului biciclic necondensat, format din ciclurile piridinei și pirolidinei. Din această subgrupă face parte nicotina.



nicotina

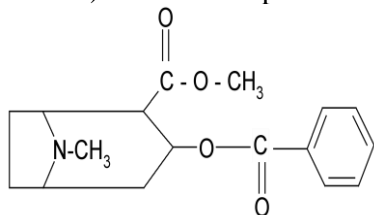
Derivați ai sistemului biciclic necondensat, format din ciclurile piridinei și piperidinei: anabazina.



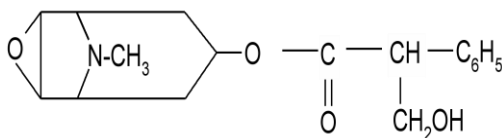
anabazina

Derivați ai sistemului biciclic condensat al piperidinei și pirolidinei.

a) Alcaloizi tropanici: hiosciamina (atropina), scopolamina, cocaina.



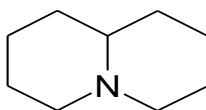
atropina



scopolamina

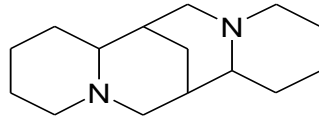
b) Un derivat al sistemului biciclic condensat al piperidinei și pirolidinei este securinina.

Derivații sistemului biciclic condensat, format din două cicluri ale piperidinei sau piridinei și piperidinei (chinolizidinei).



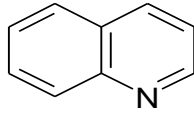
chinolizidina

Reprezentanți: citizina, pahicarpina, așa numiții alcaloizi lupinici sau chinolizidinici.



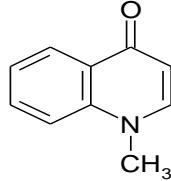
pahicarpina

Alcaloizi derivați ai chinolinei



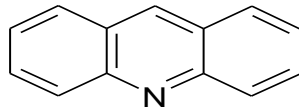
chinolina

Exemple: chinina, chinidina, cinconidina, echinopsina.



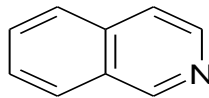
echinopsina

Alcaloizi derivați ai acridinei



acridina

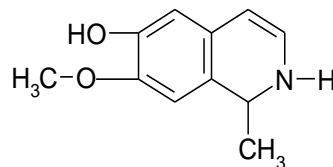
Alcaloizi derivați ai izochinolinei



izochinolina

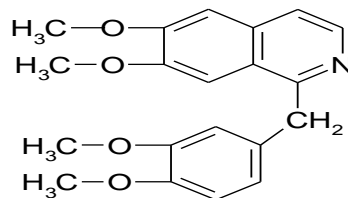
Sunt cunoscute următoarele subgrupe:

Derivați simpli ai izochinolinei: salsolina, salsolidina.



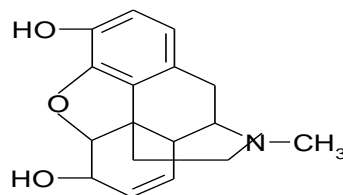
salsolina

Derivații benzilizochinolinei: papaverina, narcotina.



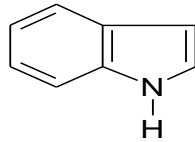
papaverina

Derivații fenantrenizochinolinei. Din această grupă fac parte morfina, codeina, tebaina.



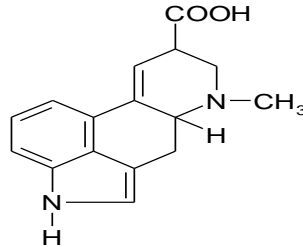
morfina

Alcaloizi derivați ai indolului



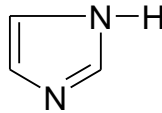
indol

Mulți alcaloizi indolici au o structură complexă – derivați ai acizilor lizergic și izolizergic: ergometrina, ergotamina, ergocristina etc.



acid lizergic

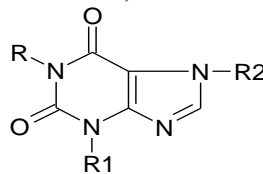
Alcaloizi derivați ai imidazolului



imidazol

Alcaloizi derivați ai purinei

Derivații purinei sunt cafeina, teobromina, teofilina.

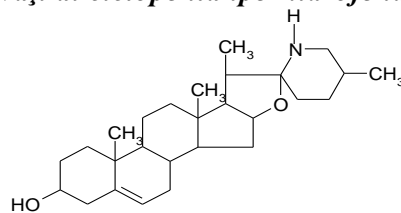


cafeina R=R1=R2=CH₃

teofilina R=R1=CH₃, R2=H

teobromina R=H, R1=R2=CH₃

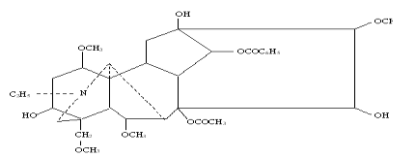
Alcaloizi derivați ai ciclopentanperhidrofenantrenei (alcaloizi steroidici)



solasodina

Alcaloizi diterpenici

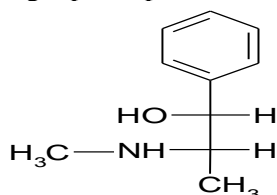
Alcaloizii diterpenici sunt reprezentați prin: delsolina, delcosina, aconitina, songorina, acetilsongorina.



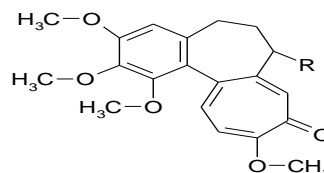
aconitina

Alcaloizi cu azotul în catena laterală (alcaloizi aciclici)

Din acest grup fac parte: efedrina, colchicina, colhamina, capsaicina

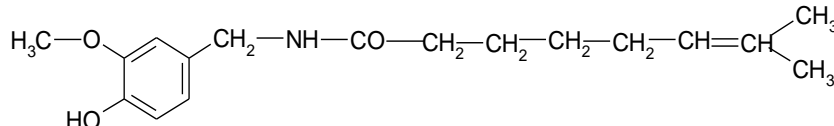


L-efedrina



colchicina

colhamina



capsaicina

Extragerea alcaloizilor din produsul vegetal decurge în 3 etape:

extragerea alcaloizilor din produsul vegetal;

purificarea extractului;

separarea alcaloizilor și purificarea lor.

Reacțiile de identificare pentru alcaloizi. În planta vie alcaloizii sunt în formă de soluție, în suc celular, la uscarea materialului vegetal, ei formează conglomerări ce nu pot fi observați la microscopul obișnuit sau sunt adsorbiți de diferite structuri celulare. Ei pot fi determinați doar cu ajutorul reactivelor, care sedimentează alcaloizii, sau prin aplicarea reacțiilor de colorare, specifice pentru fiecare alcaloid.

Reacții de precipitare la alcaloizi. Pentru această reacție poate fi folosit orice reactiv, ce sedimentează alcaloizii în țesuturile plantei. Rezultate mai bune se obțin în cazul soluției de acid picric, care formează sediment cristalizat cu mulți alcaloizi – reactivul *Dragendorff*, reactivul *Mayer*.

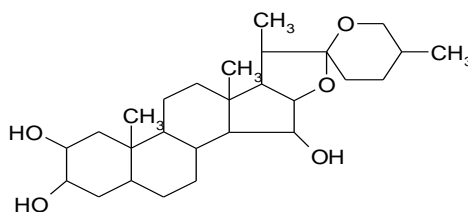
Reacțiile de precipitare a alcaloizilor pot fi efectuate pe lamă sau în eprubete, introducând în picătura reactivului secțiunea materialului vegetal proaspăt sau extractul.

O altă variantă a reacției: fragmente de material vegetal se introduc în unul din reactivele indicate timp de 1-2 săptămâni, după care se prepară secțiuni și se includ în glicerol. Sedimente ale alcaloizilor pot fi observate în formă de aglomerări ale unor ace mici (picrați) sau incluziuni granuloase mici de culoare gri sau gălbuie-gri. Sedimentul de natură alcaloidă dă rezultate negative cu același reactiv în experiența de control.

II. REACȚII DE IDENTIFICARE PENTRU SAPONOZIDE

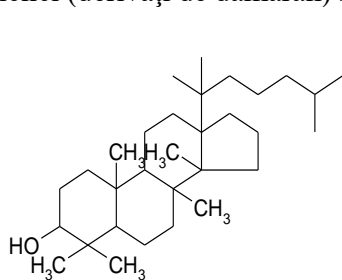
Saponozidele sunt compuși macromoleculari naturali vegetali, care constau din carbon, hidrogen și oxigen, posedă un șir de proprietăți specifice, inclusiv formarea spumei persistente, hemoliza eritrocitelor sângelui și toxicitatea pentru animale cu sânge rece (pești), prin care și se deosebesc de alte heterozide. După structura agliconului (sapogeninei) saponinele se împart în două grupe: steroidice și triterpenice.

După structura agliconului (sapogeninei) saponinele se împart în două grupe: steroidice și triterpenice. *Saponozidele steroidice* numite și neutre (sapotoxine) sunt derivați ai ciclotentanperhidrofenantrenei, care în poziția 17 conțin o catenă spirocetalică, alcătuită din 8 atomi de carbon dispuși în spirală, cu formarea a două inele: furanic și piranic.

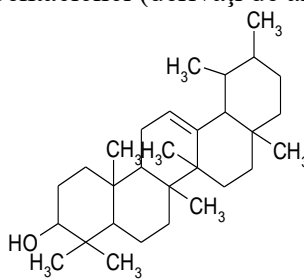


digitogenina

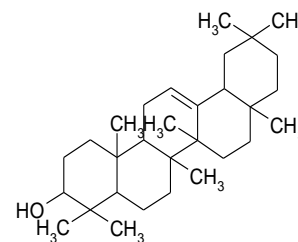
Saponozidele triterpenice (acide) au în structura lor agliconi cu 30 atomi de C, care pot fi tetraciclici (derivați de damaran) sau pentaciclici (derivați de alfa-amirină, beta-amirină).



damarandiol



alfa-amirină



beta-amirină

Reacțiile de identificare pentru saponozide. partea histochimică a saponinelor nu totdeauna dă rezultatele scontate, deoarece nu există reacții specifice, care pot fi efectuate în țesuturile plantelor. Mai convingătoare sunt rezultatele reacției, bazată pe proprietățile hemolitice ale saponinelor. Reacțiile de identificare a saponozidelor pot fi clasate în reacții biologice, fiziologice și chimice.

Reacția de formare a spumei: se iau două eprubete, în una se adaugă 5 ml soluție HCl 0,1 n, iar în a doua 5 ml NaOH 0,1 n. În ambele eprubete se adaugă câte 2-3 picături de extract sau soluția saponinelor și se agită energic. La prezența în produsul vegetal a saponinelor triterpenice în ambele eprubete se formează spumă egală după volum și stabilitate. Dacă produsul vegetal conține saponine steroidice, atunci în mediul bazic se formează spumă de câteva ori mai multă după volum și mai stabilă.

Reacția cu acetat de plumb. La 2 ml de extract în eprubetă se adaugă câteva picături de acetat de plumb. Se formează precipitat.

Reacția cu colesterol. La 1 ml de soluție alcoolică de saponine se adaugă câteva picături de soluție alcoolică de colesterol 1 %. Se formează precipitat.

Reacția Liebermann-Bourchard. Pentru efectuarea acestei reacții substanța de analizat se dizolvă în acid acetic glacial și se adaugă amestec de anhidridă acetică și acid sulfuric concentrat (50:1). Peste un timp culoarea trece de la roz la verde și albastru.

Reacția Lafon. La 2 ml de infuzie se adaugă 1 ml de acid sulfuric concentrat, 1 ml de alcool etilic și o picătură soluție sulfat de fier 10%. La încălzire apare o culoare albastră-verzuie.

Reacția cu nitrat de sodiu. La 2 ml infuzie se adaugă 1 ml soluție de nitrat de sodiu și o picătură acid sulfuric concentrat. Apare o culoare roșie-sângerie.

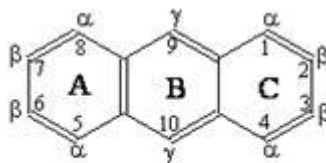
Hemoliza eritrocitelor. O suspensie de globule roșii, obținută din 2 ml sânge defibrinat și 98 ml ser fiziologic, se prezintă ca un lichid roșu-turbure, netransparent, care prin repaus depune un sediment de globule roșii. Când se amestecă volume egale de astfel de suspensie cu un decoct din plante cu saponine preparat după tehnica de la proba de spumificare, soluția trebuie să devină limpede, transparentă, de culoare roșie intensă, iar prin repaus să nu mai depună sediment roșu de hematii. Mecanismul hemolizei este de natură coloid-osmotică. Hematiile se umflă, datorită unor diferențe de presiune osmotică, se sparg punând în libertate hemoglobina, sau mai probabil se formează complexi între saponină și proteinele eritrocitare din membrana hematiilor.

Proba câmpului hemolytic. Determinarea prezenței saponinelor se mai poate face microscopic, utilizând secțiuni sau mici fragmente de produs vegetal, incluse într-un preparat obținut din 4% sânge defibrinat dispersat într-o soluție de gelatină. Saponina prezentă în produs difuzează în amestecul de gelatină-sânge, hemolizează globulele roșii și determină apariția unei zone limpede, transparente, numită câmp hemolytic. Proba câmpului hemolytic poate fi executată și cu bucăți de hârtie de filtru, îmbibate cu decoct din planta cu saponine. După scoaterea acestora din soluția cu saponine, se usucă, apoi se pun în preparatul de gelatină-sânge, unde se poate evidenția hemoliza.

Determinarea indicelui de spumificare. Indicele de spumificare este un parametru prin care se pot caracteriza produsele vegetale cu saponine și se bazează pe proprietatea acestora de a forma o spumă persistentă în soluție apoasă.

III. REACȚII DE IDENTIFICARE PENTRU DERIVAȚII ANTRACENULUI

Derivații antracenului sunt o grupă de compuși naturali, la baza cărora stă nucleul antracenului cu diferit grad de hidroxidare la inelul mijlociu (inelul B):



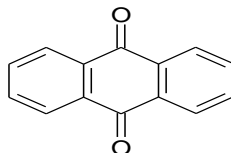
antracen

Derivații antracenului sunt substanțe cristaline de culoare galbenă, portocalie sau roșie. Agliconii liberi sunt ușor solubili în eter etilic, cloroform, benzen și alți solvenți organici; în apă nu se dizolvă, dar sunt ușor solubili în soluție apoasă de baze datorită formării fenolaților. În funcție de structura scheletului de carbon, derivații antracenului naturali se clasifică în 3 grupe:

1. compușii la baza cărora stă un nucleu de antracen (monomeri);
2. compușii cu două nuclee de antracen (dimeri);
3. derivații condensați ai antracenului.

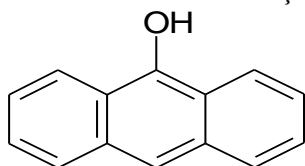
Monomerii, în funcție de gradul de oxidare a nucleului principal, la rândul său, se împart în 2 subgrupe:

- a) formele oxidate – la baza lor stă nucleul antrachinonei;

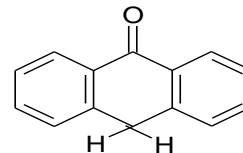


antrachinona

- b) formele reduse – derivații antranolului, antronei;



antranol



antrona

Reacțiile de identificare a derivaților antracenicilor se efectuează cu ajutorul metodelor chimice și fizice, care se completează unele pe altele.

Reacția cu bază (reacția Borntrager): 0,2 g de produs vegetal mărunțit se fierb 2 min cu 5 ml NaOH 10%. După răcire amestecul se dizolvă cu 5 ml de apă și se filtrează. 3 ml de filtrat se toarnă în eprubetă, se adaugă 3 ml HCl 10% și 10 ml benzen. Se amestecă foarte atent și după stratificarea lichidului stratul benzenic se scurge filtrându-l printr-un tampon mic de vată. La filtrat se adaugă 3 ml soluție de amoniac 10%. La prezența derivaților antracenului stratul amoniacal capătă o colorație roșie-vișinie (1,8-dioxiantrachinone), purpurie (1,4-dioxiantrachinone) sau violetă (1,2-dioxiantrachinone). Esența reacției constă în următoarele: la fierberea produsului vegetal cu bază are loc hidroliza antraheterozidelor cu formarea agronilor liberi.

Sublimarea derivaților antracenului. În eprubeta uscată se adaugă 0,2 g produs vegetal mărunțit și se încălzește, ținând eprubeta aproape orizontal. Temperatura sublimării e de 210°C, timpul sublimării – 10 minute. Sublimatul se condensează pe părțile reci ale eprubetei sub formă de picături galbene sau cristale aciforme galbene. După răcirea eprubetei la sublimat se adaugă o picătură soluție NaOH 5% în alcool etilic; apare o colorație roșie sau violetă, în funcție de componența derivaților antracenului (formarea fenolaților). Esența reacției se explică prin proprietatea antraheterozidelor din produsul vegetal, de a se descompune, la temperatură înaltă, formând agliconi liberi; concomitent derivații antronei și antranolului se oxidează până la antrachinone care sublimază.

Dintre metodele fizice cea mai completă informație o furnizează cele spectrale, care permit a stabili grupa de compuși, precum și prezența, caracterul substituenților.

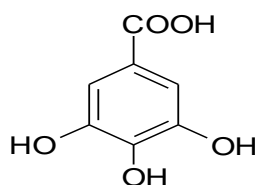
Spectroscopia UV se aplică pe larg în cercetările structurale ale derivaților antracenului. În regiunea UV acești compuși au câteva maxime de absorbție mai sus de 200 nm. Fiecare tip de substituție se caracterizează printr-un număr determinat de particularități spectrale, care facilitează stabilirea structurii compușilor noi din această grupă.

IV. REACȚII DE IDENTIFICARE PENTRU SUBSTANȚE TANANTE

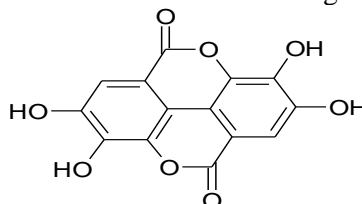
Substanțe tanante se numesc compușii naturali, care constau din polifenoli, flobafene, genetic legate între ele, indiferent dacă posedă proprietăți de tăbăcire a pielii sau nu. Ele se caracterizează printr-o mare heterogenitate structurală. Unitățile constituente aparțin seriei acizilor polifenolcarboxilici sau seriei 2-fenilbenzopiranului.

În celula vegetală vie substanțele tanante se află în formă de soluție în sucii celulari, parțial adsorbite de coloizii celulari. În produsul vegetal substanțele tanante formează ghemuri neuniforme de culoare cafenie-gălbuie. Colorația e condiționată de flobafene – produse de condensare ale substanțelor tanante, ce se împart în două grupuri:

Substanțe tanante hidrolizabile: a) galotaninuri – esterii acidului galic cu glucidele; b) esterii acizilor fenolcarbonici; c) elagotaninuri – esterii acidului elagic cu glucidele.

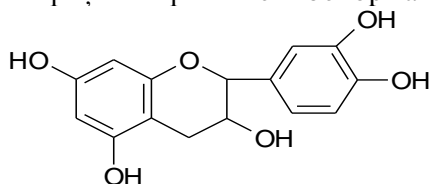


acid galic



acid elagic

Substanțe tanante condensate: a) derivații flavanolului 3; b) derivații flavandiolumului – 3,4; c) derivații oxistilbenului. Substanțele tanante nehidrolizabile sunt produși de condensare a unor compuși de tipul 2-fenilbenzopiranului (catechina).



catechina

În produsul vegetal substanțele tanante se identifică cu ajutorul a 2 grupuri de reacții calitative: reacții de sedimentare și de culoare:

Reacția cu soluție de alăun de fier și amoniu. La 2-3 ml de extract se adaugă 4-5 picături de soluție de alăun de fier și amoniu. În cazul substanțelor tanante hidrolizabile apare culoare sau precipitat negru-albastru, iar în cazul celor condensate – precipitat negru-verde (această reacție se folosește la identificarea substanțelor tanante în produsul vegetal).

Reacția cu soluție de gelatină. La 2-3 ml de extract se adaugă în picături soluție de gelatină 1%. Apare opalescență ce dispare la adăugarea excesului de gelatină.

Reacția cu clorhidrat de chinină. La 2-3 ml de extract se adaugă câteva picături de clorhidrat de chinină (antipirină) 1%. Apare un precipitat amorf.

Reacția cu soluție de aldehydă formică în mediu acid. La 10 ml de extract se adaugă 5 ml de amestec (2 ml de HCl diluat în proporție 1:1 și 3 ml de soluție de aldehydă formică 40%). Amestecul obținut se menține la fierbere 30 minute în balonul unit cu refrigerentul ascendent. Dacă în produsul vegetal se află substanțe tanante condensate, ele cad sub formă de precipitat. Precipitatul se filtrează. La 2 ml de filtrat se adaugă 10 picături de soluție de alăun de fier și amoniu 1% și 0,2 g acetat de plumb cristalin, soluția se amestecă. Dacă se găsește substanțe tanante hidrolizabile, apare culoarea azurie până la violaceu (în mediu neutru).

Reacția cu apă de brom. La 2-3 ml de extract se adaugă în picături apă de brom (5g de brom la un litru apă), până la momentul când în soluție se va simți miros de brom.). La prezența substanțelor tanante condensate se formează precipitat.

Reacția cu acetat de plumb în mediu acid. La 1 ml de extract se adaugă 2 ml de acid acetic 10% și 1 ml de sare mijlocie a acetatului de plumb 10% – substanțele tanante hidrolizabile formează precipitat. La prezența substanțelor tanante condensate filtratul se va colora în negru-verde la adăugarea a 5 picături de soluție de de alăuni de fier 1% și 0,1 g acetat de plumb.

Determinarea cromatografică a catechinelor. La produsul vegetal mărunțit (frunze de ceai), se adaugă 2 ml de alcool etilic 95% și se încălzește la baia de apă până la fierbere, se filtrează. Extractul alcoolic obținut se aplică cu ajutorul unui capilar pe linia de start a plăcii cromatografice (înălțimea coloanei de soluție în capilare e de 1,5-2 cm; diametrul petelor pe linia de start este nu mai mare de 5 mm. Alături de extractul examinat pe linia de start se aplică în calitate de soluție de referință soluția curățată a totalului de catechine din frunze de ceai.

După uscarea placa se instalează în camera de cromatografiere cu sistemul de solvenți n-butanol-acid acetic-apă (40:12:28). Cromatografierea se efectuează timp de 1,5 ore (distanța parcursă de solvent e de 10-12 cm). Ulterior cromatograma se usucă la aer și se tratează cu soluție de vanilină 1 % în HCl concentrat. Catechinele apar în formă de spoturi oranj-roșii.

II. LUCRARE PRACTICĂ CU COMPLETARE ÎN ALBUM:

Lucrare practică Nr. 1. Pregătirea extractului și identificarea alcaloizilor în frumze de mătregună (*Belladonnae folia*, *Atropa belladonna* L., Fam. Solanaceae)

(Definiție) Alcaloizii sunt produși ai metabolismului secundar și prezintă substanțe organice heterociclice azotate, de origine vegetală, cu caracter bazic, derivate biogenetic din aminoacizi (excepție pseudoalcaloizii), care în doze determinate posedă acțiune fiziologică asupra organismului, iar în doze mari sunt toxice.

Pregătirea extractului din produsul vegetal: 1 g produs vegetal mărunțit se plasează în balon de 100 ml, se adaugă 25 ml HCl 1%, se extrag timp de 5 minute la baia de apă. După răcire extractul se filtrează prin filtru de hârtie. Având în vedere, că sensibilitatea alcaloizilor față de reactivi este diferită, reacțiile se efectuează cu câțiva reactivi (5-7).

Belladonnae folia, *Atropa belladonna* L., Fam. Solanaceae



Tabelul 1

Reacții de identificare a alcaloizilor în frumze de mătregună (*Belladonnae folia*)

Reactivul	Compozența reagentului	Rezultatele reacției
-----------	------------------------	----------------------

1	Mayer	soluție de clorură de mercur în iodură de potasiu	precipitat alb sau gălbui (++)
2	Wagner și Bouchardat	soluția de iod în iodură de potasiu	precipitat brun (++)
3	Dragendorff	soluție de nitrat de bismut și iodură de potasiu cu adăugarea acidului acetic	precipitat de culoare roșie-portocalie sau roșie-cărămizie (++)
4	Marme	soluție de iodură de cadmiu în soluție de iodură de potasiu	precipitat alb sau galben (+)
5	Sol. de tanină	soluție de tanină 10%	precipitat amorf albui sau gălbui (+++)
6	Bertrang	soluție apoasă al acidului silicowolframic	precipitat albui (++)
7	Scheibler	soluție apoasă al acidului fosfowolframic	precipitat gălbui (++)
8	Sonnenschein	soluția acidului fosfomolibdenic în acid azotic	precipitat verde, în urma reducerii acidului molibdenic (+++)
9	Acid picric	Soluția acidului picric 10%	precipitat de culoare galbenă (+)
	Concluzie	<i>Alcaloizii sau identificat în frunze de mătrăgună (Belladonnae folia) prin reacții de precipitare și culoare, cu o sensibilitate mai înaltă pentru soluția acidului fosfomolibdenic, fosfowolframic și tanină.</i>	

Lucrare practică Nr. 2. Pregătirea extractului și identificarea saponozidelor

În rizomi cu rădăcini de dioscoree -Dioscoreae rhizomata cum radicibus, Dioscorea niponica, Fam. Dioscoreaceae (saponozide steroidice) și în rădăcini de lemn dulce -Glycyrrhizae radices, Glycyrrhiza glabra L., Fam. Fabaceae (saponine triterpenice)

(Definiție) Saponozidele sunt compuși macromoleculari naturali vegetali, care constau din carbon, hidrogen și oxigen, posedă un șir de proprietăți specifice, inclusiv formarea spumei persistente, hemoliza eritrocitelor sângelui și toxicitatea pentru animale cu sânge rece (pești), prin care și se deosebesc de alte heterozide. După structura agliconului (sapogeninei) saponinele se împart în două grupe: steroidice și triterpenice.

Pregătirea extractului din produsul vegetal: pregătirea infuziei (1:10) cate 2 g produs vegetal mărunțit se plasează în balon se adaugă 20 ml apă distilată și se extrag 10 minute la baia de apă. După răcire extractul se filtrează prin filtru de hârtie. Se efectuează reacții de identificare la ambele grupe de saponozide: steroidice și triterpenice.



Дioscoreя японская

Dioscoreae rhizomata cum radicibus, Dioscorea niponica , Fam. Dioscoreaceae



Glycyrrhizae radices, Glycyrrhiza glabra L., Fam. Fabacea

Tabelul 2

Reacții de identificare a saponinelor steroidice și triterpenice în produse vegetale

	<i>Reactivi</i>	<i>Dioscoreae rhizomata cum radicibus</i> (saponine steroidice)	<i>Glycyrrhizae radices</i> (saponine triterpenice)
Reacții fiziologice			
1.	Reacția de formare a spumei în cate 2 eprubete pentru ambele produse: în una se adaugă 5 ml soluție HCl 0,1 N, iar în a doua 5 ml NaOH 0,1N. În ambele eprubete se adaugă câte 3 picături de extract și se agită energic.	în mediul bazic se formează spumă de câteva ori mai multă după volum și mai stabile (<u>în prezența saponinelor steroidice</u>)	în ambele eprubete se formează spumă egală după volum și stabilitate (<u>în prezența saponinelor triterpenice</u>)
Reacții chimice			
1	Reacția cu acetat de plumb La 2 ml de extracte în eprubete se adaugă câteva picături de acetat de plumb.	se formează precipitat albui (+++)	se formează precipitat (+++)
2	Reacția cu colesterol La cate 1 ml de extracte ce conțin saponine se adaugă câteva picături de soluție alcoolică de colesterol 1 %.	se formează precipitat (++)	se formează precipitat (++)
3	Reacția Lafon La câte 2 ml de extracte se adaugă 1 ml de acid sulfuric concentrat, 1 ml de alcool etilic și o picătură soluție sulfat de fier 10%.	la încălzire apare o culoare azurie-verzuie(++)	la încălzire apare o culoare azurie-verzuie(++)
4	Reacția Liebermann-Bouchard Pentru efectuarea acestei reacții substanța de analizat se dizolvă în acid acetic glacial și se adaugă amestec de anhidridă acetică și acid sulfuric concentrat (50:1)	reactive pozitivă doar pentru saponozide steroidice, culoarea trece de la roz la verde și azuriu (++)	reacție negativă (-)
Reacții biologice			
1	Hemoliza eritrocitelor La suspensie de globule roșii (2 ml sânge defibrinat+98 ml ser fiziologic) se adaugă extractele obținute și se agită.	soluția devine transparentă (+)	soluția devine transparentă
	Concluzie:		

Lucrare practică Nr. 3. Pregătirea extractului și identificarea derivaților antracenici în scoartă de crușin: *Frangulae cortex*, *Frangula alnus* Mill. (syn. *Rhamnus frangula* L.), Fam. **Rhamnaceae**

(Definiție) Derivații antracenului sunt o grupă de compuși naturali, la baza cărora stă nucleul antracenului cu diferit grad de hidroxidare.



Frangulae cortex*, *Frangula alnus* Mill. (syn. *Rhamnus frangula* L.), Fam. **Rhamnaceae*

Tabelul 3

Reacții de identificare a derivaților antracenici în *Frangulae cortex*

	<i>Reaactivi</i>	<i>Rezultatul reacției</i>
1	Reacția cu bază (reacția Borntrager) 0,2 g de produs vegetal + 5 ml NaOH 10%, fierbere 2 minute. După răcire amestecul se dizolvă cu 5 ml de apă și se filtrează, la 3 ml de filtrate se adaugă 3 ml HCl 10% și 10 ml benzene. După stratificarea lichidului stratul benzenic se filtrează printr-un tampon mic de vată. La filtrat se adaugă 3 ml soluție de amoniac 10%.	În prezența derivaților antracenului stratul amoniacal capătă o colorație roșie-vișinie (1,8-dioxiantrachinone), purpurie (1,4-dioxiantrachinone) sau violetă (1,2-dioxiantrachinone), în urma hidrolizei antraheterozidelor cu formarea agronilor liberi
2.	Sublimarea derivaților antracenului în eprubetă se adaugă 0,2 g produs vegetal mărunțit și se încălzește, ținând eprubeta înclinată. Temperatura sublimării e de 210°C, timpul sublimării – 10 minute. Sublimatul se condensează pe părțile reci ale eprubetei sub formă de picături galbene sau cristale aciforme galbene. După răcirea eprubetei la sublimat se adaugă o picătură soluție NaOH 5% în alcool etilic	Se observă colorație roșie sau violetă, în funcție de componența derivaților antracenului, prin formarea fenolaților și prin proprietatea antraheterozidelor de a descompune la temperatură înaltă, formând agliconi liberi și a sublime
	Concluzii:	

Lucrare practică Nr. 4. Pregătirea extractului și identificarea substanțelor tanante în scoartă de stejar- *Quercus cortex*, *Quercus robur* L., Fam. Fagaceae

(Definiție) Substanțele tanante se numesc compuși naturali, care constau din polifenoli, flobafene, genetic legate între ele, indiferent dacă posedă proprietăți de tăbăcire a pielii sau nu. Ele se caracterizează printr-o mare heterogenitate structurală. Unitățile constituente aparțin seriei acizilor polifenolcarboxilici sau seriei 2-fenilbenzopiranului.

Pregătirea extractului. Se ia 1 g de produs vegetal mărunțit, se toarnă 100 ml de apă. Se încălzește la baie de apă 20-30 minute, se strecoară prin vată și extractul obținut se folosește la efectuarea reacțiilor calitative.



***Quercus cortex, Quercus robur* L. Fam. Fagaceae**

Tabelul 4

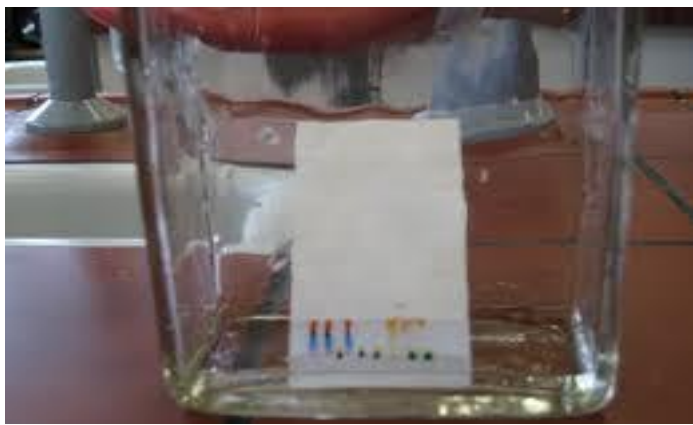
Reacții de identificare a substanțelor tanante în Quercus cortex

	<i>Reaactivi</i>	<i>Substanțe tanante hidrolizabile</i>	<i>Sustanțe tanante condensate</i>
1.	<i>Reacția cu soluție de alăun de fier și amoniu</i> La 2-3 ml extract se adaugă 4-5 picături de soluție de alăun de fier și amoniu, se agită	culoarea sau precipitatul negru-albastru- pentru substanțele tanante hidrolizabile	precipitatul negru-verzui –pentru substanțele tanante condensate
2.	<i>Reacția cu soluție de gelatină</i> La 2-3 ml de extract se adaugă în picături soluție de gelatină 1%	Apare opalescență ce dispăre la adăugarea excesului de gelatină	opalescență ce dispăre la adăugarea excesului de gelatină
3.	<i>Reacția cu apă de brom</i> La 2-3 ml de extract se adaugă în picături apă de brom până la momentul când în soluție se va simți miros de brom	-	precipitatul se formează în prezența substanțelor tanante condensate
4.	<i>Reacția cu acetat de plumb în mediu acid</i> La 1 ml de extract se adaugă 1-2 ml de acid acetic 10% și 1 ml acetat de plumb 10%	precipitat, ce se formează în prezența substanțelor tanante hidrolizabile	filtrat colorat în nuanțe verde-închis, la adăugarea alăunului de fier
5.	<i>Identificare catechinelor prin cromatografie pe strat subțire</i>	identificare prin spoturi	Identificare prin spoturi
	<i>Concluzie:</i>		

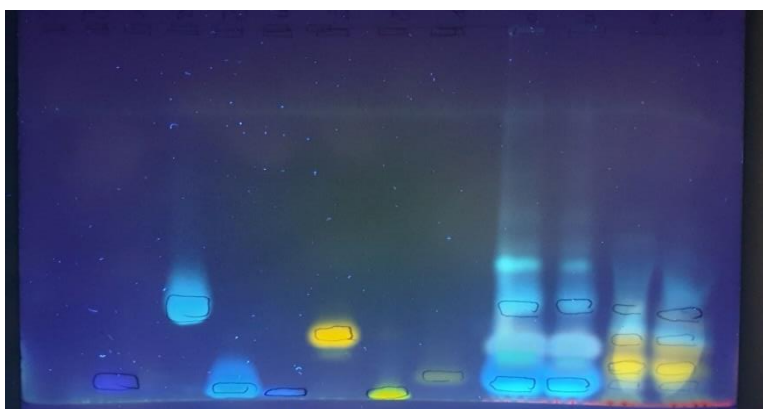
Identificarea catechinelor prin cromatografie pe strat subțire. La produsul vegetal mărunțit (frunze de ceai), se adaugă 2 ml de alcool etilic 95% și se încălzește la baie de apă până la fierbere, se filtrează.

Extractul alcoolic obținut se aplică cu ajutorul unui capilar pe linia de start a plăcii cromatografice (înălțimea coloanei de soluție în capilare e de 1,5-2 cm; diametrul petelor pe linia de start este nu mai mare de 5 mm. Alături de extractul examinat pe linia de start se aplică în calitate de soluție de referință soluția de catechină.

După uscarea plăcii se instalează în camera de cromatografiere cu sistemul de solvenți n-butanol-acid acetic-apă (40:12:28). Cromatografierea se efectuează timp de 1,5 ore (distanța parcursă de solvent e de 10-12 cm). Ulterior cromatograma se usucă la aer și se tratează cu soluție de vanilină 1 % în HCl concentrat. Catechinele apar în formă de spoturi oranj-roșii.



În imagine: camera de cromatografiere



În imagine: identificarea unor compuși chimici prin cromatografie pe strat subțire în UV (compuși fenolici în 2 extracte obținute prin diferite metode)

Surse bibliografice:

1. Nisteanu A. Farmacognozie. Chișinău, 2000.
2. Nisteanu A., Calalb T. Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale. Compendiu. Chișinău, 2016.
3. Cojocaru-Toma M. Produse vegetale și fitopreparate din Republica Moldova. Compendiu pentru lucrări de laborator la farmacognozie. Chișinău, 2017.
4. European Pharmacopoeia, vol. I, II, 2018
5. Farmacopeea română, ediția X. Editura medicală, București, 1993.
6. Государственная Фармакопея. XI издание. Москва. «Медицина», том 1 и том 2, 1990.
7. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Том II, 2007, Том III, 2009.