

Identifikacija antrahinonskih derivata u mikrosublimatima droga

Marković, D.

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1948, 4, 181 - 193**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:979128>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



NAUKA I PRAKSA

D. Marković:

Identifikacija antrahinonskih derivata u mikrosublimatima droga

(Iz Zavoda za farmakognozu Farmaceutskog fakulteta u Zagrebu, predstojnik prof.
dr. B. Akačić)

UVOD

Mikrokemijsko dokazivanje antrahinonskih derivata u drogama uspijeva zasada samo sa grupnim reakcijama, specijalnih reakcija na pojedine spojeve nemamo. Za dokazivanje njihovo služe alkalije, pare amonijaka, sublimacija i t. d. Kao podloga za sve reakcije služi u literaturi općenito poznata Bornträgerova reakcija. Princip je, da se organskim otapalom direktno izolirani antrahinonski derivati ili dobiveni hidrolizom glikozida pomoću kiseline ili lužine i otopljeni u nekom organskom otapalu mučkaju s amonijakom, koji se oboji crveno. U jednostavnijoj izvedbi služi ova reakcija i za lokalizaciju antrahinona u pojedinim partijama staničja. Noviji pokušaji, da se kromatografskom adsorpcionom metodom antrahinonski derivati izoliraju i odijele pa zatim identificiraju, daju opet mogućnost samo za razlikovanje grupa oksimetilnih antrahinona i antranola pomoću obojenih reakcija.^{1) 2) 3)}

Izoliranje antrahinonskih derivata iz droga sublimacijom može se također izvesti, jer se oni dadu sublimirati, no time nije dosada bilo moguće prijeći od grupnih reakcija na specijalne.⁴⁾ I najnoviji pokušaji, da se mikrosublimacijom izoliraju antrahinonski derivati iz droga na modernoj aparaturi uz točnu kontrolu uvjeta rada ne donose u principu ništa novo, jer se izolirani kristalići identificiraju opet samo grupno pomoću habitusa odnosno reakcijama boja s alkalijama.^{5) 6) 7)}

U vezi s ranijim radovima s područja mikrosublimacije droga^{8) 9)} postavili smo sebi zadaću da riješimo ovo pitanje tako, da bi se pomoću relativno jednostavnog postupka mogla izolirati iz smjese različitih glikozida i njihovih aglukona antrahinonskog karaktera bar jedna karakteristična komponenta u čistu stanju. Određivanjem mikrotališta ili eutektičkih temperatura s prikladnim test-supstancijama mogla bi se supstancija točno identificirati. Identifikacijom barem jedne karakteristične komponente bilo bi u većini slučajeva moguće identificirati male količine praška droge dotično njezina ekstrakta, tinkture itd. Osim toga mogla bi se pratiti nazočnost i raspored pojedinih antrahinonskih derivata u različnim vegetacijskim stadijima odnosno u različitim organima bilja.

Iz dosadašnjih radova u području mikrosublimacije antrahinonskih droga vidljivo je, da je usprkos činjenice, što antrahinonski derivati relativno lako sublimiraju iz praška droga, teško dobiti sublimat u kristalnom, a još teže u čistu stanju. Samo jedan dio droga daje sublimat, gdje se uz amorfan sublimat dobiju i kristalići obično u obliku iglica.^{4) 5)} Skoro u svakoj antrahinonskoj drogi nadeni su sterini: ramnol u Cort. Frangulae i u Cort. Cascarae Sagradae¹⁰⁾, neimenovani sterin u Fol. Sen-nae¹¹⁾, fitosterin u Rheum Emodi Wall.¹⁰⁾ itd.

Osim toga je na pr. u Cort. Frangulae naden vosak ramnocerin i arahinska kiselina.¹²⁾ Prema tome se može svakako zaključiti, da uz antrahinonske derivate sublimiraju direktno iz praška droge i masti i fitosterini, u kojima se smjesa antrahinona u neku ruku koloidno otapa, pa tako ove supstancije smetaju u većini slučajeva kristalizaciji antrahinonskih derivata. Holesterin daje kod sublimacije kristaliće⁴⁾ odnosno kapljice¹³⁾, a fitosterini samo kapljice.⁴⁾ Prije istraživanja pojedinih droga trebalo je riješiti 2 opća problema: 1. uklanjanje masti i fitosterina, koji smetaju mikrosublimaciji, i 2. dobivanje kontrolnih supstancija za kontrolu rezultata dobivenih mikrometodama.

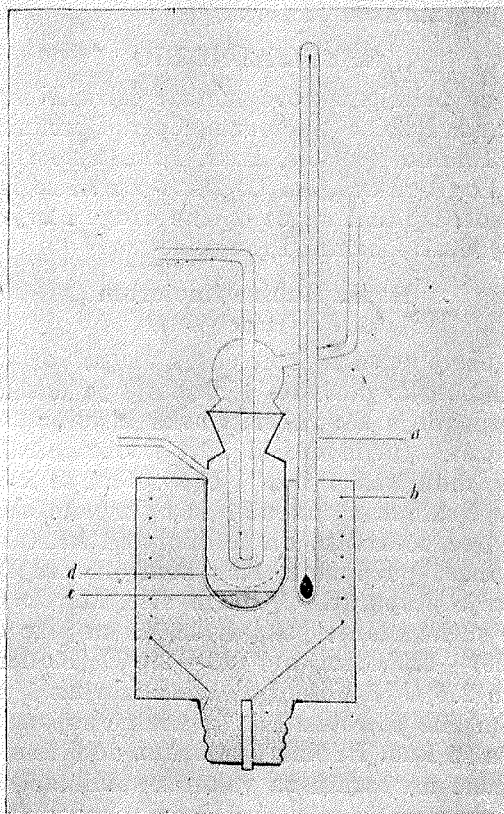
Što se tiče prvog problema teškoća se kod odjeljivanja masti i sterina sastoji uglavnom u tome, što organska otapala, koja otapaju masti i sterine, ponajčešće otapaju i antrahinonske derivate. Uklanjanje masti saponifikacijom pomoću lužine također se ne da provesti, jer se zajedno otapaju i antrahinoni.

Eventualno prethodno čišćenje ekstrakta antrahinona od masti preko stupca Al_2O_3 ili MgO kromatografski, kako su to primijenili C. Björling i I. Ehrlén¹⁴⁾ za fotometrička kvantitativna određivanja antrahinonskih derivata u Extr. Frangulae, bilo bi komplicirano za male količine praška. Osim toga i ovako prečišćeni preparat nije dovoljno čist nego se mora još dalje čistiti sublimacijom, pa kombinacija ove metode i sublimacije ne bi popravila postupak.

Za uklanjanje masti i sterina bar u tolikoj mjeri, da se kristali dobiveni sublimacijom mogu resublimacijom očistiti, primijenjeni su kod različitih droga različiti načini, kako je to u specijalnom slučaju odgovaralo. Uglavnom smo kod toga postupali tako, da smo iz smjese antrahinona uklanjali onu komponentu, koju trenutno nismo dokazivali, otapanjem u nekom otapalu u kojem se druga komponenta ne topi, a zajedno s njom uklonjena je i mast, vosak i sterini. Mali ostaci masti odstranjeni su napokon resublimacijom.

U vezi s drugim problemom upotreбили smo za kontrolu rezultata i izoliranih supstancija konstante dobivene kontrolnim supstancijama u čistu stanju iz prometa ili, ako ovih nije bilo, priredili smo ih sami iz droga makrokemijskim putem. Za prečišćavanje nečistih preparata iz prometa ili za konačno čišćenje vlastitih kontrolnih supstancija služili smo se sublimacijom u aparatu, koji je nalik na aparat O. Wernera za mikrosublimaciju u vakuumu¹⁵⁾.

Aparat se sastoji od dvije široke cijevi, koje su na krajevima zataljene, od kojih unutrašnja služi ujedno i kao hladilo, a zatvara izvanjsku na njenom gornjem kraju kao ubrušeni čep. Izvanjska cijev ima sa strane mali tubus za evakuiranje i uložena je u šamotnu masu u koju je uloženi i kratak štap-toplomjer (dug 160 mm, a širok 5 mm) sa skalom od -25° do $+360^{\circ}$ C (sl. 1, a). Živin rezervoar toplomjera nalazi se u istoj visini u kojoj i komorica za sublimaciju. Toplomjer je odijeljen od izvanjske stijenke aparata tankim slojem šamota, tako da je temperatura izvanjske cijevi aparata



Slika 1.

za vrijeme sublimacije neznatno različita od očitane temperature na toplomjeru, pa se ta razlika može ovdje i zanemariti. U praktične se svrhe prečišćavanja supstancije i onako upotrebljava interval od nekoliko (često 10° – 15°) stupnjeva kao sublimacioni optimum temperature. Šamotna masa grije se pomoću uložene spirale. Temperatura grijanja regulira se pomoću ukopčanog otpornika. Baždarenjem pojedinih točaka otpornika dobivene su empirijski različite temperature šamotne mase. Šamotna se masa nalazi u metalnom ovoju, koji je preko normiranog zavrtnja obične električne sijalice spojen na gradsku mrežu.

Kod čišćenja dolazi supstanca na dno izvanjske cijevi (sl. 1, c), a iznad nje je okrugla pločica od tvrdog papira za filtriranje, koji je izbušen iglom na rupice priječnika cca 0,05–0,1 mm. Priječnik pločice je za cca 2 mm veći od nutarnjeg priječ-

nika izvanjske cijevi, tako da papir stoji u cijevi u svedenu obliku (sl. 1, d). Kod sublimacije uhvati se sublimat između papira za filtriranje i stijenke hladila dotično na samom hladilu. Papir za filtriranje služi kao izolator prostora s nečistom supstancijom, a zajedno sa hladilom i kao recipient za prečišćenu supstanciju. Nakon dovršene sublimacije u vakuumu izvadi se oprezno papir za filtriranje s čistom supstancijom pomoću igle ili tanke čelične žice s malom kukicom.

Kod mikrosublimacije i identifikacije mikrosublimata pomoću tališta odnosno eutektičkih temperatura služili smo se Koflerovom aparaturom za određivanje mikrotališta.¹⁸⁾ Sve dobivene vrijednosti odnose se na ovakav način rada i na aparaturu od Koflera.

SPECIJALNI DIO

Kao primjere za primjenu nove metode istražili smo ove droge dotično preparate: Rad. Rubiae tinctorum, Cort. Rhamni Frangulae, Cort. Purshianae, Cort. Rhamni fallacis, Extr. Frangulae fluidum, Extr. Purshianae fluidum i Sagrada dragées UNRRA. Da bi se ispitala mogućnost šire primjene metode, ispitani su uz obične droge i svježiji primjerci Rad. Rubiae tinctorum i Cort. Rhamni Frangulae.

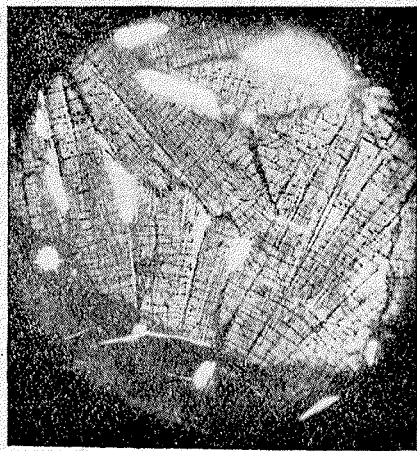
Radix Rubiae tinctorum

(Broć)

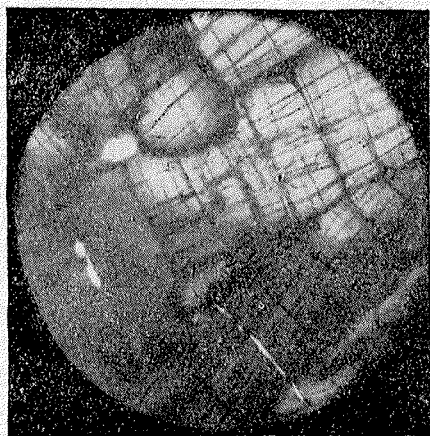
Ova je droga uzeta prva u ispitivanje stoga, što sadržava relativno jednostavne antrahinonske derivate i najbolje je dosada istražena. Kao djelotvorne tvari spominju se: ruberitrinska kiselina (alizarin-primverozid), alizarin, galiozin (primverozid 1,2,4 trioksiantrahinon-3-karbonske kiseline), purpurin, munjistin i t. d.¹⁹⁾ U svježem se korijenu nalaze glikozidi, a u starom, suhom aglukoni i to uglavnom alizarin i purpurin. Prema tome moglo se očekivati, da će dobiveni kristali mikrosublimata sastojati od alizarina i purpurina. Kao kontrolne supstancije stajali su nam na raspolaganje preparati »Alizarin sicc. Merck« i »Purpurin sicc. Merck«, a njihove su konstante pokazivale, da su jako onečišćeni: talište alizarina bilo je 287°—289° C, mjesto 289°—290° C [Kofler¹³⁾], a purpurina 215°—250° C, mjesto 256° C.¹⁷⁾ Veće količine alizarina i purpurina u čistu stanju, koje su nam bile potrebne kao kontrolne supstancije kod ispitivanja mikrosublimata iz Rad. Rubiae tinctorum, dobili smo tako da su obje supstancije prečišćene u aparatu za vakuum-sublimaciju (sl. 1.). Već kod prve sublimacije, zbog uklapanja rupičastog papira za filtriranje, dobiveni su potpuno čisti preparati.

Kod određivanja eutektičkih temperatura čistog alizarina i purpurina u smjesi sa salofenom odnosno s dicijandiamidom pokazalo se da su im eutektičke temperature s ovim supstancijama gotovo iste: sa salofenom cca 180°C, a s dicijandiamidom cca 201°C. To je ukazivalo na izomorfiju ovih dvaju spojeva.¹⁸⁾ Daljnjim određivanjem eutektičkih temperatura u smjesi s novim test-supstancijama moglo se konstatirati da su i ovdje njihove eutektičke temperature gotovo iste: s benzanilidom E cca 159° C, s fenacetinom E cca 131° C. Kod priređivanja kontaktnog preparata¹³⁾ mogli smo utvrditi da se radi o tipu I Roosebooma izomorfni supstancija sa svojstvom potpunog miješanja tekućih faza (sl. 2. i 3.). Na slikama pripada tamniji dio purpurinu, a svjetliji alizarinu.

Prema naprijed utvrđenim činjenicama ne bismo kod mikrosublimata praška broća mogli dokazati alizarin i purpurin samo pomoću eutektičkih temperatura, nego treba odrediti i njihovo talište. Kako se radi o dvjema supstancijama, koje kod više temperature lako vjetre, to za određivanje tališta treba uzeti kod mikrosublimacije nešto veću količinu praška, da bi se dobilo dovoljno mikrosublimata.



Slika 2.



Slika 3.

Izomorfija alizarina i purpurina

Mikrosublimacijom praška broća iz zbirke Zavoda za farmakognoziju, koji je bio dovoljno odležao, dobiveno je kod običnog tlaka obilno iglica crvenosmede boje uz kapljice masnih supstancija. Dvokratnom resublimacijom dobiven je čisti alizarin tališta 290°C , E sa salofenom = 180°C , a sa dicijandamidom = 201°C . Sublimati dobiveni mikrosublimacijom veće količine praška pokazivali su taljenje nekih kristalića kod 255°C . Iz toga se može zaključiti, da se u sublimatu, koji se sastoji većinom iz alizarina, nalazi i nešto purpurina.

Što se tiče svježeg korijena, Molisch¹⁸⁾ i Tunmann⁴⁾ navode da se mikrosublimacijom svježeg korijena broća dobiva ruberitrinska kiselina. Dokazom za to služi im morfološki izgled mikrosublimata (mikrofotografija kod Molisch-a i crtež kod Tunmann-a) i vladanje prema otapalu. Ovi dokazi nisu bazirani ni na kakvim utvrđenim konstantama i imaju relativno slabu dokaznu vrijednost. Kod pokušaja sublimiranja svježeg korijena dobili smo vrlo male količine sublimata u obliku iglica, a sve ostalo bile su kapljice masnog ulja. Kako se djelotvorne tvari nalaze samo u kori, to je priređena veća količina svježeg, stabilizirane kore za sublimaciju. Sublimacijom praška stabilizirane kore dobivene su u frakcijama od $120^{\circ}\text{--}180^{\circ}\text{C}$ kapljice, a u frakciji kod cca $180^{\circ}\text{--}200^{\circ}\text{C}$ iglice. Frakcija kod cca $200^{\circ}\text{--}220^{\circ}\text{C}$ sadržava kapljice i iglice, kojih je oblik i boja bila drugačija od onih iz frakcije $180^{\circ}\text{--}200^{\circ}\text{C}$. Resublimacijom ovih obiju frakcija dobivene su iglice, koje su izvjetrile kod cca 270°C , a da se prije nisu talile. Nisu dakle bile ruberitrinska kiselina [talište je ruberitrinske kiseline $260^{\circ}\text{C}^{4)}$]. Prema tome se iglice dobivene direktnom sublimacijom

svježeg korijena broća sastoje od alizarina. Za dokazivanje ruberitrinske kiseline poslužili smo se suhim ostatkom vodenog ekstrakta svježeg i stabilizirane kore. Iz suhog ostatka satrtog u prah dobiveni su kod mikrosublimacije u frakciji kod 180° — 200° C kristali, koji su na izgled bili dvovrtni. Kod resublimacije dobivene su dvije frakcije: I. od 120° — 180° C i II. od 180° — 220° C. Kristali prve frakcije talili su se kod 260° C, prema tome je to ruberitrinska kiselina. Kristali druge frakcije, koji su i morfološki bili drugačiji od onih prve, davali su sa salofenom eutektičku temperaturu 180° C, a s dicijandiamidom 201° C — sastojali su se dakle od alizarina. Kod višekratnih pokušaja resublimacije opaženo je da se ruberitrinska kiselina kod više temperature raspada i daje alizarin. Ovaj par supstancija, koje kod mikrosublimacije nastaju jedna iz druge raspadanjem kod viših temperatura, moguće je na ovaj način razlučiti i razlikovati. Tako je dokazano, da se iz vodenog ekstrakta stabiliziranog svježeg korijena broća kod temperature od 180° — 200° C sublimira ruberitrinska kiselina, a kod temperature od 200° — 220° C alizarin, na koji se ruberitrinska kiselina kod više temperature raspada. Prema tome kod mikrosublimacije svježeg korijena broća ovisi o temperaturi sublimacije, da li ćemo dobiti ruberitrinsku kiselinu ili aglukon alizarin.

Cortex Rhamni Frangulae (Krkovina)

Glavna djelotvorna tvar u Cort. Rhamni Frangulae je emodin-biozid glukofrangulin [Maeder¹²⁾]. Njegovu je strukturu točno utvrdio Schindler¹³⁾ i dokazao da je šećerna komponenta bioza, sastavljena od ramnoze i glukoze, preko ramnoze vezana u obliku β -hidroksiantrahinonglikozida. Bridel i Charraux²⁰⁾ našli su osim toga još jedan glikozid — frangularozid (ramnozid frangulaemodinantranola), koji se uglavnom nalazi u svježoj, a oksidiran u emodin u starijoj kori.

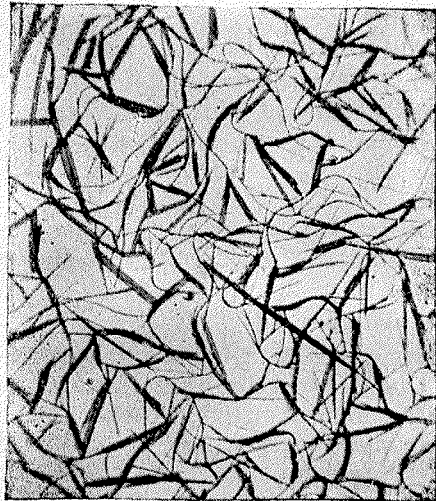
Mikrosublimacijom kore krkovine dobiva se žuta masa i iglice, koje daju pozitivnu Bornträgerovu reakciju. Kakvog su karaktera te iglice i masa nije dosada nigdje u literaturi navedeno. Seifert⁵⁾, osim točnih podataka o načinu mikrosublimacije, ne navodi ništa novo prema dotadašnjim rezultatima. Wasieky²¹⁾ razlikuje u sublimatima svježeg kore pomoću »selenaste sumporne kiseline« skupno antranole i antrahinone. Antranoli se ovim reagensom oboje crveno i prijedu u zeleno ili crno, a antrahinoni ostanu crveni.

Kod vlastitih pokušaja direktne sublimacije iz droge i resublimacije u svrhu čišćenja od masti i sterina nisu se mogli dobiti čisti produkti, koji bi davali oštro talište i eutektičke temperature. Nakon mnogobrojnih ispitivanja različitih mogućnosti izoliranja i odjeljivanja antrahinonskih derivata u svrhu identifikacije pokazalo se najzgodnijim, da se ne podvrgne sublimaciji prašak kore izravno, nego isparni ostatak dobiven obradivanjem kore kiselom vodom i ekstrakcijom izvjesnim organskim otapalom. Na taj je način pošlo za rukom odijeliti sastojke među sobom i dokazati ih pojedinačno, a ujedno ukloniti i masne primjese koje smetaju.

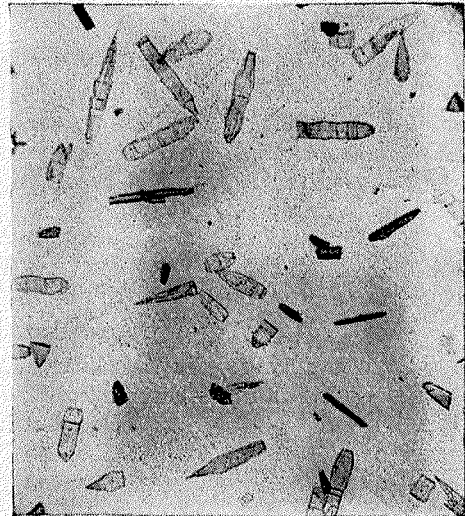
1. *Dokazivanje frangula-emodina.* Prašak kore zakuha se sa 1% HCl, tekućina zajedno s praškom ekstrahira pomoću etera, eter ispari do suha, ostatak propere sa CCl_4 da se ukloni mast i sublimira emodin, koji se resublimacijom na objektom stakaleu i ispiranjem sa CCl_4 ponovo prečisti

od primjesa. Tako se dobiju kristali sublimata (sl. 4.), koji se identificiraju pomoću određivanja tališta i eutektičkih temperatura. Talište = 264°C , eutektička temperatura sa salofenom = 175°C , s dicijandiamidom = 202°C .

Kod ovog postupka uzet je kao otapalo eter, a kao sredstvo za uklanjanje masti CCl_4 , jer se emodin prema Seidell-u²⁾ najlakše topi u eteru, a najteže u CCl_4 . Talište je mikrosublimata dobivenih na navedeni način bilo 264°C , a eutektičke temperature su bile za oko 1° više nego što ih navodi Kofler¹³⁾, a i svi navodi iz literature za korigirano talište emodina označuju nižu temperaturu negoli što smo je mi dobili. Često se u literaturi spominje samo »emodin« kao sinonim za frangula-, reum- itd. -emodin. Da se utvrdi, da li ovo dosada najviše postignuto talište pripada zaista frangula-emodinu, bilo je potrebno za provjeravanje rezultata priređivanja čistog frangula-emodina kao kontrolne supstancije, jer njime nismo raspolagali. Čisti frangula-emodin priređen je iz nešto veće količine kore (vidi eksp. dio). Konačno čišćenje preparata provedeno je sublimacijom u aparatu za vakuum-sublimaciju (sl. 1.). Ovako prečišćeni frangula-emodin služio je kao kontrolna supstancija za sva daljnja određivanja, a pokazivao je ove konstante: F = 264°C , E sa salofenom = 175°C , s dicijandiamidom = 202°C . Mješovito talište frangula-emodina kao kontrolne supstancije i mikrosublimata iz male količine droge nije pokazivalo depresije, prema tome su kristalići, dobiveni mikrosublimacijom iz eternog ekstrakta praška krkrovine frangula-emodin.



Sl. 4. Frangula-emodin



Sl. 5. Frangula-emodin antranol

2. *Dokazivanje frangula-emodin antranola.* Prašak kore zakuha se sa 1% HCl, tekućina zajedno s praškom ekstrahira pomoću kloroforma, kloroform ispari do suha, ostatak sublimira, sublimat ispere eterom, da se uklone masti, sterini i event. emodin. Resublimacijom se dobiju kristali frangula-emodin antranola (sl. 5.). On ima ove konstante: F = 282°C , E

u smjesi sa salofenom = 179° C, s dicijandiamidom = 195° C, sa frangula-emodinom 224° C. Da je to frangula-emodin antranol dokaz je, što za njega Bridel i Charraux²⁰⁾ navode talište 280° C, a osim toga daje sa selenasto-sumpornom kiselinom nakon crvene zelenu, a zatim crnu boju.

Kloroform je upotrebljen za ekstrakciju frangula-emodin antranola, a eter za uklanjanje masti i sterina, jer se frangula-emodin antranol lako topi u kloroformu, a vrlo teško u eteru [Schwimmer²³⁾]. Na ovaj način bilo je moguće ispitati koje antrahinonske derivate sadržava kora.

Svježa kora s istog individuum, pobrana u rano proljeće, podijeljena je u tri dijela. Prvi dio stabiliziran je u autoklavu parama alkohola kod 2 atm. pretlaka kroz tri minute [Perrot²⁴⁾]. Drugi je dio navlažen dobro vodom i podvrgnut fermentaciji u termostatu kod 35°–40°C za vrijeme od 48 sati, a treći brzo posušen na zraku kod obične temperature. Sve tri vrste kore sadržavale su neposredno nakon branja i nakon dva mjeseca stajanja na zraku samo frangula-emodin antranol.

U primjercima kore iz ljekara i iz zbirke zavoda utvrđen je frangula-emodin i frangula-emodin antranol u različnim omjerima prema vremenu stajanja droge. Što je kora dulje stajala, to je imala manje frangula-emodin antranola, a više emodina. No i vrlo dugo odstajali primjerci iz zbirke zavoda (cca 20 godina) nisu bili sasvim bez frangula-emodin antranola.

Na takav je način moguće s vrlo malo kore utvrditi, da li kora odgovara zahtjevima farmakopeje, t. j. da kora mora sadržavati emodin, a ne antranol. Ako se na gore opisani način ispita 0,05 g kore, koja odgovara zahtjevima farmakopeje, smije sadržavati antranola samo u tragovima.

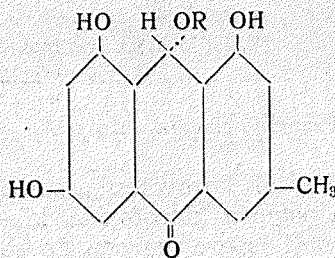
Extractum Frangulae fluidum

U Pharm. Jug. I. oficinalan je Extr. Frangulae fluid. Frangula-emodin odnosno frangula-emodin antranol dokazuju se istom metodom kao i kod praška, samo se ovdje mjesto praška droge uzima za dokazivanje emodina 1 kap ekstrakta, a za dokazivanje frangula-emodin antranola 5 kapi.

Nazočnost frangula-emodin antranola u ekstraktu daje nam mogućnost razlikovati ovaj ekstrakt od Extr. Rhamni Purshianae. Ovo razlikovanje jednostavnim načinom bilo je dosada nemoguće.

Cortex Rhamni Purshianae

Prema najnovijim istraživanjima Schindlera²⁵⁾ glavna djelotvorna tvar u Cort. Rhamni Purshianae bio bi glukozid emodin-oksantona (Ia), koji kod hidrolize pomoću razrijeđene sumporne kiseline daje (frangula)-emodin. Ovaj bi nastao sekundarno oksidacijom na zraku, a sam je glukozid zaštićen od oksidacije vezanjem šećera na -OH skupinu u položaju 9 (Ib). I za Cort. Rhamni Purshianae navodi novija literatura⁵⁾⁷⁾ kao i sva stara, da kod mikrosублиmacije daje tekuće mase s eventualno nešto kristalića. U našim prethodnim pokusima direktnom mikrosублиmacijom praška dobivene su kod cca 160°–200°C frakcije, koje su se sastojale samo od masti, a kod cca 220°–230°C



Ia: R = H

Ib: R = ostatak glukoze

dobiven je sublimat bez kristalića, koji daje Bornträgerovu reakciju, ali se ne da kristalizirati ni grepanjem pomoću lancetne igle, ni cijepljenjem pomoću emodina. Kod prepariranja oko 50 mg praška kore s kiselim vodom i eterom na način kao kod Cort. Frangulae dobiven je već nakon drugog mućkanja skoro bezbojni eterni sloj. Ispareni eter davao je nakon sublimiranja u frakciji 170°—190°C i resublimiranja relativno malu količinu frangula-emodina, dovoljnu tek za određivanje eutektičkih temperatura sa salofenom i dicijandiamidom (175°C, dotično 202°C). Za identifikaciju frangula-emodina uzeto je 5 g kore. Dobiveni frangula-emodin nije s kontrolnim frangula-emodinom davao sniženje tališta.

Kiseli vodeni sloj bio je nakon ekstrakcije eterom intenzivno tamnozuto obojen (poput 10% otopine kalijeva bikromata). Nekoliko kapi sloja davalo je s amonijakom vrlo jaku Bornträgerovu reakciju. Kod mućkanja s benzenom, kloroformom, CCl_4 , CS_2 , ostala su sva ova otapala potpuno bezbojna. Etilni ester octene kiseline obojio se tek slabo žućkasto. Mućkanjem kiselog vodenog sloja s jednakim volumenom izoamilnog alkohola (primarni α) prelaze u nj antrahinonski derivati kvantitativno.

Kako jednokratno kuhanje sa 1% HCl nije cijepalo glikozid, pokušano je cijepanje sa 5% H_2SO_4 za vrijeme od 3 sata na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Mućkanjem s eterom obojio se on slabo žućkasto i nakon isparenja dao mikrosublimacijom tek nekoliko iglica frangula-emodina, koji je identificiran pomoću eutektičkih temperatura sa salofenom i dicijandiamidom. Ostatak koji se nije hidrolizirao glatko se opet otopio u izoamilnom alkoholu. Za cijepanje glikozida hidrolizirao je Schindler²⁵⁾ sa 0,5 n- H_2SO_4 (otprilike jednako 5%) 2 sata na kipućej parnoj kupelji i nakon toga 17 sati u termostatu kod 50°C.

Prema tome se iz Cort. Rhamni Purshianae mogu sublimacijom dobiti samo minimalne količine frangula-emodina. Ostalo je emodin-oksantron glukozid, vrlo postojan, koji se ne da cijepati ni duljim kuhanjem s kiselinom.

Extractum Purshianae fluidum

Jedna kap ekstrakta Purshianae (Pharm. Helv. V.) obradena na isti način kao i Extr. Frangulae fluid. daje nakon mućkanja s eterom mršav sublimat emodina (E sa salofenom = 175°C, s dicijandiamidom = 202°C). Ostatak sačinjava glikozid identičan s onim iz droge.

Sagrada dragées

Nakon otapanja vanjskog šećernog sloja u vodi, razdrobljena je komprimirana masa dražeja u tarionici i od suhog praška obradeno je cca 10 mg kao i Pulv. Cort. Frangulae. Ekstrakcijom eterom dobiveno je nešto frangula-emodina, koji je nakon resublimacije identificiran pomoću eutektičkih temperatura sa salofenom i dicijandiamidom. Ostatak čini glikozid sa svojstvima kao kod praška droge.

Cortex Rhamni fallacis

Za ovu koru spominje prvi Tunnmann²⁶⁾ da sadržava »frangula-emodin«. Vrgoč²⁷⁾ ga je nazvao »carniolica-emodin«, premda ne navodi njegove konstante ni svojstva. Akačić²⁸⁾ je izolirala iz kore supstanciju glikozidnog karaktera, tališta 201°C, sastava $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_{20}$, koja se hidrolizom cijepa na aglukon tališta 171°C, sastava $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ i na nekakav šećer. Prema tome kemijski sastav droge Cort. Rhamni fallacis nije dosada točno poznat.

Kod obradivanja praška odstajale kore s kiselom vodom i eterom jednako kao i kod praška krkovine dobili smo obilate mikrosublimite, koji su identificirani kao frangula-emodin, pomoću tališta i eutektičkih temperatura sa salofenom i dicijandiamidom. S kontrolnim frangula-emodinom nije se u mješovitom preparatu snizilo talište.

Obraden s kloroformom dao je prašak kore obilat sublimat frangula-emodin antranola sa svim pripadnim konstantama. Mješovit preparat sa frangula-emodin antranolom iz Cort. Rhamni Frangulae nije pokazivao sniženje tališta.

Prema tome smo mogli prvi put sa sigurnošću konstatirati, da kora žestike (Rhamnus fallax Boiss.) sadržava frangula-emodin i frangula-emodin antranol*).

U tablici donosimo pregled tališta i eutektičkih temperatura:

Supstancija:	Talište:	Eutektička temperatura sa:		
		salofenom:	dicijan- diamidom:	frangula- emodinom:
Alizarin	290°C	180°C	201°C	236°C
Purpurin	256°C	180°C	201°C	236°C
Frangula-emodin	264°C	175°C	202°C	264°C
Frangula-emodin- antranol	282°C	179°C	195°C	224°C

EKSPERIMENTALNI DIO

Prečišćavanje »Alizarin sicc. Merck«

0,5 g »Alizarin sicc. Merck« sublimira se u aparatu za vakuum-sublimaciju (sl. 1.) kod tlaka 12 mm Hg i 200°–220° C. Trajanje sublimacije 3 sata i 20 min. Dobiveno 0,48 g alizarin p. a. tališta 290° C.

Prečišćavanje »Purpurin sicc. Merck«

0,5 g »Purpurin sicc. Merck« sublimira se u aparatu za vakuum-sublimaciju kod tlaka 12 mm Hg i 200°–210° C. Trajanje sublimacije 2 sata 40 min. Dobiveno 0,39 g purpurin p. a. tališta 256° C.

Mikrosublimacija Pulv. Rubiae tinctorum

5–10 mg praška (jedna lancetna igla) sublimira se kod 1–2 mm razmaka (uklapanjem krhotina objektnog stakla) na objektno staklo. Frakcije s kapljicama i nešto iglica do cca 190° C zabace se, a uhvati frakcija 190°–210°. Dvokratnom resublimacijom kod 0,1 mm razmaka (uklapanjem krhotina pokrovnog stakalca) i kod 150°–160° C dobije se čist preparat, potreban za određivanje tališta dotično eutektičkih temperatura.

Mikrosublimacija svježeg, stabiliziranog korijena Rubiae tinctorum

Svježe iskopano korijenje opere se odmah mlazom vode, kora brzo oguli i odmah posuši u sušioniku kod 100°–105° C i satre u prah. Sušenje traje 5–10 min, pa je time kora stabilizirana.

* Daljnja istraživanja ove skoro endemične²⁷⁾ domaće droge nalaze se u toku.

0,25 g praška digerira se u porculanskoj zdjelici sa 25 g destilirane vode 1 sat kod cca 80° C, otfiltrira kroz vatu i ispari na vodenoj kupelji do ostatka cca 0,5 cem. Ostatak se ispari do suha stavljanjem kap po kap iserpine pomoću uske staklene cjevčice na objektno staklo, koje se nalazi na metalnom prstenu visine 3 mm i priječnika 12 mm na stoliću aparata za određivanje mikrotališta⁸⁾ kod temperature od cca 150° C. Suhi ostatak prorahli se lancetnom iglom u prašak i sublimira kod razmaka 1—2 mm. Frakcije do cca 170° C zabace se, a hvata se frakcija od 170°—190° C. Resublimacijom kod 0,1 mm razmaka i 120°—170° C dobije se ruberitrinska kiselina, a kod 180°—220° C alizarin.

Dokazivanje frangula-emodina

Oko 50 mg praška kore Rhamnus Frangula prokuha se u epruveti sa 5 cem 1% HCl i, kad se ohladi, mučka 3—4 puta sa po 5 cem etera. Ako je potrebno, slojevi se odijele ručnom centrifugom, otpipetiraju eterni slojevi i sjedinjeni ispare na vod. kupelji u porculanskoj zdjelici do ostatka od 0,3—0,5 cem. Ostatak se ispari pomoću tanke staklene cjevčice na objektnom staklu i metalnom prstenu visine 3 mm i priječnika 12 mm do suha kod temperature od cca 80° C i isparni ostatak sublimira kod razmaka od 1—2 mm na objektno staklo. Frakcije do cca 170° C se uklone, jer sadržavaju uglavnom mast, a hvataju frakcije od 170°—190° C, koje sadržavaju emodin. Sublimati se nakon ohlađenja isperu 3 puta sa po 2 kapi CCl₄, da se ukloni mast. Zaostao, skoro čist frangula-emodin resublimira se kod razmaka od 0,1 mm na tri pokrova stakla kod temperature od 150°—180° C. Kod toga se prvi sublimat uhvati nešto veći, jer će on služiti za određivanje tališta. Kod određivanja tališta stavi se preparat na stolić za grijanje tek kod cca 250°—255° C, da relativno mala količina emodina ne izvjetri prije tališta.

Dokazivanje frangula-emodin antranola

Po prilici 0,20 g odstajale ili oko 0,05 g svježje kore u prašku prokuha se u epruveti sa 10 cem 1% HCl i, pošto se ohladi, sve promućka 3 puta sa po 10 cem kloroforma. Broj mućkanja epruvete svaki puta je 8—10 (ako se dulje mućka, prelazi i emodin u kloroform u većoj količini). Slojevi se odijele, ako je potrebno, u ručnoj centrifugi, a otpipetirani kloroformski slojevi se sjedine i ispare u porculanskoj zdjelici na vodenoj kupelji do ostatka od 0,3—0,5 cem. Ostatak se pomoću staklene cjevčice ispari na objektnom staklu i metalnom prstenu visine 3 mm, a priječnika 12 mm do suha kod 100°—120° i podvrgne sublimaciji kod razmaka od 1 mm i temperature od 110°—160° C. Sublimat se opere tri puta s po 2 kapi etera na nagnutom objektnom staklu⁹⁾ i resublimira kod razmaka od 0,1 mm i temperature od oko 160° na objektno staklo i odredi talište. Da supstancija ne izvjetri prije određivanja tališta, stavi se preparat na stolić za grijanje kod cca 270° C.

Izoliranje frangula-emodina kao kontrolne supstancije iz Cort. Rhamni Frangulae

20 g praška kore Rhamnus Frangula kuha se sa 200 g 10% NaOH u vodenoj kupelji $\frac{1}{2}$ sata i filtrira kroz Büchner-ov lijevak. Filtrat se u lijevku za odjeljivanje zakiseli razrijeđenom HCl do kisele reakcije i s eterom mućka nekoliko puta, dok se eterni slojevi još oboje žuto. Sjedinjene eterne otopine ispare se na mali volumen, doda NaOH do lužnate reakcije i odlije bezbojni eterni sloj. Lužnatoj otopini dodajemo HCl do kisele reakcije i ponovo mućkamo nekoliko puta s eterom, dok se on još oboji žuto. Nakon odjeljivanja slojeva ponovo isparimo sjedinjene eterne slojeve na mali volumen i ponovo zaluzimo. Lužnatu otopinu mućkamo 2 puta s po 100 cem kloroforma, da se uklone masne supstancije, koje nisu saponificirane. Nakon ponovnog zakiseljenja sa HCl ekstrahiramo antrakinone s eterom u lijevku za odjeljivanje, eter isparimo do suha i suhi ostatak digeriramo na vodenoj kupelji 3 puta sa po 50 cem Acid. acetic. gla-

ciale, Sjedinjene octeno-kisele otopine isparene su na vodenj kupelji do malog volumena i prepuštene kristalizaciji. Dobiveni kristali čišćeni su sublimacijom u vakuumu od 12 mm Hg i kod temperature od 190°–220° C. Talište čistih kristala = 264° C.

ZAKLJUČAK

1. Opisana je nova metoda, kojom je moguće pomoću mikrosublimacije izolirati u čistu stanju pojedine antrahinonske derivate iz malih količina droga, identificirati ih i pratiti njihovu nazočnost i raspored u drogama u različnim vegetacijskim stadijima, godišnjim doba i u pojedinim organima.

2. Izoliranje se vrši ili direktnom mikrosublimacijom iz praška droga ili mikrosublimacijom suhog ostatka, dobivenog ekstrakcijom droge prikladnim otapalom i isparavanjem ekstrakta. Prečišćeni sublimati identificiraju se pomoću određivanja tališta i eutektičkih temperatura u smjesi s prikladnim test-supstancijama. Kao kontrolne supstancije služe preparati iz prometa ili izolirani iz droga makrokemijskim putem i prečišćeni u aparatu za vakuum-sublimaciju. Dan je opis aparata.

3. Svi radovi kod izoliranja, prečišćavanja i identifikacije vršeni su na aparaturi Koflera za određivanje mikrotališta. Dobivene konstante odnose se na rad s ovom aparaturom.

4. Kao primjeri za primjenu metode istražene su droge: Rad. Rubiae tinctorum, Cort. Rhamni Frangulae, Cort. Rhamni Purshianae i Cort. Rhamni fallacis; preparati: Extr. Frangulae fluid., Extr. Purshianae fluid. i Sagrađa dragées.

5. Ova metoda omogućuje razlikovanje farmakopejom propisane odstajale Cort. Rhamni Frangulae od nepropisane svježe. Isto tako omogućuje razlikovanje Extr. Frangulae fluidum od Extr. Purshianae fluidum.

6. Utvrđena je identičnost emodina u Rh. Frangula, Rh. Purshiana i Rh. fallax. U svim trim drogama nalazi se isti (frangula-) emodin (1, 6, 8 trioksi-3-metilantrahinon).

7. Utvrđeno je da se u Cort. Rhamni fallacis nalazi frangula-emodin antranol (1, 6, 8 trioksi-3-metilni antranol) identičan s onim iz Cort. Rhamni Frangulae.

8. Utvrđena je izomorfija alizarina (1,2 dioksiantrahinon) i purpurina (1, 2, 4 trioksiantrahinon) po I. tipu Roozeboom-a.

9. U tablici dan je pregled tališta i eutektičkih temperatura.

Identification of anthraquinone derivatives in microsublimates of drugs

by D. Marković

(Summary)

1. A new method by which it is possible by means of microsublimation to isolate individual anthraquinone derivatives from small quantities of drugs in pure state, to identify them and to follow their appearance and their distribution in drugs in different vegetative stages, seasons and organs has been described.

2. The isolation is done either by direct microsublimation of the powder of the drug or by microsublimation of the dry residue obtained by extraction of the drug with a suitable solvent and its evaporation. Purified sublimates are identified by determining micromelting points and eutectic temperatures in a mixture with suitable test-substances. As control-substances may serve commercial preparations or these iso-

lated from drugs macrochemically and purified in an apparatus for vacuum-sublimation. Description of the apparatus is given.

3. The isolation, purification and identification was carried out with Kofler's apparatus for determination of micromelting point. The obtained constants are related to the working with this apparatus.

4. As examples for application of the method following drugs have been examined: Rad. Rubiae tinctorum, Cort. Rhamni Frangulae, Cort. Rhamni Purshianae, Cort. Rhamni fallacis, and the preparations: Extract. Frangulae liquid., Extr. Cascarae Sagradae liquid., and Sagrada dragées.

5. By means of this method it is possible to make a distinction between an old Cort. Rhamni Frangulae, as prescribed by Pharmacopoea, and a recent one. It is, further, possible to distinguish Extr. Frangulae liquid. from Extr. Cascarae Sagradae liquid.

6. Identity of emodine in Rh. Frangula, Rh. Purshiana and Rh. fallax has been proved. In all three drugs the same (frangula-) emodine (1.6.8 trioxy-3-methylanthraquinone) appears.

7. It has been proved that in Cort. Rhamni fallacis appears frangula-emodine-anthrone (1.6.8 trioxy-3-methylanthrone) identic to that of Cort. Rhamni Frangulae.

8. Isomorphy of alizarine (1.2 dioxyanthraquinone) and of purpurine (1.2.4 trioxyanthraquinone) has been proved according to 1-st type of Roozeboom.

9. It is given in figure a review of melting points and of eutectic temperatures of examined substances.

(Institute of Pharmacognosy, Pharmac. Faculty, Zagreb. Director Prof. B. Akačić)

LITERATURA — REFERENCES

1. Ernst P. & Weiner G., Sci. Pharmac. 8, 45 (1937).
2. Fischer R. & Iwanoff W., Sci. Pharmac. 13, 29 (1942).
3. Fischer R. & Iwanoff W., Arch. Pharm. 281, 376 (1943).
4. Tunmann-Rosenthaler, Pflanzenmikrochemie II. Aufl. Berlin 1931.
5. Seifert R., Deutsch. Apoth. Zeitg. 55, 576 (1940).
6. Casanada R., An. real. acad. farm. 2, 295 (1941) prema Chem. Zentralbl. 1942 I 3293.
7. Komment. z. Pharmakop. Helv. V. Zürich 1947, p. 293.
8. Marković D., Farm. glasnik 2, 255 (1946).
9. Marković D., Farm. glasnik 3, 1 (1947).
10. Dalmer u Klein, Handb. d. Pflanzenanalyse II. Bd. Wien 1932, p. 758.
11. Wehmer C., Die Pflanzenstoffe, Ergänzgsbd. z. II. Aufl. Jena 1935, p. 173.
12. Maeder, Dissert., Basel 1925, p. 25 & 26.
13. Kofler L. & Kofler A., Mikromethoden z. Kennzeichnung org. Stoffe u. Stoffgemische. Innsbruck 1948.
14. Björling C. O. & Ehrlén L., Collectan. Pharm. Suec. I 1946.
15. Werner O., Mikrochemie 1, 33 (1923).
16. Madans, Mittlg. für biolog. Therapie Heft 6/7 1938 p. 120.
17. D'Ans J. & Lax E., Taschenb. f. Chemiker u. Physiker, Berlin 1943.
18. Molisch H., Mikrochemie d. Pflanze III. Aufl. Jena 1923.
19. Schindler O., Helv. Chim. Acta 29, 411 (1946).
20. Bridel & Charraux, C. R. Acad. Sci. 191, 1374 (1930).
21. Wasicky R., Pharm. Monatsh. 5, 250 (1924).
22. Seidell, Solubilities of org. compounds 3-rd ed. New York 1941, p. 736.
23. Schwimmer E., Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Értesítője 21, 36 (1947).
24. Perrot E., Matières premières us. du règne végét. Tom. I. Paris 1943-44, p. 305.
25. Schindler O., Pharm. Acta Helv. 21, 189 (1946).
26. Tunmann, Schweiz. Apoth. Zeitg. 53, 313 (1915).
27. Vrgoč A., Farm. vjesnik 14, 741 (1924).
28. Akačić B., Dissert., Zagreb 1939.