



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIWERSYTET GDAŃSKI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

SKRYPT Z CHEMII LEKÓW

Chemiczna analiza środków leczniczych (Leki proste)



**Regina
Kasprzykowska**

**Aleksandra S.
Kołodziejczyk**

SKRYPT Z CHEMII LEKÓW

Regina Kasprzykowska
Aleksandra S. Kołodziejczyk

Chemiczna analiza środków lecniczych (Leki proste)

Gdańsk 2010

Uniwersytet Gdański

© Copyright by Regina Kasprzykowska and Aleksandra S. Kołodziejczyk
Skład komputerowy: Regina Kasprzykowska

Projekt okładki i strony tytułowej: Anna Białk-Bielińska, Regina Kasprzykowska

All rights reserved

ISBN 978-83-7326-713-8

Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
80-952 Gdańsk, ul. Sobieskiego 18

Spis treści

I. Wprowadzenie	7
II. Badania wstępne w chemicznej analizie związków organicznych	9
1. Próby spalania	9
2. Badania rozpuszczalności	10
3. Jakościowa analiza elementarna (oznaczanie azotu, siarki, fluorowców)	13
3.1. Wykrywanie obecności azotu	14
3.2. Próby na obecność siarki	14
3.3. Wykrywanie i identyfikacja fluorowców	14
III. Wybrane metody analizy ilościowej środków leczniczych	17
1. Oznaczenia spektrofotometryczne	17
2. Oznaczenia alkacymetryczne	19
2.1. Oznaczenia alkacymetryczne w środowisku wodnym	19
2.2. Oznaczenia alkacymetryczne w środowisku niewodnym	19
3. Oznaczenia redoksymetryczne	21
3.1. Oznaczenia bromianometryczne	22
3.2. Oznaczenia jodometryczne	23
4. Oznaczenia strąceniowe	23
IV. Analiza jednoskładnikowych środków leczniczych	25
1. Przygotowanie próbek	25
2. Identyfikacja pojedynczych substancji leczniczych	25
2.1. Alkaloidy i ich syntetyczne analogi	25
2.1.1. Testy analityczne alkaloidów i ich syntetycznych analogów	28
2.1.2. Analiza wybranych alkaloidów	33
<i>Chininy chlorowodorek</i>	33
<i>Efedryny chlorowodorek</i>	36
<i>Kofeina</i>	39
2.1.3. Reakcje specyficzne wybranych alkaloidów	41
2.2. Niealkaloidowe azotowe zasady organiczne z układami heterocyklicznymi	44
<i>Aminofenazon</i>	44
<i>Chlorochinaldol</i>	47
<i>Izoniazyd</i>	48
<i>Metronidazol</i>	50
<i>Niketamid</i>	52
<i>Propyfenazon</i>	55
<i>Metamizol sodowy (Pyralgina)</i>	57
2.3. Związki o budowie steroidowej	60
2.3.1. Reakcje charakterystyczne steroidów	61
2.3.2. Przygotowanie leków steroidowych do analiz	63
2.3.3. Testy analityczne steroidów	64
2.4. Sulfonamidy	66
2.4.1. Reakcje wspólne sulfonamidów	66
2.4.2. Rozróżnianie sulfonamidów	67
2.4.3. Testy analityczne sulfonamidów	70
2.5. Tetracykliny	75
2.5.1. Reakcje charakterystyczne tetracyklin	76
2.5.2. Przygotowanie leków tetracyklinowych do analiz	78
2.5.3. Testy analityczne tetracyklin	78
2.6. Pochodne kwasu salicylowego i aniliny	79

2.6.1. Reakcje charakterystyczne.....	80
2.6.2. Analiza wybranych substancji czynnych.....	80
<i>Benzokaina</i>	80
<i>Etenzamid</i>	82
<i>Kwas 4-aminobenzoowy</i>	84
<i>Kwas 4-aminosalicylowy</i>	85
<i>Kwas acetylosalicylowy</i>	87
<i>Kwas salicylowy</i>	88
<i>Paracetamol</i>	90
<i>Salicylamid</i>	92
2.7. Związki β -laktamowe.....	93
2.7.1. Reakcje charakterystyczne związków o budowie β -laktamowej.....	94
2.7.2. Analiza leków o strukturze β -laktamowej.....	95
2.8. Barbiturany.....	95
2.8.1. Reakcje charakterystyczne barbituranów.....	96
2.8.2. Testy analityczne barbituranów.....	98
2.8.3. Reakcje odróżniające poszczególne barbiturany.....	98
2.9. Leki o budowie peptydowej.....	100
2.9.1. Reakcje ogólne związków peptydowych.....	100
2.9.2. Wykrywanie wybranych aminokwasów.....	104
2.9.3. Identyfikacja nieznanego związku peptydowego.....	111
2.9.4. Identyfikacja nieznanego aminokwasu.....	114
2.10. Leki z grupy witamin.....	115
2.10.1. Witamina A.....	115
2.10.2. Witaminy D ₂ i D ₃	116
2.10.3. Witamina E.....	117
2.10.4. Witaminy z grupy B.....	117
2.10.5. Witamina C (kwas askorbowy).....	119
3. Monografie leków prostych.....	121
3.1. <i>Chininum hydrochloricum</i>	121
3.2. <i>Ephedrinum hydrochloricum</i>	123
3.3. <i>Galospa</i>	125
3.4. <i>Cardiamidum</i>	127
3.5. <i>Metronidazol Polpharma</i>	128
3.6. <i>Pyralgina</i>	129
3.7. <i>Hydrocortisonum</i>	131
3.8. <i>Sulgin</i>	133
3.9. <i>Tetracyclinum</i>	134
3.10. <i>Urtosal</i>	136
3.11. <i>APAP</i>	137
3.12. <i>Amotaks</i>	139
3.13. <i>Descipher Barbitalum</i>	141
3.14. <i>Vitaminum C</i>	144
V. Identyfikacja leków o nieznanym składzie.....	146
VI. Chemia wybranych odczynników analitycznych.....	148
1. Odczynnik Marquisa.....	148
2. Reakcje z aldehydami aromatycznymi.....	149
3. Kondensacje z fenolami w środowisku kwaśnym.....	153
4. Reakcje ze stężonym kwasem siarkowym.....	153
5. Reakcja Emersona.....	155
6. Tworzenie aromatycznych związków nitrowych.....	155

7. Tworzenie trudnorozpuszczalnych soli.....	157
8. Reakcje z jonami żelaza(III)	158
9. Odczynnik Millona	159
10. Kwas 4-diazobenzenosulfonowy (odczynnik Pauliego).....	160
VII. Procedury ćwiczeń	162
Ćwiczenie 1. <i>Identyfikacja leku o nieznanym składzie</i>	162
Ćwiczenie 2. <i>Analiza znanego leku jednoskładnikowego</i>	163
Ćwiczenie 3. <i>Reakcje charakterystyczne alkaloidów</i>	164
Ćwiczenie 4. <i>Identyfikacja alkaloidów i ich syntetycznych analogów</i>	165
Ćwiczenie 5. <i>Testy diagnostyczne alkaloidów</i>	166
Ćwiczenie 6. <i>Identyfikacja i rozróżnianie tetracyklin</i>	167
Ćwiczenie 7. <i>Identyfikacja i rozróżnianie steroidów</i>	168
Ćwiczenie 8. <i>Reakcje charakterystyczne związków peptydowych</i>	171
Ćwiczenie 9. <i>Reakcje charakterystyczne barbituranów</i>	173
Ćwiczenie 10. <i>Analiza witamin</i>	174
VIII. Literatura źródłowa i uzupełniająca.....	176
IX. Załączniki	177
1. Przygotowanie wybranych odczynników analitycznych.....	177
2. Formularze sprawozdań.....	181
2.1. Identyfikacja nieznanego leku prostego.....	181
2.2. Analiza znanego leku jednoskładnikowego.....	184
2.3. Reakcje charakterystyczne związków wybranej grupy	187
2.4. Testy diagnostyczne związków wybranej grupy	190
2.5. Identyfikacja związków wybranej grupy	194
3. Zestawienie danych do identyfikacji substancji czynnej w nieznanym leku.....	199
X. Skorowidz	203

I. Wprowadzenie

Rosnące zainteresowanie analizą leków, wynikające z jej roli w kontroli jakości farmaceutyków oraz w wykrywaniu i identyfikacji szeroko pojętych środków biologicznie czynnych w materiałach i organizmach ludzi oraz zwierząt (środki psychotropowe, anaboliki, kontrola dopingu sportowego...) spowodowało coraz częstsze pojawianie się tej tematyki w ofercie edukacyjnej i coraz silniej odczuwalny brak podręczników do ćwiczeń laboratoryjnych z tej dziedziny.

Podczas gdy dostępne są na rynku księgarskim pozycje stanowiące wystarczający materiał referencyjny do prowadzenia zajęć poświęconych syntezie środków leczniczych, trudno znaleźć podręcznik, który stanowiłby dobre odniesienie dla zajęć z analizy chemicznej substancji czynnych farmaceutyków, zarówno jedno-, jak i wieloskładnikowych.

Analiza substancji leczniczych z uwagi na ich różnorodność postaci farmaceutycznych i niejednokrotnie złożoną budowę chemiczną jest często dużym wyzwaniem dla chemika, wymagającym od niego wszechstronnego przygotowania teoretycznego i eksperymentalnego. Główną intencją przyświecającą tworzeniu tego podręcznika było nauczenie studentów podstaw samodzielnego wyboru właściwej metody analitycznej, a następnie sprawnego przeprowadzania analizy identyfikacyjnej substancji czynnych leków. Uznałyśmy, że najbardziej wartościowym podejściem do zgłębiania tych niewątpliwie złożonych zagadnień będzie wykorzystanie znajomości istotnych elementów struktury chemicznej badanych związków oraz ich właściwości fizykochemicznych. Stąd, w zastosowanym w podręczniku podziale środków leczniczych przyjęto za podstawę (prócz wydzielonej grupy witamin) budowę chemiczną opisywanych związków (alkaloidy, sulfonamidy, tetracykliny, β -laktamy...). Dodatkowo, konsekwencją takiego założenia jest sporadyczne pojawianie się w treści podręcznika informacji o substancjach farmaceutycznych aktualnie wycofanych w Polsce z lecznictwa, lecz bardzo użytecznych z dydaktycznego punktu widzenia. Czytelnik z pewnością zauważy także wyjątkowo szerokie potraktowanie rozdziału dotyczącego analizy alkaloidów, które z uwagi na swe niezwykle zróżnicowanie chemiczne stanowią cenny materiał do ćwiczeń, zwłaszcza z zakresu porównawczej analizy jakościowej.

Przy opracowywaniu treści naszego podręcznika przyjęliśmy założenie, że studenci opanowali podstawy chemii organicznej, a zwłaszcza zagadnienia związane z zależnością pomiędzy budową a właściwościami fizykochemicznymi związków organicznych oraz przebiegiem najważniejszych mechanizmów reakcji.

Opracowany przez nas podręcznik omawia zagadnienia szeroko pojętej analizy chemicznej leków jednoskładnikowych, zwanych inaczej lekami prostymi. Zagadnienia związane z analityką chemiczną leków zawierających w swym składzie co najmniej dwie substancje czynne, czyli tzw. leków złożonych, zostaną omówione w odrębnej pozycji wydawniczej naszego autorstwa, jaka ukaże się na rynku księgarskim niebawem.

Treść niniejszego podręcznika stanowi podstawę do prowadzenia ćwiczeń obejmujących:

- ustalanie tożsamości i czystości substancji leczniczej na drodze analizy chemicznej, chromatograficznej i spektralnej;
- analizę jakościową znanego leku i ilościowe oznaczanie w nim zawartości substancji leczniczej;
- projektowanie toku oraz przeprowadzanie analizy jakościowej polegającej na rozróżnianiu kilku związków biologicznie aktywnych, które należą do jednej grupy strukturalnej (np. barbituranów, steroidów, peptydów, tetracyklin).

Zawartość podręcznika postanowiliśmy dodatkowo poszerzyć o rozdział dotyczący badań wstępnych w chemicznej analizie związków organicznych, której nie ma w programie wielu studiów oraz rozdział zwięźle omawiający podstawy wybranych metod analizy ilościowej.

Mamy nadzieję, że podręcznik ten ułatwi studentom zgłębianie i przyswajanie niełatwej i obszernej wiedzy z zakresu analizy leków.

Chciałybyśmy równocześnie podziękować studentom, którzy jako pierwsi „przecierali szlak” przedmiotów dotyczących chemii leków na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego za ich wkład w testowanie niektórych procedur i reakcji. Będziemy też ogromnie wdzięczne tym, którzy swoimi uwagami krytycznymi zechcą pomóc wyeliminować błędy czy niedoskonałości tego wydania podręcznika.

Autorki.

II. Badania wstępne w chemicznej analizie związków organicznych

Większość substancji czynnych zawartych w stosowanych w leczeniu środkach farmaceutycznych to związki organiczne. W niniejszym rozdziale zostaną zaprezentowane podstawowe metody ich wstępnej klasycznej analizy jakościowej. Wszystkie podane tutaj informacje dotyczyć będą pojedynczych substancji w stanie czystym, tzn. substancji czynnych wyodrębnionych z masy leku, składników recepturowych, substratów farmaceutycznych, produktów rozkładu leków itp...

Przed przystąpieniem do analizy związku organicznego czy ustalania tożsamości substancji leczniczej należy ocenić jej właściwości fizyczne (stan skupienia, barwa, zapach), wykonać próbę spalania, ocenić rozpuszczalność i dokonać analizy elementarnej po przeprowadzeniu związku w połączenia jonowe (stopieniu z sodem). Najpowszechniej występującymi w związkach organicznych pierwiastkami są: węgiel, wodór, tlen, azot, siarka i chlorowce, z których jedynie tlen nie może być oznaczony bezpośrednio, a oznaczenie węgla i wodoru zwykle pomija się z uwagi na ich powszechne występowanie w związkach organicznych.

1. Próby spalania

Dowodem organicznego charakteru związku jest zachowanie się podczas ogrzewania na porcelanie, platynie lub innym niereaktywnym metalu (np. niklu).

Jeśli umieszczona na blaszce platynowej lub w tygielku porcelanowym substancja pod wpływem stopniowego ogrzewania aż do ciemnego żaru topnieje, zwęgla się i spala (związki aromatyczne palą się charakterystycznym, kopącym płomieniem), to prawdopodobnie jest ona substancją organiczną. Nie ulegają spalaniu substancje bardzo łatwo sublimujące, łatwo lotne i rozkładające się w podwyższonej temperaturze. Bez stopienia i wyraźnego spalania zwęglają się często sole amin, kwasów i fenoli.

Jeśli podczas ogrzewania na blaszce substancja zwęgla się lub spala, ale po wyprażeniu pozostaje popiół o barwie różnej od czarnej wskazuje to na obecność metalu w związku organicznym. Biała, silnie alkaliczna pozostałość po wyprażeniu może wskazywać na obecność w próbce potasu, sodu lub wapnia, żółta – na bizmut lub ołów, brunatna – na żelazo, żółta podczas prażenia, a po ostygnięciu biała – na tlenek cynku. Substancje nieorganiczne nie zwęglają się i nie palą.

Cennych wskazówek podczas badań wstępnych analizowanych próbek mogą dostarczyć tzw. **próby płomieniowe**. Podczas ogrzewania warto zwracać uwagę na kolor

uzyskiwanego płomienia. I tak na przykład: sole sodowe, potasowe i wapniowe barwią płomień odpowiednio na: żółto (Na^+), fioletowo (K^+) i ceglasto (Ca^{2+}). Związki organiczne zawierające chlorowce (nie fluor) podczas ogrzewania na drucie miedzianym (oczyszczonym, wyprażonym) barwią płomień na kolor zielony (jodek) lub zielononiebieski (chlorek, bromek), pochodzący od tworzących się halogenków miedzi. Próba ta jest tylko orientacyjna, gdyż wiele związków organicznych niezawierających fluorowców (np. pochodne pirydyny, chinoliny...) także barwi w tych warunkach płomień.

2. Badania rozpuszczalności

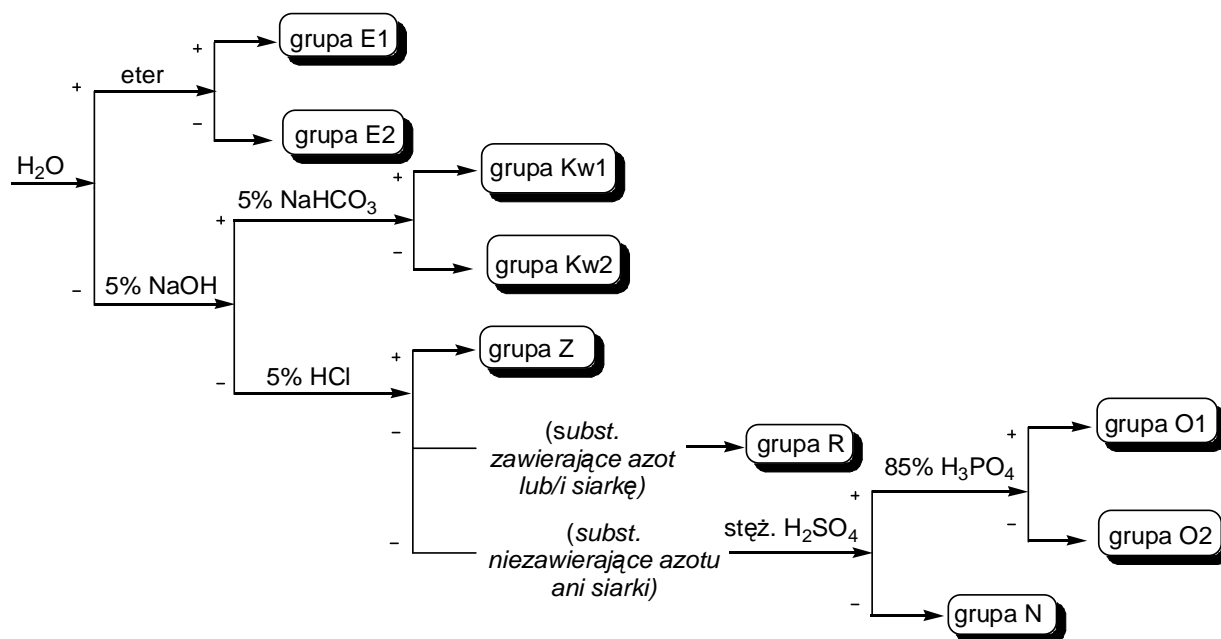
Oznaczenie rozpuszczalności badanej substancji w wodzie oraz rozcieńczonych wodnych roztworach kwasów, zasad i określonych soli pozwala poznać jej właściwości hydrofilowe/hydrofobowe oraz charakter kwasowo-zasadowy. Próby rozpuszczalności przeprowadza się w temperaturze pokojowej, wytrząsając ok. 30 mg badanej substancji z 1 ml określonego rozpuszczalnika. Podstawowymi rozpuszczalnikami nieorganicznymi są: woda, roztwór wodorotlenku sodu (5%), roztwór wodorowęglanu sodu (5%) i kwas solny (5%). Substancje krystaliczne przed badaniem ich rozpuszczalności należy dokładnie sproszkować (np. w małym moździerzu).

Woda rozpuszcza związki o charakterze hydrofilnym: alkohole wielowodorotlenowe, cukry, niektóre aminokwasy, hydroksykwasy i różnego typu sole. Odczyn powstałego roztworu dostarcza informacji o chemicznym charakterze badanego związku.

Rozpuszczalność w roztworze wodorotlenku sodu wynika zwykle z tworzenia soli sodowych przez kwas karboksylowy, fenol czy imid. Brak rozpuszczalności w roztworze NaHCO_3 pozwala wyselekcjonować z tych związków słabe kwasy, jak np. niepodstawione silnie elektroujemnymi grupami fenole, laktamy czy amidy, które są w tych warunkach nierozpuszczalne.

Rozpuszczalność w kwasie solnym wskazuje na związki o charakterze zasadowym, np. aminy.

Dla potrzeb analizy związków organicznych przyjmuje się też często system wprowadzony przez Shrinera, Fusona i Curtina, który w przybliżony sposób pozwala na zakwalifikowanie badanej substancji do jednej z dziewięciu grup rozpuszczalności. Poniższy schemat przedstawia zwięzły algorytm postępowania przy oznaczaniu grupy rozpuszczalności nieznanego związku organicznego.



Rys.1. System ustalania grup rozpuszczalności związków organicznych wg Shrinera, Fusona i Curtina

Grupa E1 obejmuje związki niskocząsteczkowe, rozpuszczalne w wodzie i w eterze etylowym, zawierające do pięciu atomów węgla:

- zawierające tylko węgiel, tlen i wodór: alkohole, aldehydy, ketony, kwasy karboksylowe, bezwodniki, estry, etery, polihydroksyfenole;
- zawierające azot: aminokwasy, aminy, amidy, aminofenole, nitrofenole, nitrokwasy;
- zawierające fluorowec: fluorowcofenole, fluorowcokwasy;
- zawierające siarkę: merkaptany, tiofenole, heterocykliczne związki siarki.

Grupa E2 obejmuje związki rozpuszczalne w wodzie, lecz nierozpuszczalne w eterze etylowym (głównie związki o większej ilości grup polarnych):

- zawierające tylko węgiel, wodór i tlen: hydroksykwasy, polihydroksykwasy, najprostsze cukry, kwasy di- i wielokarboksylowe;
- zawierające metale: sole kwasów karboksylowych i fenoli;
- zawierające azot: sole amoniowe kwasów organicznych, amidy aminofenole, aminokwasy, nitrokwasy, semikarbazydy, moczniki i semikarbazony;
- zawierające fluorowce: fluorowcoalkohole, fluorowcokwasy, fluorowcoaldehydy, halogenki acylowe – ulegają hydrolizie;
- zawierające siarkę: merkaptany, kwasy sulfonowe;
- zawierające azot i fluorowce: sole amin i fluorowcokwasów;

- zawierające azot i siarkę: kwasy aminosulfonowe, kwasy cyjanosulfonowe, kwasy nitrosulfonowe, siarczany(VI) słabych zasad.

Grupa Kw1 obejmuje silne kwasy - związki nierozpuszczalne w wodzie, lecz rozpuszczalne w wodnych 5% roztworach wodorotlenku sodu i wodorowęglanu sodu:

- zawierające tylko węgiel, wodór i tlen: kwasy karboksylowe i bezwodniki;
- zawierające azot: aminokwasy aromatyczne, nitrokwasy, polinitrofenole, cyjanokwasy;
- zawierające fluorowce: fluorowcokwasy, polifluorowcofenole;
- zawierające siarkę: kwasy sulfonowe i sulfonowe, merkaptany;
- zawierające azot i siarkę: sulfonamidy, nitrotiofenole;
- zawierające siarkę i fluorowce: fluorowcosulfokwasy.

Grupa Kw2 obejmuje słabe kwasy - związki nierozpuszczalne w wodzie i w wodnym 5% roztworze wodorowęglanu sodu, lecz rozpuszczalne w wodnym 5% roztworze wodorotlenku sodu:

- zawierające tylko węgiel, wodór i tlen: niektóre bezwodniki kwasowe, fenole, enole;
- zawierające azot: amidy, aminokwasy, nitrofenole, imidy, aminofenole, cyjanofenole, nitroalkany, oksymy;
- zawierające fluorowce: fluorowcofenole, niektóre halogenki kwasowe;
- zawierające siarkę: niektóre merkaptany, tiofenole;
- zawierające azot i siarkę: alkilo- i arylosulfonamidy, aminotiofenole, tioamidy, kwasy aminosulfonowe;
- zawierające azot i fluorowce: polinitrofluorowcowęglowodory aromatyczne, podstawione fluorowcami fenole.

Grupa Z obejmuje związki o charakterze zasadowym i amfoterycznym - związki nierozpuszczalne w wodzie i w wodnym 5% roztworze wodorotlenku sodu, lecz reagujące z 5% kwasem solnym: aminy, aminokwasy, arylohydrazyny, *N,N*-dialkiloamidy.

Grupa R obejmuje substancje o charakterze obojętnym - związki nierozpuszczalne w wodzie, 5% kwasie solnym i 5% roztworze wodorotlenku sodu:

- zawierające azot: amidy, nitrozwiązki, zawierające elektroujemne podstawniki aminy aromatyczne, nitryle, nitrozo-, hydrazo – i azozwiązki;
- zawierające siarkę lub azot i siarkę: sulfony, sulfonamidowe pochodne amin drugorzędowych, merkaptany, rodanki, izorodanki, tioetery, pochodne tiomocznika.

Grupa O1 obejmuje substancje o charakterze obojętnym - związki nierozpuszczalne w wodzie, lecz rozpuszczalne w stęż. kwasie siarkowym i 85% kwasie fosforowym: zawierające

nie więcej niż dziewięć atomów węgla alkohole, aldehydy, metyloketony, estry, ketony pierścieniowe.

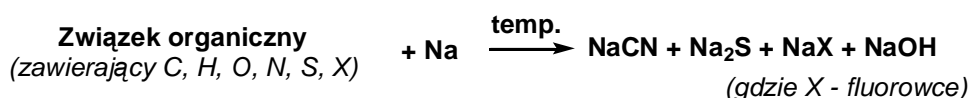
Grupa O2 obejmuje substancje o charakterze obojętnym - związki nierozpuszczalne w wodzie i w 85% kwasie fosforowym, lecz rozpuszczalne w stęż. kwasie siarkowym: zawierające ponad dziewięć atomów węgla alkohole, aldehydy, metyloketony, estry, ketony pierścieniowe, etery, węglowodory nienasycone, alkilowane węglowodory aromatyczne, bezwodniki, laktyny, bezwodniki, chlorki kwasowe, chinony, acetale.

Grupa N obejmuje substancje o charakterze obojętnym - związki nierozpuszczalne w wodzie ani też w żadnym z rozpuszczalników reaktywnych. Należą tu także alifatyczne węglowodory nasycone i aromatyczne oraz ich fluorowcowi pochodne, diaryloetery.

Podczas eksperymentalnych prób kwalifikowania danej substancji do określonych grup rozpuszczalności należy stale mieć na uwadze fakt, że mają one tylko wartość orientacyjną, chociaż w większości przypadków niewątpliwie ułatwiają dalsze postępowanie identyfikacyjne. Tok analizy należy przede wszystkim opierać na określeniu charakterystycznych grup funkcyjnych, a rozpuszczalność traktować jako właściwość mniej istotną. Omówienie i sposoby przeprowadzania reakcji charakterystycznych pozwalających na wykrycie podstawowych grup funkcyjnych, występujących w związkach organicznych, można znaleźć w wielu dostępnych źródłach literaturowych, jak np. [1, 2, 7-10]. Bardziej specyficzne, czy mniej znane próby analityczne służące identyfikacji ugrupowań spotykanych w strukturach substancji leczniczych zostaną przedstawione w dalszych rozdziałach niniejszego podręcznika.

3. Jakościowa analiza elementarna (oznaczanie azotu, siarki, fluorowców)

Najlepszym sposobem przekształcenia związku organicznego w rozpuszczalne w wodzie sole nieorganiczne jest stapianie z nadmiarem sodu.



Wykonanie próby:

Do małej cienkościennej ampułki/probówki wprowadza się bryłkę metalicznego sodu o wielkości ziarna pieprzu i odrobinę substancji (10-20 mg), po czym ogrzewa się stopniowo, najpierw łagodnie (w świecącym płomieniu palnika) w celu stopienia sodu i umożliwienia jego reakcji z badaną próbką (bez jej zwęglania!), później aż do temperatury czerwonego żaru. Rozżarzoną ampułkę wrzuca się następnie do zlewki/parownicy z ok. 10 ml odjonizowanej wody (**Ostrożnie!** Może nastąpić mały wybuch; wszystkie czynności winny być przeprowadzone w okularach ochronnych, pod digestorium). Po pęknięciu ampułki i zakończeniu reakcji z sodem przezroczysty i bezbarwny roztwór przesącza się i dzieli na trzy części przeznaczone do badania na obecność azotu, siarki i fluorowców.

Jeżeli substancja jest bardzo lotna i odparowuje zbyt szybko podczas grzania probówki należy ją przed stapianiem z sodem utrzymać np. z sacharozą lub glukozą.

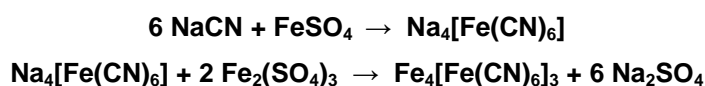
3.1. Wykrywanie obecności azotu

Próba Lassaigne'a:

Wykonanie próby:

Do ok. 1 ml roztworu uzyskanego po stopieniu z sodem dodaje się kryształek lub kilka kropli nasyconego roztw. siarczanu żelaza(II), ogrzewa do wrzenia i dodaje rozc. kwasu siarkowego do uzyskania odczynu kwaśnego i rozpuszczenia wodorotlenków żelaza. W przypadku obecności azotu w badanej próbce powstaje niebieskawe zabarwienie lub osad błękitu pruskiego czyli heksacyjanożelazianu(II) żelaza(III).

Konieczne do reakcji jony Fe^{3+} powstają wskutek utlenienia powietrzem gorącego roztworu alkalicznego soli Fe^{2+} .



błękit pruski

Jeżeli substancja zawiera siarkę, wówczas po rozpuszczeniu siarczanu żelaza(II) wytrąca się czarny osad siarczku żelaza(II). Ogrzanie do wrzenia i zakwaszenie rozcieńczonym kwasem siarkowym powoduje jego rozpuszczenie i utworzenie się błękitu pruskiego.

3.2. Próby na obecność siarki

Obecność siarki można wykryć za pomocą jednej z dwu metod:

- Reakcja z octanem ołowiu(II)

Wykonanie próby:

Do ok. 1 ml roztworu po stopieniu z sodem, zakwaszonego kwasem octowym dodaje się kilka kropli octanu ołowiu. W przypadku obecności siarki wytrąca się czarny osad siarczku ołowiu.

- Reakcja z nitroprusydkiem sodowym

Wykonanie próby:

Do ok. 1 ml roztworu po stopieniu z sodem dodaje się 2-3 krople świeżo przyrządzonego 0,5% roztworu nitroprusydku (pentacyjanonitrożyłozelazianu) sodu. W przypadku obecności siarki powstaje krótkotrwałe purpurowe zabarwienie.



3.3. Wykrywanie i identyfikacja fluorowców

Obecność fluorowców można orientacyjnie stwierdzić za pomocą próby Beilsteina – patrz próby płomieniowe (rozd. II.1.).

- Próba z azotanem(V) srebra (wykrywanie obecności fluorowców)

Wykonanie próby:

Część przesącza uzyskanego po stopieniu z sodem zakwasza się rozcieńczonym kwasem azotowym(V) (jeśli związek zawiera azot lub siarkę, to zakwaszony roztwór należy ogrzewać kilka minut w temperaturze wrzenia (zatrzymać do połowy objętości), aby usunąć cyjanek lub siarczek sodowy, które także reagują z azotanem(V) srebra. A następnie do roztworu dodaje się w nadmiarze 10% wodnego roztworu azotanu(V) srebra. W przypadku obecności fluorowca powstaje natychmiast osad halogenku srebra.

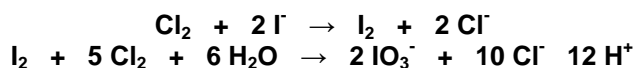
- Rozpoznanie rodzaju fluorowca
 - Badanie halogenków srebra

Wykonanie próby:

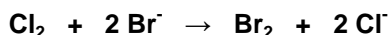
Wytrącony osad halogenku srebra (patrz poprzednia próba) zadać 1-2 ml rozcieńczonego (ok. 10%) roztworu amoniaku. Jeśli osad jest biały i rozpuszczalny w roztworze amoniaku, to oznaczanym chlorowcem jest chlor, jeśli osad jest żółtawy i dość trudno rozpuszczalny – brom, a jeśli ciemnożółty i praktycznie nierozpuszczalny – jod.

- Reakcja z wodą chlorową w obecności chloroformu

W próbie tej, przeprowadzanej w roztworze dwufazowym (wodno-chloroformowym), obecne w przesączu otrzymanym po stapianiu próbki z sodem jony poddaje się utlenianiu za pomocą wody chlorowej. Obserwuje się zabarwienie warstwy organicznej. W pierwszej kolejności woda chlorowa utlenia jony jodkowe do wolnego jodu, który zabarwia warstwę chloroformową na fioletowo, po czym następuje reakcja następcza utlenienia jodu do bezbarwnego jodanu.



W przypadku obecności w analizie jonów bromkowych w następnej kolejności następuje ich utlenianie pod wpływem wody chlorowej do bromu, w wyniku czego warstwa chloroformowa przyjmuje barwę od żółtej do brunatnej (zależnie od stężenia bromu).



Wykonanie próby:

Roztwór po stopieniu z sodem zakwasza się kwasem siarkowym, dodaje 2-5 kropli chloroformu, a następnie, wstrząsając, dodaje się po kropli świeży roztwór wody chlorowej. Zabarwienie warstwy organicznej wskazuje na rodzaj fluorowca: bezbarwna – chlor, żółtobrunatna – brom, purpurowa – jod, purpurowa przechodząca w żółtobrunatną – brom i jod.

- Próba cyrkonu-alizarynowa - wykrywanie fluoru

Wykonanie próby:

Mocno zakwaszoną kwasem octowym próbkę roztworu po stopieniu z sodem ogrzewa się do wrzenia, zagęszczając roztwór do ok. połowy objętości. Po oziębieniu, kroplę roztworu nanosi się na papierek wskaźnikowy cyrkonu-alizarynowy S. Zmiana barwy papierka z czerwonej na żółtą wskazuje na obecność fluoru (duże ilości siarczanów i fosforanów zafałszowują przebieg próby).

Papierki wskaźnikowe cyrkonu-alizarynowe – przygotowanie:

Suchą bibułę filtracyjną nasycy się 5% roztworem azotanu(V) cyrkonu w 5% kwasie solnym, a po wysuszeniu zanurza w 2% wodnym roztworze soli sodowej kwasu alizarynosulfonowego (alizaryna S). Następnie czerwoną bibułę płucze się wodą, aż popłuczyny staną się bezbarwne i suszy na powietrzu.

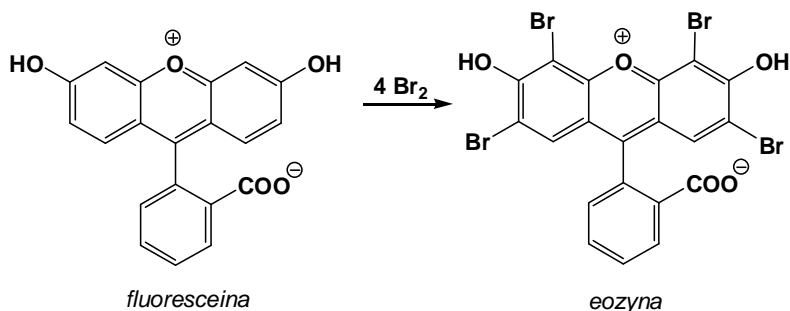
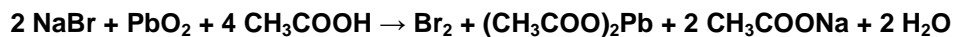
- Próba eozynowa - wykrywanie bromu

Pod wpływem tlenku ołowiu(IV) w środowisku kwasu octowego obecne w przesączu po stapianiu z sodem jony bromkowe utleniają się do wolnego bromu, który następnie w reakcji z fluoresceiną daje czerwony barwnik – eozynę.

Wykonanie próby:

Do umieszczonego w probówce, zakwaszonego kwasem octowym roztworu po stapianiu z sodem dodaje się odrobinę tlenku ołowiu(IV), u wylotu probówki umieszcza kawałek bibuły nasycony fluoresceiną i roztwór łagodnie ogrzewa. Jeśli substancja zawierała brom, papierek wskaźnikowy barwi się na różowo (powstaje

eozyne). Fluoresceinowy papierek wskaźnikowy otrzymuje się zanurzając bibułę w rozc. etanolowym roztworze fluoresceiny. Wyszuszony papierek wskaźnikowy ma barwę cytrynową.



Rys. 2. Próba eozyne

- Próba na obecność czynnego fluorowca

Niektóre substancje zawierające tzw. ruchliwy atom fluorowca (np. fluorowiec jonowy czy obecny np. w pozycji benzyłowej) reagują bezpośrednio z roztworem azotanu srebra i dają (zwykle po ogrzaniu) osad odpowiedniego halogenku srebra, nierozpuszczalny w rozcieńczonym kwasie azotowym(V).

Wykonanie próby:

Badaną substancję (ok. 50 mg) rozpuszcza się w wodzie/etanolu, zakwasza kilkoma kroplami 5% kwasu azotowego(V) i zadaje 1% etanolowym roztworem azotanu srebra i ewentualnie delikatnie ogrzewa. Powstanie osadu halogenku srebra świadczy o obecności w związku luźno związane chlorowca.

III. Wybrane metody analizy ilościowej środków leczniczych

Do podstawowych metod stosowanych w analizie ilościowej związków organicznych należą:

- metody spektrofotometryczne i kolorymetryczne;
- metody alkacymetryczne;
- metody redoksymetryczne, w tym oznaczenia jodometryczne, bromianometryczne, cerometryczne i manganometryczne;
- metody strąceniowe, np. oznaczenia argentometryczne;
- metody kompleksometryczne;
- oznaczenia elektrometryczne, np. miareczkowanie potencjometryczne, konduktometryczne czy amperometryczne;
- metody polarymetryczne;
- metody fluorymetryczne.

Poniżej zostaną omówione jedynie niektóre z nich. Wybór został podyktowany potrzebami analizy środków leczniczych prezentowanej w niniejszym podręczniku.

1. Oznaczenia spektrofotometryczne

Spektrofotometria jest działem fotometrii obejmującym pomiary natężenia linii widmowych widm różnych substancji lub wyznaczanie charakterystycznych dla substancji krzywych absorpcji lub transmisji (przepuszczania). Obejmuje ona obszar widmowy od nadfioletu do podczerwieni. Ilościowo, promieniowanie przepuszczone przez roztwór opisuje **transmitancja (T)**, wyrażająca się stosunkiem natężenia światła przepuszczonego (I_t) do natężenia światła padającego (I_0), natomiast promieniowanie zaabsorbowane opisuje **absorbancja (A)**, stanowiąca logarytm dziesiętny z odwrotności transmitancji.

$$T = I_t / I_0 \qquad A = \lg I_0 / I_t = \lg 1/T = - \lg T$$

Jako metoda analityczna spektrofotometria wykorzystuje pomiary absorpcji promieniowania monochromatycznego, uzyskiwanego dzięki zastosowaniu w aparatach, zwanych spektrofotometrami, odpowiedniego pryzmatu bądź siatek dyfrakcyjnych.

Jedną z najstarszych metod instrumentalnych w analizie chemicznej jest spektrofotometria w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego (UV/Vis), której przedmiotem badań są widma elektronowe. Przejścia elektronowe bada się zwykle w związkach organicznych lub w kompleksach metali d-elektronowych. Ich prawdopodobieństwo jest mocno zróżnicowane i określają je reguły wyboru decydujące o tym, czy dane przejście jest dozwolone (konieczna m.in. zmiana momentu dipolowego cząsteczki)

czy zabronione. Zgodnie z prawami Lamberta-Beera, przy założeniu zerowej absorpcji rozpuszczalnika, absorbanca proporcjonalna jest do stężenia roztworu absorbującego (c ; mol/dm³) i grubości warstwy roztworu (l ; cm), a współczynnik proporcjonalności zwany jest molowym współczynnikiem absorpcji (ϵ) i w zależności od prawdopodobieństwa przejścia, osiąga wartości rzędu $1 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$A = \epsilon l c$$

Absorpcja roztworu wieloskładnikowego równa się sumie absorpcji poszczególnych składników (II prawo Lamberta-Beera; prawo addytywności absorpcji):

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n,$$

gdzie: A_1, A_2, \dots, A_n są absorpcjami poszczególnych składników.

Metody spektrofotometryczne są szeroko wykorzystywane w analizie leków. Badania absorpcji wykonuje się zwykle metodą bezpośrednią, czyli rozpuszcza się badany związek w odpowiedniej ilości rozpuszczalnika i dokonuje pomiaru, a następnie wyznacza się stężenie w oparciu o znany współczynnik absorpcji przy określonej długości fali. Rzadziej wymagane jest sporządzanie krzywych wzorcowych absorpcji i kalibracji.

W analizach farmaceutycznych często zamiast molowego współczynnika absorpcji (ϵ) spotyka się współczynnik procentowy $E_{1cm}^{1\%}$ odpowiadający absorpcji roztworu jednoprocentowego (1g substancji absorbującej w 100 ml roztworu), o grubości warstwy 1 cm. Znajomość $E_{1cm}^{1\%}$ pozwala na szybkie obliczenie stężenia wagowo-procentowego w oparciu o pomiar absorpcji w kuwecie o grubości 1 cm, przy tej samej długości fali, przy której wyznaczono $E_{1cm}^{1\%}$.

Kolorymetria, stanowiąca podwaliny spektrofotometrii, jest techniką analityczną służącą do określania stężenia roztworów barwnych za pomocą wizualnego porównania intensywności barwy roztworu badanego z intensywnością barwy wzorca. W kolorymetrii wykorzystuje się liniową zależność absorpcji promieniowania widzialnego od stężenia roztworu (**prawo Lamberta-Beera**). Wyróżnia się następujące metody kolorymetryczne:

- **metodę serii wzorców** - próbkę badaną porównuje się z zestawem wzorców w probówkach kolorymetrycznych zawierających roztwory badanej substancji w określonych stężeniach lub ze skalą barw we wzorniku.
- **miareczkowanie kolorymetryczne** - do odpowiedniego rozpuszczalnika dodaje się substancję oznaczaną tak długo, aż barwa roztworu zrówna się z barwą roztworu oznaczanego.
- oznaczenia stężenia w **kolorymetrach**, wykorzystujące liniową zależność pomiędzy intensywnością zabarwienia a grubością warstwy roztworu.

Obecnie metody kolorymetryczne zostały w znacznej mierze wyparte przez obiektywną analizę spektrofotometryczną. Miniaturowe podręczne zestawy kolorymetryczne z tabelami barw wykorzystywane są w warunkach pozalaboratoryjnych. Powszechnie stosowana jest do szybkiego oszacowania pH roztworów za pomocą wyskalowanych papierków wskaźnikowych.

2. Oznaczenia alkacymetryczne

Ilościowe oznaczenia leczniczych substancji czynnych o charakterze kwaśnym lub zasadowym wykonuje się często przez miareczkowanie alkacymetryczne, tzn. przez miareczkowanie mianowanymi roztworami kwasów (acydymetria) lub zasad (alkalimetria). W praktyce alkacymetrii wyróżnia się trzy typy miareczkowania:

- miareczkowanie mocnych kwasów i mocnych zasad
- miareczkowanie słabych kwasów i słabych zasad
- miareczkowanie kwasów i zasad o różnej mocy.

We wszystkich przypadkach titrantem (roztworem wkraplanym) jest roztwór mocnego kwasu lub mocnej zasady. Nie stosuje się miareczkowania roztworami słabych kwasów bądź słabych zasad. W zależności od rodzaju powstającej soli odczyn środowiska w punkcie równoważnikowego zobojętnienia jest obojętny lub w przypadku soli hydrolizujących – kwaśny lub zasadowy. Odczyn środowiska decyduje o doborze wskaźnika w celu ustalenia punktu równoważnikowego zobojętnienia.

2.1. Oznaczenia alkacymetryczne w środowisku wodnym

Oznaczenia alkacymetryczne w środowisku wodnym dają dobre rezultaty tylko w przypadku związków o wyraźnym charakterze kwaśnym lub zasadowym. Związki o charakterze słabych kwasów lub zasad nie dają klarownych wyników w reakcjach ilościowego zobojętnienia w wodzie z uwagi na hydrolizę powstających produktów, niestabilne pH środowiska i trudności w uchwyceniu punktu równoważnikowego. Zdecydowanie lepsze rezultaty uzyskuje się w tych przypadkach przy zastosowaniu zamiast wody rozpuszczalników niewodnych. W środowisku wodnym nie można też miareczkować wielu kwasów czy zasad organicznych, które są słabo rozpuszczalne w wodzie.

2.2. Oznaczenia alkacymetryczne w środowisku niewodnym

Podstawą miareczkowania w środowisku niewodnym jest teoria Brönsteda kwasów wyjaśniająca równowagi kwasowo-zasadowe w różnych rozpuszczalnikach. Rozpuszczalniki dobiera się, więc tak, aby miareczkowany kwas lub zasada były w tym środowisku

dostatecznie mocne. Zdolność oddawania bądź przyłączania protonów (potencjał wymiany protonowej) można wyrazić w woltach jako dodatni lub ujemny potencjał kwasowości. Zgodnie z nim można zgrubnie uszeregować związki od najsilniejszych kwasów do zasad:



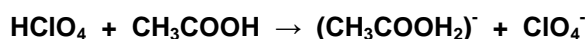
W szeregu tym, licząc od najsilniejszego protonodawcy, kwasu nadchlorowego, każdy związek może oddawać proton wszystkim leżącym na prawo od niego. W alkacymetrycznym oznaczaniu w środowisku niewodnym wykorzystuje się to do wyboru zarówno titrantów, jak i rozpuszczalników. W acydymetrii stosuje się najczęściej mianowany roztwór kwasu nadchlorowego w bezwodnym kwasie octowym, w alkalimetrii roztwór metanolanu sodu w metanolu. W oznaczeniach niewodnych rola rozpuszczalników nie ogranicza się wyłącznie do rozpuszczania substancji miareczkowanej i powstających produktów zobojętnienia. Różne powinowactwo rozpuszczalników do protonów wpływa na korzystne kształtowanie właściwości kwasowych/zasadowych oznaczanej substancji.

Rozpuszczalniki stosowane w tym typie miareczkowania dzieli się na:

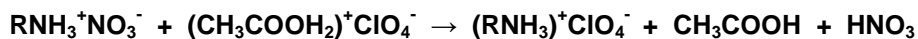
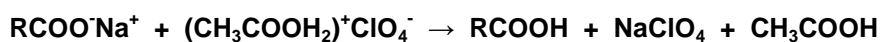
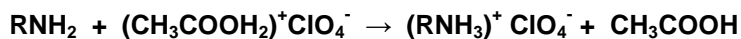
- **aprotonowe niepolarne** (węglowodory, chlorowcopochodne węglowodorów) – wykazują właściwości różnicujące moc kwasów i zasad, dlatego są często stosowane jako składniki rozpuszczalników mieszanych; nie wykazują one właściwości zwiększających moc kwasów i zasad;
- **różnicujące – aprotonowe, ale polarne** - (aceton, nitrometan) – nie biorą udziału w reakcji, lecz wpływają w znacznym stopniu na wzajemny stosunek mocy rozpuszczonych w nich kwasów i zasad;
- **wyrównujące** (np. kwas mrówkowy) – kwasy i zasady różniące się znacznie mocą wykazują w nich zbliżoną moc;
- **protonodonorowe** (np. kwas octowy) – reagują z rozpuszczonymi w nich zasadami zwiększając względnie ich moc i ułatwiając miareczkowanie;
- **protonoakceptorowe** (np. n-butyloamina, etylenodiamina) – reagują z rozpuszczonymi w nich kwasami znacznie podnosząc ich względną moc;
- **amfiprotyczne** (np. alkohole) – które nie różnią się od wody pod względem wpływu na reakcje kwas-zasada, więc stosuje się je, gdy produkty lub substraty reakcji są nierozpuszczalne w wodzie, a rozpuszczalne w alkoholach;
- **mieszane** – stosuje się, gdy istnieje potrzeba połączenia właściwości kilku rozpuszczalników.

Jeśli np. w oznaczeniach acydymetrycznych zastosujemy jako rozpuszczalnik bezwodny kwas octowy zamiast wody, to będzie on oddawał oznaczanej zasadzie pobrany od kwasu nadchlorowego proton znacznie łatwiej niż woda, co możemy określić jako „względny wzrost zasadowości” oznaczanej substancji. Podobnie, gdy oznaczany związek o charakterze słabo kwaśnym rozpuścimy w rozpuszczalniku o większym powinowactwie do protonów niż woda, nastąpi łatwiejsze pobieranie pochodzących od niego protonów, czyli „względny wzrost kwasowości”.

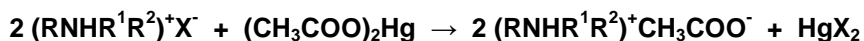
Najczęściej stosowanymi w acydymetrii rozpuszczalnikami są rozpuszczalniki protonodonorowe lub aprotonowe. Titrantem jest często roztwór kwasu nadchlorowego w kwasie octowym:



Przykłady acydymetrii w środowisku niewodnym obrazują równania:



Pośród substancji leczniczych oznaczanych acydymetrycznie dużą grupę stanowią sole zasad organicznych i kwasów chlorowcowodorowych. Ze względu na fakt, iż jony chlorowcowe nie są zdolne do przejęcia protonu od kwasu octowego, reakcja zobojętniania musi być poprzedzona wytrącaniem jonów chlorowcowych w postaci niezjonizowanych halogenków rtęci, a wydzielona zasada tworzy zwykle octan, zgodnie z reakcją:



W oznaczeniach alkalimetrycznych najczęściej stosowanym titrantem jest roztwór metanolanu sodowego w metanolu.

3. Oznaczenia redoksymetryczne

Redoksymetria obejmuje zbiór technik miareczkowych, gdzie wykorzystuje się reakcje, w których następuje przejście elektronów od jednej substancji do drugiej (od reduktora do utleniacza). Redoksymetria dzieli się na:

- **oksydymetrię** - miareczkowanie mianowanymi roztworami utleniaczy,
- **reduktometrię** - miareczkowanie mianowanymi roztworami reduktorów.

Oksydymetria i reduktometria dzielą się na kilka metod w zależności od związku będącego titrantem. Do typowych metod **oksydometrycznych** należą:

- **manganometria** - jako utleniacz stosowany jest KMnO_4 ,
- **cerometria** - jako utleniacz stosowany jest $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$,

- **chromianometria** - jako utleniacz stosowany jest $K_2Cr_2O_7$ lub K_2CrO_4 ,
- **bromianometria** - jako utleniacz stosowany jest $KBrO_3$.

Do typowych metod **reduktometrycznych** należą:

- **tytanometria** - jako reduktor stosuje się związki tytanu(III) najczęściej $TiCl_3$,
- **ferrometria** - jako reduktor stosowany jest roztwór $FeSO_4$.

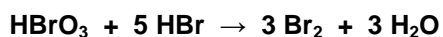
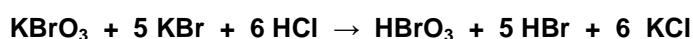
W porównaniu z reakcjami jonowymi reakcje „red-oks” przebiegają wolniej i wymagają na ogół dłuższego czasu do wykonania oznaczenia.

Do ustalenia końcowego punktu miareczkowania stosuje się dwa rodzaje wskaźników: wskaźniki specyficzne i wskaźniki oksydacyjno-redukcyjne. **Wskaźniki specyficzne** tworzą połączenia z utleniaczem lub reduktorem, czemu towarzyszy zmiana zabarwienia (np. niebieska barwa skrobi wobec jodu). **Wskaźniki oksydacyjno-redukcyjne** stanowią utleniacze lub reduktory, które w zależności od formy występowania (utleniona bądź zredukowana) przyjmują różne zabarwienie.

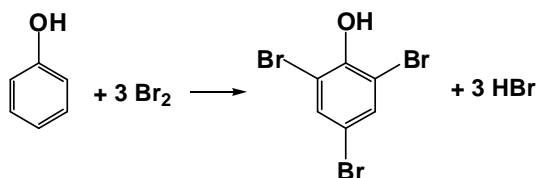
Szczególne zastosowanie w analizie środków leczniczych znalazła jodometria i bromianometria. Pozostałe metody redoksymetryczne wykorzystywane są znacznie rzadziej.

3.1. Oznaczenia bromianometryczne

W oznaczeniach bromianometrycznych do miareczkowania, wykorzystuje się mianowane roztwory bromianu(V) potasu, który w środowisku kwaśnym ulega redukcji do bromków, reagujących dalej z bromianem(V) do wydzielenia bromu.



Utworzony ilościowo brom może służyć zarówno do utlenienia oznaczanej substancji (np. hydrazynu), jak i do bromowania związków aromatycznych:

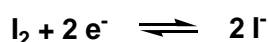


Ilość powstałego bromu określa się każdorazowo w próbie kontrolnej (ślepej próbie), wykonywanej równolegle w identycznych warunkach. Nadmiar bromu niezucytego na utlenienie bądź bromowanie utlenia jon jodkowy (z dodanego KI) do wolnego jodu, który oznacza się przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu. Ilość bromu zużytego w reakcji z oznaczanym związkiem oznacza się na podstawie różnicy między ilością roztworu

tiosiarczaniu zużytego do zmiareczkowania próby ślepej i próbki właściwej. Z uwagi na lotność bromu oznaczenia bromianometryczne powinny być wykonywane w naczyniach z doszlifowanym korkiem i w możliwie niskiej temperaturze.

3.2. Oznaczenia jodometryczne

Jodometria jest metodą miareczkowania wykorzystującą mianowane roztwory jodu (do oznaczania reduktorów) lub tiosiarczaniu (do oznaczania utleniaczy). Bazuje ona na reakcji:



Substancje o właściwościach redukujących można ilościowo oznaczyć wykorzystując utleniające właściwości jodu:

- metodą bezpośredniego miareczkowania mianowanym roztworem jodu;
- stosując nadmiar mianowanego roztworu jodu do utleniania oznaczanej substancji i odmiareczkowanie nie zużytego jodu mianowanym roztworem tiosiarczaniu.

Substancje o charakterze utleniaczy poddaje się redukcji jodowodorem (KI w środowisku kwaśnym), a wydzielony jod, proporcjonalny do ilości oznaczanej substancji, odmiareczkowany jest za pomocą roztworu tiosiarczaniu. Za pomocą jodometrii oznaczać można bromiany(V) (sole kwasu bromowego, $HBrO_3$), jodany(VII), dichromiany(VI), manganiany(VII), nadtlenek wodoru, cer(IV), miedź(II), żelazo(III) oraz nadtlenki organiczne. Najczęściej stosowanymi wskaźnikami są skrobia i chloroform, które pod wpływem jodu zabarwiają się na, odpowiednio, niebiesko i fioletowo.

4. Oznaczenia strąceniowe

Ilościowa analiza strąceniowa wykorzystuje reakcje, w których podstawą miareczkowania jest tworzenie nierozpuszczalnych osadów wg ogólnego schematu:

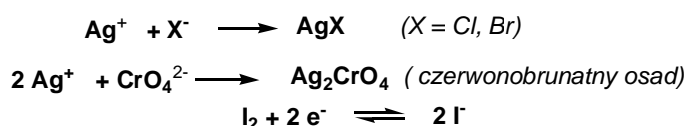


Zakłada się, że w warunkach doświadczenia produkt jest praktycznie nierozpuszczalny. Najważniejszą techniką strąceniową jest argentometria.

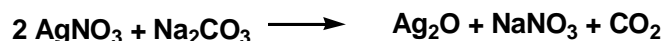
Argentometria jest działem analizy miareczkowej, w którym wykorzystuje się reakcje tworzenia trudno rozpuszczalnych związków srebra na przykład $AgCl$, $AgBr$, AgI lub $AgSCN$. Oznaczenia argentometryczne można wykorzystywać do określania stężenia jonów srebra lub jonów halogenkowych. W zależności od pH analizowanego roztworu oznaczenie tych jonów przeprowadza się według:

- metody Mohra,
- metody Volharda.

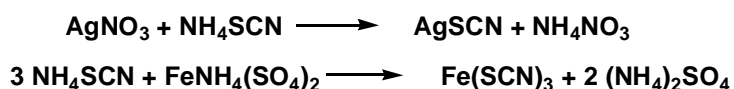
Metoda Mohra opiera się na współzawodnictwie anionów i wykorzystuje różnicę rozpuszczalności dwóch różnych soli srebrowych. Stosuje się ją m. in. do oznaczania jonów chlorkowych i bromkowych w solach nieorganicznych. Tytrantem jest mianowany roztwór azotanu srebra, a wskaźnikiem – 5% roztwór chromianu(VI) potasu. Tworzący się początkowo chlorek srebra jest znacznie gorzej rozpuszczalny niż chromian(V) srebra, którego wytrącenie sygnalizuje punkt końcowy miareczkowania.



Reakcje należy przeprowadzać w środowisku obojętnym (optymalne $\text{pH} \approx 8$), gdyż środowisko kwaśne uniemożliwia tworzenie osadu chromianu srebra, a w środowisku alkalicznym istnieje możliwość reakcji:



Metoda Volharda jest metodą pośrednią i służy do ilościowego oznaczania jonów srebra oraz jonów halogenkowych w solach nieorganicznych i organicznych. Płynem miareczkującym jest mianowany roztwór rodanku amonu, a wskaźnikiem – siarczan żelazowo-amonowy, tworzący w punkcie równoważnikowym, w środowisku kwaśnym (zapobiegającym hydrolizie wskaźnika), czerwony kompleks z nadmiarem jonów rodanowych. Miareczkowanie przebiega zgodnie z równaniem:



Procedura argentometrycznego oznaczania jonów halogenkowych wymaga dodania do roztworu nadmiaru mianowanego roztworu AgNO_3 (nie jest konieczne odsączenie halogenku srebra), a nadmiar azotanu srebra odmiareczkuje się rodankiem amonowym wobec jonów Fe^{3+} . Po wytrąceniu wszystkich jonów srebra w formie AgSCN nadmiar dodanego rodanku tworzy z jonami żelaza czerwony kompleks. Koniec miareczkowania nie jest zbyt ostry, ale metoda daje niezłe wyniki.

IV. Analiza jednoskładnikowych środków leczniczych

1. Przygotowanie próbek

Jakościowa analiza substancji czynnych, występujących w preparatach farmaceutycznych często wymaga odpowiedniego przygotowania badanych próbek. Obecne w masie leku substancje pomocnicze, barwniki, dodatki smakowe i zapachowe, wypełnienia czy nośniki w niektórych przypadkach mogą utrudniać, względnie uniemożliwiać prawidłową analizę substancji czynnej. Przed próbami mającymi na celu zidentyfikowanie substancji czynnej badanego leku należy postarać się je choćby zgrubnie usunąć. Leki posiadające postać maści lub żelowych czopków należy wstępnie wymrozić, rozkruszyć (o ile masa jest zestalona), zadać odpowiednią ilość wybranego węglowodoru (np. eter naftowy, pentan, heksan), dokładnie wymieszać, przesączyć. Pozostałość na sączku, która zawiera interesujące nas substancje czynne leku, należy następnie przemyć kilkakrotnie stosowanym rozpuszczalnikiem i wysuszyć. W przypadku analizowania leków kapsułkowanych, substancję czynną wydobywa się z kapsułki po uprzednim jej otwarciu (rozerwaniu lub rozkruszeniu). Leki w otoczkach cukrowych (drażetki) należy opłukać kilkoma małymi porcjami wody (do odmycia warstwy cukrowej), a następnie pozostałość wysuszyć. Wszystkie leki tabletkowane i granulaty należy dokładnie sproszkować w moździerzu.

Środki farmaceutyczne będące płynami iniekcyjnymi poddaje się próbom analitycznym na ogół bez jakiegokolwiek wstępnej obróbki, o ile zawartość wody czy innego, obecnego w leku rozpuszczalnika nie wpływa negatywnie na prawidłowy przebieg danego testu.

Przedstawione tu wstępne sposoby przygotowania próbek leków do testów identyfikacyjnych powinny w większości przypadków pozwolić na przeprowadzenie przynajmniej zgrubnej analizy jakościowej badanego związku (w tym m.in. oznaczanie składu pierwiastkowego oraz wykrywanie podstawowych ugrupowań strukturalnych).

2. Identyfikacja pojedynczych substancji leczniczych

2.1. Alkaloidy i ich syntetyczne analogi

Alkaloidy, to związki azotowe o specyficznym działaniu fizjologicznym, bardzo często pochodzenia roślinnego, z nielicznymi wyjątkami (np. efedryna i inne pochodne etyloaminy) posiadające w swych strukturach układy karbo- lub heterocykliczne. Najczęściej są one drugo- lub trzeciorzędowymi aminami, znacznie rzadziej stanowią aminy pierwszorzędowe względnie czwartorzędowe zasady amoniowe. Ostatnie z nich wykazują najwyższą zasadowość.

Alkaloidy wykazują spore zróżnicowanie pod względem struktury układu cyklicznego, jego złożoności, jak i sposobu jego podstawienia. W większości przypadków układy heterocykliczne zawierają co najmniej jeden atom azotu.

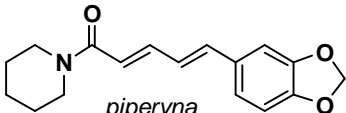
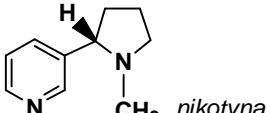
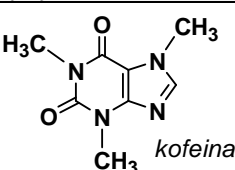
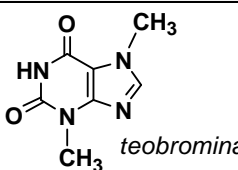
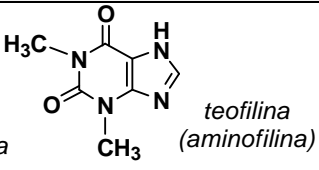
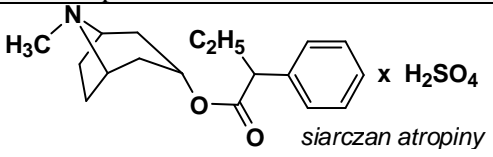
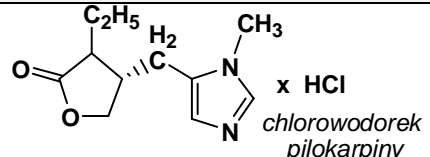
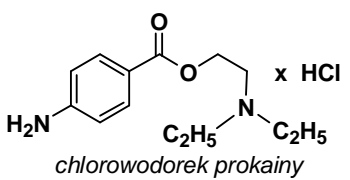
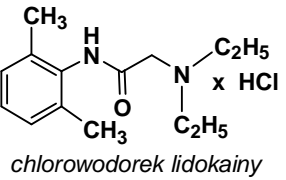
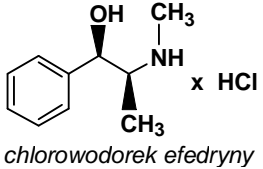
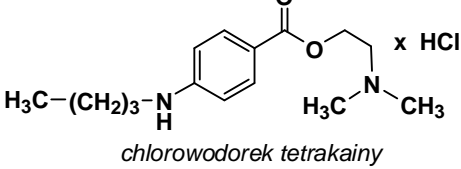
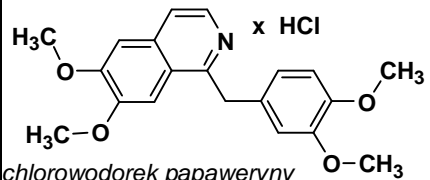
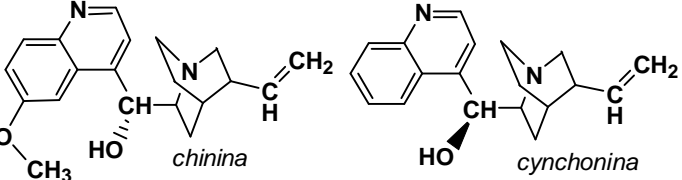
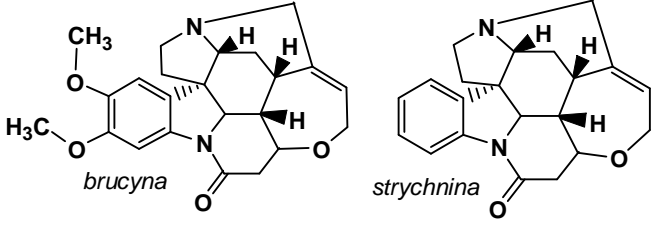
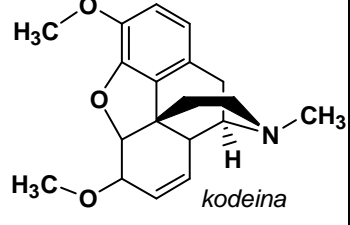
Ze względu na budowę alkaloidy i ich syntetyczne analogi często przyporządkowuje się do następujących grup:

- związki aromatyczne bez układów heterocyklicznych (meskalina, kolchicina, efedryna, 2-fenyletyloamina, amfetamina, metadon, lidokaina, tetrakaina, prokaina),
- pochodne pirolu, piperidyny i pirydyny (nikotyna, anabazyna, lobelina, pirolidyna, higryna, piperyna, rycynina, koniina),
- pochodne imidazolu (pilokarpina),
- pochodne puryny (kofeina, teobromina, teofilina),
- pochodne i analogi indolu (fizostygmina, brucyna, strychnina, johimbina, LSD-25, ergotamina i inne alkaloidy sporyszu),
- grupa tropanu (atropina, skopolamina, kokaina, pelletieryna, sparteina),
- zawierające pierścień chinolinowy lub izochinolinowy (chinina, cynchonina, narkotyna, papaweryna),
- pochodne morfinanu (morfina, tebaina, kodeina, nalokson, heroina, kolchicina),
- alkaloidy steroidowe (solanidyna, samandaryna).

Tabela 1 prezentuje przykłady struktur alkaloidów z wyżej wymienionych grup.

Na ogół alkaloidy to substancje stałe, krystaliczne, jako wolne zasady – trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalne w większości rozpuszczalników organicznych oraz w roztworach kwasów mineralnych. Niektóre z nich, np. morfina czy teobromina, wykazują charakter amfoteryczny, tworząc także dobrze rozpuszczalne w wodzie sole z zasadami litowców. Sole alkaloidów są z kolei trudno rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, co często wykorzystuje się w wielu metodach ich identyfikacji i oznaczeń.

Tabela 1. Niektóre alkaloidy z wybranych grup strukturalnych

Pochodne pirydyny, piperydyny i pirolu:		
		
Pochodne puryny:		
		
Pochodne tropanu:	Pochodne imidazolu:	
		
Pochodne etyloaminy bez układów heterocyklicznych:		
		
		
Pochodne chinoliny i izochinoliny:		
		
Analogi indolu:	Pochodne morfinanu:	
		

2.1.1. Testy analityczne alkaloidów i ich syntetycznych analogów

W klasycznej analityce rozmaitych związków chemicznych o znaczeniu farmakologicznym szerokie zastosowanie znajdują reakcje prowadzące do barwnych produktów. Wiele z nich charakteryzuje się wysoką czułością, więc zwykle przeprowadza się je w skali mikro. Do jednej serii testów przeznaczają się zwykle ok. 10-50 mg badanej próbki. Jeżeli przedmiotem testów jest seria kilku czy kilkunastu próbek, każdą z reakcji analitycznych należy przeprowadzać dla wszystkich badanych substancji równolegle. Wskazano jest też, aby ocena obserwowanych barw, efektów fluorescencji i innych charakterystycznych dla danej reakcji zjawisk, została skonsultowana z inną osobą. Pozwala to na dokładniejszą i bardziej obiektywną ocenę ich wyników. Testy nie wymagające ogrzewania mieszanin reagujących przeprowadza się zwykle na białej porcelanowej płytce z serią kilkunastu okrągłych wgłębień na jej powierzchni. Są to tzw. płytki do analizy kroplowej (Rys. 3). W każdym zagłębieniu płytki umieszcza się kilka miligramów badanej substancji (np. szczyptę, mieszczącą się na końcu łyżeczki dentystycznej), a następnie dodaje z pipety Pasteura 2-3 krople odpowiedniego odczynnika i dokonuje się obserwacji wyniku testu. Istotnym jest, aby wynik każdej reakcji obserwować co najmniej kilka minut, w którym to czasie ewentualnie powstające barwy produktów mogą ulegać zmianom. Próby z zastosowaniem ogrzewania mieszanin reagujących należy przeprowadzać na wrzącej łaźni wodnej (ogrzewanie łagodne!) w probówkach z nasadzoną chłodniczką powietrzną (chyba, że przepis podaje inaczej) lub małych parowniczkach (tylko mieszaniny bez palnych rozpuszczalników).



Rys. 3. Zestaw do analizy kroplowej [19]

Alkaloidy i ich syntetyczne analogi należą do substancji biologicznie aktywnych, których zawartość w badanych próbkach (np. w materiale biologicznym, środkach leczniczych, używkach i narkotykach) jest zazwyczaj dość niska. Zastosowanie analizy kroplowej, jako

prostej techniki pozwalającej na pracę w skali mikro, w tym przypadku jest zatem jak najbardziej uzasadnione.

Alkaloidy należące do poszczególnych grup strukturalnych cechuje duże podobieństwo reaktywności. Generalnie, testy służące do ich wykrywania i identyfikacji można podzielić na reakcje dające w wyniku charakterystyczne osady (czasami łatwe do identyfikacji pod mikroskopem) oraz reakcje prowadzące do swoiście zabarwionych połączeń.

Reakcje strąceniowe przeprowadza się za pomocą tzw. ogólnych odczynników na alkaloidy, z którymi tworzą one trudno rozpuszczalne w wodzie osady. Najczęściej są to sole proste amin, jakimi są alkaloidy lub ich związki kompleksowe. Należy jednak zaznaczyć, że nie ma odczynnika, który by strącał bez wyjątku wszystkie alkaloidy. Jeżeli jednak w trakcie kolejnych analiz nie powstaje osad z kilkoma odczynnikami, obecność alkaloidu można raczej wykluczyć. Dodatkowo wyniki reakcji strąceniowych mogą jedynie sugerować obecność alkaloidu w badanej próbce. Należy bowiem pamiętać, że poszczególne odczynniki strącające często dają osady z licznymi związkami organicznymi, należącymi do innych grup strukturalnych. W celu głębszej analizy konieczne są dodatkowe testy (np. reakcje barwne) dla identyfikacji badanej próbki.

Do najpopularniejszych odczynników strącających alkaloidy należą:

- **odczynnik Mayera** (jodortęcian potasowy) – wytrąca z alkaloidami bezpostaciowe, białe lub żółtawe osady o ogólnej strukturze $[(H_n\text{Alkaloid})^{n+}]_2(\text{HgI}_4^{2-})_n$;
- **odczynnik Dragendorffa** (jodobizmutan(III) potasowy) – z roztworów alkaloidów wytrąca w większości przypadków żółtopomarańczowe lub czerwone osady o ogólnej strukturze $[H_n\text{Alkaloid}]^{n+}(\text{BiI}_4^-)_n$;
- **odczynnik Wagnera** (roztwór jodu w wodnym roztworze jodku potasowego) – osady są jasnokawowe do ciemnobrunatnych, przeważnie kłaczkowate, proszkowate lub galaretowate; ich ogólna struktura to: $[K_n\text{Alkaloid}]^{n+}(\text{I}_3^-)_n$;
- **kwas pikrynowy** (nasycony na zimno roztwór wodny) – osady z alkaloidami są krystaliczne lub bezpostaciowe o barwie żółtej;
- **odczynnik Sonnenscheina** (kwas molibdenianofosforowy) – bardzo czuły odczynnik do wykrywania alkaloidów, strącający bezpostaciowe, jasno żółte albo brunatno-żółte osady, które po pewnym czasie przybierają barwę błękitną albo zieloną;
- **odczynnik Scheiblera** (kwas wolframianofosforowy) – czułość reakcji z wieloma alkaloidami jest wyjątkowo wysoka, osady są kłaczkowate, początkowo dość objętościowe;

- **kwask chloroplatynowy** – daje z większością alkaloidów osady o barwie od jasnożółtej do pomarańczowej.

Skład i dokładny sposób przygotowania wszystkich odczynników potrzebnych do testów analitycznych podano w rozdz. IX.1.

Wykonanie reakcji strąceniowych:

Rozpuścić szczyptę badanej substancji w minimalnej ilości (kilku kroplach) 1% kwasu solnego lub lodowatego kwasu octowego. Umieścić jedną kroplę tego roztworu na szkiełku zegarkowym ustawionym na czarnym tle. Tuż obok tej kropli umieścić kroplę jednego z wyżej wymienionych odczynników strącających i połączyć je końcem bagietki. Próbę przeprowadzić z dwoma różnymi odczynnikami, z których przynajmniej jeden okaże się efektywnym strącalnikiem.

Obserwacje:

Obserwować zmętnienie lub powstanie osadu na granicy zetknięcia obu roztworów. Zanotować kolor oraz postać osadu.

Charakterystyczne dla alkaloidów **reakcje barwne** przeprowadza się z wykorzystaniem:

- środków odwadniających, jak stężony kwas siarkowy(VI);
- związków utleniających, jak kwasy azotowy(V), chlorowce;
- związków jednocześnie utleniających i odwadniających, jak:
 - **odczynnik Erdmanna** (roztwór kwasu azotowego(V) w kwasie siarkowym(VI)),
 - **odczynnik Mandelina** (roztwór wanadanu(V) amonowego w kwasie siarkowym(VI)),
 - **odczynnik Fröhdego** (roztwór molibdenianu sodowego w stęż. kwasie siarkowym(VI)),
 - **odczynnik Rosenthalera i Türka** (roztwór arsenianu(V) potasowego w stęż. kwasie siarkowym(VI)),
 - **reakcja Vitaliego** (nitrowanie wraz z następczym zalkalizowaniem powstałego produktu);
- odczynników zawierających aldehydy w obecności substancji dehydratujących (najczęściej stęż. kwasu siarkowego(VI)), jak:
 - **odczynnik Wasicky'ego** (roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w stęż. kwasie siarkowym(VI)),
 - **odczynnik Marquisa** (aldehyd mrówkowy w stęż. kwasie siarkowym(VI)).

Wykonanie analiz kroplowych nie wymagających ogrzewania

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w zagłębieniu płytki porcelanowej dodać kilka kropli odczynnika i całość zamieszać szklaną bagietką.

Wykonanie analiz kroplowych z ogrzewaniem

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w małej parownicze lub próbówce dodać kilka kropli odczynnika i całość zamieszać szklaną bagietką. Po ok. 10 min. ogrzać zawartość próbówki lub parowniczkę na wrzącej łaźni wodnej.

Obserwacje:

Zanotować barwę mieszaniny reagującej, a także jej ewentualne zmiany w czasie 5-15 minut przed oraz po ogrzewaniu (o ile wymaga tego procedura). Sprawdzić, czy wystąpi zjawisko fluorescencji w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ lub 365 nm dla próby Marquisa). W przypadku stwierdzenia braku fluorescencji mieszaninę rozcieńczyć niewielką ilością wody (OSTROŻNIE!), ewentualnie dodatkowo dodać ok. 1 ml chloroformu i powtórzyć obserwacje w świetle UV.

Badania fluorescencji

Badania fluorescencji należy wykonywać na płytkach do analizy kroplowej (nie w szklanych probówkach!). W przypadkach, gdzie wcześniej reakcję przeprowadzano w probówce lub innym naczyniu niewielką ilość mieszaniny reagującej pobiera się pipetą Pasteura i nakrapla się w zagłębienie płytki. Dotyczy to mieszanin zarówno homo-, jak i heterogenicznych. Obserwacje fluorescencji pod lampą UV należy prowadzić w zaciemnionym miejscu.

Wykonanie wybranych reakcji charakterystycznych

- Reakcja Vitaliego

Wykonanie próby:

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w małej parownicze dodać kroplę dymiącego kwasu azotowego(V) i roztwór odparować na łaźni wodnej. Do pozostałości dodać kilka kropel 10% etanolowego roztworu wodorotlenku potasowego.

Obserwacje:

Zanotować barwy mieszaniny reagującej, jakie powstały przed i po zalkalizowaniu produktu nitrowania/utleniania.

- Reakcja ze stęż. kwasem siarkowym(VI) i chlorkiem żelaza(III) (charakterystyczna dla pochodnych izochinoliny)

Wykonanie próby:

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w parownicze dodać 0,5 ml stęż. kwasu siarkowego(VI) i jedną kroplę 5% roztworu FeCl_3 . Roztwór zabarwia się na zielono. Po ogrzaniu na łaźni wodnej zabarwienie zmienia się na fioletowe, a po ochłodzeniu i dodaniu 1-2 kropli 25% kwasu azotowego przechodzi w ciemnoczerwone.

- Reakcja ze stęż. kwasem siarkowym(VI) i glukoza

Wykonanie próby:

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w probówce lub małej parownicze dodać 2- krotną ilość glukozy ok. 0,25 ml stęż. kwasu siarkowego(VI).

Obserwacje:

Zanotować zmiany barw mieszaniny reagującej w czasie 5-10 minut.

- Reakcja z kwasem octowym i tlenkiem ołowiu(IV)

Wykonanie próby:

Do odrobiny badanej substancji (w postaci stałej), umieszczonej w probówce dodać niewielką ilość PbO_2 oraz ok. 1 ml lodowatego kwasu octowego. Całość ogrzać do wrzenia, po czym przesączyć.

Obserwacje:

Zanotować barwę przesączu i jego ewentualną fluorescencje w świetle UV.

- Reakcja z nitroprusydkiem sodowym (charakterystyczna dla pochodnych imidazolu)

Wykonanie próby:

Do wodnego roztworu ok. 20 mg badanej substancji dodać kilka kropli 10% roztworu NaOH i 5% roztworu nitroprusydku sodowego. Po 5 minutach mieszaninę delikatnie zakwasić za pomocą 10% kwasu solnego. W przypadku obecności pochodnych imidazolu powstaje fioletowe zabarwienie. Po dodaniu 2 kropli 3% roztworu nadtlenu wodoru barwa zmienia się na ciemnoczerwoną.

- Reakcja talejochinowa (charakterystyczna dla pochodnych chinoliny)

Wykonanie próby:

Do około 3 ml wodnego roztworu badanej substancji dodać 2-3 krople wody bromowej (unikać jej nadmiaru!) i po ok. 1 min. 0,5 ml 10% roztworu amoniaku, wprowadzając go do probówki po ściance. Powstaje zielony pierścień na granicy faz.

- Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Wykonanie próby:

Do około 2 ml świeżo przygotowanego odczynnika Marquisa dodać bardzo niewielką ilość (śladową) badanego alkaloidu i całość zamieszać. Przy użyciu większych ilości zabarwienia poszczególnych alkaloidów nie są charakterystyczne. Po ok. 5-10 minutach całość lekko ogrzać na łaźni wodnej.

Przeważnie obserwuje się zabarwienia od jasnoróżowego poprzez karminowoczerwone do fioletowego.

Obserwacje:

Zanotować zmiany barw mieszaniny reagującej.

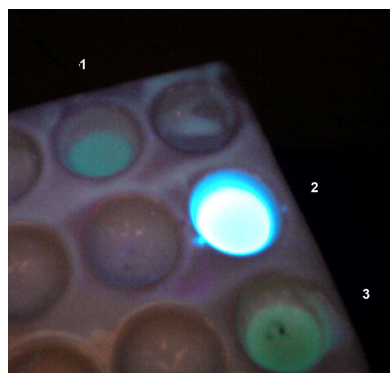
- Reakcja z bezwodnikiem octowym w obecności steż. kwasu siarkowego(VI) (tzw. próba koralinowa)

Wykonanie próby:

Do ok. 5 mg badanej substancji dodać 3 ml bezwodnika octowego, ogrzać na łaźni wodnej do ok. 80 °C, po czym dodać ostrożnie 5 kropli steż. kwasu siarkowego(VI).

Obserwacje:

Obserwować fluorescencję mieszaniny reagującej w świetle UV.



Rys. 4. Fluorescencja w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) produktów próby koralinowej dla papaweryny (1) i cynchoniny (2) oraz reakcji z PbO_2 w kwasie octowym dla cynchoniny (3)

- Reakcja mureksydowa (charakterystyczna dla pochodnych puryny)

Wykonanie próby:

Ok. 10 mg badanej substancji umieścić w parownicze, dodać 5 kropli 30% roztworu nadtlenku wodoru i 5 kropli 25% kwasu solnego. Mieszaninę odparować na łaźni wodnej do sucha. Stałą pozostałość poddać działaniu par amoniaku. W przypadku obecności pochodnych puryn obserwuje się powstanie purpurowofioletowego produktu.

- Reakcja z odczynnikiem Wasicky'ego

Wykonanie próby:

Do około 2-5 mg badanej substancji dodać 2-3 krople świeżo przygotowanego odczynnika Wasicky'ego. Całość wymieszać bagietką. Po ok. 5-10 minutach całość lekko ogrzać na łaźni wodnej.

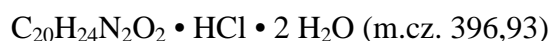
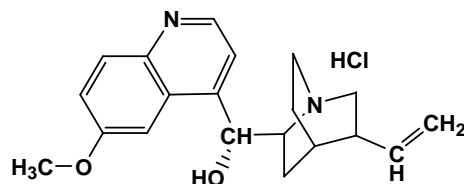
Obserwacje:

Zanotować zmiany barw mieszaniny reagującej.

2.1.2. Analiza wybranych alkaloidów

Chininy chlorowoderek

Chlorowoderek (2*R*, 4*S*, 5*R*)-[(*R*)-(6-metoksy-4-chinolilo)-hydroksymetylo]-5-winylochinuklidyny



Właściwości fizyczne

Białe lub prawie białe, igiełkowate kryształy, bez zapachu, o gorzkim smaku, żółknące pod wpływem światła, łatwo rozpuszczalne w etanolu i chloroformie, średnio w wodzie, praktycznie nierozpuszczalne w eterze etylowym. Skręcalność właściwa $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -240^{\circ}$ - 258° ($c = 2$; 0,1 N kwas solny). Współczynnik absorpcji $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 845$ ($\lambda = 245 \text{ nm}$) oraz $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 155$ ($\lambda = 315 \text{ nm}$). Temp. topn. 205-210 °C.

Chemiczne metody identyfikacji

Chinina, jak też i jej lewoskrętny diastereoizomer, zwany chinidyną (substancja lecznicza o działaniu antyarytmicznym) posiadają w swej strukturze dwa układy: chinolinowy oraz chinuklidynowy. Drugi z nich zbudowany jest z dwóch skondensowanych pierścieni piperydynowych. Obecne w cząsteczce dwa atomy azotu wykazują właściwości zasadowe. Zasadowość atomu azotu w układzie chinuklidynowym jest zdecydowanie wyższa (trzeciorzędowa amina alifatyczna). Chinina i chinidyna różnią się od siebie konfiguracją przestrzenną podstawników układu chinuklidynowego (w chininie – *trans*, w chinidynie – *cis*) oraz atomu węgla przy grupie hydroksylowej.

- Reakcja erytrochinowa

Wykonanie próby:

Do około 4 ml roztworu wodnego badanej substancji w rozdzielniku dodać 0,5 ml 30% roztworu Na_2CO_3 i przeprowadzić ekstrakcję wolnej zasady za pomocą chloroformu (ok. 4 ml). Do 2 ml roztworu chloroformowego dodać 3 ml 10% kwasu octowego i kroplami wody bromowej do żółtobrunatnego zabarwienia, po czym dodać kroplę 10% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i 1 kroplę 10% roztworu amoniaku. Po zmieszaniu warstwa chloroformowa zabarwia się na czerwono lub różowo.

- Reakcja z kwasem siarkowym

Chinina wykazuje intensywną niebieską fluorescencję w środowisku kwasów tlenowych (np. siarkowy, winowy, octowy, fosforowy, azotowy). Kwasy fluorowcowodorowe wygaszają fluorescencję.

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać 0,25 ml 16% roztworu kwasu siarkowego. Powstaje niebieska fluorescencja, szczególnie dobrze widoczna w świetle UV. Fluorescencję należy obserwować na płytce do analizy kropkowej (szklane ścianki probówek niekwarcowych silnie absorbują światło UV, utrudniając obserwację fluorescencji).

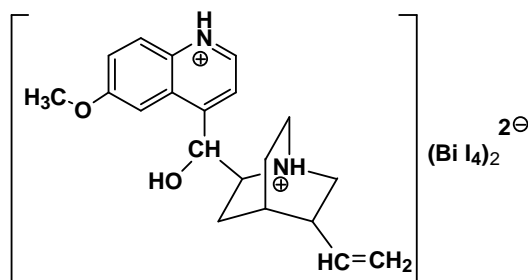


Rys. 5. Produkty reakcji chininy ze stęż. kwasem siarkowym wykazują intensywną fluorescencję w świetle UV

- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa (jodobizmutanem potasowym)

Wykonanie próby:

Do około 1 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać 2 ml odczynnika Dragendorffa. Powstaje czerwony osad soli z chininą o strukturze:



- Reakcja specyficzna dla chininy

Wykonanie próby:

Ok. 0,1 g chininy, dodać 3 ml mieszaniny zawierającej 19 ml 30% roztworu kwasu octowego, 5 ml etanolu i 1 ml 15% kwasu siarkowego, intensywnie zamieszać. Następnie dodać 2-3 krople 10% etanolowego roztworu jodu, tak aby mieszanina przybrała jasnożółte zabarwienie i zamieszać. Po kilku sekundach tworzy się krystaliczny zielony osad soli jodochininy. Pod mikroskopem osad widoczny jest w postaci płytek rombów, silnie załamujących światło. Zależnie od położenia osi kryształów względem wiązki światła wydają się bądź to zielone, bądź czerwone.

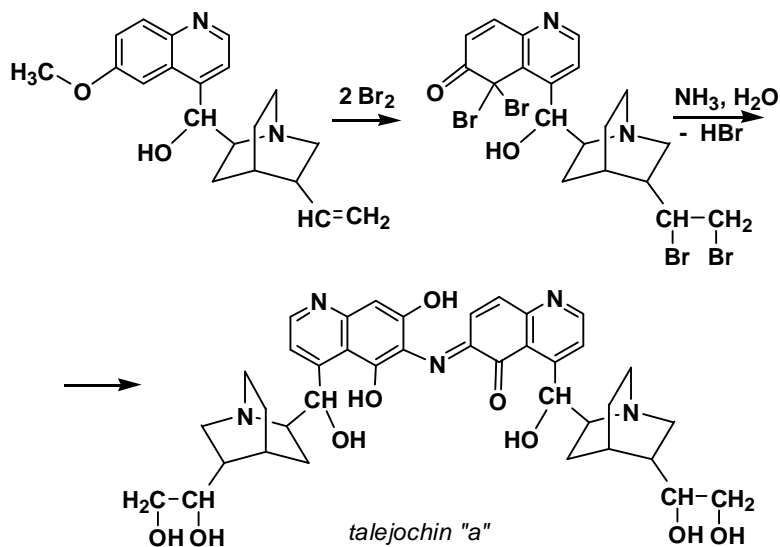
- Reakcja odróżniająca chininę od chinidyny

Wykonanie próby:

Okolo 0,5 mg substancji rozpuścić w 2 ml rozcieńczonego roztworu kwasu octowego, ogrzać do ok. 60 °C, dodać 1 kroplę 5% wodnego roztworu octanu sodowego (bez mieszania), 2 krople wody bromowej i po upływie 1 min. zamieszać. Powstaje czerwone lub fioletowe zabarwienie. Po 2-3 min. dodać 3 ml 2 N roztworu NaOH, po czym po kolejnych 2 min. otrzymany roztwór wytrząsnąć z 2 ml chloroformu. Chinidyna zabarwia warstwę chloroformową na kolor czerwono-fioletowy, podczas gdy w przypadku chininy warstwa chloroformowa pozostaje bezbarwna.

- Reakcja talejochinowa

Chinina odbarwia wodę bromową tworząc bromopochodną, która następnie pod



Rys. 6. Przebieg reakcji talejochinowej

wpływem amoniaku daje związek (talejochin „a”) o zielonym zabarwieniu (Rys. 6 i 7).

Wykonanie próby:

Do około 3 ml wodnego roztworu badanej substancji dodać 3 krople wody bromowej (unikać jej nadmiaru) i po ok. 1 min. 0,5 ml 10% roztworu amoniaku, wprowadzając go do próbówki po ściance. Powstaje zielony pierścień na granicy faz.

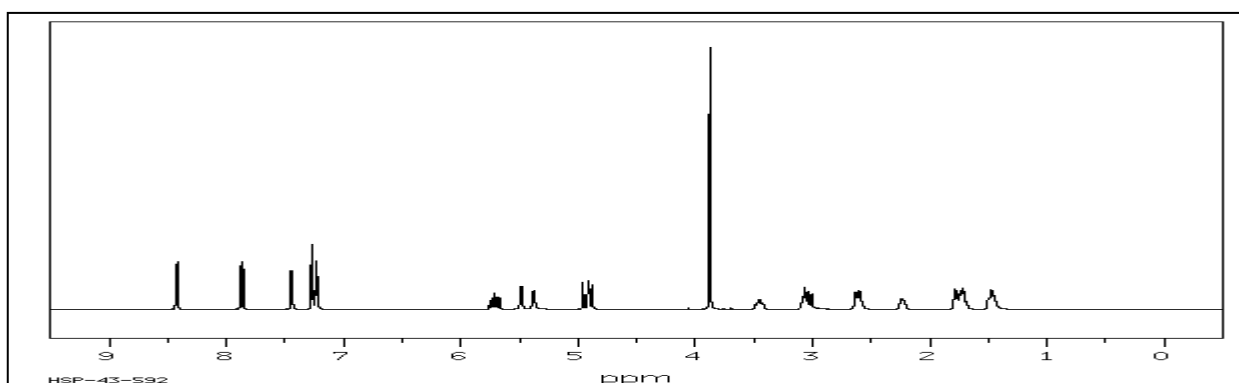
Próbe można przeprowadzić również na płytce do analizy kroplowej (Rys. 7)



Rys. 7. Pozytywny wynik próby talejochinowej

Analiza spektralna

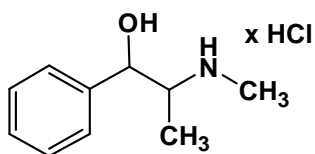
Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z dostępnymi odpowiednimi widmami wzorcowymi.



Rys. 8. Widmo ¹H NMR chininy (400 MHz, c = 0.03 g / 0.5 ml CDCl₃) [18]

Efedryny chlorowoderek

Chlorowoderek (*1S, 2R*) 1-fenyl-2-metyloaminopropan-1-olu



$C_{10}H_{15}NO \cdot HCl$ (m.cz. 201,09)

Cząsteczka efedryny posiada w swej strukturze dwa asymetryczne atomy węgla. Może zatem występować w czterech optycznie czynnych postaciach: dwóch diastereoizomerycznych formach (*1S, 2R*) czyli *erythro* – efedryna oraz (*1S, 2S*) czyli *treo* – pseudoefedryna) oraz ich enancjomerach. Wszystkie formy wykazują działanie lecznicze, a lewoskrętny izomer (*1R, 2S*) – najsilniejszy. Lek w formie racemicznej zwany jest efetominą.

Właściwości fizyczne

Białe lub bezbarwne kryształy, bez zapachu, ciemniejące pod wpływem światła, łatwo rozpuszczalne w etanolu, wodzie i kwasach, praktycznie nierozpuszczalne w eterze etylowym. Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ do -35° ($c = 5$; woda). Współczynnik absorpcji $E_{1cm}^{1\%} = 150$ ($\lambda = 250$ nm) w 0,1 N kwasie solnym. Temp. topn. 217-220 °C.

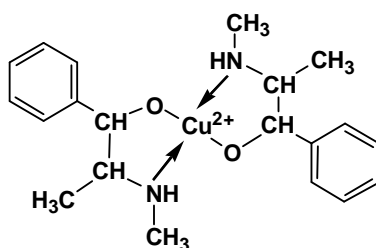
Chemiczne metody identyfikacji

W celu przeprowadzenia niżej przedstawionych prób tożsamościowych należy wcześniej przygotować ok. 0,5% wodny roztwór badanej substancji - roztwór (A).

- Reakcja z siarczanem miedzi(II)

Wykonanie próby:

Do około 1 ml roztworu (A) dodać 0,1 ml 2% roztworu $CuSO_4$ i 2-3 krople 15% roztworu NaOH. Powstaje fioletowe zabarwienie związku kompleksowego o strukturze podanej poniżej. Następnie dodać 2 ml eteru etylowego i wytrząsnąć. Powstaje purpurowe lub różowe zabarwienie warstwy eterowej i niebieskie warstwy wodnej.



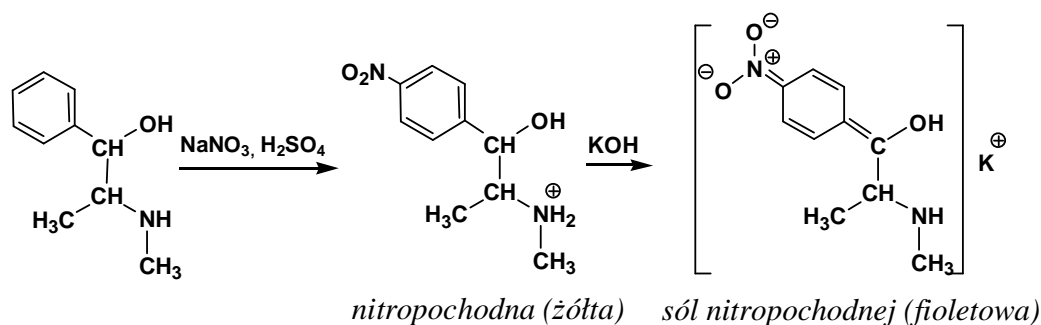
Rys. 9. Związek kompleksowy efedryny z jonem miedzi(II)

- Reakcja nitrowania (zmodyfikowana reakcja Vitaliego)

Wykonanie próby:

0,1 ml roztworu (A) odparować na łaźni wodnej do sucha. Pozostałość rozpuścić w 0,4 ml 96% H_2SO_4 i dodać kilka kryształków $NaNO_3$; powstaje żółte zabarwienie roztworu, które po zalkalizowaniu 0,1% etanolem roztworem KOH zmienia się na fioletowe.

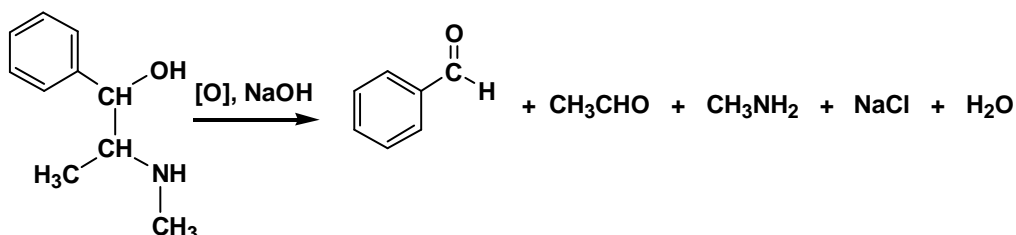
Reakcja przebiega wg schematu, jak pokazano na Rys. 10.



Rys. 10. Przebieg reakcji Vitaliego dla efedryny

- Reakcje utleniania

Pochodne fenyletyloaminy z drugorzędową grupą alkoholową w sąsiedztwie pierścienia aromatycznego łatwo ulegają utlenieniu pod wpływem takich związków, jak: ninhydryna heksacyjanożelazian(III) potasu, manganian(VII) potasu, jod czy jodan(I) sodowy w środowisku zasadowym do odpowiednich aldehydów z „rozerwaniem” łańcucha alifatycznego.



Rys. 11. Reakcja utleniania efedryny w środowisku zasadowym

- Reakcja z heksacyjanożelazianem (III) potasu

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać 0,5 ml 15% roztworu NaOH oraz 0,5 ml 5% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (przygotowanego *ex tempore*) i ogrzać. Wydziela się zapach gorzkich migdałów (aldehyd benzoesowy) i niebieszczejze zwilżony wodą papierek lakmusowy, umieszczony u wylotu próbówki (metyloamina).

- Reakcja z ninhydryną

Ninhydryna jest odczynnikiem służącym przede wszystkim do wykrywania alifatycznych pierwszorzędowych grup aminowych. W tym przypadku reaguje z metyloaminą, która powstaje po utlenieniu efedryny (Rys. 11). Przebieg reakcji – analogicznie, jak w rozdz. IV.2.9.2.

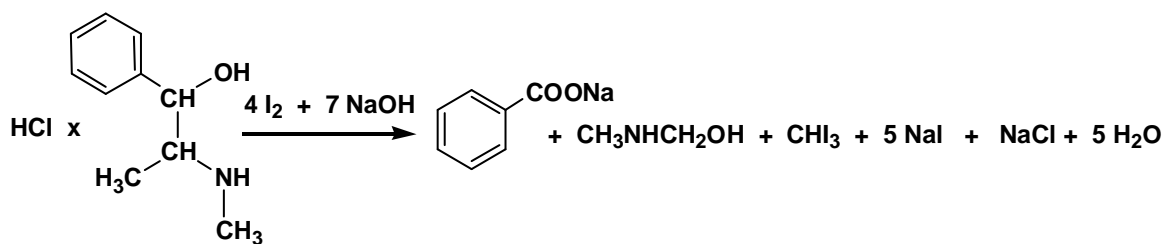
Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać 0,5 ml 0,2% roztworu ninhydryny w etanolu, 0,05 g Na_2CO_3 i ogrzewać. Powstaje fioletowe zabarwienie.

- Reakcja jodoformowa

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać 2 ml 10% roztworu NaOH, a następnie kroplami, 0,05 M roztworu jodu w roztworze jodku potasowego do uzyskania lekko żółtego zabarwienia, wytrząsać ok. 1 min. i ogrzać do temperatury ok. 60 °C. Wydziela się charakterystyczny zapach, a po ochłodzeniu z roztworu wypada żółty osad jodoformu.



Rys. 12. Przebieg reakcji jodoformowej w przypadku efedryny

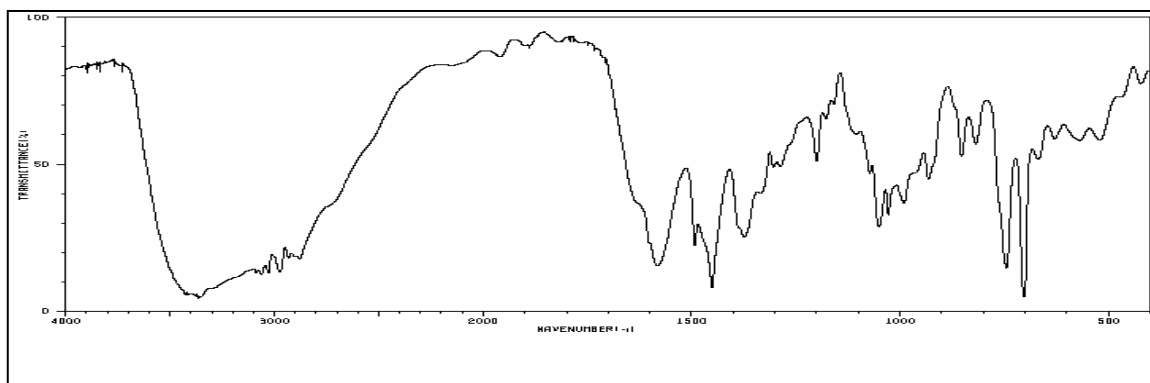
- Odróżnianie efedryny od racemicznej efetoniny

Wykonanie próby:

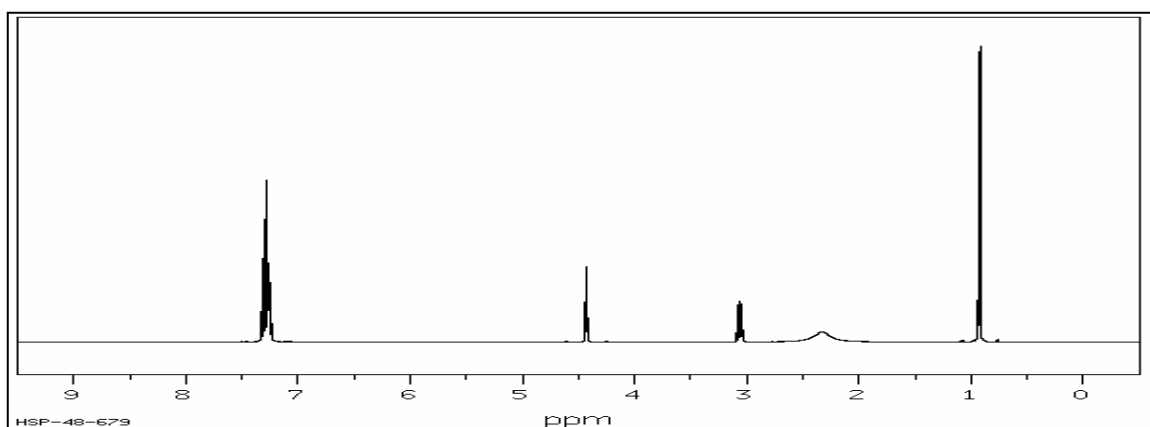
Do 0,1 ml roztworu (A) dodać kryształek szczawianu potasowego. W przypadku efedryny powstaje krystaliczny igielkowy osad. Szczawian efetoniny krystalizuje w postaci płytek. Wynik próby obserwuje się pod mikroskopem.

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z dostępnymi widmami wzorcowymi.



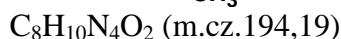
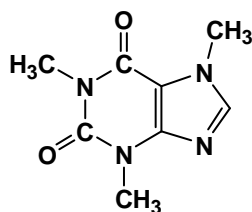
Rys. 13. Widmo IR efedryny (pastylka KBr) [18]



Rys. 14. Widmo ^1H NMR efedryny (400 MHz, $c = 0.04 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]

Kofeina

1,3,7-trimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dion



Właściwości fizyczne

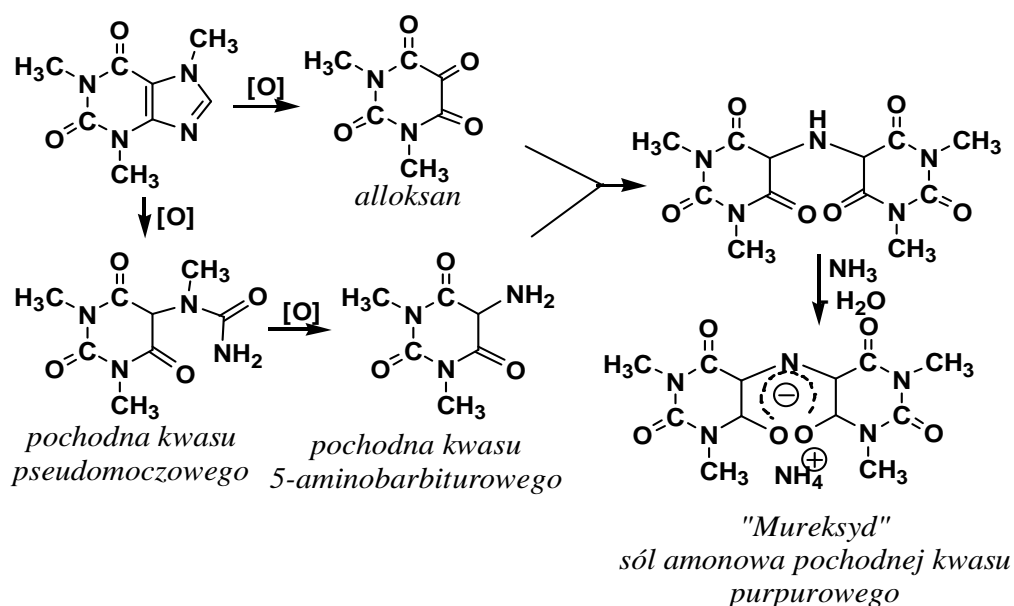
Białe, igłowate kryształy o gorzkim smaku, temp. topn. 234-238 °C (dla postaci bezwodnej), trudno rozpuszczalne w wodzie, eterze etylowym, łatwo rozpuszczalne w chloroformie i wodzie wrzącej, dość łatwo w metanolu. Związek rozpuszcza się także w stężonych roztworach salicylanów i benzoosanów litowców (powstają kompleksy z przeniesieniem ładunku, w których akceptorem elektronów π jest grupa karbonylowa ksantyny).

Chemiczne metody identyfikacji

Wyodrębnioną z masy leku kofeinę należy poddać niżej podanym próbom tożsamościowym.

- Reakcja mureksydowa

W reakcji tej kofeina utleniana jest w obecności nieznacznych ilości stężonego kwasu solnego za pomocą np. H_2O_2 lub $KClO_3$ do produktów, które z amoniakiem tworzą tzw. tetrametylomureksyd.



Rys. 15. Przebieg reakcji mureksydowej w przypadku kofeiny

Wykonanie próby:

Okolo 0,01 g badanej substancji umieszczonej w małej parownicze zadać 1ml 30 % roztworem perhydrolu (wody utlenionej), po czym dodać 1 ml 25% kwasu solnego i całość odparować na łaźni wodnej do sucha. Do pozostałości dodać 1-2 krople 25% roztworu amoniaku. Mieszanina zabarwia się na kolor czerwono fioletowy. Powstały produkt wykazuje w świetle UV fioletową fluorescencję.

- Reakcje strąceniowe

Tylko nieliczne odczynniki grupowe heterocyklicznych związków azotowych wytrącają osady z pochodnymi ksantyny (w tym i z kofeiną).

- Reakcja z roztworem jodu w jodku potasowym

Wykonanie próby:

Ok. 50 mg badanej substancji wytrząsnąć z 2 ml wody, po ochłodzeniu w razie potrzeby przesączyć. Do ok. 1 ml tego roztworu dodać 1 kroplę 0,2M roztworu I₂/KI (roztwór powinien pozostać klarowny), po czym dodać 1 kroplę 5% kwasu solnego. Tworzy się brunatny osad nadjodku kofeiny (C₈H₁₀N₄O₂ • I₄ • HI), który jest rozpuszczalny w 10% roztworze NaOH.

- Reakcja z chlorkiem rtęci(II)

Wykonanie próby:

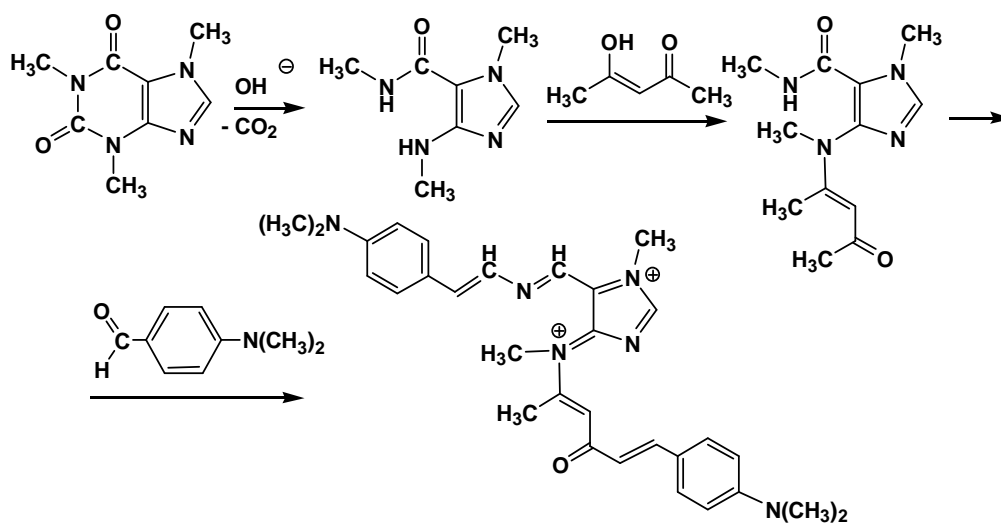
Do ok. 1 ml wyżej otrzymanego roztworu wodnego kofeiny dodać 0,1 ml 1% roztworu HgCl₂. Tworzy się biały osad (C₈H₁₀N₄O₂ • HgCl₂).

- Reakcja specyficzna dla kofeiny

W toku tej próby kofeina hydrolizuje w środowisku alkalicznym do kofeidyny, która pod wpływem acetyloacetonu przechodzi w pochodną enaminową, a ta z kolei poddana kondensacji z aldehydem 4-dimetyloaminobenzoesowym tworzy barwnik o intensywnie niebieskim kolorze.

Wykonanie próby:

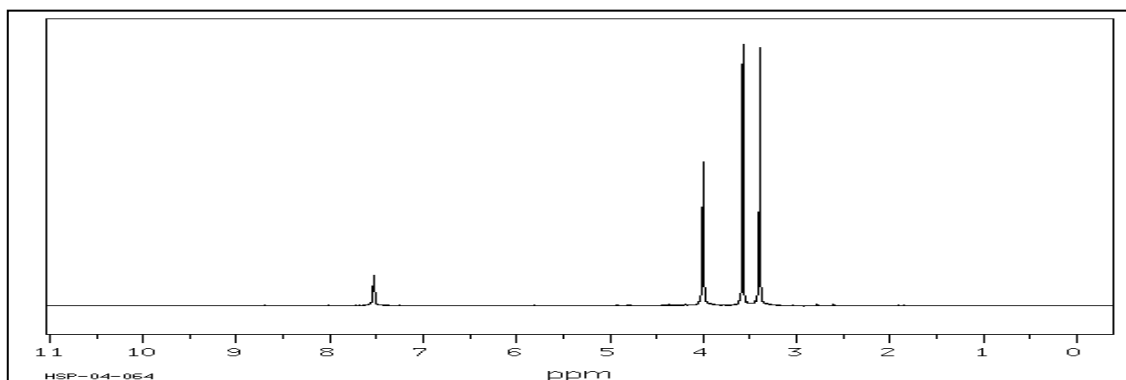
Ok. 0,01 g kofeiny rozpuścić w 0,25 ml mieszaniny 0,5 ml acetyloacetonu oraz 5 ml 10% roztworu NaOH, po czym roztwór ogrzewać na łaźni wodnej o temp. ok. 80 °C przez 7 min. , Po oziębieniu dodać 0,5 ml 1 % roztworu aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 5% kwasie solnym i ponownie ogrzewać na łaźni wodnej o temp. ok. 80 °C przez 7 min. Po oziębieniu mieszaniny reagującej dodać 10 ml wody. Powstaje intensywnie niebieskie zabarwienie.



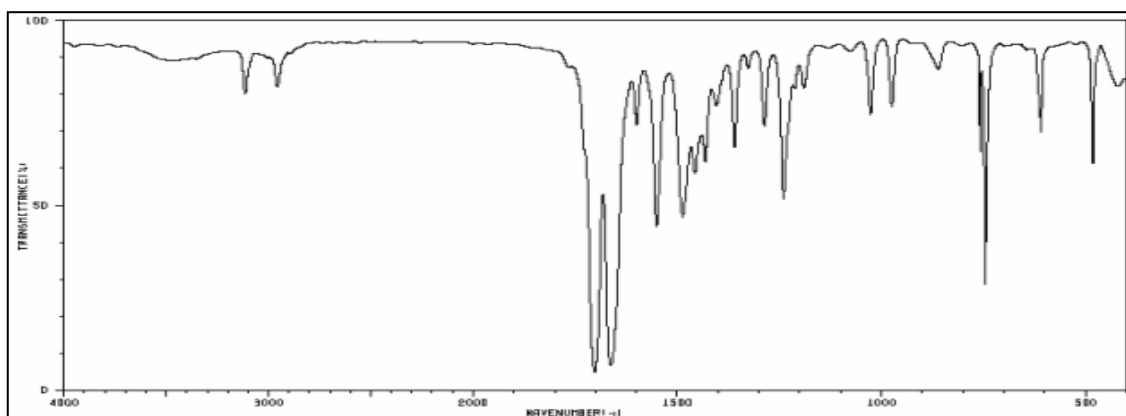
Rys. 16. Reakcja specyficzna dla kofeiny

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



Rys. 17. Widmo ^1H NMR kofeiny (90 MHz, $c = 0.046 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]



Rys. 18. Widmo IR kofeiny (pastylka KBr) [18]

2.1.3. Reakcje specyficzne wybranych alkaloidów

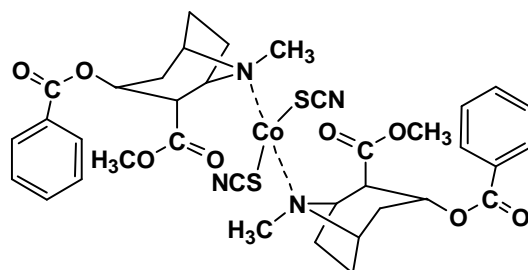
Niektóre alkaloidy posiadają pewne unikalne fragmenty strukturalne, dzięki którym możliwe jest przeprowadzanie tzw. analitycznych reakcji specyficznych. Reakcje te, z uwagi na swój przebieg czy mechanizm są charakterystyczne tylko dla konkretnego alkaloidu i z powodzeniem mogą być dowodem potwierdzającym jego obecność. Warto tu jednak mieć na względzie fakt, że w niektórych warunkach, pomimo obecności w analizowanej próbce danego alkaloidu jego reakcja specyficzna może dawać wynik negatywny lub odmienny od oczekiwanego. Spowodowane to może być obecnością w próbce domieszek innych substancji niealkaloidowych, które w warunkach danej reakcji specyficznej potrafią skutecznie maskować jej oczekiwany wynik. Dlatego też zwykle przed analizą warto dążyć do wyodrębnienia alkaloidu i otrzymania go w stanie możliwie czystym. Niżej przedstawiono kilka przykładów reakcji specyficznych dla wybranych alkaloidów.

Reakcja specyficzna dla chininy

Za najbardziej specyficzną reakcją dla chininy uznaje się reakcję erytrochinową (wykonanie – patrz rozdz. IV.2.1.2.). Polega ona na addycji bromu do wiązań podwójnych, a następnie reakcji powstałego produktu z heksacyjanożelazianem(III) potasowym w lekko alkalicznym środowisku. W przypadku pozytywnego przebiegu reakcji z chininą finalny produkt zabarwia na czerwono obecną w mieszaninie reagującej warstwę chloroformową. Pozostałe alkaloidy kory chinowej nie dają tej reakcji, podobnie jak alkaloidy z innych grup strukturalnych, jak morfina, strychnina, narkotyna, papaweryna, atropina, kokaina, kofeina, albo leki, jak aspiryna, fenacetyna. Brucyna daje barwę jedynie jasnorożową.

Reakcja specyficzna dla kokainy

Szczególnie specyficzną reakcją dla kokainy jest tworzenie z tiocyjanianem kobaltu(II) intensywnie niebieskiego związku kompleksowego, najprawdopodobniej o strukturze przedstawionej na Rys. 19.



Rys. 19. Produkt reakcji kokainy z tiocyjanianem kobaltu(II)

Wykonanie próby:

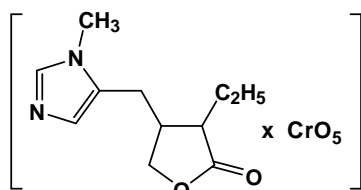
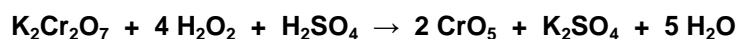
Niewielką ilość badanej substancji zadać 1% wodno-glicerynowym roztworem tiocyjanianu kobaltu(II). Powstaje intensywnie niebieski produkt, często wydzielający się w postaci płatków. W przypadku kokainy produkt nie powinien zmieniać swojej barwy po dodaniu kilku kropeł roztworu chloru cyny(II) w kwasie solnym. Rozpuścić powstały osad przez dodanie kwasu solnego, a następnie dodać 2 ml chloroformu. Po wymieszaniu dolna warstwa chloroformowa przyjmuje barwę niebieską.

Reakcja specyficzna dla kofeiny

Kofeinę można łatwo zidentyfikować przeprowadzając najpierw reakcję z acetyloacetone w środowisku zasadowym, a następnie kondensację powstałego produktu z aldehydem 4-dimetyloaminobenzoesowym w środowisku kwaśnym. Powstaje produkt o ciemnoniebieskim zabarwieniu (wykonanie i przebieg przemian – patrz rozdz. IV.2.1.2.).

Reakcja specyficzna dla pilokarpiny

Pilokarpina tworzy z pięciotlenkiem chromu związek kompleksowy, który w roztworze benzenowym lub chloroformowym przyjmuje trwałą niebieskofioletową barwę.



Rys. 20. Związek kompleksowy pilokarpiny z pięciotlenkiem chromu

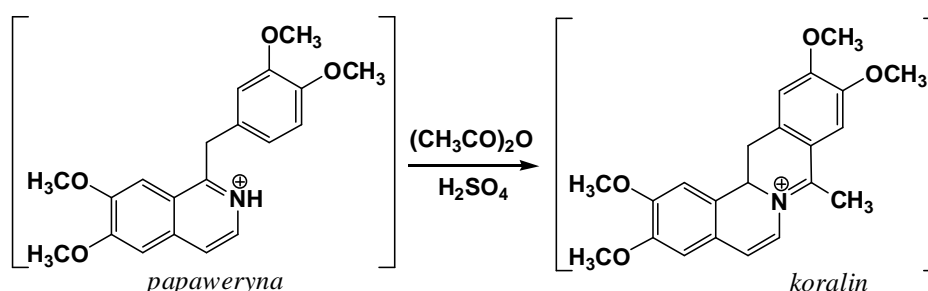
Dla odróżnienia warto podać, że apomorfina zabarwia chloroform na fioletowo po reakcji z dwuchromianem już bez nadtlenu wodoru, natomiast strychnina powoduje przemijające zabarwienie niebieskie.

Wykonanie próby:

Ok. 10 mg badanej substancji rozpuścić w 5 ml wody, dodać 0,1 ml 16% roztworu H_2SO_4 , 1 ml 3% roztworu H_2O_2 , 0,1 ml 5% roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 3 ml benzenu lub chloroformu i całość intensywnie wytrząsnąć. Warstwa organiczna zabarwia się na niebieskofioletowo. Warstwa wodna stopniowo traci swą ciemną barwę, przechodząc ostatecznie w żółtą.

Reakcja specyficzna dla papaweryny

Znaną reakcją specyficzną dla papaweryny jest tzw. „próba koralinowa”. Papaweryna w obecności bezwodnika octowego i kwasu solnego tworzy produkt zwany „koralinem” o charakterystycznej intensywnej jasnozielonej fluorescencji.



Rys. 21. Próba koralinowa

Wykonanie próby:

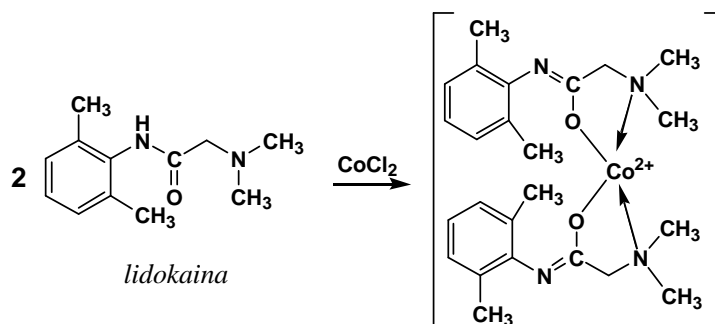
Do ok. 5 mg badanej substancji dodać 3 ml bezwodnika octowego, ogrzać na łaźni wodnej do 80°C , a następnie dodać ostrożnie 5 kropli stęż. H_2SO_4 . Powstaje intensywna fluorescencja mieszaniny reagującej, dobrze widoczna w świetle UV.

Reakcja specyficzna dla lidokainy

Specyficzną reakcją dla lidokainy jest tworzenie jasnozielonego osadu jej kompleksu z chlorkiem kobaltu(II) o strukturze, jak pokazano na Rys. 22.

Wykonanie próby:

Ok. 0,25 g badanej substancji (w postaci chlorowodoru) rozpuścić w 5 ml wody, dodać 0,5 ml 10% roztworu NaOH , powstający osad odsączyć i przemyć wodą do obojętnego odczynu przesączu. Rozpuścić 0,1 g tak otrzymanego osadu w 0,5 ml etanolu (95%), dodać 0,5 ml 2% roztworu CoCl_2 i dokładnie wymieszać. Jasnozielony osad pojawia się po ok. 2 minutach.

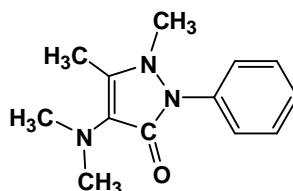


Rys. 22. Związek kompleksowy lidokainy z jonem kobaltu(II)

2.2. Niealkaloidowe azotowe zasady organiczne z układami heterocyklicznymi

Aminofenazon

1-fenyl-2,3-dimetylo-4-dimetylamino-3-pirazolin-5-on



$C_{13}H_{17}N_3O$ (m.c.z. 231,30)

Właściwości fizyczne

Bezbarwne, bezzapachowe kryształy o słabo gorzkim smaku, temp. topn. 107-109 °C, rozpuszczalne w wodzie, etanolu (95%), chloroformie, eterze etylowym i benzenie, a także w rozcieńczonych wodnych roztworach kwasów.

Chemiczne metody identyfikacji

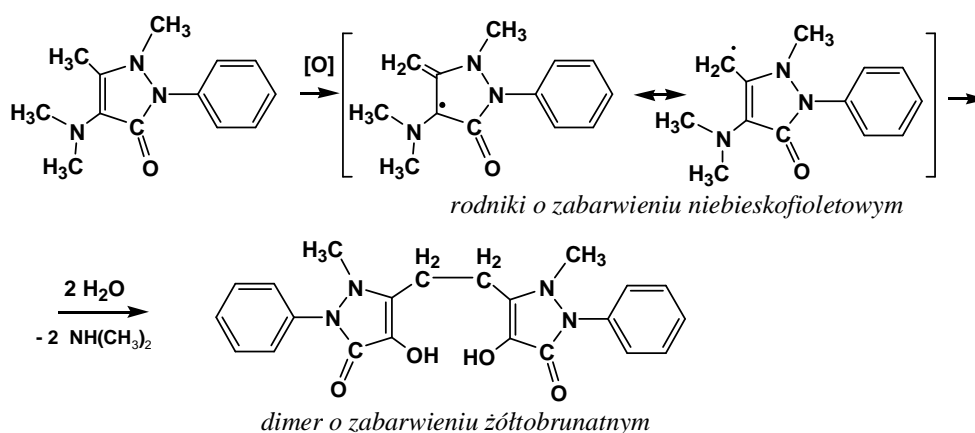
Wyodrębniony z masy leku aminofenazon należy poddać niżej podanym próbom tożsamościowym używając do nich substancji stałej lub jej wodnego roztworu (zależnie od informacji podanej w odpowiedniej procedurze).

Aminofenazon wykazuje właściwości redukujące już na zimno pod wpływem wielu, nawet łagodnych utleniaczy, np. $FeCl_3$, roztworu jodu, azotanu srebra. Początkowo powstają niebieskofioletowe rodniki, które po odłączeniu dimetyloaminy łączą się w dimer o barwie żółtobrunatnej.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% wodnego roztworu badanej substancji dodać kroplę roztworu $FeCl_3$. Roztwór zabarwia się na niebieskofioletowo. Po dodaniu 6 kropli 16% kwasu siarkowego zabarwienie przechodzi w fioletowoczerwone.



Rys. 23. Utlenianie aminofenazonu

- Reakcja z etanolemowym roztworem jodu

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% wodnego roztworu badanej substancji dodać 1 kroplę etanolowego roztworu jodu. Powstaje niebieskie zabarwienie.

- Reakcja z azotanem(V) srebra

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% roztworu badanej substancji dodać 5 kropli 2% roztworu AgNO_3 . Powstaje fioletowe zabarwienie, a po pewnym czasie czarny osad metalicznego srebra.

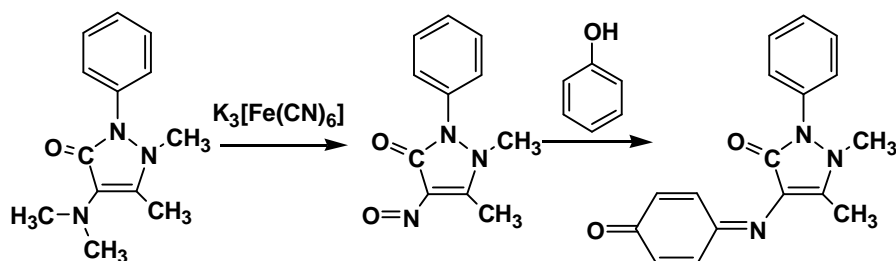
- Reakcja z heksacyjanożelazianem(III) potasu i chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% wodnego roztworu badanej substancji dodać 0,5 ml 5% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a następnie kroplę 1% roztworu FeCl_3 . Utworzony w wyniku utleniania aminofenazonu $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tworzy z jonami żelaza(III) ciemnoniebieski błękit pruski $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

- Reakcja Emersona

Aminofenazon, metamizol sodowy i izopiryryna w tzw. reakcji Emersona dają produkty o zabarwieniu czerwonym. Reakcja polega na utlenieniu tych pochodnych pirazolinonu za pomocą heksacyjanożelazianu(III) potasu, a następnie kondensacji utworzonego produktu utlenienia z fenolem.



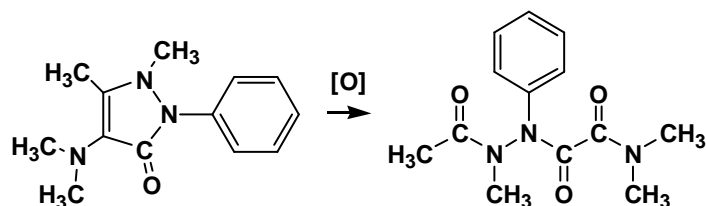
Rys. 24. Aminofenazon w reakcji Emersona

Wykonanie próby:

Do 3 ml 2% roztworu badanej substancji dodać 0,5 ml 5% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i 0,5 ml 2% roztworu fenolu. Mieszanina reagująca zabarwia się na czerwono.

- Reakcja z manganianem(VII) potasu

Silniejsze środki utleniające, np. manganian(VII) potasu, utleniają aminofenazon do 2-(*N'*-acetylo-*N'*-metylo-*N*-fenylo-hydrazyno)-*N,N*-dimetylo-2-okso-acetamidu.

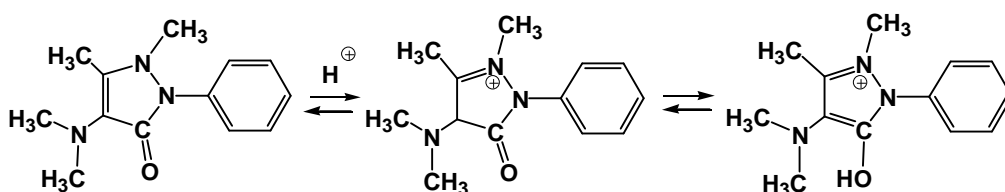


Rys. 25. Utlenianie się aminofenazonu pod wpływem silnych utleniaczy

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% wodnego roztworu badanej substancji dodawać kroplami 1% roztwór KMnO_4 w 0,25 M H_2SO_4 . W przypadku obecności aminofenazonu obserwuje się odbarwienie się fioletowego roztworu dodawanego utleniacza.

Atom azotu w położeniu 2 pierścienia pirazolinowego w pochodnych pirazolinonu-5 (w tym i aminofenazonu) wykazuje słaby charakter zasadowy. Może zatem tworzyć sole, występując w kationowych formach tautomerycznych.



Rys. 26. Właściwości kwasowo-zasadowe pochodnych pirazolinonu-5

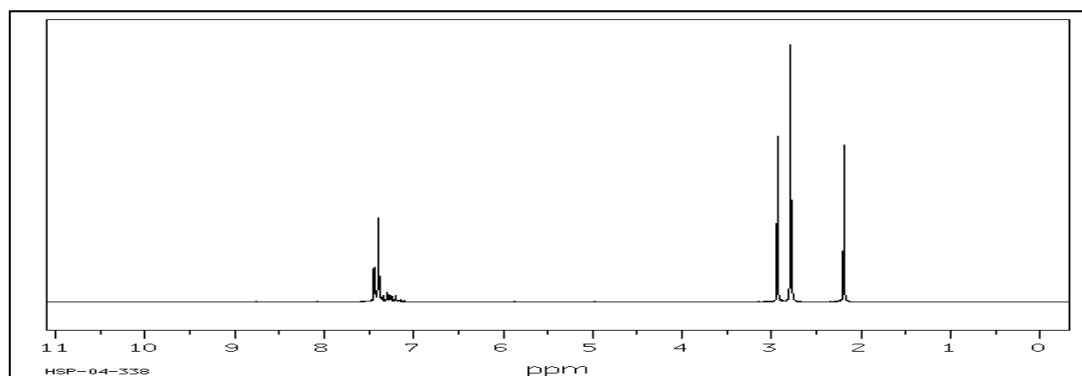
- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

Wykonanie próby:

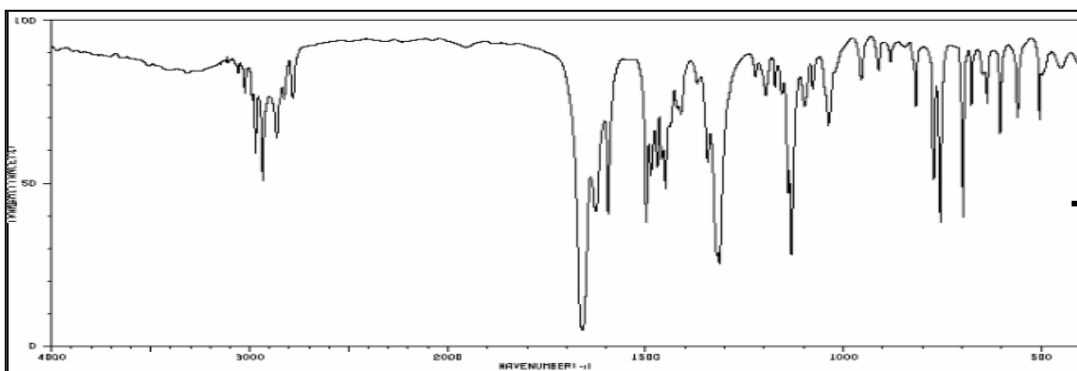
Do niewielkiej ilości badanej stałej substancji dodać kilka kropli odczynnika Dragendorffa. W przypadku obecności aminofenazonu obserwuje się pojawianie brązowopomarańczowego osadu.

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



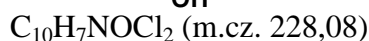
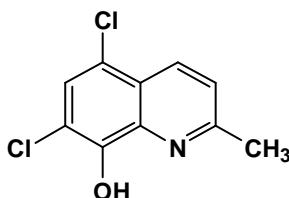
Rys. 27. Widmo ^1H NMR aminofenazonu (90 MHz, $c = 0.04 \text{ g} / 0.5 \text{ ml } \text{CDCl}_3$) [18]



Rys. 28. Widmo IR aminofenazonu (pastylka KBr) [18]

Chlorochinaldol

5,7-dichloro-2-metylo-8-chinolinol



Właściwości fizyczne

Krystaliczny, żółtobrunatny związek o dość charakterystycznym słodkawym zapachu i temp. topn. 109-113 °C. Substancja rozpuszcza się w chloroformie, acetonie, eterze etylowym, trudno rozpuszcza się w etanolu (95%), jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie.

Chemiczne metody identyfikacji

Wyodrębniony z masy leku chlorochinaldol należy poddać niżej podanym próbom tożsamościowym.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Reakcja jest charakterystyczna dla grupy fenolowej.

Wykonanie próby:

Okolo 5 mg badanej substancji rozpuścić w 5 etanolu (95%), dodać 1 kroplę 1% roztworu $FeCl_3$. Obserwuje się ciemnozielone zabarwienie od powstałego związku kompleksowego.

- Reakcja z siarczanem miedzi(II)

Wykonanie próby:

Okolo 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 2,5 ml etanolu (95%), dodać 0,1 ml roztworu siarczanu miedzi(II). Powstaje żółtobrunatny osad.

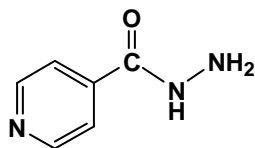
- Wykrywanie obecności chloru

Wykonanie próby:

Okolo 1 mg badanej substancji rozpuścić w kilku kroplach acetonu. Miedziany drucik, zanurzony uprzednio w tak otrzymanym roztworze, umieszczony w płomieniu palnika barwi go na kolor zielony.

Izoniazyd

Hydrazyd kwasu 4-pirydynokarboksylowego



C₅H₇N₃O (m.cz.137,14)

Właściwości fizyczne.

Biały, krystaliczny proszek o temp. topn. 170-173 °C, rozpuszczalny w wodzie, dość trudno w etanolu i chloroformie, praktycznie nierozpuszczalny w benzenie i eterze etylowym.

Chemiczne metody identyfikacji.

- Kondensacja z aldehydem benzoesowym

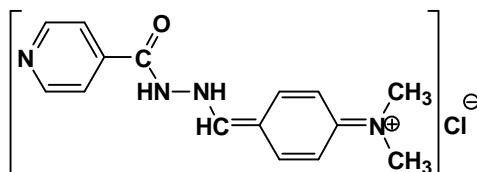
Wykonanie próby:

Do ok. 0,25 g badanej substancji dodać 0,25 ml świeżo przedestylowanego aldehydu benzoesowego, 2 ml etanolu (95%) i całość ogrzewać pod chłodniczką zwrotną na wrzącej łaźni wodnej przez ok. 15 min. Po ochłodzeniu wydzielony osad odsączyć, przemyć niewielką ilością etanolu, wysuszyć, po czym przekrystalizować z etanolu. Uzyskany produkt (*N*¹-izonikotynoilo-*N*²-benzylidenohydrazyna) powinien wykazywać temp. topn. 201-203 °C.

- Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

Wykonanie próby:

Okolo 0,01 g badanej substancji zadać 0,25 ml odczynnika Ehrlicha (roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10 % kwasie solnym) i całość zamieszać bagietką. Pojawia się żółte zabarwienie lub osad produktu kondensacji o strukturze:



- Reakcja z odczynnikiem Tollensa

Pod wpływem działania amoniakalnego roztworu azotanu srebra (odczynnik Tollensa) izoniazyd ulega utlenieniu do amidu kwasu 4-pirydynokarboksylowego. Obserwuje się szybkie wytrącanie czarnego osadu metalicznego srebra.

Wykonanie próby:

Okolo 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać 1 ml amoniakalnego roztworu azotanu srebra (odczynnik Tollensa) i ogrzewać całość na wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Powstaje czarny osad.

- Reakcja z odczynnikiem Fehlinga

Wykonanie próby:

Okolo 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać 1 ml odczynnika Fehlinga i ogrzewać całość na wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Powstaje ceglastoczerwony osad tlenku miedzi(I).

- Reakcja z octanem miedzi(II)

Próba polega na wykrywaniu kwasu izonikotynowego – produktu utlenienia izoniazydu.

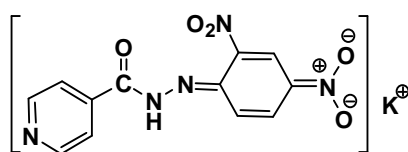
Wykonanie próby:

Do około 0,1 g badanej substancji rozpuszczonej w 0,5 ml wody dodać kroplami wody bromowej do utrzymywania się trwałego jasnosłomkowego zabarwienia. Całość ogrzać do odbarwienia, dodać 0,5 g octanu sodu (w celu przeprowadzenia powstałego kwasu izonikotynowego w postać soli), przesączyć, a do przesączu dodać 3 ml 10% roztworu octanu miedzi(II). Po kilku minutach obserwuje się wydzielenie niebieskiego osadu izonikotynianu miedzi(II).

- Reakcja z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem

Wykonanie próby:

Około 10 mg badanej substancji rozpuścić w 4 ml etanolu i dodać 1 ml etanolowego roztworu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu, zamieszać, po czym dodać kroplami 1 ml ok. 5% etanolowego roztworu KOH. Obserwuje się powstawanie produktu o zabarwieniu brunatnoczerwonym o wzorze:



- Ogrzewanie z bezwodnym węglanem sodu

Wykonanie próby:

Izoniazid ogrzewany z nadmiarem bezwodnego węglanu sodowego ulega rozkładowi. Wyczuwa się zapach pirydyny.

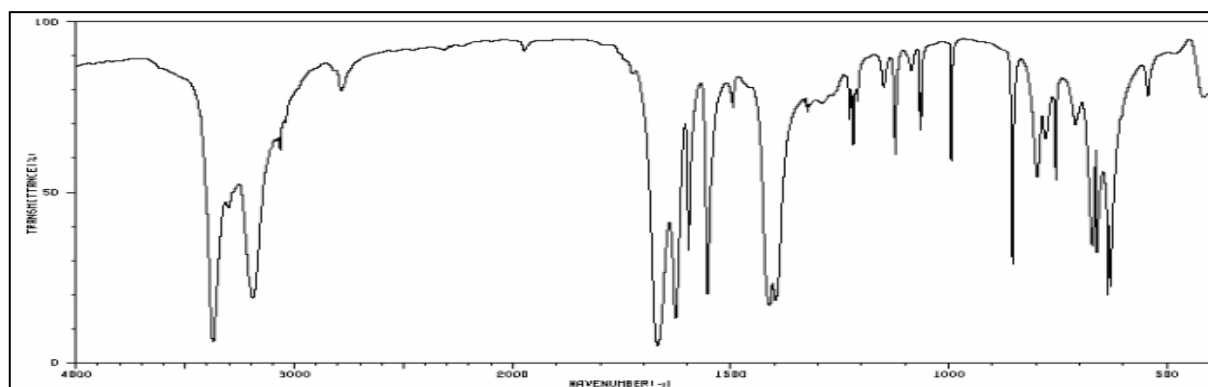
- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa.

Wykonanie próby:

Do około 0,01 g badanej substancji rozpuszczonej w 0,5 ml wody dodać kilka kropli odczynnika Dragendorffa. Wydziela się pomarańczowy osad.

Analiza spektralna.

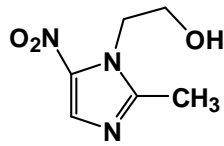
Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z dostępnymi widmami wzorcowymi.



Rys. 29. Widmo IR izoniazydu (KBr) [18]

Metronidazol

2-(2-Metylo-5-nitro-imidazol-1-ylo)-etanol



C₆H₉N₃O₃ (m.cz.171,15)

Właściwości fizyczne.

Biały lub jasno żółty krystaliczny proszek o słabym, charakterystycznym zapachu, trudno rozpuszczalny w wodzie i w etanolu. Współczynnik absorpcji $E_{1cm}^{1\%} = 380$ ($\lambda = 276$ nm) w 0,1 N kwasie solnym. Temp. topn. 159-163°C.

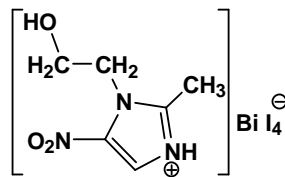
Chemiczne metody identyfikacji.

Rozpuścić ok. 0,25 g badanej substancji w 10 ml 0,1 N H₂SO₄, otrzymując roztwór (A), który należy przeznaczyć do niżej zaproponowanych prób na badanie tożsamości.

- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

Wykonanie próby:

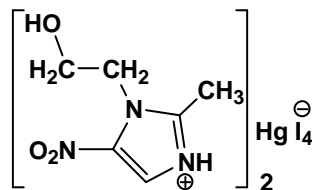
Do około 1 ml roztworu (A) dodać 2 ml odczynnika Dragendorffa. Powstaje pomarańczowy osad soli z metronidazolem o składzie:



- Reakcja z roztworem jodortęcianu (II) potasowego (odczynnikiem Mayera)

Wykonanie próby:

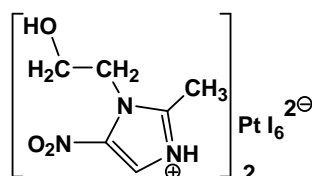
Do około 1 ml roztworu (A) dodać 2 ml odczynnika Mayera. Wytrąca się bezpostaciowy, żółtobiały osad soli z metronidazolem o składzie:



- Reakcja z jodoplatynianem (IV) potasowym

Wykonanie próby:

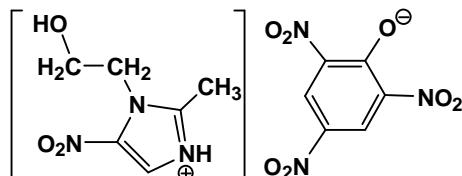
Do około 1 ml roztworu (A) dodać 2 ml odczynnika jodoplatynianowego. Wytrąca się osad szarofioletowej soli z metronidazolem o składzie:



- Reakcja z kwasem pikrynowym

Wykonanie próby:

Do 5 ml roztworu (A) dodać 10 ml nasyconego wodnego roztworu kwasu pikrynowego, mieszaninę ogrzać prawie do wrzenia i pozostawić do krystalizacji na 12 godzin. Powstały osad odsączyć, przemyć zimną wodą (3 x 5 ml), po czym dokładnie wysuszyć. Zmierzyć temp. topn. pikrynianu metronidazolu, która powinna wynosić 150-153 °C.

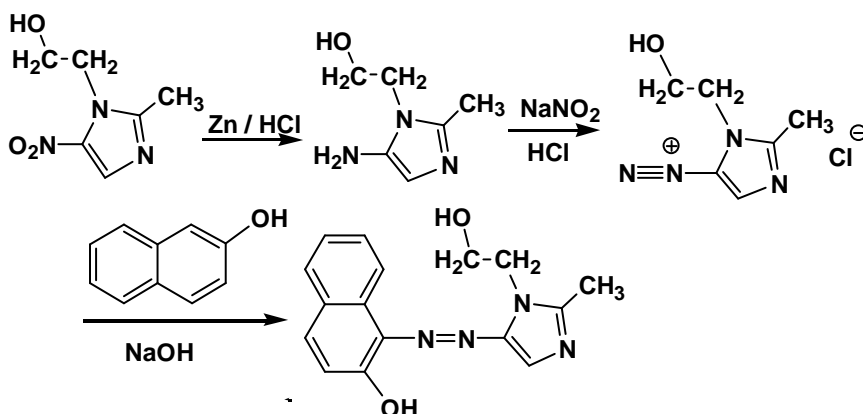


- Potwierdzenie obecności grupy nitrowej

W próbie tej grupa nitrowa metronidazolu zostaje zredukowana do grupy aminowej, dając 2-(5-amino-2-metylo-imidazol-1-yl)-etanol. Następnie powstały związek, pod wpływem kwasu azotowego(III) przekształca się w sól diazoniową, która w zakresie pH 5-9 tworzy z 2-naftolem brunatnofioletowy barwnik diazowy.

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać 0,5 ml 25% kwasu solnego, 0,02 g pyłu cynkowego i ogrzewać na łaźni wodnej przez 5 minut. Mieszaninę ochłodzić na łaźni lodowej, dodać 0,5 ml zimnego 0,1 M roztworu NaNO₂, silnie zamieszać, po czym dodać kroplami zimnego 2 ml 1% roztworu 2-naftolu w 0,1 N roztworze NaOH. Wytrąca się brunatnofioletowy osad.



Rys. 30. Wykrywanie obecności grupy nitrowej w strukturze metronidazolu

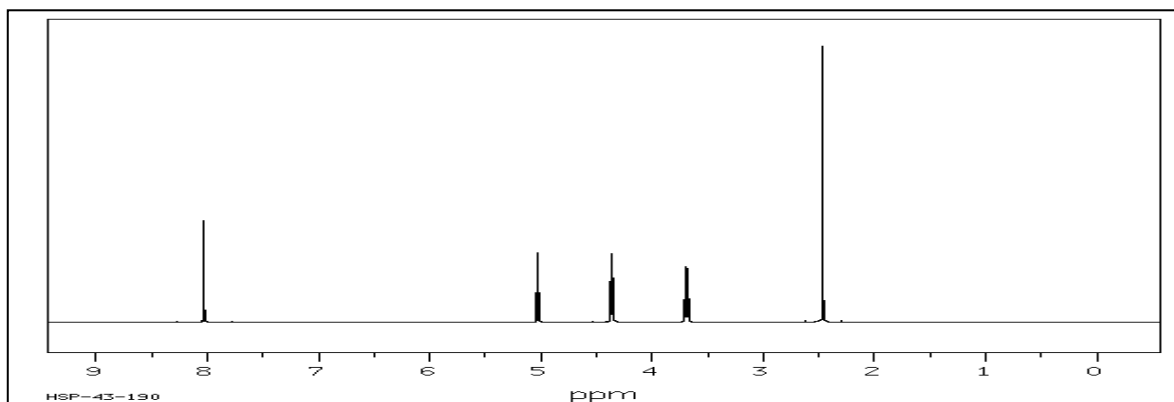
- Wyodrębnienie czystego metronidazolu

Wykonanie próby:

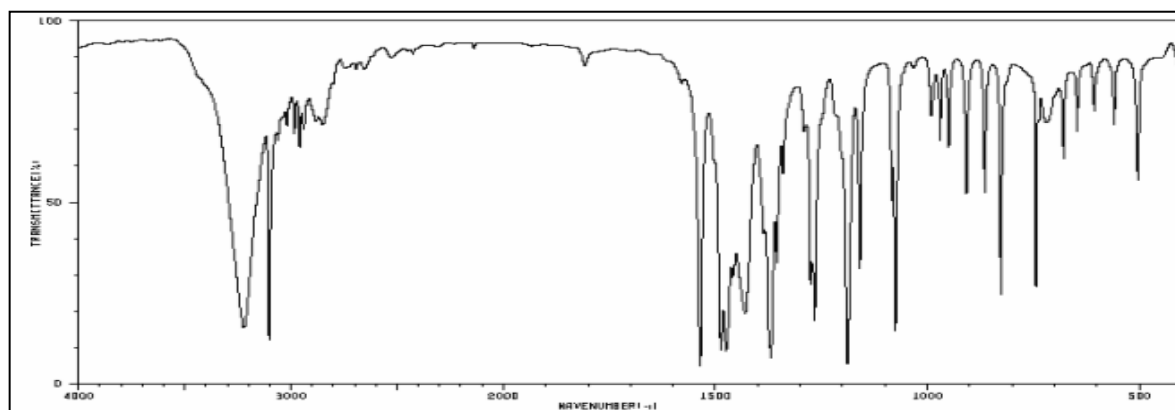
Surowy metronidazol, wyodrębniony wcześniej z masy tabletkowej przekrystalizować z gorącej wody. Osad odsączyć, przemyć zimną wodą, dokładnie wysuszyć i zbadać jego temp. topnienia. Temp. topn. metronidazolu wynosi 159-163 °C.

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



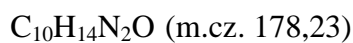
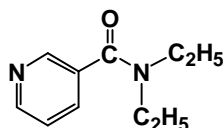
Rys. 31. Widmo ^1H NMR metronidazolu (400 MHz, $c = 0.04 \text{ g} / 0.5 \text{ ml DMSO-d}_6$) [18]



Rys. 32. Widmo IR metronidazolu (pastylka KBr) [18]

Niketamid

N,N-Dietyloamid kwasu pirydyno-3-karboksyowego



Właściwości fizyczne.

Bezbarwna lub jasnożółta oleista ciecz, silnie załamująca światło, o słabym swoistym zapachu. Może występować w postaci krystalicznej o temp. topn. 22-24 °C. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, etanolu, chloroformie i eterze etylowym. W preparatach farmaceutycznych często występuje w postaci soli, np. mleczanu.

Chemiczne metody identyfikacji.

- *Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa*

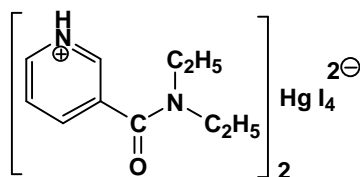
Wykonanie próby:

Do około 1 ml wodnego roztworu badanej substancji dodać 2 ml wody i kilka kropli odczynnika Dragendorffa. Powstaje żółtobrazowy osad soli z niketamidem.

- Reakcja z odczynnikiem Mayera (jodortęcianem potasowym)

Wykonanie próby:

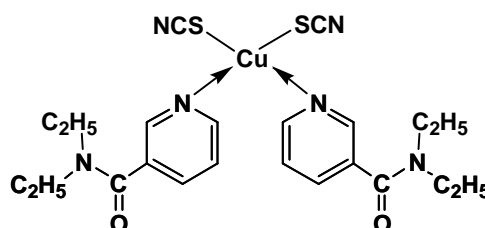
Do około 1 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać 2 ml wody i kilka kropli odczynnika Mayera. Wytrąca się biały osad soli z niktamidem o składzie:



- Reakcja z CuSO_4 i NH_4SCN

Wykonanie próby:

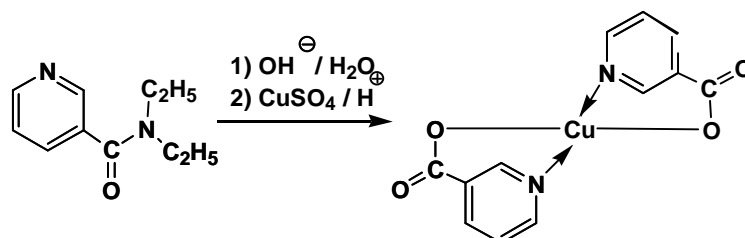
Do 1 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać kroplę 10 % kwasu solnego, kroplę 1 % roztworu CuSO_4 oraz dwie krople 0,1 N roztworu NH_4SCN . Wytrąca się krystaliczny, zielony osad w kształcie rozet (badanie mikroskopowe).



- Reakcja hydrolizy i tworzenia kompleksu miedziowego

Wykonanie próby:

Do około 1 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać 5 ml 10 % NaOH i ogrzewać; wydziela się charakterystyczny zapach dietyloaminy. Zawartość próbki ochłodzić, zobojętnić za pomocą 16% H_2SO_4 , dodać 2 ml 2% roztworu CuSO_4 . Powstaje niebieski osad niktynianu miedziowego.



Rys. 33. Synteza kompleksu miedziowego niktamidu

- Reakcja jodoformowa

Reakcja potwierdza obecność kwasu mlekowego, który zwykle dodawany jest do preparatów leczniczych zawierających niktamid:



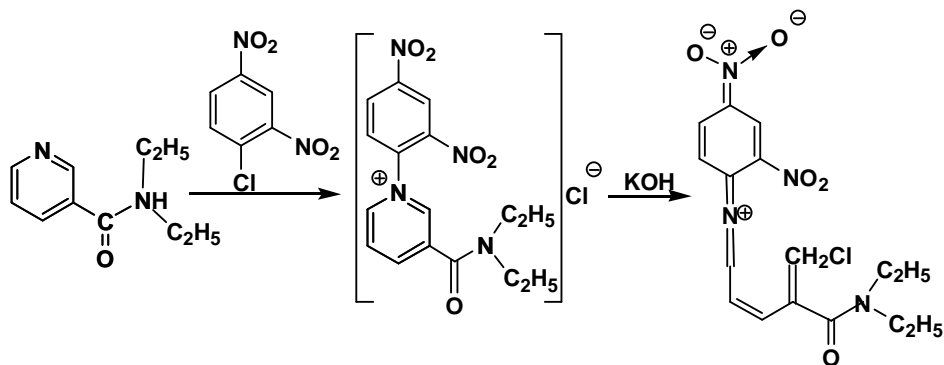
Wykonanie próby:

Do 0,3 ml roztworu wodnego badanej substancji dodać 3 ml 50 % roztworu KOH , 3 ml 0,1N roztworu jodu w 2% roztworze KI i ogrzać. Wydziela się zapach jodoformu, a po ochłodzeniu wytrąca się żółty osad.

- Reakcja z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem

Wykonanie próby:

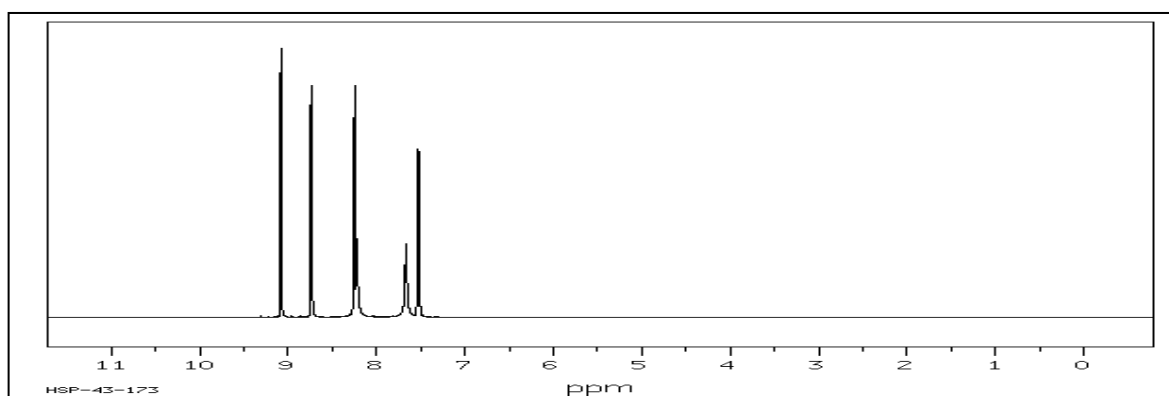
Do około 0,1 g badanej substancji dodać podwójną ilość 2,4-dinitrochlorobenzenu, łagodnie stopić (świecący płomień palnika), ochłodzić i dodać 3 ml 0,1 N etanolowego roztworu KOH . Powstaje produkt o czerwonym zabarwieniu.



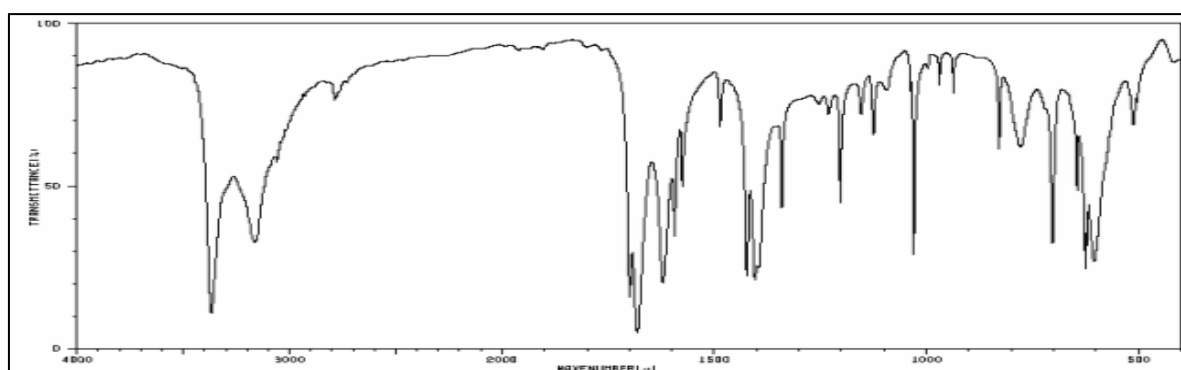
Rys. 34. Synteza barwnej pochodnej nikitamidu poprzez „dobudowanie” znitrowanego układu aromatycznego i przekształcenie w formę nitrową „aci”

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



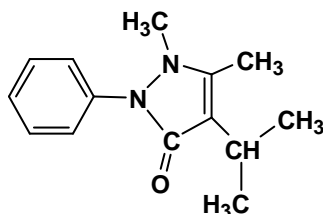
Rys. 35. Widmo ^1H NMR nikitamidu (400 MHz, $c = 0.05 \text{ g} / 0.5 \text{ ml DMSO-d}_6$) [18]



Rys. 36. Widmo IR nikitamidu (pastylka KBr) [18]

Propyfenazon

1-fenyl-4-izopropyl-2,3-dimetylo-3-pirazolin-5-on



C₁₄H₁₄N₂O (m.cz. 230,14)

Właściwości fizyczne

Bezbarwne, bezzapachowe kryształy o lekko gorzkim smaku, temp. topn. 102-103 °C, rozpuszczalne w etanolu (95%), eterze etylowym, słabo w wodzie.

Chemiczne metody identyfikacji

Wyodrębniony z masy leku propyfenazon należy poddać niżej podanym próbom tożsamościowym.

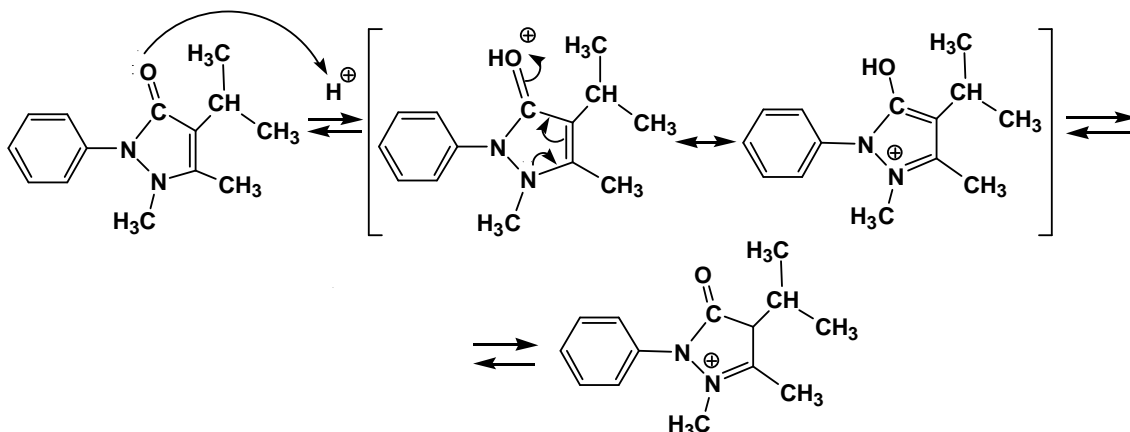
- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Do 1 ml ok. 2 % wodnego roztworu badanej substancji dodać kroplę 5% roztworu FeCl₃. Roztwór przyjmuje kolor brązowo czerwony od powstającego związku kompleksowego. Po dodaniu 1 ml 10% kwasu solnego zabarwienie roztworu zmienia się na żółte.

- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

W środowisku kwaśnym sprotonowana forma pierścienia pirazolinonu-5 w propyfenazonie jest stabilizowana efektem rezonansowym, a nadto występuje w dwóch formach tautomerycznych. Kationowa struktura umożliwia tworzenie soli z popularnymi odczynnikami strącającymi organiczne zasady azotowe (np. z odczynnikiem Dragendorffa lub kwasem pikrynowym).



Rys. 37. Właściwości kwasowo-zasadowe propyfenazonu

Wykonanie próby:

Do niewielkiej ilości badanej stałej substancji dodać kilka kropli odczynnika Dragendorffa. W przypadku obecności propyfenazonu obserwuje się pojawianie brązowopomarańczowego osadu.

- Reakcja z manganianem(VII) potasu

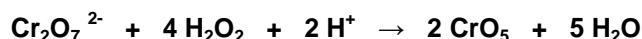
Silniejsze środki utleniające, np. manganian(VII) potasu, utleniają propyfenazon. Reakcja przebiega podobnie, jak w przypadku aminofenazonu, tj. poprzez rozszczepienie wiązania podwójnego w pierścieniu heterocyklicznym.

Wykonanie próby:

Do 3 ml ok. 2% wodnego roztworu badanej substancji dodawać kroplami 1% roztwór KMnO_4 w 0,25 M H_2SO_4 . W przypadku obecności propyfenazonu obserwuje się odbarwienie się fioletowego roztworu dodawanego utleniacza.

- Reakcja z pięciotlenkiem chromu

Propyfenazon, jako jedyny z pochodnych pirazolinonu, jakie znalazły zastosowanie w lecznictwie, tworzy fioletowo zabarwiony kompleks z pięciotlenkiem chromu(V). Odstępstwo to, w stosunku do np. aminofenazonu, wynika z braku podstawnika aminowego w pozycji 4 jego pierścienia heterocyklicznego.



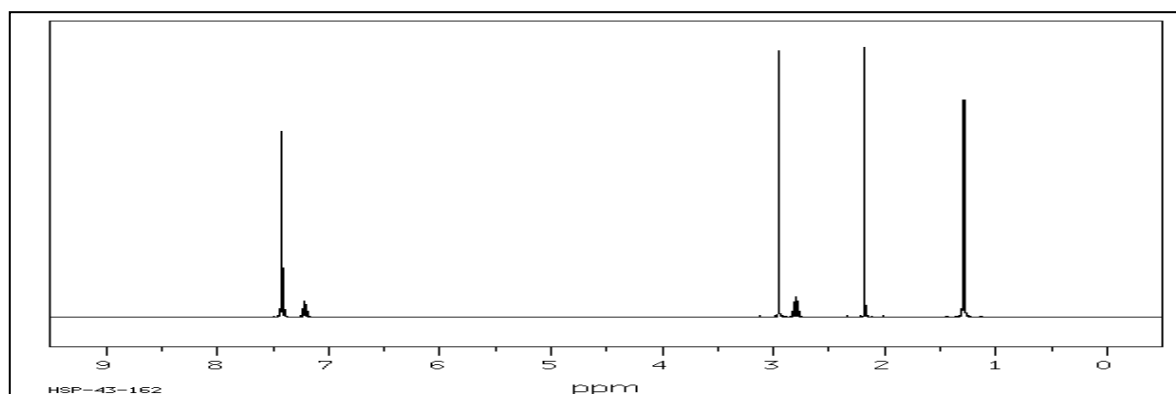
Propyfenazon tworzy kompleks z CrO_5 w stosunku (3:1).

Wykonanie próby:

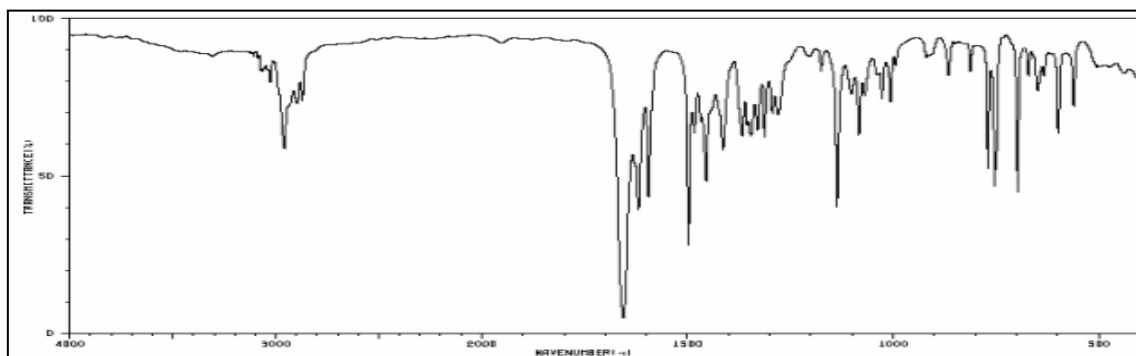
Do 5 ml ok. 0,2% wodnego roztworu badanej substancji dodać 5 kropli 15% roztworu H_2SO_4 , 1 ml 3% roztworu H_2O_2 , 0,5 ml 0,02 M roztworu chromianu(VI) potasu oraz 1 ml chloroformu. Po wytrząśnięciu i rozdzieleniu warstw obserwuje się fioletowe zabarwienie fazy organicznej.

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



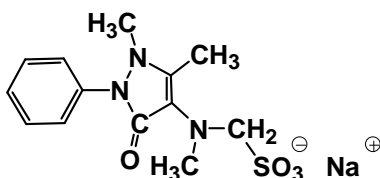
Rys. 38. Widmo ^1H NMR propyfenazonu(400 MHz, c =0.04 g / 0.5 ml CDCl_3) [18]



Rys. 39. Widmo IR propyfenazonu (pastyłka KBr) [18]

Metamizol sodowy (Pyralgina)

N-(1-fenyl-2,3-dimetylo-5-okso-3-pirazolin-4-ylo)-*N*-metyloaminometanosulfonian sodowy

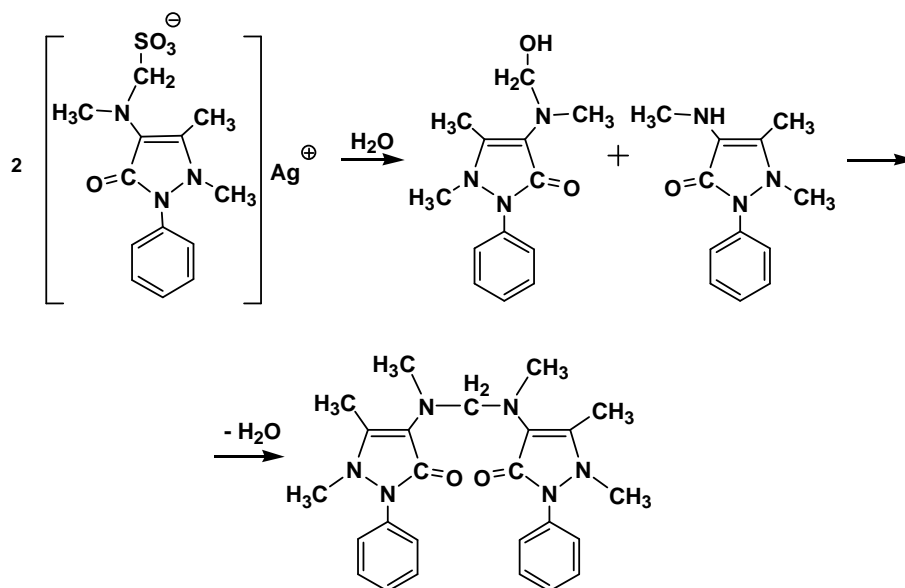


Właściwości fizyczne.

Biały lub prawie biały, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczalny w wodzie, metanolu, praktycznie nierozpuszczalny w eterze etylowym, acetonie, benzenie i chloroformie.

Chemiczne metody identyfikacji.

- Reakcje utleniania



złoty produkt kondensacji

Rys. 40. Utlenianie pyralginy za pomocą azotan(V) srebra

○ Reakcja z azotanem srebra

Wykonanie próby:

Do 2 ml ok. 2% roztworu badanej substancji dodać 5 kropli 2% roztworu AgNO_3 . W pierwszym etapie tworzy się biały osad soli srebra, a następnie roztwór mętnieje i przybiera zabarwienie niebieskie, przechodzące w zielone, a na końcu powstaje żółto zabarwiony produkt kondensacji.

○ Reakcja z azotanem(III) sodu

Wykonanie próby:

2 ml ok. 2% roztworu badanej substancji zakwasić za pomocą 10% kwasu solnego do pH ok. 1, następnie dodać 1 ml 5% roztworu NaNO_2 . Powstaje natychmiast niebieskie zabarwienie, przechodzące w żółte.

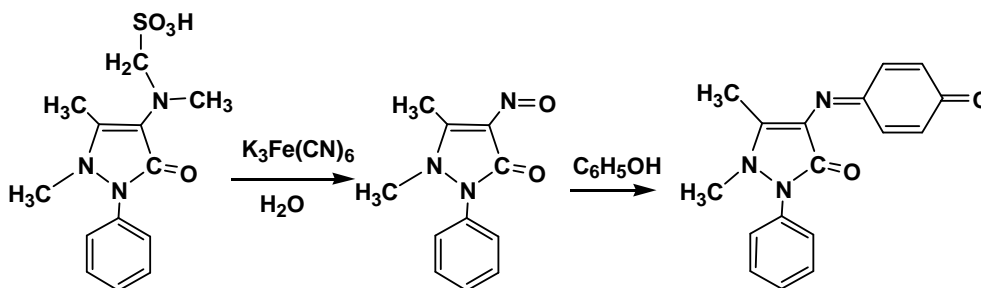
○ Reakcja z heksacyjanożelazianem(III) potasu i chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Do 3 ml 2% roztworu badanej substancji dodać 0,5 ml 5% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oraz kroplę 1% roztworu FeCl_3 . Utworzony w wyniku utleniania metamizolu sodowego $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tworzy z jonami żelaza(III) ciemnoniebieski błękit pruski $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$.

○ Reakcja Emersona (z heksacyjanożelazianem(III) potasu i fenolem)

Pochodne pirazolinonu, w tym m.in. aminofenazon, pyralgina (metamizol sodowy) czy izopiryna, w reakcji Emersona dają produkty o zabarwieniu czerwonym. W pierwszym etapie, pod wpływem heksacyjanożelazianu(III) potasu zachodzi utlenianie grupy dialkiloaminowej (obecnej przy pierścieniu pirazolinonu) do grupy nitrozowej. Utworzony produkt utleniania w reakcji z fenolem prowadzi do czerwonego produktu kondensacji.



Rys. 41. Reakcja Emersona

Wykonanie próby:

Do 3 ml 2% roztworu badanej substancji dodać 0,5 ml 5% roztworu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oraz 0,5 ml 2% roztworu fenolu. Roztwór zabarwia się na czerwono.

• Reakcje strąceniowe (charakterystyczne dla alkaloidów)

Pyralgina wykazuje właściwości kwasowo-zasadowe analogicznie, jak propyfenazon (patrz Rys. 37), co umożliwia tworzenie trudnorozpuszczalnych soli o znaczeniu diagnostycznym. W wyniku reakcji strąceniowej z jodobizmutanem(III) potasu (odczynnik Dragendorffa) tworzy się osad o zabarwieniu pomarańczowym, z kwasem pikrynowym – osad żółty, z jodortęcianem(II) potasu (odczynnik Mayera) - osad szarobiały.

○ Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

Wykonanie próby:

Do około 1 ml roztworu dodać 2 ml wody i kilka kropli odczynnika Dragendorffa. Powstaje pomarańczowy osad soli z z pyralginą.

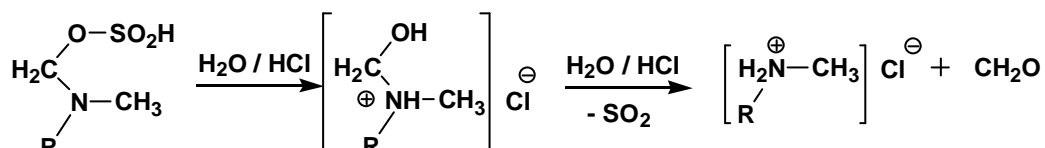
○ Reakcja z odczynnikiem Mayera

Wykonanie próby:

Do około 1 ml roztworu dodać 2 ml wody i kilka kropli odczynnika Mayera. Wytrąca się szarobiały osad soli z pyralginą.

• Reakcja hydrolizy

Obecne w badanym związku ugrupowanie sulfonilometylenoaminowe ($>N-CH_2-SO_3H$) łatwo ulega hydrolizie pod wpływem ogrzewania w wodnym roztworze kwasu solnego. Reakcja biegnie z wydzielaniem dwutlenku siarki oraz formaldehydu, którego obecność wykrywa się odczynnikiem Schiffa.



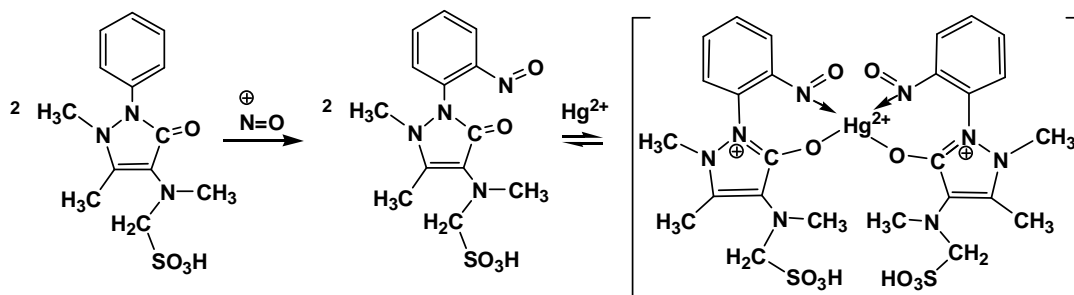
Rys. 42. Przebieg hydrolizy kwasowej pyralginy

Wykonanie próby:

Okolo 0,1 g badanej substancji rozpuścić w 2,5 ml 10% kwasu solnego i ogrzewać do wrzenia. Wydziela się dwutlenek siarki, a następnie formaldehyd. Do 0,5 ml ciepłego roztworu dodać 1 ml odczynnika Schiffa. Mieszanka przyjmuje barwę fioletowopurpurową.

• Reakcja z odczynnikiem Millona

Odczynnik Millona zawiera azotan(V) i azotan(III) rtęci(II) oraz kwas azotowy(V). W obecności jonów Hg^{2+} zachodzi nitrozowanie pierścienia aromatycznego pyralginy w pozycji 2, a powstały produkt tworzy z jonami Hg^{2+} w środowisku kwaśnym związek kompleksowy o zabarwieniu czerwonym.



Rys. 43. Przebieg reakcji pyralginy z odczynnikiem Millona

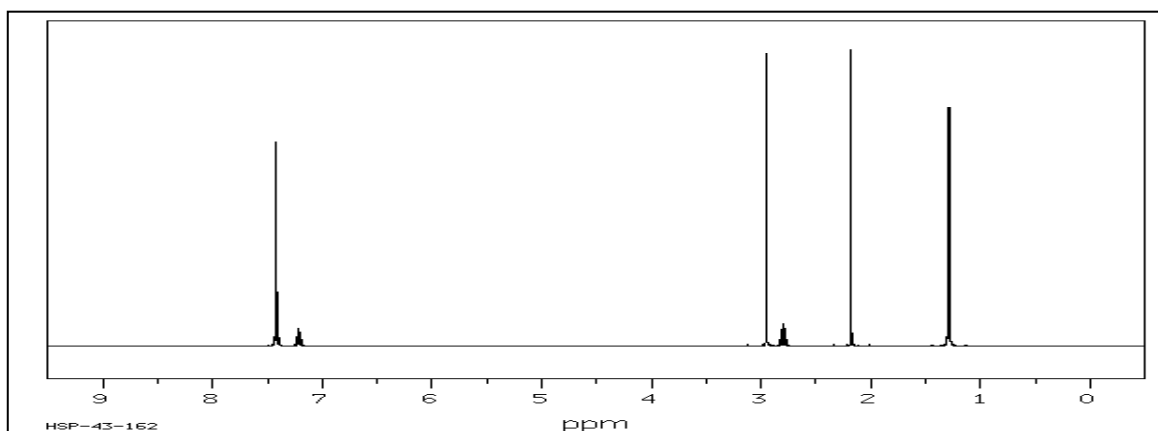
Wykonanie próby:

Okolo 1 ml wodnego roztworu badanej substancji ogrzać do wrzenia, po czym dodać 0,5 ml odczynnika Millona. Mieszanka przyjmuje czerwone zabarwienie.

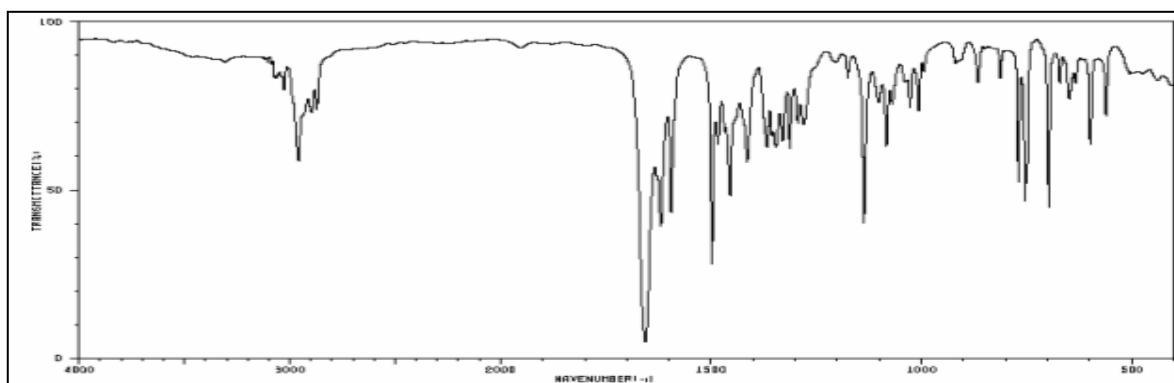
• Związek wykazuje reakcje na obecność siarki i jonu sodowego.

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



Rys. 44. Widmo ^1H NMR pyralginy (400 MHz, $c = 0.04 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]

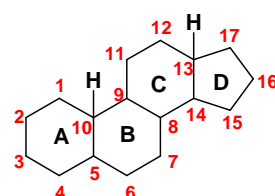


Rys. 45. Widmo IR pyralginy (KBr) [18]

2.3. Związki o budowie steroidowej

Związki steroidowe, są pochodnymi cyklopentanoperhydrofenantrenu, zawierającymi w swych strukturach tzw. układ steranu. Steran jest 17-węglowym węglowodorem alicyklicznym. Składa się z czterech skondensowanych pierścieni. Trzy z nich (6-cio członowe) oznaczają się zwyczajowo literami A, B i C, natomiast czwarty (5-cio członowy) – literą D.

Poszczególne steroidy odróżniają się od siebie stopniem nasycenia układu steranu oraz ilością i rodzajem podstawników.



Rys. 46. Układ steranu

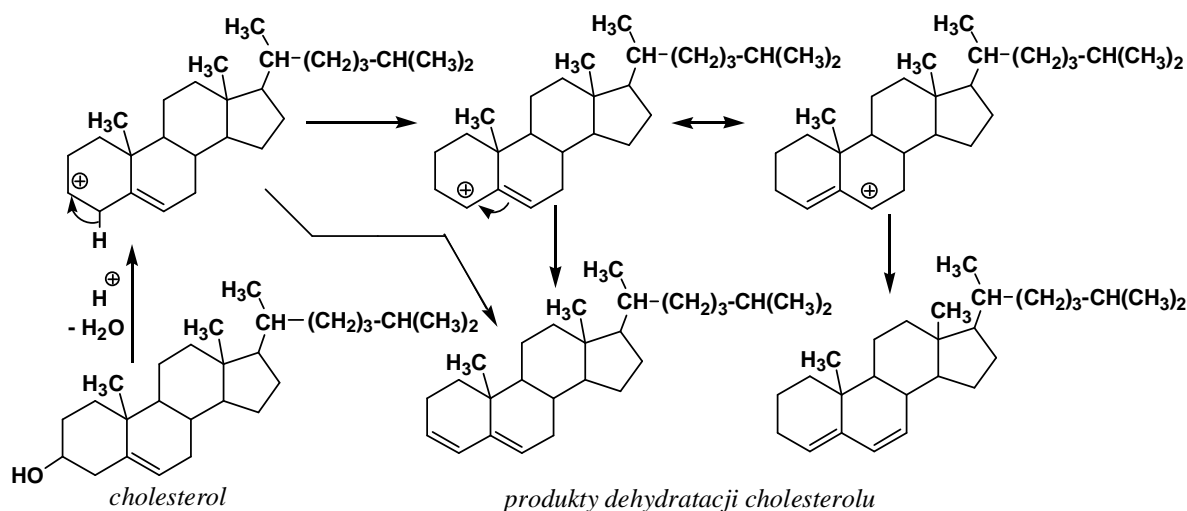
2.3.1. Reakcje charakterystyczne steroidów

W analizie jakościowej związków steroidowych stosuje się przede wszystkim testy barwne, których przebieg wyróżnia się specyficzną dla danego związku kolejnością zmiany barwy i/lub jej natężenia.

Większości reakcji barwnych towarzyszy obecność stężonego mocnego kwasu, np. kwasu siarkowego(VI), czy azotowego(V). Związki steroidowe reagują z kwasem mineralnym dzięki obecności wiązań nienasyconych w układzie steranu, a także grup hydroksylowych w pozycjach C-3, C-11, C-14 i C-17. Każdorazowo, w pierwszym stadium reakcji kwas umożliwia odszczepienie wody po sprotonowaniu grupy hydroksylowej w pochodnej sterolu. Tworzący się pierwotnie karbokation w drugim etapie może:

- uczestniczyć w odszczepianiu protonu z sąsiedniej pozycji β (reakcje typu E1),
- ulegać reakcjom z obecnymi w środowisku reakcji nukleofilami,
- ulegać przegrupowaniom (na drodze migracji anionów wodorkowych względnie grup alkilowych), a następnie prowadzić do produktów reakcji wymienionych w dwóch pierwszych punktach.

Poniższy schemat przykładowo przedstawia mechanizm powstawania najbardziej prawdopodobnych produktów reakcji cholesterolu ze stężonym kwasem siarkowym.



Rys. 47. Mechanizm prawdopodobnych przemian strukturalnych cholesterolu pod wpływem działania stężonego kwasu siarkowego(VI)

W przypadkach pochodnych steroli przegrupowania karbokationów są przemianami dość powszechnymi, często mającymi charakter kaskadowy, co w rezultacie skutkuje jednoczesnym powstawaniem szeregu produktów o zróżnicowanych własnościach chromoforowych. W większości przypadków, przy przeprowadzaniu testów barwnych steroli rzeczywiście

obserwuje się pojawienie się na początku określonej barwy pierwotnej mieszaniny reagującej, a następnie jej transformację, aż do ustalenia się określonej barwy końcowej.

Przykładowo, w wyniku tzw. próby Salkowskiego chloroformowy roztwór cholesterolu zabarwia się początkowo na kolor krwistoczerwony, po pewnym czasie staje się ciemnopurpurowy, a warstwa kwasu siarkowego wykazuje zieloną fluorescencję.

W wyniku reakcji z samym stężonym kwasem siarkowym tworzą się barwne produkty dehydratacji, które w niektórych przypadkach wykazują intensywną fluorescencję w świetle widzialnym lub UV. Po rozcieńczeniu mieszaniny powstałych produktów wodą mogą mieć miejsce kolejne przemiany, związane tym razem z katalizowaną kwasowo addycją wody do wiązań podwójnych – zarówno pierwotnych, jak i nowopowstałych. W rezultacie, mieszanina często zmienia zabarwienie, bądź fluorescencję.

Produkty reakcji steroli z kwasem p-toluenosulfonowym charakteryzują się żółtym albo czerwonomarańczowym zabarwieniem oraz fluorescencją w świetle UV.

Reakcja pochodnych steroli z fenolami w środowisku stężonego kwasu siarkowego prowadzi do produktów, których barwa zależy od rodzaju sterolu oraz stopnia rozcieńczenia mieszaniny reagującej wodą. Przykładowo, w przypadku octanu dezoksykortonu pomarańczowoczerwone zabarwienie produktu kondensacji z 2-naftolem zmienia się po oziębieniu i rozcieńczeniu wodą na niebieskofioletowe, a octan kortyzonu daje produkt barwy pomarańczowobrazowej, zmieniającej się po oziębieniu i rozcieńczeniu wodą na pomarańczową. Ostateczny wynik tej próby analitycznej jest przede wszystkim rezultatem kolejno następujących po sobie reakcji: kwasowo katalizowanej dehydratacji z wytworzeniem przejściowych karbokationów (a tym samym elektrofilu), substytucji elektrofilowej karbokationów do pierścienia aromatycznego fenolu i na końcu addycji wody do istniejących i/lub nowopowstałych wiązań podwójnych węgiel-węgiel.

W reakcji Liebermanna–Burcharda (reakcja z bezwodnikiem octowym w obecności stęż. kwasu siarkowego) w przypadku większości steroli obserwuje się z upływem czasu charakterystyczne przechodzenie barw jednych w inne, co i tu świadczy o złożoności procesu (reakcje następcze wynikające z przegrupowań karbokationów). Przykładowo, w obecności cholesterolu występuje najpierw zabarwienie różowoczerwone, które poprzez błękitne przechodzi w zielone.

Sterole zawierające grupy hydroksylowe w położeniach enolowych reagują z hydrazynami, dając po zakwaszeniu żółto zabarwione hydrazony.

Pochodne steroli, posiadające w podstawniku przy pozycji C-17 ugrupowania β -ketonowe tworzą pochodne krystaliczne z hydroksyloaminą, semikarbazydem,

tiosemikarbazydem oraz 2,4-dinitrofenylohydrazyną o charakterystycznych temperaturach topnienia.

Z hydroksyloaminą reagują także estry steroli (np. octany). Produktami reakcji są kwasy hydroksamowe, które z solami żelaza(III) dają czerwono-fioletowe związki kompleksowe.

W przypadku obecności w strukturach badanych związków grup fenolowych lub enolizujących ketonowych reakcje z roztworami soli żelaza(III) prowadzą do charakterystycznie zabarwionych połączeń kompleksowych.

W reakcji steroli z nadtlakiem benzoilu ulegają epoksydacji wiązania podwójne. Powstałe połączenia epoksydowe poddane następnie działaniu stężonego kwasu siarkowego dają stopniowo zróżnicowane pod względem barwy produkty otwarcia pierścieni oksiranowych (np. cholesterol: zielone → błękitne, ergosterol: żółte → bezbarwne).

Kwasowo katalizowane kondensacje pochodnych steroli z aldehydami pozbawionymi tzw. protonów α (np. z furfurałem czy formaldehydem) charakteryzują się barwnym przebiegiem. Reakcja może zachodzić w obrębie pierścienia aromatycznego pochodnej sterolu (o ile jest obecny), względnie angażować układ enolowy. Tworzące się produkty kondensacji odznaczają się często kolorem specyficznym dla połączenia z danym steroidem, co ułatwia jego identyfikację.

Generalnie, wszelkie reakcje analityczne, których przebieg wyróżnia się specyficzną zmianą barw lub fluorescencją mogą stanowić cenną podstawę przy projektowaniu prostych testów o charakterze diagnostycznym.

2.3.2. Przygotowanie leków steroidowych do analiz

Do testów należy przygotować taką ilość leku, która zawiera ok. 50 mg badanego steroidu. Leki tabletkowane należy dokładnie sproszkować w małym moździerzu, przenieść do niewielkiej kolbki stożkowej, zadać 5 ml mieszaniny chloroform – metanol (9:1, v/v), dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie, po czym tak uzyskaną zawiesinę przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Przesącz należy zebrać bezpośrednio do kolbki okrągłodennej poj. 50 ml. Pozostały na sączku osad należy dodatkowo 4-krotnie przemyć za pomocą w/wym. mieszaniny rozpuszczalników (4 x ok. 5 ml) i zebrać ekstrakty. Wszystkie połączone przesącze należy odparować do sucha na wyparce rotacyjnej, a uzyskaną w ten sposób suchą pozostałość przeznaczyć do badań analitycznych.

Leki w postaci maści należy mieszać z eterem naftowym, silnie zamieszać (na mieszadle magnetycznym lub poprzez wytrząsanie) i płyn zdekantować. Pozostałość przemyć kilkakrotnie zbliżonymi do pierwotnej objętościami eteru naftowego, wyciągi eterowe

każdorazowo odrzucając. Przemyty osad wysuszyć na wyparce obrotowej, rozpuścić w mieszaninie chloroform – metanol (9:1, v/v) i w razie potrzeby przesączyć, usuwając nierozpuszczalne zanieczyszczenia. Przesącz podzielić na kilka porcji (zależnie od ilości zaplanowanych do przeprowadzenia testów), które należy odparować do sucha (np. strumieniem azotu). Otrzymany osad poddać testom analitycznym.

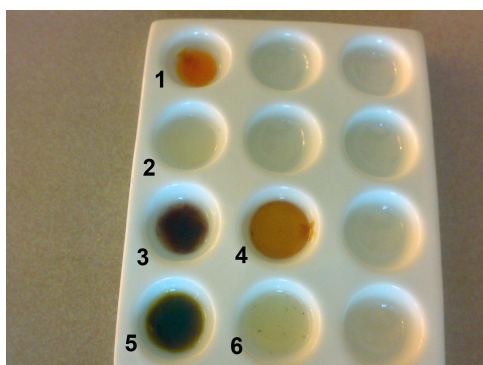
Uwaga. W przypadkach, gdy dysponuje się niewielką ilością próbki, wskazanym jest, aby przed odparowaniem połączonych przesączy podzielić je na taką ilość w przybliżeniu równych porcji (np. przez odmierzenie pipetą do osobnych probówek), która będzie odpowiadała ilości przewidzianych do przeprowadzenia testów. Rozpuszczalniki należy odparować, a pozostałość wykorzystać do przeprowadzania danej próby analitycznej.

2.3.3. Testy analityczne steroidów

Próby z zastosowaniem ogrzewania mieszanin reagujących należy przeprowadzać na gorącej lub wrzącej łaźni wodnej (ogrzewanie łagodne!) w probówkach z nasadzoną chłodniczką powietrzną (chyba, że przepis podaje inaczej). Próby, które nie wymagają ogrzewania, ani też obserwacji jakichkolwiek zmian w określonej warstwie lub granicy międzyfazowej w mieszaninach heterogenicznych, zwykle przeprowadza się na płytce do analizy kroplowej, o ile skala danego testu na to pozwala. Obserwacje fluorescencji warto także przeprowadzać na płytkach do analizy kroplowej.

- Rozkład pod wpływem stężonego kwasu siarkowego (próba Salkowskiego)

W próbie tej, w zależności od rodzaju steroidu jedna lub obie warstwy wykazują intensywne, kontrastujące ze sobą zabarwienia, a czasami dodatkowo jedna z nich fluoreskuje w świetle UV. Przykładowo, octan dezokortonu – po rozcieńczeniu mieszaniny reagującej w 1 ml etanolu i ogrzaniu daje roztwór niebieski, a w świetle UV – czerwoną fluorescencję; octanu kortyzonu – po 1 minucie – roztwór żółty, a w świetle UV – zieloną fluorescencję.



Rys. 48.. Wyniki reakcji Salkowskiego (po rozcieńczeniu wodą) dla wybranych steroidów. 1 – spirolakton (pomarańczowa barwa dolnej warstwy, żółta fluorescencja warstwy górnej), 2 – finasteryd (jasnoseledynowa barwa oraz szarofioletowa fluorescencja dolnej warstwy), 3 – prednizolon (wiśniowoczerwona barwa dolnej warstwy, szaroniebieska fluorescencja warstwy górnej), 4 – dehydroandrosteron (dolna warstwa – pomarańczowa z różowofioletową fluorescencją), 5 – hydrokortyzon (żółtozielona warstwa górna z intensywnie zieloną fluorescencją, brązowa warstwa dolna z niebieską fluorescencją) 6 – prednizon (obie warstwy bezbarwne, delikatna niebieska fluorescencja warstwy dolnej).

Wykonanie próby:

Kilka miligramów badanej substancji rozpuścić w niewielkiej ilości chloroformu (ok. 2 ml) i „podwarstwić” (tzn. wprowadzić po ściance próbówki) 2 ml stęż. kwasu siarkowego(VI). Po zanotowaniu wyników mieszaninę rozcieńczyć wodą (1-2 ml, OSTROŻNIE!) i ponownie dokonać obserwacji.

Obserwacje:

Dla każdej z warstw zanotować zmiany barwy w świetle widzialnym, a także fluorescencję w świetle UV w czasie ok. 5 minut od dodania kwasu siarkowego, a następnie po rozcieńczeniu mieszaniny wodą (OSTROŻNIE!). Badania fluorescencji należy wykonywać na płytce do analiz kroplowych lub w próbkach ze szkła kwarcowego, o ile są dostępne.

- Reakcja Liebermanna-Burcharda (reakcja z bezwodnikiem octowym w obecności stęż. kwasu siarkowego(VI))

Wykonanie próby:

Kilka miligramów steroidu rozpuszcza się w niewielkiej ilości chloroformu (ok. 2 ml), dodaje (chłodząc w razie potrzeby) 10 kropli bezwodnika octowego i po ściankach próbówki 2-3 krople stęż. H₂SO₄.

Obserwacje:

Zanotować fluorescencję (lub brak) oraz barwę mieszaniny reagującej, a także jej zmiany w czasie 5-10 min. w świetle widzialnym oraz w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

- Reakcja z kwasem siarkowym(VI) i nadtlenkiem benzoilu

Wykonanie próby:

W 3 ml lodowatego kwasu octowego rozpuszcza się kilka miligramów badanego steroidu i dodaje szczyptę nadtlenku benzoilu. Mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia, a po ochłodzeniu dodaje po ściance próbówki 4 krople stęż. kwasu siarkowego(VI). Próbę wykonać w szklanej próbówce. Obserwuje się charakterystyczne dla danego steroidu „przechodzenie” barw.

Obserwacje:

Zanotować barwę i ewentualnie zmiany barwy mieszaniny reagującej w czasie ogrzewania. Zwrócić uwagę na szybkość zachodzących zmian.

- Reakcja z kwasem siarkowym(VI) i furfurałem

Wykonanie próby:

Ok. 5 mg steroidu rozpuszcza się w 2,5 ml alkoholu etylowego, dodaje 3 krople 0,5% alkoholowego roztworu furfuralu (świeżo sporządzonego), po czym OSTROŻNIE podwarstwia stęż. kwasem siarkowym(VI). Po zmieszaniu i ochłodzeniu obserwuje się charakterystyczne dla danego steroidu „przechodzenie” barw (np. cholesterol: czerwone → błękitne, ergosterol: brunatnoróżowe → brunatne, stigmasterol: czerwono-brunatne → słabobłękitne).

Obserwacje:

Zanotować zmiany barwy obu warstw w czasie.

- Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Wykonanie próby:

Do około 2-5 mg badanej substancji dodać 2 ml stęż. H₂SO₄ zmieszanego wcześniej z 2 kroplami 38% roztworu formaldehydu. *Uwaga: stężenie steroidu w mieszaninie reagującej nie może być zbyt duże, gdyż utrudnia to porównywanie barw w przypadku równoległego analizowania kilku różnych próbek.*

Obserwacje:

Należy śledzić barwę (i ewentualne jej zmiany) mieszaniny reagującej w czasie ok. 5-10 minut od zainicjowania reakcji. Dodatkowo warto obserwować kolor ewentualnej fluorescencji mieszaniny reagującej w świetle UV.

- Reakcja z chlorkiem acetylu wobec chlorku cynku

Wykonanie próby:

Do około 10 mg badanej substancji w 2 ml lodowatego kwasu octowego dodać 1 ml chlorku acetylu i kryształek bezwodnego (np. świeżo stopionego) chlorku cynku, po czym ogrzewać ciecz ok. 5 min. w próbówce zaopatrzonej w chłodniczkę powietrzną (praca pod wyciągiem!).

Obserwacje:

Należy śledzić barwę (i ewentualne jej zmiany) mieszaniny reagującej w czasie do 30 minut od zainicjowania reakcji. Po zakończeniu ogrzewania zanotować kolor ewentualnej fluorescencji mieszaniny w świetle UV.

- Reakcja z chlorkiem cyny(IV)

Wykonanie próby:

Około 2-5 mg badanej substancji rozpuścić w 2 ml lodowatego kwasu octowego i dodać roztwór otrzymany przez rozpuszczenie 1 kryształka chlorku cyny(IV) w 0,4 ml lodowatego kwasu octowego. Całość ogrzać.

Tę samą próbę powtórzyć, stosując jako rozpuszczalnik chloroform.

Obserwacje:

Należy śledzić barwę (i ewentualne jej zmiany) mieszaniny reagującej przed i po jej ogrzaniu. Zanotować ewentualne różnice po zmianie rozpuszczalnika.

- Reakcja z chlorkiem antymonu(III)

Wykonanie próby:

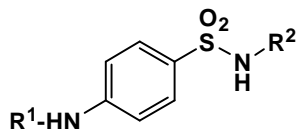
Sporządzić roztwór 2 mg badanego steroidu w 1 ml bezwodnego chloroformu (bez domieszek alkoholu!). Do 0,2 ml tego roztworu dodać 4 ml nasyconego na zimno roztworu chlorku antymonu(III) w bezwodnym i bezalkoholowym chloroformie.

Obserwacje:

Należy śledzić barwę (i ewentualne jej zmiany) mieszaniny reagującej w czasie, a nadto zwrócić uwagę na fluorescencję w długofalowym świetle UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$).

2.4. Sulfonamidy

Leki z grupy sulfonamidów są pochodnymi amidu kwasu 4-aminobenzenosulfonowego (sulfanilamidu) o ogólnej strukturze:



Mogą one zawierać różne podstawniki (R^1 i R^2), zarówno na grupie aminowej, jak i sulfonamidowej, a w zależności od ich rodzaju mogą wykazywać charakter kwasowy lub/i zasadowy, bądź też obojętny. Charakter zasadowy nadaje im nie podstawiona grupa aminowa przy pierścieniu aromatycznym ($pK_b = 11,64-12,3$), natomiast charakter kwasowy – ugrupowanie sulfonamidowe (dla większości związków $pK_a = 6,5-7,5$). Sulfaguanidyna, posiadająca ugrupowanie sulfaguanidynowe zamiast sulfonamidowego, jest praktycznie pozbawiona własności kwasowych ($pK_a = 12,05$). W roztworach wodorotlenków rozpuszcza się dopiero na gorąco, rozkładając się z wydzieleniem amoniaku (odróżnienie od innych sulfonamidów z wyjątkiem *Sulfakarbamidu*).

2.4.1. Reakcje wspólne dla sulfonamidów

Związki z grupy sulfonamidów po stopieniu z sodem w próbach wstępnych dają pozytywne reakcje na obecność siarki (np. produkt o czerwonym, nietrwałym zabarwieniu po

reakcji z roztworem nitroprusydku sodowego), a stopione z bezwodnym węglanem sodowym – pozytywne reakcje na obecność jonów siarczanowych.

Związki tej grupy pod wpływem ogrzewania w wodnych roztworach wodorotlenków ulegają reakcjom hydrolizy. Jednym z produktów jest amina lub amoniak (zależnie od struktury badanego związku), które identyfikuje się w mieszaninie poreakcyjnej w oparciu o właściwe im próby charakterystyczne.

Sulfonamidy w środowisku kwasu solnego reagują z formaldehydem, tworząc na ogół białe, rozpuszczalne w roztworze wodorotlenku sodowego, osady. Osady te po ogrzaniu roztworów macierzystych (tj. tych, z których wytrąciły się) ulegają rozpuszczeniu, dając pomarańczowe lub czerwone roztwory. Po oziębieniu ponownie pojawia się biały osad, rozpuszczalny w ługu.

Wszystkie sulfonamidy rozpuszczalne w kwasie solnym po potraktowaniu wodą bromową dają w tym roztworze białe lub żółtawe osady produktów bromowania pierścieni aromatycznych.

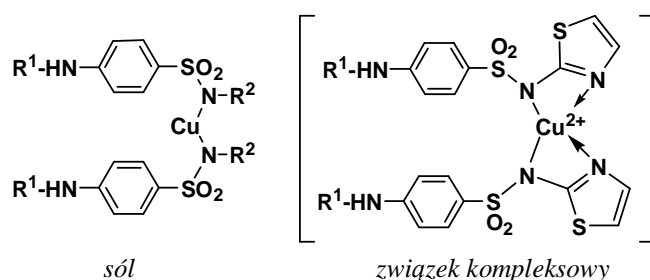
2.4.2. Rozróżnianie sulfonamidów

W próbach rozróżniania poszczególnych sulfonamidów często wykorzystywane są właściwości zmiany barwy podczas przechodzenia w stan stopiony. Wiele sulfonamidów podczas łagodnego ogrzewania w suchej próbówce (w temperaturze redukującego płomienia palnika) tworzy stopy o charakterystycznych dla siebie barwach.

Jednakże, podobnie, jak w przypadku większości związków organicznych, główną podstawą rozróżniania, a tym samym i identyfikacji poszczególnych sulfonamidów są wyniki reakcji barwnych.

Sole sodowe sulfonamidów, zawierających podstawioną ugrupowaniem heterocyklicznym grupę sulfonamidową tworzą z jonami Cu^{2+} barwne kompleksy. W próbach z innymi sulfonamidami obserwuje się powstawanie niespecyficznego zielonego lub niebieskiego zabarwienia od ich soli miedziowych. Reakcja ta nie jest charakterystyczna dla nich specyficzną, gdyż sole miedziowe wielu kwasów organicznych posiadają podobne zielone lub niebieskie zabarwienia.

Sulfonamidy podstawione niektórymi heterocyklicznymi układami aromatycznymi tworzą barwne związki kompleksowe z solami kobaltu(II) o strukturach analogicznych do podanych na Rys. 49.

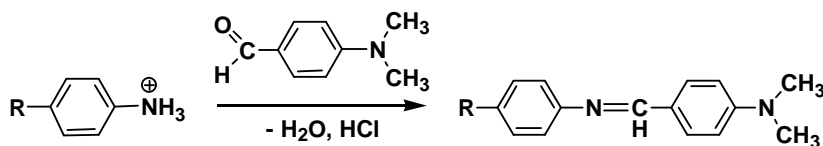


Rys. 49. Rodzaje połączeń sulfonamidów z jonami miedzi(II)

W reakcji z wodnym roztworem mieszaniny jodu i jodku potasowego sulfonamidy podstawione ugrupowaniem heterocyklicznym dają brązowo- lub żółtawoczerwone osady soli, w przeciwieństwie do sulfonamidów z grupy izocyklowej lub podstawionych ugrupowaniami karbocyklicznymi, które z tym odczynnikiem osadów nie tworzą.

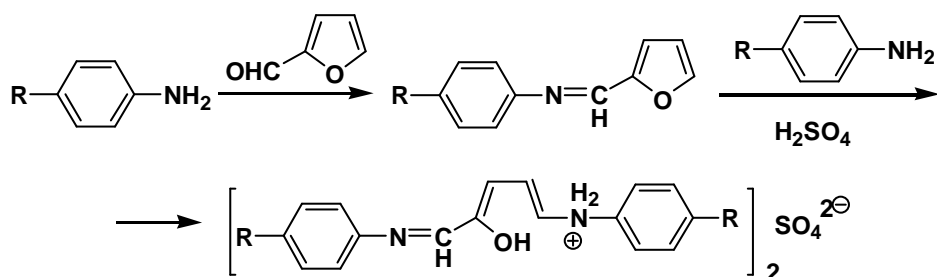
Pierwszorzędowe aminy aromatyczne pod wpływem kwasu azotowego(III) przekształcają się w sole diazoniowe, które w reakcjach z silnie zaktywowanymi na substytucję elektrofilową związkami aromatycznymi (np. fenolami, aminami aromatycznymi, a zwłaszcza *N,N*-dialkiloaminami) dają barwne produkty sprzęgania – związki diazowe. Zwykle, ze względów sterycznych preferowane jest podstawienie w pozycji 4 sześciocłonowego pierścienia aromatycznego. Układ aromatyczny 2-naftolu jest podstawiany w pozycji 1.

Dodatkowo, związki zawierające w swych strukturach pierwszorzędowe grupy aminowe ulegają reakcjom kondensacji z aldehydami, np. aldehydem 4-dimetyloaminobenzoesowym (odczynnik Ehrlicha), furfurałem czy aldehydem anyżowym tworząc barwne produkty typu zasad Schiffa, które niekiedy wypadają ze środowiska reakcji w postaci osadów. Wiele produktów reakcji sulfonamidów z odczynnikiem Ehrlicha charakteryzuje się swoistą fluorescencją w świetle UV, co często ułatwia analizę identyfikacyjną.



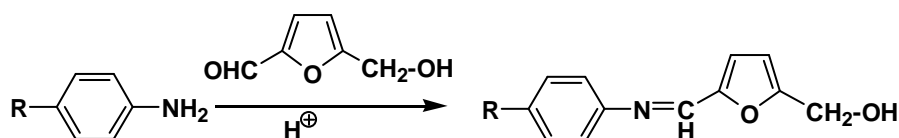
Rys. 50. Ogólna reakcja aromatycznych amin pierwszorzędowych odczynnikiem z odczynnikiem Ehrlicha

Powyższą próbę można też wykonać na celulozowej bibule (np. papierze gazetowym). Jest to tzw. **próba ligninowa**. Celuloza pod wpływem kwasu solnego ulega hydrolizie, dając glukozę, która w reakcji z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi prowadzi do czerwonopomarańczowych produktów kondensacji typu zasad Schiffa. W przypadku użycia do tej próby furfuralu przebieg reakcji jest zgodny z prezentowanym na Rys. 51.



Rys. 51. Ogólna reakcja aromatycznych amin pierwszorzędowych z furfurałem w środowisku silnie kwaśnym

Kondensacja z pochodną furfuralu, podstawioną w pozycji 5 przebiega bez otwarcia pierścienia furanowego.



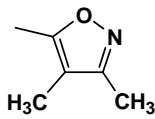
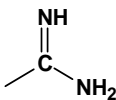
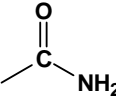
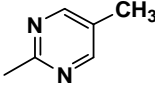
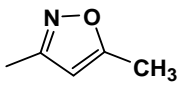
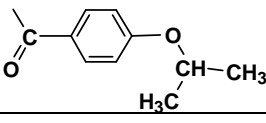
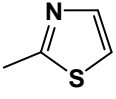
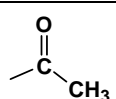
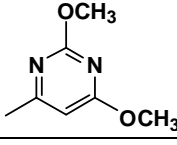
Rys. 52. Ogólna reakcja aromatycznych amin pierwszorzędowych w środowisku silnie kwaśnym z pochodnymi furfuralu podstawionego w pozycji 5

Pierścienie aromatyczne sulfonamidów ulegają reakcjom nitrowania, w wyniku czego obserwuje się powstawanie nitropochodnych o różnych odcieniach brązu, zieleni lub żółci.

Powstałe produkty poddane następnie działaniu zasad (np. etanolowy roztwór KOH) w większości przypadków zmieniają barwę (najczęściej na zbliżoną do żółtej, pomarańczowej lub brązowoczerwonej) – reakcja Vitaliego.

Wyniki wybranych reakcji barwnych, w oparciu o które można rozróżnić związki sulfonamidowe prezentuje Tabela 2.

Tabela 2. Wybrane próby analityczne rozróżniające pochodne sulfanilamidu ($R^1 = H$)

Lp.	Nazwa leku	Podstawnik grupy sulfonamidowej ($-R^2$)	Barwa stopu	Barwa produktu			
				CuSO ₄	Co(NO ₃) ₂	Odcz. Ehrlicha	Reakcja Vitaliego ^{*)}
1.	Sulfafurazol (Amidoksal)		Pomarańczowa → brunatnoczerwona	Szaroniebieska	Różowa	Ciemnożółta (cytrynowa fluorescencja)	a) Ciemna brunatnozielona, b) brązowoczerwona
2.	Sulfaguani-dyna		Żółta → fioletowa, NH ₃ ↑	Błękitna	Szaro błękitna	Pomarańczowa (pomarańczowa fluorescencja)	a) Brązowa, b) żółtopomarańczowa
3.	Sulfakarbamid		Żółta → fioletowa, NH ₃ ↑	Błękitna	Szaro błękitna	Pomarańczowa	Brak danych
4.	Sulfameryzyna		Żółta → czerwono-brunatna	Niebieskozielona (morska)	Różowofioletowa jasna	Czerwonobrazowa (bez fluorescencji)	a) Jasnobrązowa, b) oliwkowożółta
5.	Sulfametoksazol		Brunatna	Błękitna	Niebieskozielona (morska)	Ciemnopomarańczowa (czerwona fluorescencja)	a) Zielona, b) pomarańczowa
6.	Sulfaprosylina		Ciemnopomarańczowa	Zielona	Niebieska	Żółtopomarańczowa	Brak danych
7.	Sulfatiazol		Brunatnoczerwona H ₂ S ↑	Szaro-fioletowa	Niebieskofioletowa	Jaskrawopomarańczowa (kanarkowożółta fluorescencja)	a) Brązowa, b) pomarańczowa
8.	Sulfacetamid		Czerwoniębieska, H ₂ S ↑	Błękitna	Szaro błękitna	Pomarańczowa	Brak danych
9.	Sulfadime-toksyna (Madroxin)		Brunatna	Żółtozielona	Szaroniebieska	Kanarkowożółta (zielenobrunatna fluorescencja)	a) Żółta, b) żółta
10.	Sulfanilamid (Streptocyd)	-H	Ciemnofioletowa	Błękitna	Niebieska	Jasnopomarańczowa (morelowa) bez fluorescencji	a) Żółtozielona, b) żółtopomarańczowa

*) a - po nitrowaniu; b - po alkalizacji.

2.4.3. Testy analityczne sulfonamidów

Wyodrębnianie sulfonamidów z masy leku

Leki tabletkowane należy dokładnie sproszkować w małym moździerzu, przenieść do niewielkiej kolbki stożkowej, zadać acetonem (sulfonamidy zawierające podstawioną

aromatyczną grupę aminową) lub 1N kwasem solnym (dla sulfonamidów z niepodstawioną grupą aminową), dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie, po czym tak uzyskaną zawiesinę przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Przesącz należy zebrać bezpośrednio do kolbki okrągłodennej. Pozostały na sączku osad należy dodatkowo dwukrotnie przemyć za pomocą odpowiedniego w/wym. rozpuszczalnika, zebrać przesącze i połączyć je z zebranych wcześniej. Roztwory należy odparować do sucha na wyparce rotacyjnej, a uzyskaną w ten sposób suchą pozostałość przeznaczyć do badań analitycznych.

Związki sulfonamidowe, które są trudnorozpuszczalne w kwasie solnym można próbować eluować z masy leku za pomocą 1N roztworze NaOH, po czym zakwasić uzyskany eluat kwasem solnym do pH ok. 4-5. Wydzielony osad sulfonamidu po odsączeniu i ewentualnym wysuszeniu można poddawać reakcjom jakościowym. Zakwaszone eluaty, z których osad sulfonamidu nie wytrącił się odparowuje się do sucha, a otrzymaną pozostałość przeznacza się do badań identyfikacyjnych.

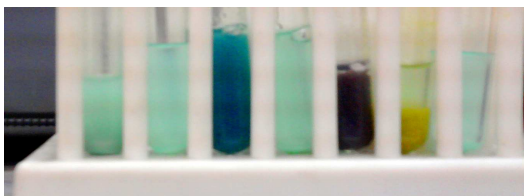
Leki w postaci maści należy zmieszać ze zbliżoną objętościowo ilością eteru naftowego, silnie zamieszać (na mieszadle magnetycznym lub poprzez wytrząsanie) i płyn zdekantować. Pozostałość przemyć eterem naftowym (2-4 razy), wyciągi eterowe każdorazowo odrzucając. Przemyty osad wysuszyć na wyparce obrotowej, rozpuścić w acetonie lub 1N kwasie solnym (dla sulfonamidów z niepodstawioną grupą aminową), w razie potrzeby przesączyć, usuwając nierozpuszczone zanieczyszczenia i odparować do sucha (wyparka rotacyjna). Otrzymany osad poddać testom analitycznym.

Procedury doświadczeń

- Reakcja z siarczanem miedzi(II)

Wykonanie próby:

Okolo 10 mg badanej substancji (sulfonamid w postaci soli sodowej) rozpuścić w 1 ml wody. Sulfonamid w postaci wolnej zawiesić w mieszaninie 1 ml wody po czym dodać 1-2 krople ok. 1N roztworu NaOH i dokładnie wymieszać do rozpuszczenia (pH roztworu nie powinno być wyższe od 9). Następnie dodać ok. 0,5 ml 5% roztworu CuSO_4 i ponownie dokładnie wymieszać. Obserwuje się powolne rozpuszczanie początkowo wytrąconego wodorotlenku miedzi(II) i tworzenie barwnego połączenia sulfonamidu z jonami miedzi(II). *Uwaga: w reakcji należy unikać nadmiaru zasady.*



Rys.53. Zabarwienia połączeń sulfonamidów jonami Cu^{2+} .

Od lewej kolejno: Sulfafurazol (Amidoxal), Sulfaguanidyna, Sulfamerazyna, Sulfametoksazol, Sulfatiazol, Sulfadimetoksyna (Madroxin), Sulfanilamid (Streptocyd).

- Reakcja z solami kobaltu(II)

Wykonanie próby:

Okolo 10 mg badanej substancji (sulfonamid w postaci soli sodowej) rozpuścić w 1 ml wody. Sulfonamid w postaci wolnej zawiesić w mieszaninie 1 ml wody po czym dodać 1-2 krople ok. 1N roztworu NaOH i dokładnie wymieszać do rozpuszczenia (pH roztworu nie powinno być wyższe od 9). Następnie dodać ok. 0,5 ml 1% roztworu $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ i ponownie dokładnie wymieszać. Obserwuje się tworzenie barwnego połączenia

sulfonamidu z jonami kobaltu(II) wytrącającego się w postaci osadu i charakterystycznie zabarwionego roztworu.
Uwaga: w reakcji należy unikać nadmiaru zasady.



Rys.54. Barwy połączeń sulfonamidów z jonami Co^{2+} .

Od lewej kolejno: Sulfafurazol (Amidoxal), Sulfaguanidyna, Sulfamerazyna, Sulfametoksazol, Sulfatiazol, Sulfadimetoksyna (Madroxin), Sulfanilamid (Streptocyd).

- Tworzenie stopów

Wykonanie próby:

Kilka miligramów badanej substancji umieścić w niewielkiej probówce i delikatnie ogrzewać świecącym płomieniem palnika. Powstaje stop o charakterystycznym dla danego sulfonamidu zabarwieniu. Przykładowo, w przypadku sulfaguanidyny stop ma barwę fioletową, a reakcji towarzyszy wydzielanie amoniaku (wykrywany przy użyciu zwilżonego wodą uniwersalnego papierka wskaźnikowego).

- Wykrywanie ugrupowania sulfonowego

Wykonanie próby:

Okolo 0,2 g badanej substancji zmieszać w suchej probówce z 0,2 g bezwodnego Na_2CO_3 , stopić i wyprażyć. Utworzony stop rozpuścić w 5 ml 25% roztworu kwasu solnego i przesączyć. Przesącz badać na obecność jonów siarczanowych. Do 0,5 ml przesączu dodać 0,5 ml 5% roztworu chlorku barowego. Wytrąca się biały osad.

- Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

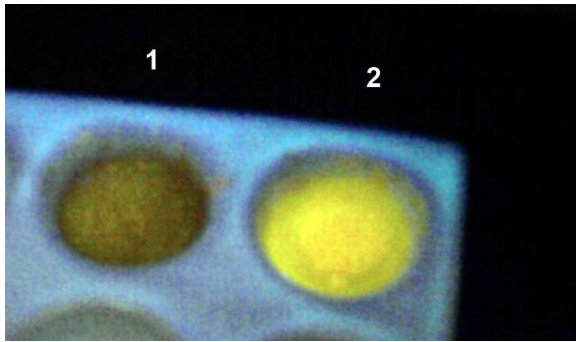
Wykonanie próby:

Okolo 20 mg badanej substancji zadać 1 ml odczynnika Ehrlicha (1% roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym) i całość dokładnie wymieszać bagietką. Powstaje zbliżony barwą do pomarańczowego osad lub roztwór produktu kondensacji (zależnie od stężenia badanej substancji). Sprawdzić fluorescencję powstałego produktu w świetle UV i zanotować jej barwę, o ile wystąpi.



Rys. 55. Wyniki reakcji sulfonamidów z odczynnikiem Ehrlicha.

Od lewej kolejno: dół - Sulfafurazol (Amidoxal), Sulfaguanidyna, Sulfamerazyna, Sulfametoksazol; góra - Sulfatiazol, Sulfadimetoksyna (Madroxin), Sulfanilamid (Streptocyd).



Rys. 56. Fluorescencja w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) produktów reakcji wybranych sulfonamidów z odczynnikiem Ehrlicha.

Góra:

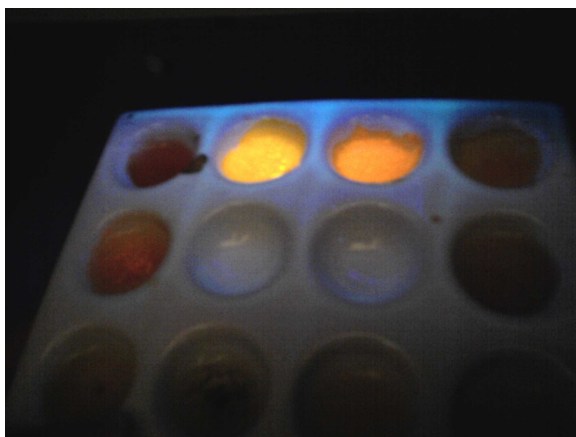
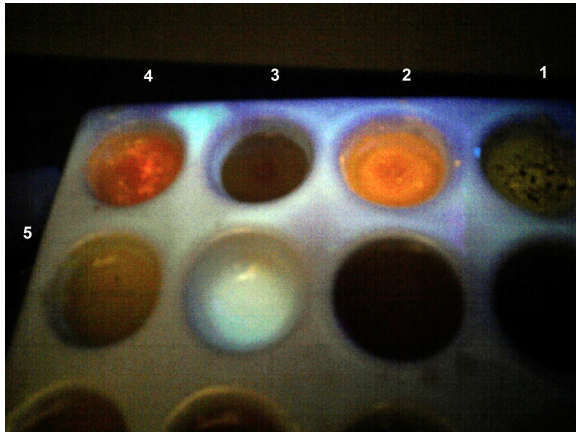
1. Sulfadimetoksyna (Madroxin) (zielonobrunatna fluorescencja)
2. Sulfafurazol (Amidoxal) (cytrynowa fluorescencja).

Środek:

1. Sulfafurazol (Amidoxal) (jasnożółta fluorescencja) - tu słabo widoczna
2. Sulfaguanidyna (silna pomarańczowa fluorescencja)
3. Sulfamerazyna (brak fluorescencji)
4. Sulfametoksazol (silna czerwona fluorescencja)
5. Sulfadimetoksyna (Madroxin) (zielonobrunatna fluorescencja).

Dół:

1. Sulfanilamid (brak fluorescencji)
2. Sulfaguanidyna (silna pomarańczowa fluorescencja)
3. Sulfatiazol (silna kanarkowożółta fluorescencja)
4. Sulfamerazyna (brak fluorescencji)
5. Sulfametoksazol (silna czerwona fluorescencja).



• Reakcja z aldehydem anyżowym w stęż. kwasie siarkowym(VI)

Wykonanie próby:

Około 50 mg badanej substancji zadać 0,5 ml stęż. H_2SO_4 , dokładnie wymieszać bagietką do rozpuszczenia się badanej substancji, po czym dodać 1 kroplę aldehydu anyżowego i całość ponownie dokładnie wymieszać. Powstaje zbliżony barwą do pomarańczowego osad lub roztwór produktu kondensacji (zależnie od stężenia badanej substancji). Zanotować powstałą barwę mieszaniny reagującej, a następnie dodać ostrożnie 0,5 ml wody. Roztwór zmienia barwę (zwykle na kremową, żółtawą lub jasnobrazową), przy czym mętnieje.



Rys. 57. Wyniki reakcji wybranych sulfonamidów z aldehydem anyżowym wobec stęż. kwasu siarkowego (przed dodaniem wody).

Od lewej kolejno: Sulfafurazol (Amidoxal), Sulfaguanidyna, Sulfamerazyna, Sulfametoksazol, Sulfatiazol, Sulfadimetoksyna (Madroxin), Sulfanilamid (Streptocyd).

- Reakcja z formaldehydem

Wykonanie próby:

Okolo 20 mg badanej substancji rozpuścić (ogrzewając w razie potrzeby) w 1 ml 10 % roztworu kwasu solnego, po czym po ochłodzeniu dodać 3 ml 35-40% formaliny i ogrzewać przez kilka sekund do wrzenia. Po oziębieniu wypada biały osad, który powinien być rozpuszczalny w 1-2N roztworze NaOH. Ponowne ogrzanie mieszaniny reagującej do wrzenia powoduje rozpuszczenie osadu, a powstały roztwór przybiera pomarańczową lub czerwoną barwę. Po ochłodzeniu znowu wypada biały osad.

- Próba ligninowa

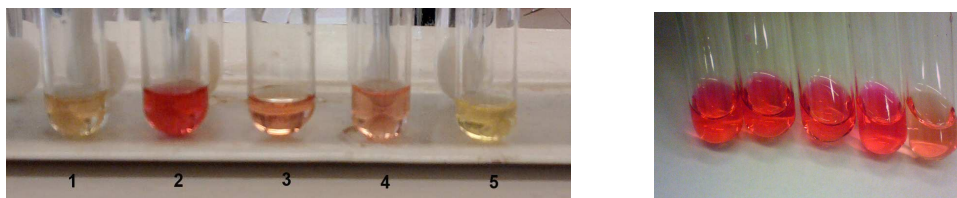
Wykonanie próby:

1 kroplę wodnego roztworu badanej substancji umieścić na bibule i dodać kroplę stęż. kwasu solnego. Powstaje pomarańczowo zabarwiona plama.

- Reakcja z furfurałem

Wykonanie próby:

Okolo 20 mg badanej substancji rozpuścić w 1 ml 50% kwasu octowego, dokładnie wymieszać bagietką, a następnie dodać 1 kroplę furfuralu i ponownie dokładnie wymieszać. Powstaje zwykle zabarwienie żółte, różowe, żółtoczerwone lub malinowe. Po 2 minutach dodać 1-2 krople 16 % roztworu kwasu siarkowego(VI). W przypadku większości sulfonamidów barwa mieszaniny reagującej zmienia się na ciemnoczerwoną lub amarantową.

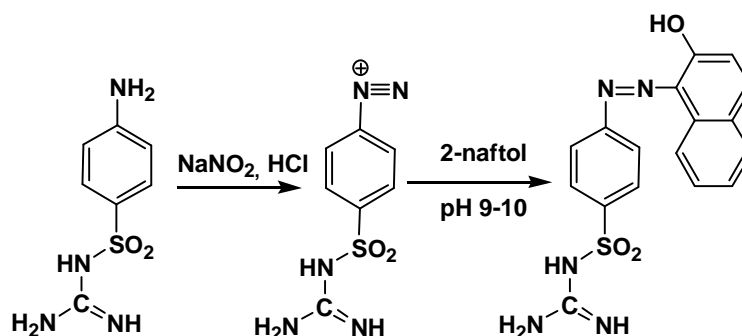


Rys. 58. Wyniki reakcji sulfonamidów z furfurałem. Po lewej - przed dodaniem stęż. H_2SO_4 :
1) Sulfafurazol (Amidoxal); 2) Sulfaguanidyna; 3) Sulfamerazyna; 4) Sulfametoksazol;
5) Sulfadimetoksyna (Madroxin). Po prawej - po dodaniu stęż. H_2SO_4 w tej samej kolejności.

- Reakcja diazowania i sprzęgania z 2-naftolem

Wykonanie próby:

Okolo 25 mg badanej substancji rozpuścić w 1 ml 10% roztworu kwasu solnego, ochłodzić na łaźni lodowej, dodać 1 ml 1% roztworu azotanu(III) sodowego i wymieszać. Następnie do tego roztworu dodać powoli po kropli, intensywnie mieszając bagietką 3 ml alkalicznego roztworu 2-naftolu (przygotowanie - patrz rozdział IX.1.). Na ogół obserwuje się powstawanie pomarańczowoczerwonego osadu względnie ciemnoczerwonego zabarwienia roztworu. Dla sulfaguanidyny reakcja przebiega najszybciej przy $pH = 9-10$ wg schematu przedstawionego na Rys. 59.



Rys. 59. Sulfaguanidyna poddana reakcji z odczynnikami Pauliego (reakcja diazowania i sprzęgania)

- Reakcja diazowania i sprzęgania z rezorcyną

Wykonanie próby – analogicznie, jak w przypadku reakcji z 2-naftolem.

- Reakcja bromowania

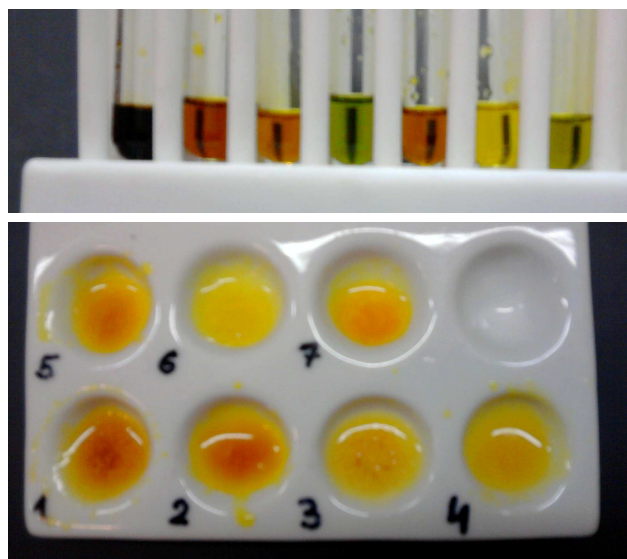
Wykonanie próby:

Około 20 mg badanej substancji rozpuścić (ogrzewając w razie potrzeby) w 1 ml 10% roztworu kwasu solnego lub octowego, po czym po ochłodzeniu dodać kroplami wody bromowej w ilości do uzyskania jasnopomarańczowej barwy mieszaniny reagującej. W przypadku obecności sulfonamidu obserwuje się wypadanie białego lub żółtawego osadu produktu bromowania pierścienia aromatycznego.

- Reakcja Vitaliego

Wykonanie próby:

Około 50 mg badanej substancji zadać 0,5 ml stęż. H_2SO_4 i całość dokładnie wymieszać bagietką. Następnie dodać kilka kryształków $NaNO_3$, wymieszać ponownie i ogrzewać krótko (5-10 sek.) na wrzącej łaźni wodnej. Po zanotowaniu barwy powstałego produktu nitrowania mieszaninę zalkalizować za pomocą 0,1% roztworu KOH w etanolu, dodawanego po kropli. W niektórych przypadkach następuje zmiana barwy mieszaniny reagującej.



Rys. 60. Wyniki reakcji Vitaliego z sulfonamidami przed alkalizacją (górną) i po alkalizacji (dolną) mieszaniny reagującej.

Od lewej kolejno: 1) Sulfafurazol (Amidoxal), 2) Sulfaguanidyna, 3) Sulfametoksazol, 4) Sulfamerazyna, 5) Sulfatiazol, 6) Sulfadimetoksyna (Madroxin), 7) Sulfanilamid (Streptocyd).

- Reakcja z roztworem jodu z jodkiem potasowym (odczynnik Wagnera)

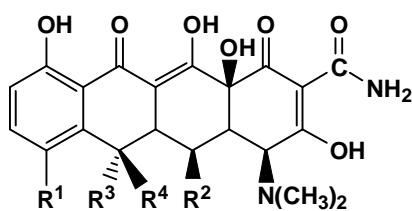
Wykonanie próby:

Do około 0,5 ml roztworu (50 mg substancji w 2 ml 1N kwasu solnego rozcieńczonego wodą do 5 ml) dodać 1-2 krople odczynnika Wagnera (5% roztwór I_2 w 10% roztworze KI). Wydzielenie się żółtawoczerwonego osadu świadczy o obecności sulfonamidu podstawionego na grupie sulfonamidowej ugrupowaniem heterocyklicznym.

2.5. Tetracykliny

Tetracykliny to grupa naturalnych lub półsyntetycznych antybiotyków o strukturze zawierającej podstawowy układ tetracenu (naftacenu), który zbudowany jest z czterech skondensowanych liniowo pierścieni sześciocłonowych o zróżnicowanym stopniu nienasycenia.

Elementami strukturalnymi, odróżniającymi poszczególne tetracykliny od siebie są podstawniki pierwszych trzech pierścieni ($R^1 - R^4$), znacznie rzadziej pierścienia ostatniego. Najczęściej są to grupy: $-CH_3$, $-Cl$, $-OH$ lub atom wodoru.



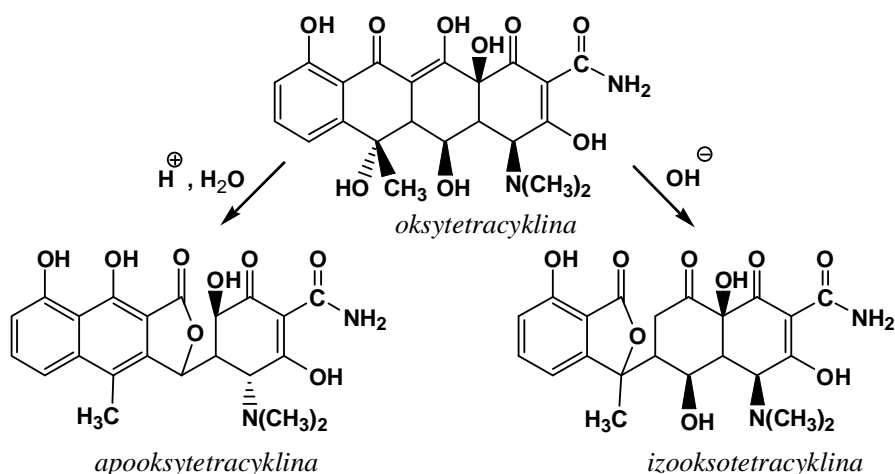
Rys. 61. Ogólna struktura tetracyklin

2.5.1. Reakcje charakterystyczne tetracyklin

Tetracykliny wykazują charakter amfoteryczny. Rozpuszczają się zatem zarówno w roztworach silnych kwasów, jak i silnych zasad. Słaby charakter kwasowy zawdzięczają obecności grupy fenolowej oraz grup enolowych. Chlorowodorki tetracyklin dobrze rozpuszczają się w wodzie.

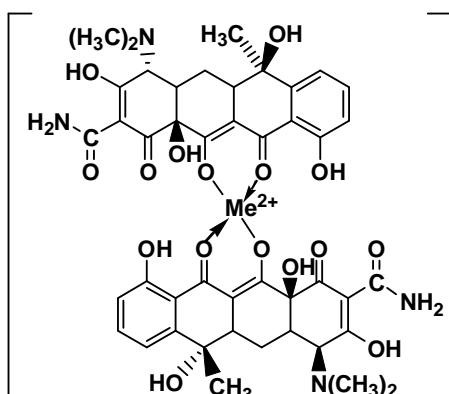
Własności zasadowe tetracyklin są związane z obecnością w ich strukturach trzeciorzędowej grupy aminowej. Wykazują zatem szereg reakcji strąceniowych z odczynnikami stosowanymi do wykrywania zasad organicznych (w tym alkaloidów), takich jak odczynnik Dragendorffa czy Mayera, a także roztwór jodu w jodku potasu itp.

Tetracykliny poddane działaniu stężonych roztworów kwasów i zasad ulegają rozkładowi (m. in. na skutek reakcji eliminacji), dając charakterystycznie fluoryzujące zabarwienia roztworów (Rys. 62.).



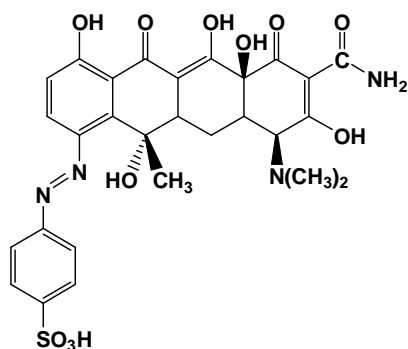
Rys. 62. Rozkład oksytetracykliny pod wpływem stężonych kwasów i zasad [6]

Grupy enolowe i fenolowe w reakcjach z solami metali dwu- i trójwartościowych, np. chlorkiem żelaza(III) czy solami cynku dają barwne, czasami trudno rozpuszczalne w wodzie związki kompleksowe.



Rys. 63. Struktura kompleksów tetracykliny z jonami metali dwuwartościowych [6]

Pierścień aromatyczny tetracyklin może wchodzić w reakcje substytucji elektrofilowej. Aromatyczna substytucja elektrofilowa łatwo zachodzi przede wszystkim w wolną od podstawników pozycję 4 w stosunku do grupy fenolowej. Produkty reakcji z kwasem 4-diazobenzosulfonowym charakteryzują się na ogół czerwonopomarańczowym zabarwieniem.



Rys. 64. Produkt kondensacji tetracykliny z kwasem diazobenzosulfonowym [4]

Pierścień aromatyczny tetracyklin w środowisku kwaśnym jest podatny także na kondensacje z aldehydami pozbawionymi w sąsiedztwie grupy karbonylowej protonów α (aldehydy aromatyczne, formaldehyd). W rezultacie powstają tu połączenia, zawdzięczające swą intensywną barwę nowopowstałym rozległym układom sprzężonych wiązań wielokrotnych.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż wszystkim przemianom przebiegającym w obecności stężonych kwasów mineralnych czy zasad może towarzyszyć przynajmniej częściowy rozpad układu tetracenu, o którym wspomniano wyżej.

2.5.2. Przygotowanie leków tetracyklinowych do analiz

Obecne w masie leku substancje pomocnicze, wypełnienia czy nośniki mogą utrudniać, względnie uniemożliwiać prawidłową analizę substancji czynnej, zatem warto je przed przystąpieniem do przeprowadzania analiz usunąć. Leki z zawartością chlorowodorków tetracyklin, posiadające postać maści, należy zadać odpowiednią ilością wybranego węglowodoru (np. eter naftowy, pentan, heksan), dokładnie wymieszać i przesączyć, a pozostałość na sączku przemyć kilkakrotnie stosowanym rozpuszczalnikiem i wysuszyć. Leki tabletkowane należy sproszkować, zadać wodą, lub metanolem (zależnie od rozpuszczalności substancji czynnej leku) dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie i oddzielić od substancji wypełniających przez ich odsączenie. Zebrane przesącze można odparować do sucha na wyparce rotacyjnej, względnie użyć bezpośrednio do analiz, o ile obecność wody jest w danej próbie dopuszczalna. W przypadku analizowania leków kapsułkowanych, substancję czynną wydobywa się z kapsułki po uprzednim jej otwarciu (rozerwaniu).

2.5.3. Testy analityczne tetracyklin

- Rozkład pod wpływem stężonego roztworu kwasu siarkowego

Wykonanie próby:

Do 1 mg badanej substancji dodać kilka kropel stęż. kwasu siarkowego. Po zanotowaniu zmiany barwy i ewentualnego wystąpienia fluorescencji w czasie ok. 5-10 minut od zapoczątkowania reakcji mieszaninę należy rozcieńczyć wodą i ponownie dokonać obserwacji ewentualnej zmiany barwy i fluorescencji. Próbę wykonać na białej płytce porcelanowej lub szkiełku zegarkowym ustawionym na białym tle.

W przypadku chlorowodoru tetracykliny powstaje czerwono-fioletowe zabarwienie, które po dodaniu 1 ml wody przechodzi w żółte, dla chlorowodoru oksytetracykliny powstaje zabarwienie czerwone, zmieniające się w żółte po rozcieńczeniu wodą, a w przypadku chlorowodoru chlorotetracykliny – zabarwienie ciemnoniebieskie, stopniowo przechodzące w zielononiebieskie, a po rozcieńczeniu wodą – żółtopomarańczowe.

- Rozkład pod wpływem stężonego roztworu wodorotlenku sodowego

Wykonanie próby:

Do ok. 5 mg badanej substancji dodać 0,5 ml wody i 0,1 ml 8% roztworu NaOH.

W przypadku chlorowodoru tetracykliny powstaje żółtopomarańczowa fluorescencja, a w świetle UV – niebieska, dla chlorowodoru oksytetracykliny powstaje fluorescencja żółtopomarańczowa, w świetle UV – zielona, a po ogrzaniu – niebieska.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Ok. 5 mg badanej substancji rozpuścić w 1 ml 0,1 N kwasu solnego i dodać 0,1 ml 1% roztworu FeCl₃. W przypadku większości tetracyklin powstaje zabarwienie czerwono-brunatne.

- Reakcja z kwasem 4-diazobenzenosulfonowym

Wykonanie próby:

Okolo 10 mg badanej substancji rozpuścić w 5 ml mieszaniny 1 ml 5% roztworu Na₂CO₃ i 4 ml wody, dodać 1 ml roztworu zawierającego kwas 4-diazobenzenosulfonowy (przygotowanie - patrz rozdział IX.1.).

W wyniku reakcji z tetracykliną powstaje pomarańczowoczerwone zabarwienie, wykazujące w świetle UV (254 nm) fioletową fluorescencję.

- Reakcja z aldehydem 4-dimetyloaminobenzoesowym w stęż. kwasie siarkowym(VI)

Wykonanie próby:

Około 25 mg badanej substancji rozpuścić w 0,3 ml świeżo sporządzonego 1% roztworu aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w stęż. H_2SO_4 z dodatkiem 1 kropli wody. Zanotować barwę mieszaniny reagującej oraz zbadać jej fluorescencję w świetle UV (na płytce do analizy kroplowej).

W przypadku chlorowodoru tetracykliny powstaje początkowo zabarwienie żółte, przechodzące w brunatne po łagodnym podgrzaniu. Chlorowodorek oksytetracykliny daje produkt fioletowy, który po podgrzaniu staje się niebieski i wykazuje czerwoną fluorescencję w świetle UV.

- Reakcja z glukozą w obecności stęż. kwasu siarkowego

Wykonanie próby:

Do ok. 5 mg badanej substancji dodać ok. 10 mg drobno sproszkowanej glukozy, po czym kilka kropli stęż. H_2SO_4 . Próbę wykonać na porcelanowej białej płytce lub szkiełku zegarkowym ustawionym na białym tle.

Obserwacje:

Zanotować zmiany barw mieszaniny reagującej w czasie ok. 10-15 minut. Dodatkowo obserwować kolor ewentualnie pojawiającej się fluorescencji mieszaniny reagującej w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

- Reakcja z chlorkiem cynku(II)

Wykonanie próby:

2 ml 50% wodnego roztworu chlorku cynku(II) ogrzewać do utworzenia twardej masy na powierzchni. Następnie dodać 1 mg badanej substancji i ogrzewać dalej przez 1 minutę.

Chlorowodorek tetracykliny daje żółto zabarwiony produkt. Chlorowodorek oksytetracykliny prowadzi do produktu o zabarwieniu ametystowym

- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

Wykonanie próby:

Około 50 mg badanej substancji zadać ok. 0,5 ml odczynnika Dragendorffa i całość zamieszać bagietką. Powstaje osad, na ogół o zabarwieniu pomarańczowobrazowym.

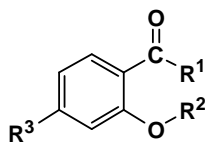
- Reakcja z odczynnikiem Mayera

Wykonanie próby:

Do około 50 mg badanej substancji dodać 1 ml wody i kilka kropli odczynnika Mayera. Wytrąca się biały osad soli.

2.6. Pochodne kwasu salicylowego i aniliny

Farmaceutyki, będące pochodnymi kwasu salicylowego (np. salicylany, amid kwasu salicylowego, etenzamid, kwas acetylosalicylowy) lub aniliny (np. paracetamol, fenacetyna) - to leki działające na ośrodkowy układ nerwowy.

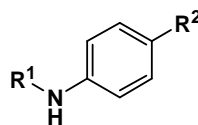


Pochodne kwasu salicylowego o zastosowaniu farmaceutycznym gdzie najczęściej:

$R^1 = OH, NH_2, OC_2H_5,$

$R^2 = H, C_2H_5, CH_3CO,$

$R^3 = H, NH_2$



Pochodne aniliny o zastosowaniu farmaceutycznym gdzie najczęściej:

$R^1 = H, CH_3CO,$

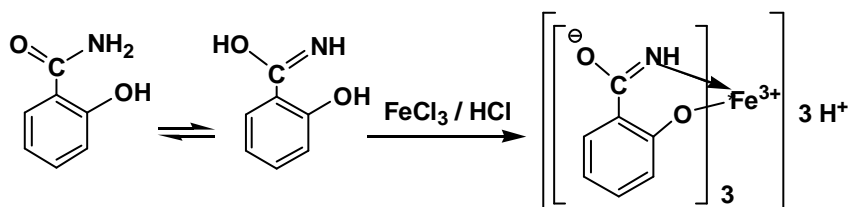
$R^2 = OH, COOC_2H_5, OC_2H_5$

Rys. 65. Ogólne struktury farmaceutyków z grupy pochodnych kwasu salicylowego (po lewej) i pochodnych aniliny (po prawej)

2.6.1. Reakcje charakterystyczne

Pochodne kwasu salicylowego, dzięki obecności w swych strukturach wolnej grupy fenolowej, bądź karboksylowej, wykazują charakter kwasowy. Związki te będą dawały pozytywne reakcje, wskazujące na obecność tych grup funkcyjnych.

W reakcji z roztworem chlorku żelaza(III) związki posiadające wolne grupy fenolowe prowadzą na ogół do purpurowofioletowych produktów o strukturze kompleksowej.



Rys. 66. Tworzenie związków kompleksowych pochodnych kwasu salicylowego z jonami żelaza(III)

Związki, będące estrami lub amidami pod wpływem silnych zasad nieorganicznych ulegają hydrolizie. Mieszaniny po reakcji poddaje się testom na obecność produktów hydrolizy (np. alkoholi, fenoli, amin).

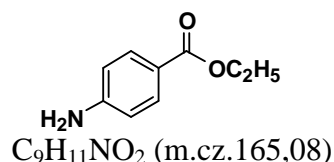
Jako połączenia o charakterze aromatycznym pochodne kwasu salicylowego oraz pochodne aniliny ulegają łatwo substytucjom elektrofilowym (np. bromowaniu), dając często związki krystaliczne o charakterystycznych temperaturach topnienia.

Pochodne aniliny, po przekształceniu w postać z uwolnioną grupą aminową (np. po hydrolizie, o ile jest potrzebna) poddaje się próbom potwierdzającym tożsamość leku, opartym o reakcje charakterystyczne dla aromatycznych pierwszorzędowych ugrupowań aminowych (np. diazowanie i następcze sprzęganie, kondensacje z aldehydami).

2.6.2. Analiza wybranych substancji czynnych

Benzokaina

Ester etylowy kwasu 4-aminobenzoesowego



Właściwości fizyczne

Białe, dość drobne kryształy o silnie gorzkim smaku, temp. topn. 88-91 °C, dobrze rozpuszczalne w etanolu, eterze etylowym, chloroformie, benzenie, bardzo trudno rozpuszczalne w zimnej wodzie.

Chemiczne metody identyfikacji

- Otrzymywanie związków diazowych

Wykonanie próby:

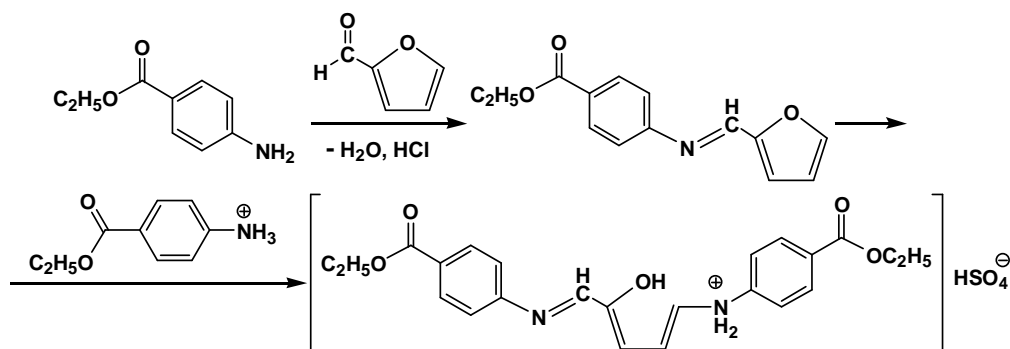
Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10 % kwasu solnego, oziębic na łaźni lodowej, mieszając dodawać powoli 0,2 ml 1 % roztworu NaNO₂ (do pozytywnej próby jodskrobiowej). Następnie, do tak otrzymanego roztworu dodać 3 ml zimnego alkalicznego roztworu 2-naftolu. Powstaje pomarańczowy osad lub pomarańczowe zabarwienie roztworu. W przypadku użycia 1-naftolu powstały barwnik diazowy ma zabarwienie malinowoczerwone.

- Reakcje kondensacji z aldehydami

- Reakcja z furfurałem

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml 10 % roztworu kwasu octowego i dodać 1 ml 2% roztworu furfuralu w kwasie octowym. Powstaje pomarańczowe zabarwienie. Po 2 minutach dodać kroplę 16% kwasu siarkowego. Roztwór zmienia barwę na ciemniejszą.



Rys. 67. Kondensacja benzokainy z furfurałem w środowisku kwaśnym

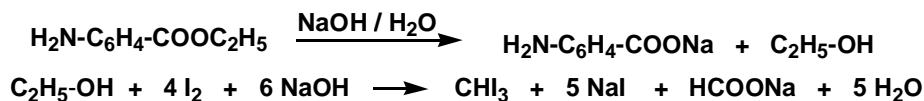
- Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

Wykonanie próby:

Około 0,05 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10% kwasu solnego i dodać 1 ml odczynnika Ehrlicha (roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym). Pojawia się pomarańczowe zabarwienie lub osad od produktu typu zasady Schiffa.

- Reakcja jodoformowa

Benzokaina poddana hydrolizie alkalicznej prowadzi m.in. do alkoholu etylowego, który można wykryć na drodze reakcji jodoformowej.



Wykonanie próby:

Do ok. 0,05 g badanej substancji dodać 1 ml 20% roztworu NaOH, ogrzać do wrzenia, po czym dodawać kroplami roztwór jodu w jodku potasowym do trwałego żółtego zabarwienia. Po krótkim czasie powstaje żółty osad jodoformu o wyczuwalnym charakterystycznym zapachu.

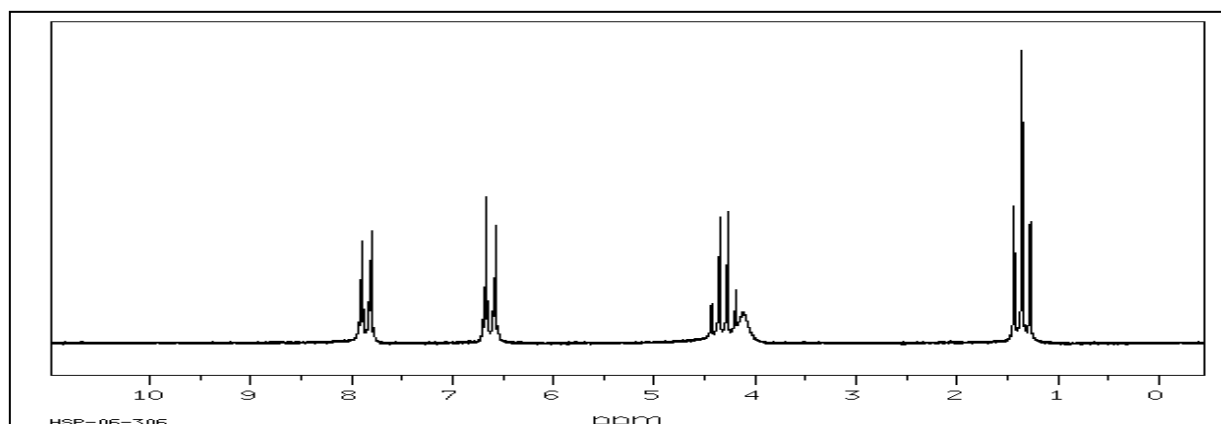
- Reakcja tworzenia kompleksów kwasów hydroksamowych z solami żelaza(III)

Wykonanie próby:

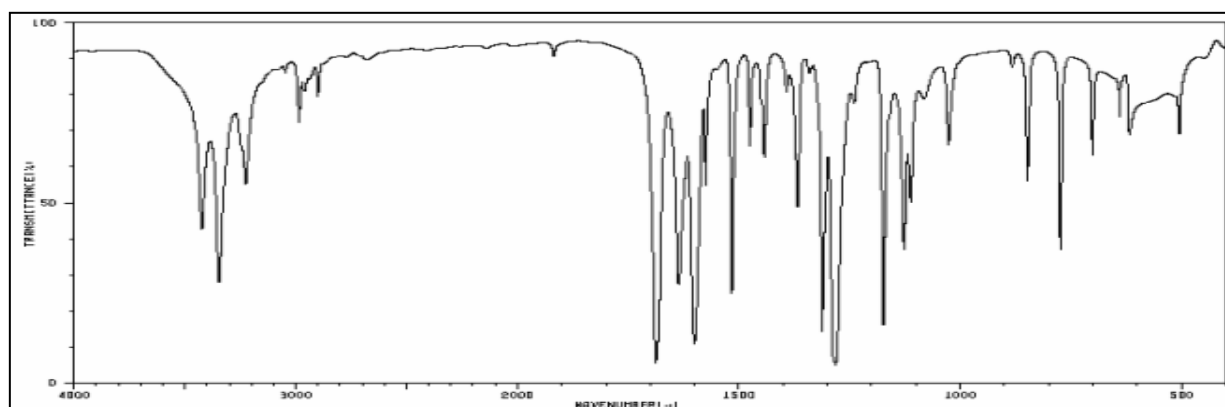
Do ok. 0,05 g badanej substancji dodać 1 ml 0,5 N etanolowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy i 0,2 ml 6N roztworu NaOH, po czym ogrzać mieszaninę do wrzenia. Po ochłodzeniu dodać kroplami 2 ml 1N kwasu solnego, a następnie 2 krople 5% roztworu FeCl₃. Mieszanina przyjmuje czerwono-fioletową barwę.

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



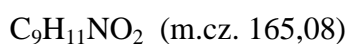
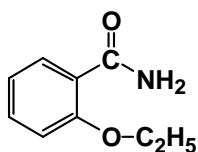
Rys. 68. Widmo ^1H NMR benzokainy (90 MHz, $c = 0.043 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]



Rys.69. Widmo IR benzokainy (pastylka KBr) [18]

Etenzamid

Amid kwasu 2-etoksybenzoesowego



Właściwości fizyczne.

Biały, krystaliczny proszek, dobrze rozpuszczalny w chloroformie, octanie etylu, metanolu, trudno w zimnej wodzie. Temp. topn. 132-134 °C.

Chemiczne metody identyfikacji

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

W próbie tej pod wpływem działania stęż. gorącego kwasu siarkowego ulega rozszczepieniu ugrupowanie eteru alkilowo-arylowego. Utworzona po acydolizie grupa fenolowa daje pozytywną reakcję z solami żelaza(III).

Wykonanie próby:

Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 0,5 ml metanolu, dodać 2 krople 5% wodnego roztworu FeCl_3 . Roztwór nie powinien zabarwić się na fioletowo (odróżnienie od salicylamidu). Jednakże, po dodaniu 0,5 ml stęż. kwasu siarkowego(VI) i ogrzaniu mieszaniny do wrzenia obserwuje się pojawienie zabarwienia ciemnofioletowego.

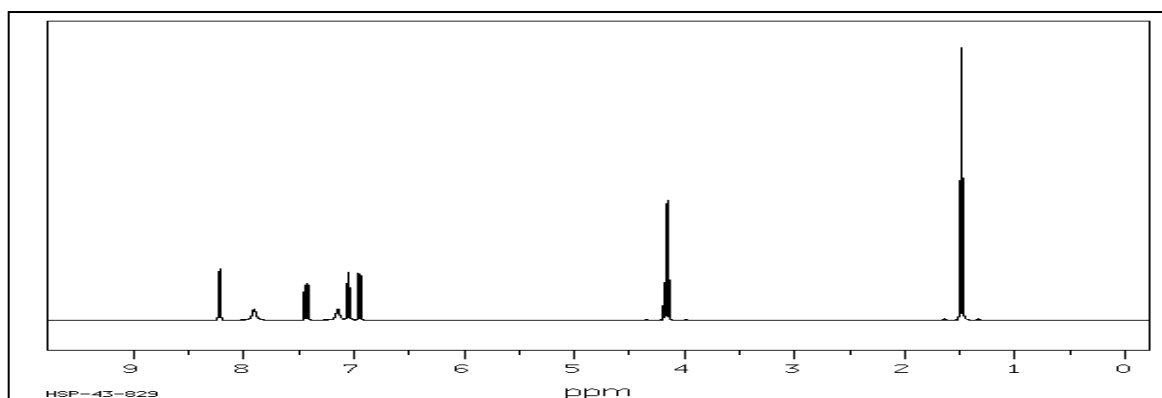
- Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Wykonanie próby:

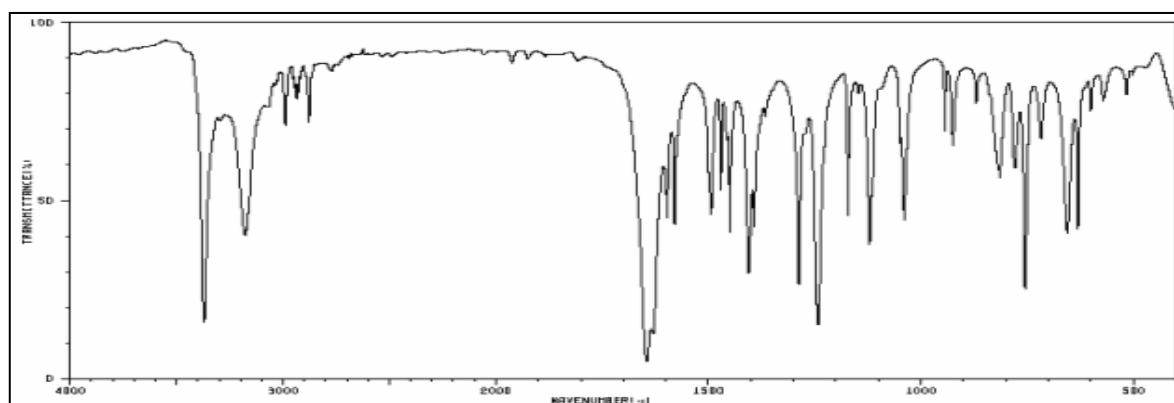
Około 0,02 g badanej substancji zmieszać z 0,3 ml 25% roztworu NaOH i ogrzewać w temp. wrzenia przez ok. 3 minuty. W wyniku hydrolizy wiązania amidowego wydziela się zapach amoniaku. Pary amoniaku barwią uniwersalny papierek wskaźnikowy (zwilżony uprzednio wodą) na kolor niebieski.

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.

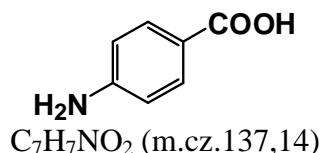


Rys. 70. Widmo ^1H NMR etenzamidu (400 MHz, $c = 0.05 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]



Rys. 71. Widmo IR etenzamidu (pastylka KBr) [18]

Kwas 4-aminobenzoesowy



Właściwości fizyczne.

Bezbarwne, kryształowy, lekko żółknący na powietrzu i pod wpływem światła, temp. topn. 187-187,5 °C, rozpuszczalne w etanolu, octanie etylu, kwasie octowym, słabo w wodzie i eterze etylowym.

Chemiczne metody identyfikacji.

- Otrzymywanie związków diazowych

Wykonanie próby:

Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10% kwasu solnego, oziębić na łaźni lodowej, mieszając dodawać powoli 0,2 ml 1% roztworu $NaNO_2$ (do pozytywnej próby jodoskrobiowej). Następnie, do tak otrzymanego roztworu dodać 3 ml zimnego alkalicznego roztworu 2-naftolu. Powstaje pomarańczowy osad lub pomarańczowe zabarwienie roztworu.

- Reakcje kondensacji z aldehydami

- Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

Wykonanie próby:

Około 0,05 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10% kwasu solnego i dodać 1 ml odczynnika Ehrlicha (roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym). Pojawia się kanarkowy osad produktu kondensacji.

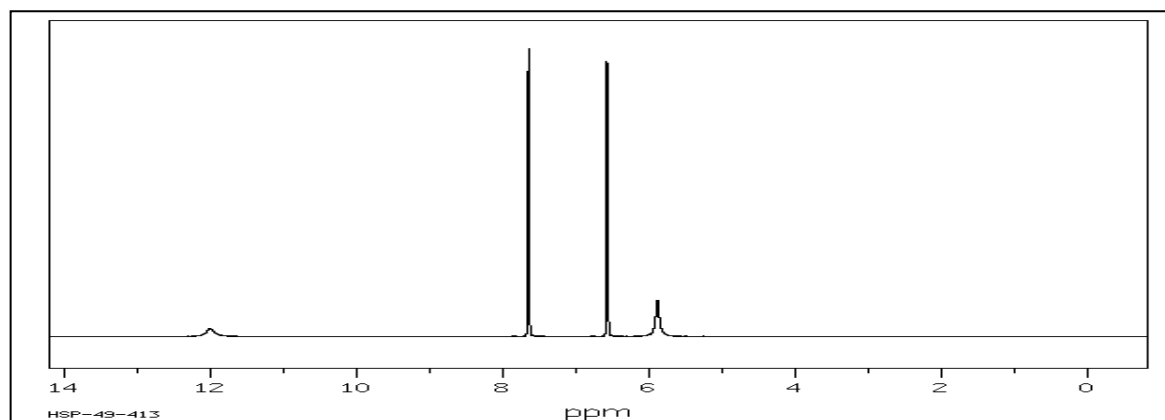
- Reakcja z furfurałem.

Wykonanie próby:

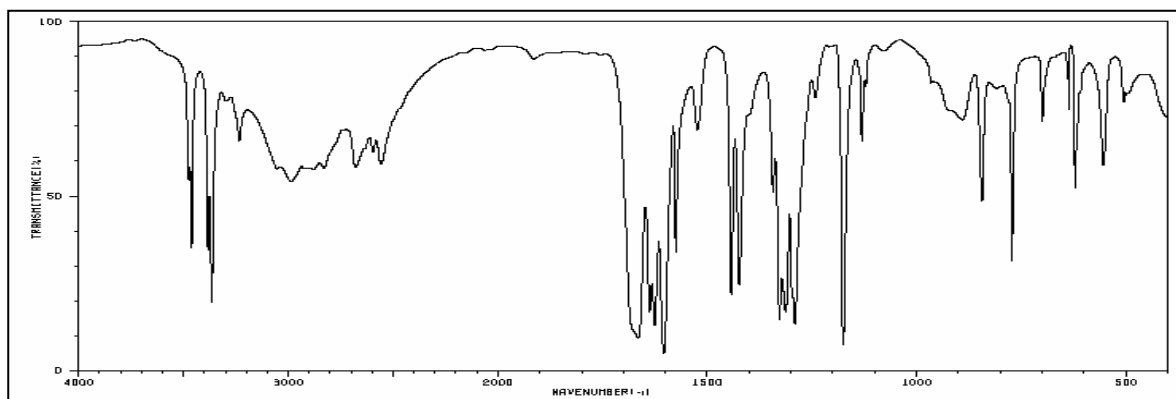
Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml 10% roztworu kwasu octowego i dodać 1 kroplę furfuralu. Powstaje czerwone zabarwienie roztworu. Po 2 minutach dodać 1 kroplę 16% kwasu siarkowego. Roztwór barwi się na ciemnoczerwono od powstałego produktu kondensacji.

Analiza spektralna.

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



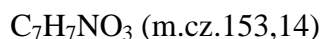
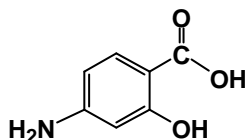
Rys. 72. Widmo 1H NMR kwasu 4-aminobenzoesowego (90 MHz, $c=0.04$ g/0.5 ml $CDCl_3$) [18]



Rys. 73. Widmo IR kwasu 4-aminobenzoesowego (pastylka KBr) [18]

Kwas 4-aminosalicylowy

Kwas 4-amino-2-hydroksybenzoesowy



Właściwości fizyczne

W lecznictwie stosowany w postaci soli sodowej. Bezbarwne, kryształy, lekko żółknące na powietrzu i pod wpływem światła, temp. topn. 144-151 °C (z rozkładem), rozpuszczalne w etanolu, rozcieńczonych roztworach kwasów i zasad, słabo w wodzie i eterze etylowym, praktycznie nierozpuszczalne w benzenie. W podwyższonej temperaturze (powyżej 40 °C) związek łatwo ulega dekarboksylacji, prowadząc do 3-aminofenolu o brunatnoszarym zabarwieniu.

Chemiczne metody identyfikacji

- Otrzymywanie związków diazowych

Wykonanie próby:

Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10% kwasu solnego, oziębic na łaźni lodowej, mieszając dodawać powoli 0,2 ml 1% roztworu $NaNO_2$ (do pozytywnej próby jodoskrobiowej). Następnie, do tak otrzymanego roztworu dodać 3 ml zimnego alkalicznego roztworu 2-naftolu. Powstaje czerwony osad.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 0,5 ml metanolu i dodać 5 kropli 5% roztworu $FeCl_3$. Powstaje czerwono-fioletowe zabarwienie.

- Wyodrębnianie chlorowodoru kwasu 4-aminosalicylowego

Wykonanie próby:

Około 0,25 g badanej substancji rozpuścić w niewielkiej ilości 1N wodnego roztworu $NaOH$, po czym otrzymany roztwór zakwaszyć za pomocą 10% kwasu solnego. Wydzielony osad chlorowodoru kwasu 4-aminosalicylowego odsączyć, przemyć kilkoma małymi porcjami wody i wysuszyć. Otrzymany produkt powinien charakteryzować się temp. topn. 220-222 °C.

- Próba „rezorufinowa”

Wykonanie próby:

Do ok. 20 mg badanej substancji dodaje się 1 ml stęż. H_2SO_4 oraz 1 kryształek $NaNO_2$. Mieszaninę ogrzewa się do wrzenia aż do wystąpienia fioletowego zabarwienia, a następnie mieszaninę wylewa się do 2 ml wody i nasycy amoniakiem. Powstały fioletowy barwnik przechodzi przy wytrząsaniu do alkoholu amylogowego. Warstwa alkoholowa wykazuje zabarwienie karmazynowe z cynobrową fluorescencją.

- Reakcje kondensacji z aldehydami

- Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

Wykonanie próby:

Około 0,05 g badanej substancji rozpuścić w 2 ml 10% kwasu solnego i dodać 1 ml odczynnika Ehrlicha (roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym). Pojawia się pomarańczowoczerwone zabarwienie lub osad produktu kondensacji.

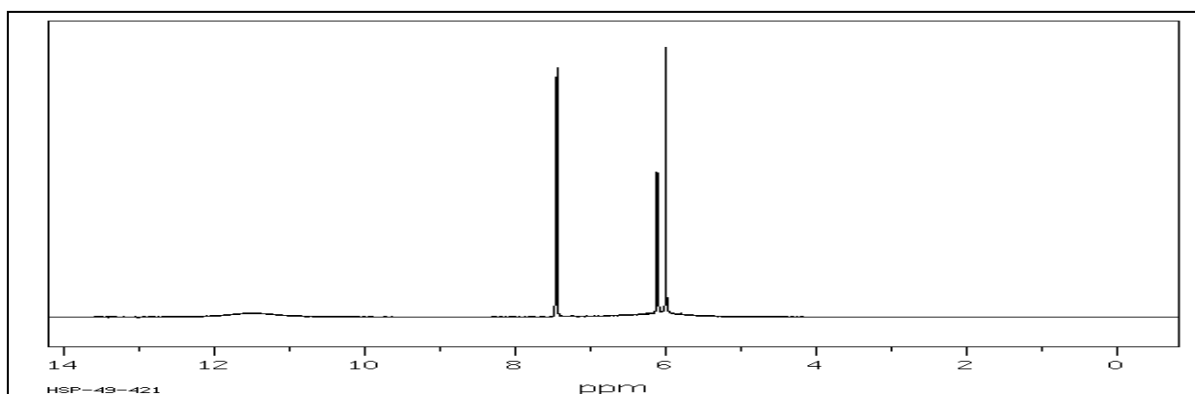
- Reakcja z furfurałem

Wykonanie próby:

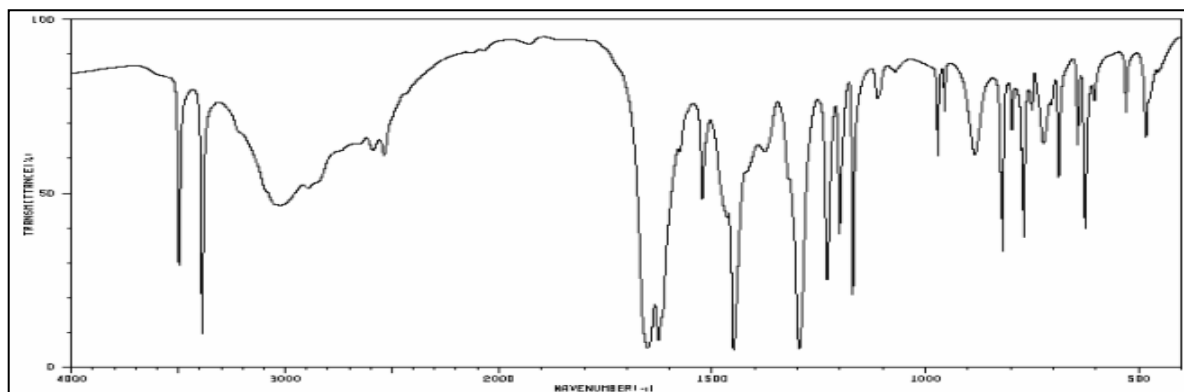
Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml 10 % roztworu kwasu octowego i dodać 1 ml 2 % roztworu furfuralu w kwasie octowym. Powstaje czerwone zabarwienie. Po 2 minutach dodać kroplę 16% kwasu siarkowego. Roztwór barwi się na ciemnoczerwono.

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



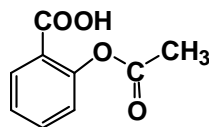
Rys. 74. Widmo 1H NMR kwasu 4-aminosalicylowego (400 MHz, $c = 0.04$ g / 0.5 ml $DMSO-d_6$) [18]



Rys. 75. Widmo IR kwasu 4-aminosalicylowego (KBr) [18]

Kwas acetylosalicylowy

Kwas 2-acetoksybenzoesowy



C₉H₈O₄ (m.cz. 180,16)

Właściwości fizyczne

Krystaliczny, biały związek o lekkim zapachu kwasu octowego, charakteryzujący się temp. topn. 134-137 °C. Substancja rozpuszcza się w etanolu, chloroformie, eterze etylowym, jest trudno rozpuszczalna w wodzie.

Chemiczne metody identyfikacji

Kwas acetylosalicylowy dość łatwo ulega hydrolizie w wodzie i pod wpływem wodnych roztworów zasad. Po hydrolizie wykrywa się obecność kwasu salicylowego i kwasu octowego.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III) po hydrolizie

Reakcja jest charakterystyczna dla grupy fenolowej.

Wykonanie próby:

Okolo 0,05 g badanej substancji zadać 5 ml wody i ogrzewać w temp. wrzenia przez ok. 1 min. Po ochłodzeniu dodać 1 kroplę 5% roztworu FeCl₃. Obserwuje się ciemnofioletowe zabarwienie od powstałego związku kompleksowego.

- Reakcja hydrolizy

Wykonanie próby:

Okolo 0,2 g badanej substancji rozpuścić w 5 ml 1N roztworu wodnego NaOH, ogrzewać w temp. wrzenia ok. 1 min., ochłodzić, po czym całość zakwaszić za pomocą 0,5 M H₂SO₄. Wydzielony osad kwasu salicylowego odsączyć, przemyć niewielką ilością wody i po wysuszeniu zmierzyć jego temp. topnienia. Związek topnieje w zakresie 158-161 °C.

- Reakcja z tlenkiem wapnia i chlorkiem żelaza(III)

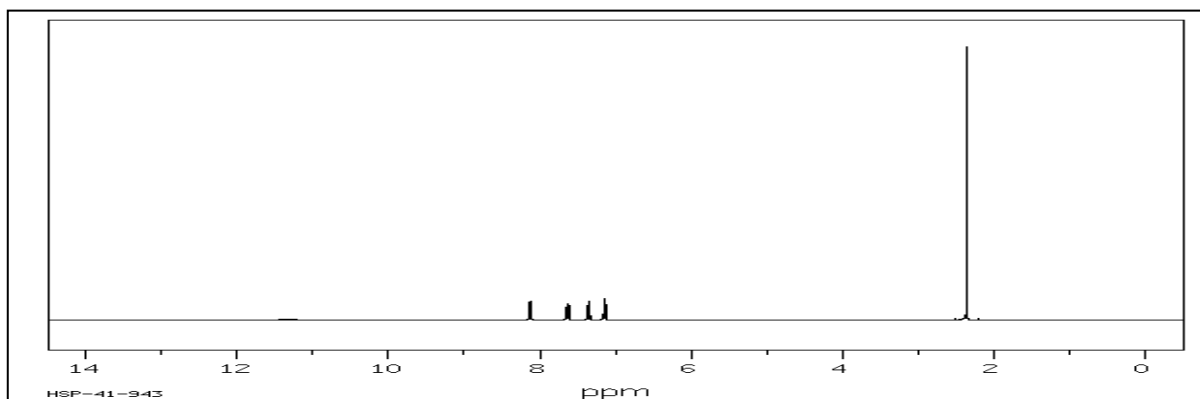
W wyniku reakcji z zawiesiną tlenku wapnia w wodzie kwas acetylosalicylowy hydrolizuje do kwasu salicylowego, który tworzy nierozpuszczalną w wodzie sól wapniową. Związek ten, jak też i tworzący się tu octan wapnia w dalszej reakcji z jonami żelaza(III) dają barwne produkty.

Wykonanie próby:

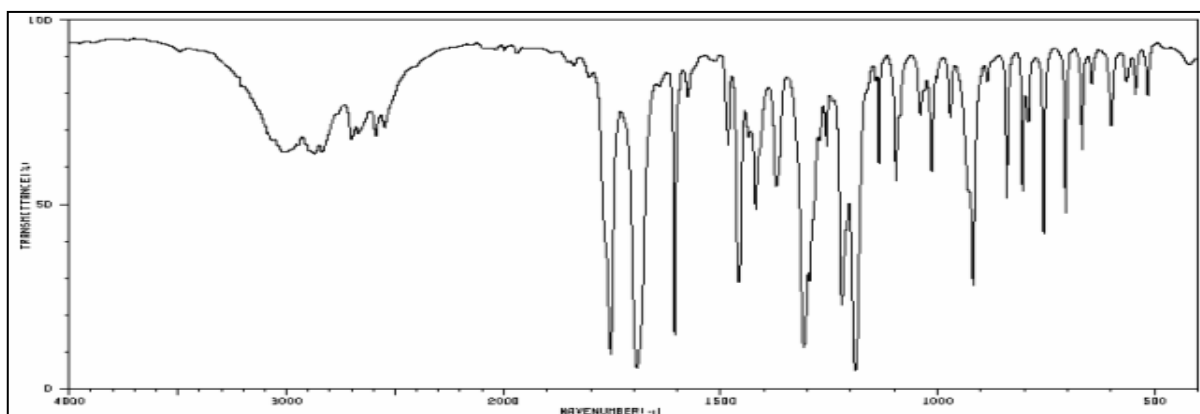
Okolo 0,2g badanej substancji rozetrzeć w moździerzu z 0,5 g tlenku wapnia z dodatkiem 2 ml wody, po czym mieszaninę przesączyć. Do osadu i do przesączu dodać po kropli 5% roztworu FeCl₃. Osad, na skutek obecności w nim salicylanu barwi się na fioletowo, a roztwór przyjmuje kolor czerwony od powstałego octanu żelaza(III).

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



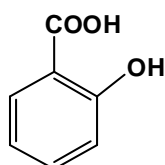
Rys. 76. Widmo ^1H NMR kwasu acetylosalicylowego (400 MHz, $c = 0.04 \text{ g} / 0.5 \text{ ml CDCl}_3$) [18]



Rys. 77. Widmo IR kwasu acetylosalicylowego (pastylka KBr) [18]

Kwas salicylowy

Kwas 2-hydroksybenzoesowy



$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ (m.cz. 138,12)

Właściwości fizyczne

Krystaliczny, biały związek, charakteryzujący się temp. topn. $156\text{-}177\text{ }^\circ\text{C}$. Substancja rozpuszcza się w etanolu, chloroformie, eterze etylowym, acetonie, jak również w wodnych roztworach NaOH, NaHCO_3 i amoniaku, jest trudno rozpuszczalna w wodzie.

Chemiczne metody identyfikacji

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Około 0,05 g badanej substancji rozpuścić w 0,5 ml etanolu. Do 5 ml wody dodać 1 kroplę tego roztworu, po czym 1 kroplę 5% roztworu FeCl_3 . Obserwuje się powstanie trwałego niebieskofioletowego zabarwienia, przechodzącego po rozcieńczeniu w czerwono-fioletowe.

- Reakcja z azotanem(III) sodu

Wykonanie próby:

Około 0,25g badanej substancji umieścić w probówce, dodać 1 ml stęż. kwasu siarkowego(VI), po czym całość ochłodzić na łaźni lodowej. Do ochłodzonej, wstrząsanej mieszaniny dodawać wolno kroplami 10% roztwór NaNO₂. Roztwór przybiera kolejno następujące barwy: pomarańczowożółtą, pomarańczowoczerwoną, krwistoczerwoną z odcieniem zielonym i ostatecznie ciemnoczerwoną (barwa soku czarnych porzeczek).

- Reakcja z wanadanem(V) amonowym (odczynnikiem Mandelina)

Wykonanie próby:

Kilka miligramów badanej substancji zadać 0,5 ml wody, ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej, sporadycznie mieszając przez ok. 2 minuty. Do 2-3 kropli tego roztworu dodać 1 ml stęż. H₂SO₄, po czym po ochłodzeniu dodać kilka kropli odczynnika Mandelina. Po kilku sekundach powstaje przejściowe zabarwienie niebieskie.

- Reakcja z odczynnikiem Millona

Przemiany kwasu salicylowego pod wpływem odczynnika Millona polegają na nitrozowaniu pierścienia aromatycznego w pozycji orto w stosunku do położenia grupy hydroksylowej, a następnie utworzeniu czerwono zabarwionego związku kompleksowego z jonami rtęci(II). Struktura powstającego kompleksu jest analogiczna do przedstawionej na Rys. 137 (patrz dalej - rozdz. VI.9.).

Wykonanie próby:

Kilka miligramów badanej substancji zadać 1 ml wody, ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej, sporadycznie mieszając przez ok. 2 minuty, po czym dodać kilka kropli odczynnika Millona. Po kilku sekundach powstaje przejściowe zabarwienie czerwone.

- Reakcja z aldehydem mrówkowym w stęż. kwasie siarkowym (odczynnik Marquisa)

Wykonanie próby:

Kilka miligramów badanej substancji rozpuścić w 2 kroplach stęż. kwasu siarkowego(VI), po czym dodać 1 kroplę odczynnika Marquisa. Mieszanina przyjmuje zabarwienie różowe.

- Reakcja z siarczanem 4-nitrobenzenodiazoniowym

Wykonanie próby:

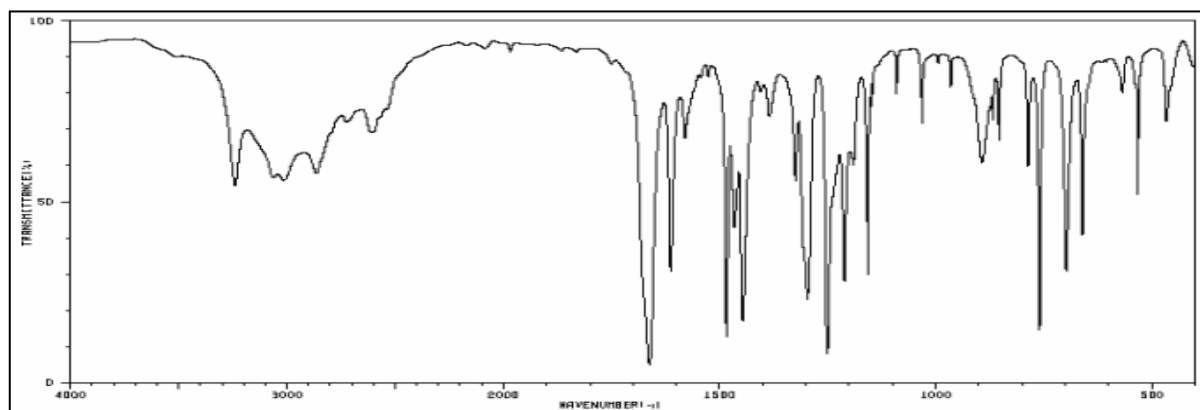
Kilka miligramów badanej substancji rozpuścić w 10 ml wody z dodatkiem 2 kropli 10% roztworu NaOH, po czym dodawać kroplami roztwór wcześniej przygotowanego roztworu kwasu p-nitrobenzenodiazoniowego (patrz dalej – „Przygotowanie odczynnika”) aż do wystąpienia, a następnie zaniku czerwonego zabarwienia. Po wyekstrahowaniu otrzymanego produktu za pomocą 10 ml eteru etylowego oddzieloną warstwę eterową wytrząsa się z 20 kroplami 10% roztworu NaOH. Warstwa eterowa pozostaje bezbarwna, natomiast warstwa wodna przyjmuje kolor czerwony.

Przygotowanie odczynnika:

Rozpuścić 0,5 g p-nitroaniliny w 5 ml wody z dodatkiem 1ml stęż. H₂SO₄, dodać dodatkowo 5 ml wody, oziębicić na łaźni lodowej, po czym mieszając wolno wkropić zimny roztwór 0,3 g NaNO₂ w 5 ml wody. Po wymieszaniu roztwór dopełnić wodą do ok. 50 ml i przesączyć, o ile to konieczne. Odczynnik przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

Analiza spektralna

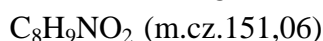
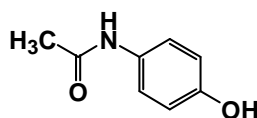
Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



Rys. 78. Widmo IR kwasu salicylowego(pastyłka KBr) [18]

Paracetamol

N-(4-Hydroksyfenylo)-acetamid



Właściwości fizyczne

Biały, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczalny w 95% etanolu, acetonie, dość trudno rozpuszczalny w wodzie, praktycznie nierozpuszczalny w eterze etylowym. Temp. topn. 178-182 °C.

Chemiczne metody identyfikacji

Wyodrębniony z masy leku paracetamol należy poddać niżej zaproponowanym próbom tożsamościowym.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Około 0,05 g badanej substancji wytrząsnąć z 5 ml gorącej wody i dodać 0,1 ml 1% roztworu $FeCl_3$. Roztwór zabarwia się na niebieskofioletowo od powstałej soli kompleksowej.

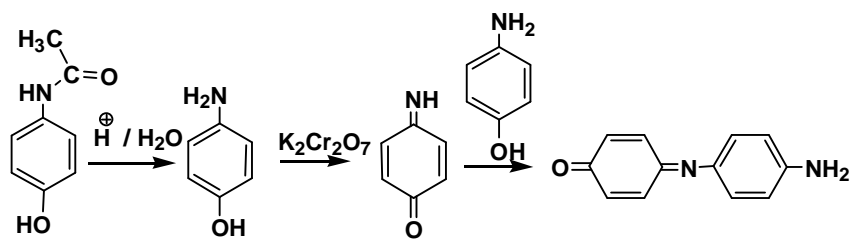
- Reakcje po hydrolizie w środowisku kwaśnym

Wykonanie próby:

Około 0,2 g badanej substancji ogrzewać na łaźni wodnej 2 min. z 5 ml 36% kwasu solnego, dodać 20 ml wody, ochłodzić i przesączyć. Otrzymany roztwór (A), zawierający 4-aminofenol, przeznaczyć do poniższych prób jakościowych.

- Reakcja utleniania

Reakcja polega na utlenianiu powstałego po hydrolizie kwasowej 4-acetyloaminofenolu do monoimino-1,4-benzochinonu. Obserwowane jako efekt reakcji fioletowe zabarwienie jest wynikiem powstania produktu jego kondensacji z drugą cząsteczką 4-aminofenolu.



Rys. 79. Utlenianie produktu kwasowej hydrolizy paracetamolu

Wykonanie próby:

Do ok. 10 ml roztworu (A) dodać 0,1 ml 0,5% roztworu chromianu (VI) potasu. Powstaje powoli fioletowe zabarwienie, nie przechodzące w czerwone (odróżnienie od fenacetyny).

○ Otrzymywanie związków diazowych

Wykonanie próby:

Około 1 ml roztworu (A) oziębić na łaźni lodowej, mieszając dodawać powoli 0,2 ml 1% roztworu NaNO_2 (do pozytywnej próby jodaskrobiowej). Następnie, do tak otrzymanego, mieszanego roztworu dodać kroplami 3 ml zimnego alkalicznego roztworu 2-naftolu. Powstaje ciemnoczerwony osad lub takie samo zabarwienie roztworu.

Przygotowanie odczynnika:

Rozpuścić 0,5 g 2-naftolu w 4 ml 8,5% roztworu NaOH i uzupełnić wodą do 10 ml. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

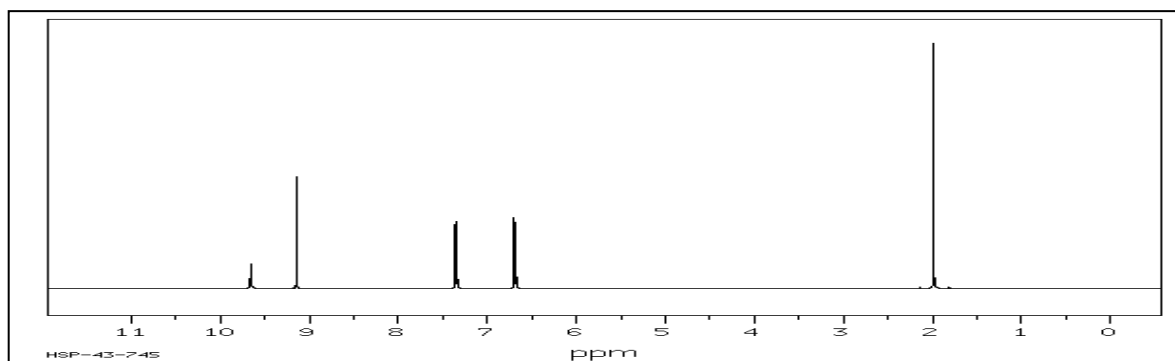
○ Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha

Wykonanie próby:

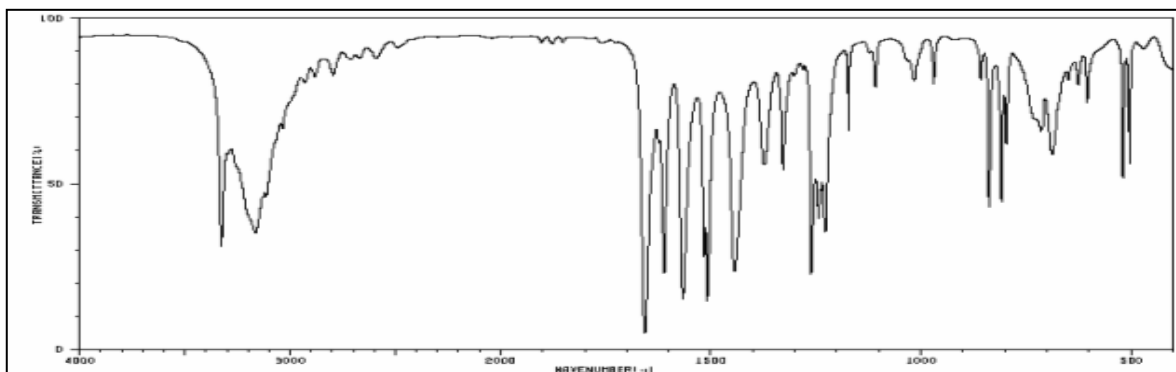
Do około 1 ml roztworu (A) lub ok. 25 mg substancji stałej, otrzymanej po odparowaniu do sucha roztworu (A) dodać 1 ml odczynnika Ehrlicha (1% roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym). Całość dokładnie wymieszać bagietką. Pojawia się żółte zabarwienie lub osad od produktu kondensacji.

Analiza spektralna

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z odpowiednimi widmami wzorcowymi.



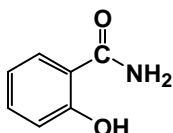
Rys. 80. Widmo ^1H NMR paracetamolu (400 MHz, $c = 0.034 \text{ g} / 0.5 \text{ ml DMSO-d}_6$) [18]



Rys. 81. Widmo IR paracetamolu (pastylka KBr) [18]

Salicylamid

Amid kwasu salicylowego, o-hydroksybenzamid



$C_7H_7NO_2$ (m.cz. 137,14)

Właściwości fizyczne

Biały, krystaliczny proszek, rozpuszczalny w roztworach KOH, NaOH, amoniaku, Na_2CO_3 , etanolu, słabo w chloroformie i eterze, bardzo trudno w wodzie. Temp. topn. 139 - 142 °C.

Chemiczne metody identyfikacji

Wyodrębniony z masy leku salicylamid należy poddać niżej podanym próbom tożsamościowym używając do nich substancji stałej.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

Około 0,01 g badanej substancji rozpuścić w 0,5 ml etanolu 95%, dodać 1-2 krople 5% roztworu $FeCl_3$. Roztwór zabarwia się na fioletowo od powstałej soli kompleksowej.

- Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji mieszać z 0,3 ml 25% roztworu NaOH i ogrzewać w temp. wrzenia przez ok. 3 minuty. W wyniku hydrolizy wiązania amidowego wydziela się zapach amoniaku. Pary amoniaku barwią uniwersalny papierek wskaźnikowy (zwilżony uprzednio wodą) na kolor niebieski.

- Reakcja hydrolizy kwasowej

Wykonanie próby:

Do około 0,1 g badanej substancji dodać 5 ml 20% kwasu solnego i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną w temp. wrzenia przez ok. 30 min. Następnie dodać 15 ml wody i ochłodzić. Wydziela się biały osad kwasu salicylowego o temp. topn. 156–158 °C, którą należy zmierzyć.

- Reakcja bromowania

Wykonanie próby:

Okolo 0,2 g badanej substancji rozpuścić w 5 ml etanolu, dodać 15ml wody i kroplami wodę bromową do trwałego zabarwienia roztworu. Powstały osad odsączyć, przemyć wodą i przekrystalizować z 20%-ego wodnego roztworu etanolu. Po wysuszeniu nad P_2O_5 (eksykator próżniowy) zmierzyć temperaturę topnienia utworzonej dibromopochodnej salicylamidu (temp. topn. 183-185 °C).

- Reakcja z kwasem diazobenzenosulfonowym

Wykonanie próby:

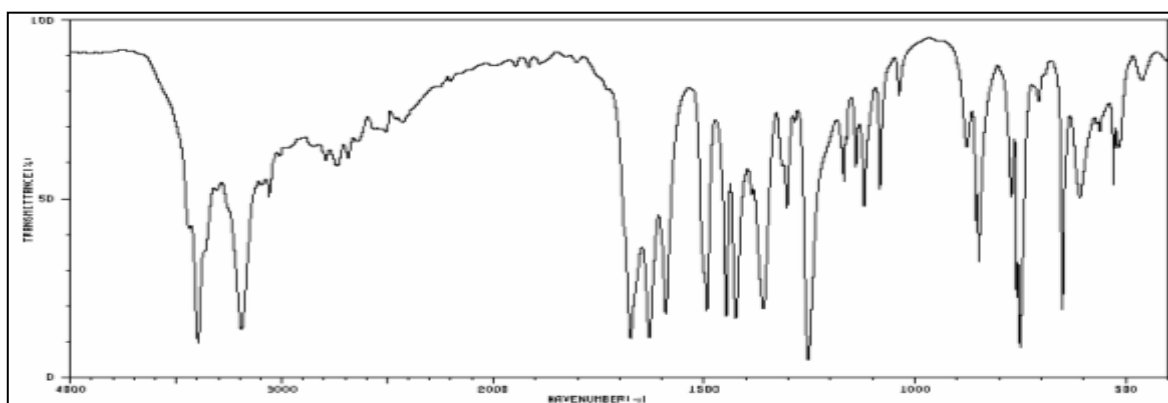
Okolo 10 mg badanej substancji rozpuścić w 5 ml mieszaniny 1 ml 5% roztworu Na_2CO_3 i 4 ml wody, ochłodzić, po czym dodać kroplami, intensywnie mieszając, 1 ml zimnego, świeżo sporządzonego roztworu zawierającego kwas 4-diazobenzenosulfonowy. Wydziela się żółty osad (lub roztwór przyjmuje żółtą barwę) produktu elektrofilowej substytucji kwasu diazobenzenosulfonowego do pierścienia aromatycznego salicylamidu.

Przygotowanie odczynnika:

Okolo 0,2 g kwasu sulfanilowego rozpuścić w 10 ml wody, ochłodzić na łaźni lodowej do ok. 5 °C, po czym mieszając dodawać powoli 1 ml 10% roztworu $NaNO_2$.

Analiza spektralna

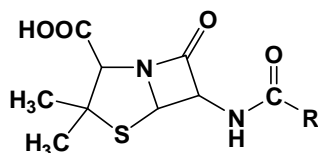
Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z dostępnymi widmami wzorcowymi.



Rys. 82. Widmo IR salicylamidu (pastylka KBr) [18]

2.7. Związki β -laktamowe

Związki lecznicze o budowie β -laktamowej to na ogół antybiotyki, które wywodzą się od penicyliny oraz cefalosporyny. Posiadają w swej strukturze układ dwóch skondensowanych pierścieni heterocyklicznych, gdzie jednym z nich jest czteroczłonowy układ β -laktamowy (zwany inaczej układem azacyklobutanonu lub azetydynonu), zaś drugim – pięcio- lub sześcioczłonowy układ cykliczny, zawierający atom siarki, tlenu lub/i wiązanie nienasycone węgiel-węgiel. W pochodnych penicyliny dwupierścieniowy układ, zwany penamem, zbudowany jest czteroczłonowego pierścienia tiazolidynowego i czteroczłonowego β -laktamowego.

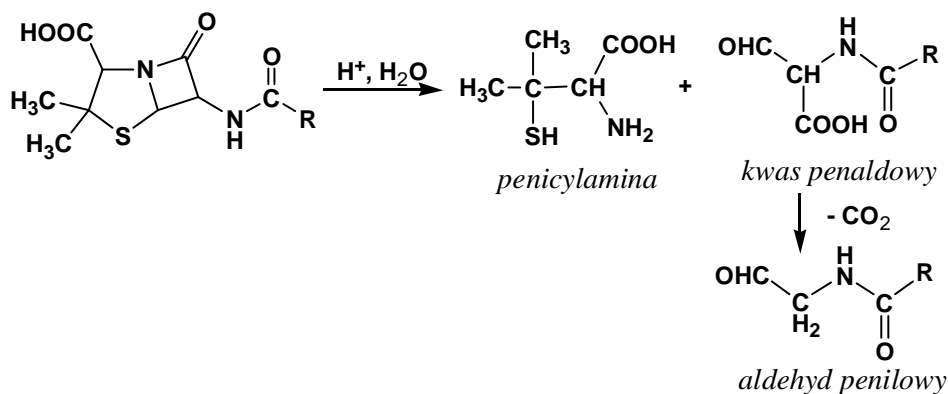


Rys. 83. Wzór ogólny pochodnych penicyliny

2.7.1. Reakcje charakterystyczne związków o budowie β -laktamowej

Testy potwierdzające tożsamość tej grupy związków obejmują kilka reakcji ogólnych. Jako kwasy jednokarboksylowe, związki te tworzą sole, m.in. z określonymi zasadami organicznymi dając w odpowiednich rozpuszczalnikach krystaliczne, trudno rozpuszczalne osady.

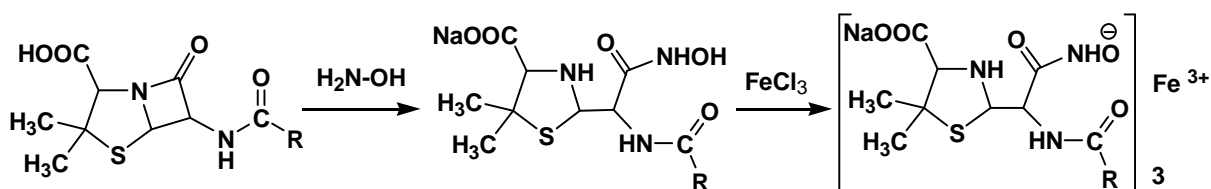
W środowisku rozcieńczonych gorących kwasów mineralnych penicyliny ulegają rozkładowi do penicylaminy i kwasu penaldowego, który dalej dekarboksyluje, dając aldehyd penilowy. Produkty hydrolizy identyfikuje się za pomocą reakcji charakterystycznych dla aldehydów i aminokwasów.



Rys. 84. Rozkład pochodnych penicylin pod wpływem rozcieńczonych kwasów mineralnych w podwyższonej temperaturze

Penicyliny w środowisku stęż. kwasu siarkowego w reakcjach z fenolami ulegają kondensacjom, dając produkty o charakterystycznych zabarwieniach. Reakcję tę daje produkt rozkładu penicylin – aldehyd penilowy.

W środowisku zasadowym naprężony pierścień β -laktamowy ulega łatwo rozerwaniu, co umożliwia tworzenie kwasów hydroksamowych w reakcji z działającą jako nukleofil hydroksyloaminą. Kwasy hydroksamowe z solami żelaza(III) dają czerwono-fioletowe połączenia.



Rys. 85. Reakcja rozszczepiania pierścienia β -laktamowego w pochodnych penicylin pod wpływem nukleofili (tutaj – hydroksyloaminy) i identyfikacja powstałego produktu

Wyżej wspomniane metody identyfikacyjne są wspólne dla całej grupy związków o strukturze penicylin. Poszczególne związki mogą też być dodatkowo identyfikowane poprzez specyficzne testy, charakterystyczne tylko dla nich samych, o ile grupa R zawiera w swej strukturze dodatkowe grupy funkcyjne czy inne nietypowe układy, a także w przypadkach obecności w leku niektórych zasad organicznych jako jonów parujących (np. prokaina w benzylopenicylinie prokainowej).

2.7.2. Analiza leków o strukturze β -laktamowej

- Reakcja z chlorowodorkiem hydroksyloaminy

Wykonanie próby:

Okolo 50 mg badanej substancji rozpuścić w 1 ml 2 N roztworu NaOH, dodać 0,15 g chlorowodoru hydroksyloaminy i odstawić na 5 minut. Następnie dodać 1 ml 0,1 N kwasu solnego i kroplę 1% roztworu FeCl_3 . Mieszanina reagująca przyjmuje barwę czerwono-fioletową od powstającego związku kompleksowego kwasu hydroksamowego z jonami Fe^{3+} .

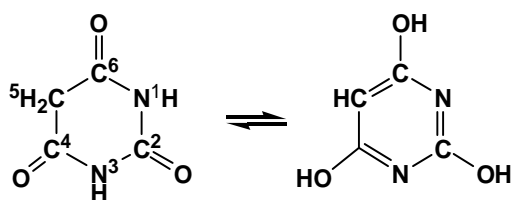
- Reakcje kondensacji z fenolami

Wykonanie próby:

Do ok. 50 mg badanej substancji dodać 10 mg rezorcyny, 0,5 ml stęż. kwasu siarkowego (96%) i ogrzewać. Powstaje czerwone zabarwienie, pochodzące od produktu kondensacji. W reakcji z 2-naftolem powstający produkt ma zabarwienie zielone.

2.8. Barbiturany

Barbiturany, zwane też często pochodnymi malonylomocznika (kwasu barbiturowego), wykazują jednocześnie charakter diimidu, jak i aromatycznego trifenolu.



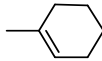
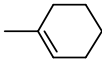
Kwas barbiturowy

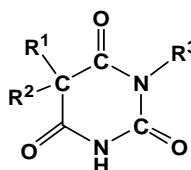
Rys. 86. Struktura kwasu barbiturowego

Dość mocny kwasowy charakter kwasu barbiturowego determinowany jest oddysocjowaniem protonów grup iminowych lub grup enolowych. Wprowadzenie podstawników w pozycje C5 pierścienia znosi jego aromatyczność oraz wyraźnie osłabia kwasowość cząsteczki. Na stopień kwasowości C5-podstawionych barbituranów wpływa

wielkość i znak efektu indukcyjnego, jaki wywołują te podstawniki. Barbital, posiadający przy atomie C5 dwa podstawniki etylowe (silny efekt +I) jest najsłabszym kwasem w tej grupie związków, a fenobarbital z podstawnikiem fenylovym w tym miejscu (rezonansowa stabilizacja anionu), to stosunkowo najmocniejszy kwas wśród barbituranów. Ponadto, obecność na jednym z atomów azotu podstawników elektrodonorowych dodatkowo obniża kwasowość tych pochodnych.

Tabela 3. Kwas barbiturowy i jego wybrane pochodne

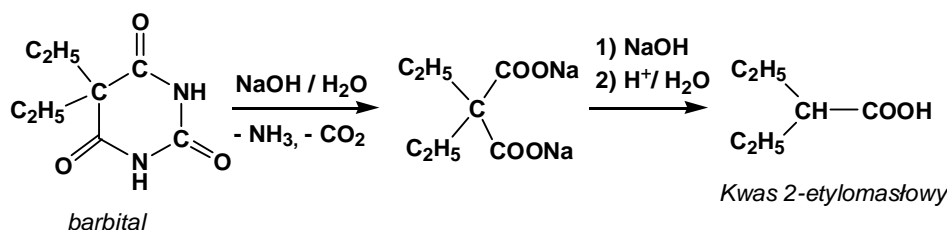
	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>
<i>Kwas barbiturowy:</i>	-H	-H	-H
<i>Barbital:</i>	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-H
<i>Fenobarbital:</i>	-C ₂ H ₅	-C ₆ H ₅	-H
<i>Heksoarbital:</i>	-CH ₃		-CH ₃
<i>Cyklobarbital:</i>	-C ₂ H ₅		-H
<i>Allolobarbital:</i>	-CH ₂ -CH=CH ₂	-CH ₂ -CH=CH ₂	-H



2.8.1. Reakcje charakterystyczne barbituranów

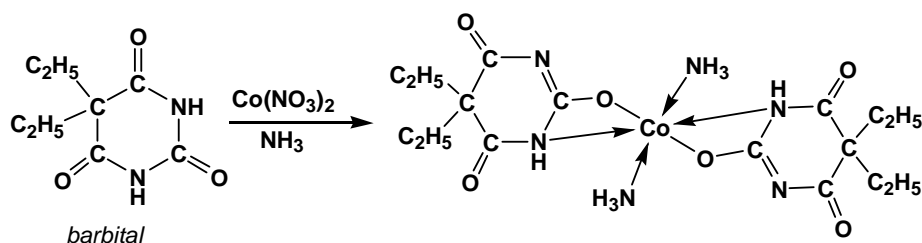
Analiza jakościowa barbituranów sprowadza się do identyfikacji układu, a następnie wykorzystania reakcji odróżniających. Próbami świadczącymi o obecności barbituranów są: rozpuszczalność (dobra w etanolu 95% i roztworach wodorotlenków potasowców, eterze i wrzącej wodzie, słaba w chloroformie i zimnej wodzie), rozkład w środowisku silnie zasadowym oraz reakcje Parri'ego i Zwikkera. Rozróżnianiu poszczególnych barbituranów mogą służyć reakcje pierścienia aromatycznego, układów wiązań nienasyconych oraz grup *N*-metylowych.

Pochodne kwasu barbiturowego stapiane ze stałym wodorotlenkiem sodowym (także potasowym) lub ogrzewane z jego stężonym roztworem ulegają rozkładowi do odpowiednio podstawionych na atomie C2 pochodnych kwasu octowego. Reakcja przebiega poprzez stadium utworzenia pochodnej kwasu malonowego z wydzieleniem amoniaku i dwutlenku węgla. Po zakwaszeniu rozcieńczonym kwasem siarkowym wydziela się charakterystyczny zapach kwasu organicznego, będącego ostatecznym produktem reakcji.



Rys. 87. Rozkład pochodnych kwasu barbiturowego pod wpływem ogrzewania ze stałym wodorotlenkiem sodowym (lub jego stężonym roztworem)

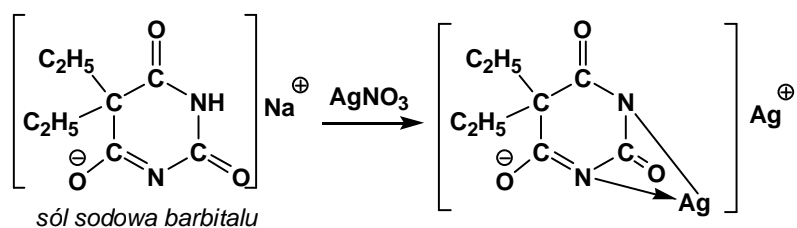
Barbiturany z jonami kobaltu(II) (tzw. **reakcja Parri**) lub miedzi(II) (tzw. **reakcja Zwickera**) w obecności zasad (np. pirydyny, amoniaku lub piperydyny) i środowisku bezwodnym tworzą barwne związki kompleksowe. Reakcja z jonami kobaltu(II) jest charakterystyczna nie tylko dla barbituranów, ale także dla pochodnych hydantoin, związków purynowych (np. teofiliny, teobrominy) oraz sulfonamidów.



Rys. 88. Reakcja Parri [3]

W wyniku reakcji Zwickera pochodne kwasu barbiturowego przekształcają się w związki kompleksowe o zabarwieniu fioletowym. Reakcja jest także charakterystyczna dla pochodnych hydantoiny (kompleksy o zabarwieniu niebieskim) oraz tiouracyli i pochodnych kwasu tiobarbiturowego (związki kompleksowe zielone). Struktura wszystkich produktów tej reakcji jest analogiczna do produktów reakcji Parri.

Sole sodowe pochodnych kwasu barbiturowego tworzą po zadaniu ich wodnymi roztworami AgNO_3 lub HgCl_2 białe osady, które łatwo rozpuszczają się w 10% wodnym roztworze amoniaku.



Rys. 89. Tworzenie soli srebrowych przez pochodne kwasu barbiturowego [3]

2.8.2. Testy analityczne barbituranów

- Rozkład pod wpływem wodorotlenków potasowców

Wykonanie próby:

Do ok. 0,05 g barbitalu dodać 0,5 ml stęż. (tj. co najmniej 50%) roztworu wodnego NaOH (lub niewielką ilość stałego NaOH), po czym silnie ogrzać mieszaninę reagującą (w przypadku przeprowadzania reakcji w fazie stałej – stopić). Wydziela się zapach amoniaku, barwiąc umieszczony u wylotu probówki wilgotny uniwersalny papierek wskaźnikowy na niebiesko. Po zakwaszeniu ogrzewanej kilka minut mieszaniny za pomocą rozcieńczonego H_2SO_4 pojawia się wyczuwalny nieprzyjemny zapach kwasu 2-etylomastowego.

- Reakcja z solami kobaltu(II) (reakcja Parri)

Wykonanie próby:

Ok. 0,05 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml metanolu, dodać kroplę 1% metanolowego roztworu $Co(NO_3)_2$ i kroplę 10% roztworu NH_3 . Powstaje czerwono-fioletowe zabarwienie. Obecność wody w stężeniu powyżej 5% w środowisku przeszkadza prawidłowemu przebiegowi tej reakcji (tworzą się niebiesko zabarwione produkty hydrolizy o nieokreślonej strukturze).

- Reakcja z solami miedzi(II) (reakcja Zwickera)

Wykonanie próby:

Ok. 1-2 mg badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać 1-2 krople 1% roztworu $CuSO_4$ oraz 0,5 ml roztworu sporządzonego wcześniej z dodania 1 kropli pirydyny do 1 ml $CHCl_3$. Po skłóceniu mieszaniny warstwa chloroformowa w przypadku obecności barbituranów barwi się na fioletowo.

- Reakcja tworzenia soli srebra lub rtęci(II)

Wykonanie próby:

Ok. 50 mg badanej substancji wytrząsnąć z 2,5 ml wody z dodatkiem 1 kropli 15% roztworu NaOH. Po ok. 2 minutach mieszaninę przesączyć, pobrać ok. 1 ml przesącza i zadać go 1-2 kroplami 2% roztworu $AgNO_3$ lub 1-2 kroplami 5% roztworu $HgCl_2$. Wytrąca się biały osad, który powinien rozpuścić się na zimno w niewielkiej ilości 10% roztworu amoniaku.

2.8.3. Reakcje rozróżniające poszczególne barbiturany

- Reakcje pierścienia fenyłowego

- Reakcja z azotanem(III) sodu

Wykonanie próby:

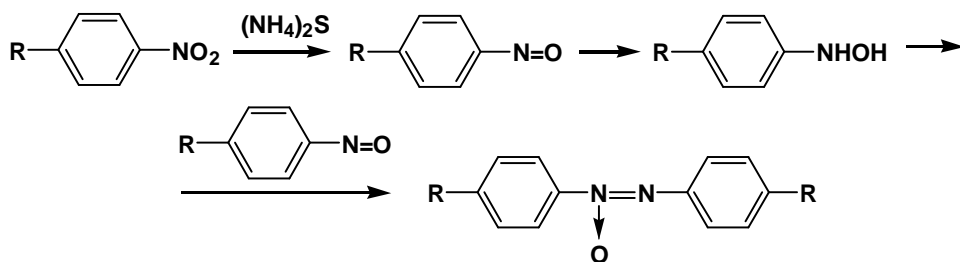
Do 0,05 g badanej substancji dodać 1 ml stęż. kwasu siarkowego(VI), po czym 5 mg azotanu(III) sodu. Lekko ogrzać. Powstaje żółte zabarwienie od tworzącej się nitropochodnej.

- Reakcja nitrowania i tworzenia pochodnej azoksybenzenu

Pierścień fenyłowy w odpowiednich pochodnych kwasu barbiturowego na wstępie niniejszej próby ulega nitrowaniu pod wpływem azotanu(V) sodu w środowisku stężonego kwasu siarkowego(VI). Redukcja grupy nitrowej powstałego produktu za pomocą siarczku amonu w środowisku alkalicznym prowadzi poprzez pochodną nitrozową i hydroksyloaminową do produktu ich kondensacji – pochodnej azoksybenzenowej kwasu barbiturowego.

Wykonanie próby:

Do 0,05 g badanej substancji dodać 1 ml stęż. kwasu siarkowego(VI), po czym 5 mg azotanu(V) sodu i lekko ogrzać. Powstaje żółte zabarwienie. Po ochłodzeniu dodać 1,5 ml wody i kroplami 15% roztworu amoniaku do odczynu alkalicznego. Mieszaninę ogrzewać na łaźni wodnej kilka minut, ochłodzić i „podwarstwzić” kilkoma kroplami siarczku amonu. Tworzy się brunatny pierścień.



Rys. 90. Przekształcanie 5-fenylopodstawionych pochodnych kwasu barbiturowego w pochodne azoksybenzenu

- Reakcje na obecność układów nienasyconych

- Reakcja bromowania

Wykonanie próby:

Do 0,1 g badanej substancji dodać 25 ml wody, silnie wymieszać przez wytrząsanie i przesączyć. Do 5 ml otrzymanego przesącza dodać 1 ml 30% kwasu octowego i 0,1 ml wody bromowej. Następuje natychmiastowe odbarwienie roztworu.

- Reakcja utleniania

Wykonanie próby:

Do 5 ml przesącza otrzymanego w poprzedniej próbie dodać 0,1 ml 0,1 M roztworu KMnO_4 . Jego różowe zabarwienie zmienia się szybko w środowisku obojętnym na brunatne (od powstającego MnO_2), a w środowisku alkalicznym – na zielone (K_2MnO_4).

- Reakcja ze stęż. kwasem siarkowym(VI)

Wykonanie próby:

Do ok.50 mg badanej substancji dodać 1 ml 96% kwasu siarkowego(VI). Cyklobarbitał i heksobarbitał barwią się powoli na pomarańczowoczerwono.

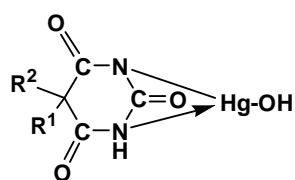
- Reakcja z rezorcyną

Wykonanie próby:

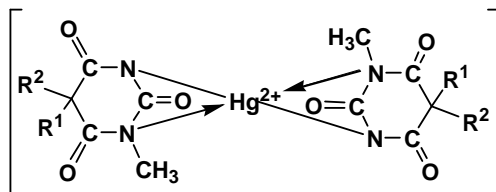
Ok. 0,1 g badanej substancji mieszać z 0,05 g rezorcyny i 2 ml stęż. kwasu siarkowego (96%), po czym ogrzać. Allobarbitał daje zabarwienie ciemnoczerwone, które po zalkalizowaniu roztworu przechodzi w żółtopomarańczowe z intensywną fluorescencją w świetle przechodzącym.

- Reakcje na wykrywanie pochodnych N-metylowych

N-metylowane barbiturany tworzą z azotanem(V) rtęci(II) rozpuszczalne w wodzie kompleksy, podczas gdy pochodne niemetylowane dają w wyniku tej reakcji białe osady.



biały osad soli



związek kompleksowy (rozpuszczalny w wodzie)

Rys. 91. Odróżnianie barbituranów N-metylowanych od ich niemetylowanych analogów

Wykonanie próby:

Ok. 0,5 g badanej substancji wytrząsnąć z 5 ml wody w ciągu 5 min. i przesączyć. Przesącz ogrzać do wrzenia, po czym dodać kroplę odczynnika Millona. W przypadku pochodnych *N*-metylowych nie obserwuje się powstania zmętnienia w ciągu 1 minuty. Pochodne niemetylowane dają osady o barwie białej.

2.9. Leki o budowie peptydowej

Analiza chemiczna farmaceutyków o budowie peptydowej sprowadza się przede wszystkim do ustalenia obecności w strukturze substancji czynnej układu wiązań peptydowych, a następnie identyfikacji poszczególnych reszt aminokwasowych. Aminokwasy stanowiące pojedyncze elementy łańcuchów peptydowych identyfikuje się wstępnie na podstawie odpowiedniej serii reakcji barwnych, w niektórych przypadkach po uprzedniej hydrolizie badanej substancji czynnej. Niektóre reakcje barwne, szczególnie charakterystyczne dla łańcuchów bocznych wybranych aminokwasów, można z powodzeniem przeprowadzać także na peptydach niezhydrolizowanych.

Leki peptydowe zawierają niejednokrotnie w swych sekwencjach reszty inne niż reszty tzw. aminokwasów kodowanych, np. reszty aminokwasów strukturalnie zmodyfikowanych, różnego typu izostery aminokwasów, ugrupowania sieciujące łańcuchy białkowe, grupy ochronne, ugrupowania glikozydowe itp. Do analizy tego typu związków każdorazowo należy podchodzić w sposób indywidualny, a przy doborze odpowiednich testów identyfikacyjnych uwzględniać także specyficzne elementy strukturalne badanego związku.

Warto zwrócić uwagę na fakt, że chemiczna jakościowa analiza oligopeptydów zazwyczaj pozwala jedynie na zgrubne poznanie składu aminokwasowego badanej próbki. W celu ustalenia dokładnej sekwencji aminokwasowej danego łańcucha peptydowego koniecznym jest podjęcie dodatkowych badań z zastosowaniem złożonych metod chemiczno-instrumentalnych (np. technik spektroskopowych, chromatograficznych, reakcji enzymatycznych).

2.9.1. Reakcje ogólne związków peptydowych

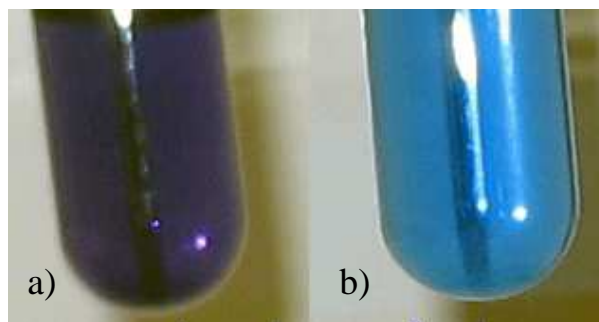
W celu poznania przebiegu najważniejszych reakcji charakterystycznych dla połączeń oligopeptydowych niżej zaproponowane doświadczenia można z powodzeniem wykonywać dla roztworu białka kurzego lub żelatyny.

- Przygotowanie roztworu białka kurzego

Dokładnie oddzielić białko od żółtka z jednego jajka kurzego, po czym dodać 100 ml 2% roztworu wodnego NaCl. Tak przygotowany roztwór przeznaczyć do badań na obecność ugrupowań strukturalnych, występujących w peptydach/białkach.

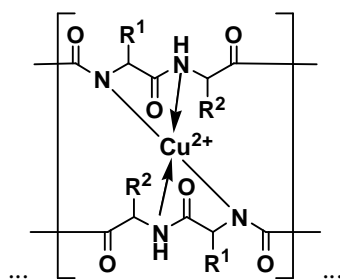
- Wykrywanie układów wiązań peptydowych (reakcja „biuretowa”)

Reakcję tę dają wszystkie połączenia, które zawierają w cząsteczce co najmniej dwie grupy $-\text{CO}-\text{NH}-$ połączone ze sobą bezpośrednio (jak w diamidzie kwasu szczawiowego), poprzez jeden atom azotu (jak w diamidzie mocznika – biurecie, $\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$) czy jeden atom węgla (jak w peptydach czy diamidzie kwasu malonowego). Próba jest także pozytywna dla połączeń podobnych do wyżej wymienionych,



Rys. 92. Wyniki reakcji biuretowej a) dla roztworu białka (pozytywna); b) dla glicyny (negatywna)

np. dla związków zawierających fragmenty strukturalne typu $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}(\text{OH})-$. Reakcja daje negatywny wynik w odniesieniu do pojedynczych aminokwasów (z wyjątkiem histydyny), ich monoamidów i dipeptydów. W przypadku związków o budowie peptydowej reakcja biuretowa polega na tworzeniu się w środowisku silnie zasadowym barwnego związku kompleksowego pomiędzy kationem miedzi(II) a heteroatomami reszt aminokwasowych oddalonych od siebie o co najmniej jedną resztę w łańcuchu głównym peptydu lub białka. Ze wzrostem liczby wiązań peptydowych w cząsteczce rośnie intensywność fioletowej barwy powstającego kompleksu.



Rys. 93. Fragment strukturalny kompleksu powstającego z oligopeptydu lub białka poddanego reakcji biuretowej

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg dokładnie sproszkowanej próbki lub 2 ml jej wodnego roztworu dodaje się 2 ml 10% roztworu NaOH, a następnie kroplami 1% wodnego roztworu CuSO_4 , wstrząsając mieszaniną reagującą po dodaniu każdej kropli. W przypadku obecności w strukturze badanego związku sąsiadujących ze sobą co najmniej dwóch wiązań peptydowych obserwuje się pojawienie zabarwienia początkowo różowego, przechodzącego poprzez fioletowe do niebieskofioletowego, a wytrącony wodorotlenek miedzi(II) ulega stopniowemu rozpuszczaniu.

- Wykrywanie wolnych grup aminowych (reakcja z ninhydriną)

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg dokładnie sproszkowanej próbki rozpuszczonej w 1 ml wody dodać 0,5 ml odczynnika ninhydrynowego (przygotowanie – patrz rozdz. IX.1.) i ogrzać do wrzenia. Obserwuje się powstawanie różowego

lub fioletowego zabarwienia. Barwa zależna jest od rodzaju aminokwasu, białka lub peptydu. Przebieg reakcji – patrz dalej Rys. 98. Uwaga: badany roztwór powinien mieć odczyn lekko zasadowy lub obojętny.

Reakcję tę można także wykonać metodą kroplową na bibule.

Wykonanie próby:

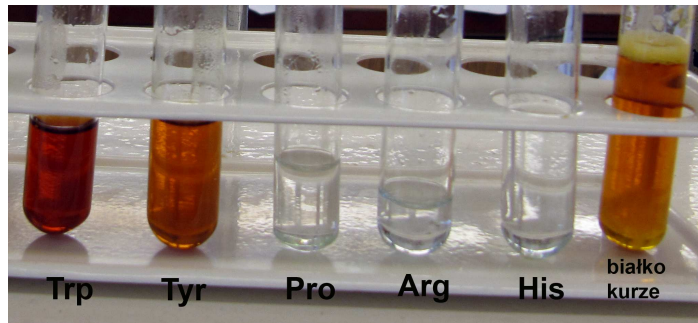
Dwie krople odczynnika ninhydrynowego umieszcza się na bibule, suszy w suszarce w temp. 100-105 °C, a następnie na wysuszoną plamę nakrapla się (1-2 krople) roztworu badanej substancji (o odczynie zbliżonym do obojętnego). Po ponownym wysuszeniu bibuły (5-10 min. w temperaturze suszarki) w obecności aminokwasu lub peptydu zawierającego pierwszorzędową grupę aminową obserwuje się powstawanie niebieskiego, różowego lub fioletowego zabarwienia.



Rys. 94. Pozytywny wynik reakcji α -aminokwasu z ninhydrną

- Wykrywanie pierścieni aromatycznych w aminokwasach (reakcja ksantoproteinowa)

Pod wpływem działania kwasu azotowego(V) układy aromatyczne obecne w łańcuchach bocznych aminokwasów (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan) ulegają nitrowaniu, a utworzone nitropochodne o barwie żółtej poddane działaniu zasady przekształcają się w formę „aci” o barwie pomarańczowej. Nitrowanie fenyloalaniny wymaga dodatku stęż. kwasu siarkowego. Histydyna w wyniku tej reakcji daje produkt jasnożółtawy.



Rys. 95. Reakcja ksantoproteinowa dla wybranych aminokwasów oraz dla białka kurzego

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg badanej próbki, rozpuszczonej w 1 ml wody dodać 0,5 ml stęż. kwasu azotowego(V) i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez ok. 5 minut. W przypadku obecności tyrozyny lub tryptofanu obserwuje się powstawanie żółtego zabarwienia. Po ochłodzeniu dodać ostrożnie 0,5 ml 20% roztworu NaOH. Barwa pogłębia się, przechodząc w pomarańczową. W przypadku otrzymania negatywnego wyniku próby, należy powtórzyć ją z dodatkiem 0,5 ml stęż. kwasu siarkowego(VI), aby potwierdzić lub wykluczyć obecność fenyloalaniny.

- Wykrywanie grup tiolowych

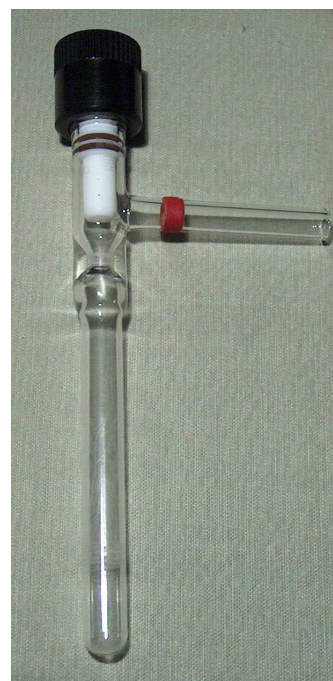
Ogrzewanie związków zawierających ugrupowania tiolowe (np. w resztach cysteiny) lub mostki disiarczkowe (np. w resztach cystyny) w stężonych roztworach NaOH powoduje ich rozkład z wydzielaniem siarkowodoru, który w reakcji z octanem ołowiu(II) daje czarny osad siarczku ołowiu(II). Próba jest negatywna dla metioniny.

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg dokładnie sproszkowanej próbki rozpuszczonej w 1 ml wody dodać kroplami 0,3 ml 2% roztworu octanu ołowiu(II) oraz 2 ml 20% roztworu NaOH. Całość ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez ok. 5 minut. Obserwuje się ciemnienie roztworu. Po oziębieniu i zakwaszeniu mieszaniny stęż. kwasem solnym wydziela się zapach siarkowodoru.

- Reakcja hydrolizy

Związki peptydowe poddane działaniu kwasu solnego w podwyższonych temperaturach ulegają hydrolizie, teoretycznie prowadzącej do składowych aminokwasów. Niestety, podczas hydrolizy przeprowadzanej zwykle w dość drastycznych warunkach (reakcja w środowisku 6N kwasu solnego w 110 °C przez 24 godziny lub w temperaturze ok. 165 °C przez 30-60 minut) niektóre reszty aminokwasowe mogą ulegać rozkładowi lub pewnym modyfikacjom na skutek np. utleniania czy reakcji rodnikowych. Do aminokwasów posiadających najbardziej labilne łańcuchy boczne należą: tryptofan, tyrozyna, cysteina/cystyna, seryna, treonina oraz aminocukry i połączenia fosforylowane. Aby zapobiec tego typu niepożądanym reakcjom hydrolizę prowadzi się często w obecności niewielkiej ilości rozmaitych dodatków - „antyutleniaczy” czy tzw. „zmiataczy” wolnych rodników (ang. scavengers), jak np. fenol i jego pochodne, kwas tioglikolowy, merkaptany. Przed rozpoczęciem reakcji mieszaninę dodatkowo przepłukuje się strumieniem gazowego azotu lub argonu celem usunięcia z niej powietrza.



Rys. 96. Naczynie do hydrolizy przeprowadzanej na skalę mikro

Wykonanie próby:

Ok. 10 mg peptydu umieścić w naczyniu do hydrolizy (w kształcie grubościennej żaroodpornej probówki o wym. 15 x 150 mm, zaopatrzonej w boczną rurkę i teflonowy zawór, Rys. 96.), dodać 1 ml 6N kwasu solnego z 2-5% dodatkiem fenolu, 2-merkaptoetanolu lub kwasu tioglikolowego. Mieszaninę przepłukać strumieniem gazowego argonu lub azotu przez kilka minut, po czym naczynie szczelnie zamknąć i umieścić w metalowym bloku grzewczym, ustawionym na 165 °C. Reakcję prowadzić 1 godzinę. W przypadku prowadzenia hydrolizy przy temp. 110 °C czas reakcji należy przedłużyć do ok. 22 godzin. Następnie, po ochłodzeniu mieszaniny reagującej do temp. pokojowej powoli otworzyć naczynie (OSTROŻNIE!), otrzymany hydrolizat w razie potrzeby rozcieńczyć i przeznaczyć do badań na obecność aminokwasów.

- Analiza TLC hydrolizatów peptydowych

Wykonanie:

Próbkę hydrolizatu peptydowego nanieść punktowo na dwie osobne płytki do TLC, z których jedna pokryta jest celulozą (np. DC Alufolien Cellulose 60 F 254; Merck, grubość warstwy: 0,1 mm), zaś druga żelom krzemionkowym (np. DC Alufolien Kieselgel 60 F 254; Merck, grubość warstwy: 0,2 mm), rozwinać chromatogram w układzie rozpuszczalników: chloroform – metanol – 25% NH₃ (8:8:3; v/v/v), po czym wywołać

plamy w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$), a następnie odczynnikami ninhydrynowym lub izatynowym. W przypadku użycia odczynnika izatynowego, który daje z aminokwasami produkty o bardziej zróżnicowanej gamie barw, należy po spryskaniu chromatogramów ogrzewać je kilkanaście minut w temp. 80-85 °C, względnie pozostawić w temp. pokojowej przez 20 godzin.

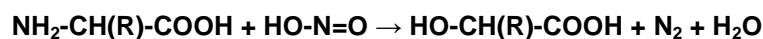
Identyfikację poszczególnych aminokwasów ułatwi chromatografia hydrolizatu wobec wzorców aminokwasowych, o ile będą dostępne.

2.9.2. Wykrywanie wybranych aminokwasów

• Reakcje ogólne α -aminokwasów

○ Próba wg Chellego (reakcja z kwasem azotowym(III), a następnie kondensacja z fenolami)

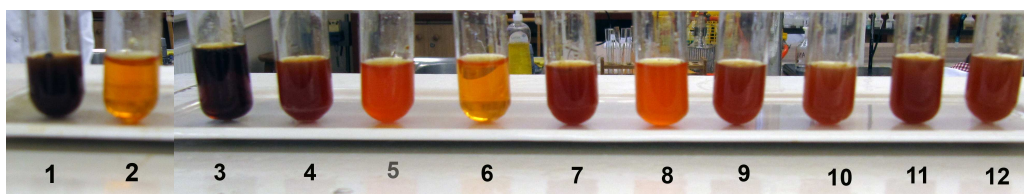
α -Aminokwasy alifatyczne, względnie aminokwasy z grupą aminową związaną z łańcuchem alifatycznym reagują z kwasem azotowym(III), dając hydroksykwas. Reakcji towarzyszy wydzielanie azotu.



Obecność hydroksykwasów w mieszaninie poreakcyjnej można wykryć na drodze np. barwnych reakcji z niektórymi fenolami (gwajakol, p-krezol, rezorcyna) w środowisku silnie kwaśnym. W obecności stężonego kwasu siarkowego(VI) hydroksykwasy ulegają dehydratacji, po czym łączą się z fenolami wg mechanizmu aromatycznej substytucji elektrofilowej (S_E) (analogiczny przebieg reakcji - patrz rozdz. VI.3. oraz Rys. 130).

Wykonanie próby:

Do ok. 0,2 ml wodnego roztworu zawierającego ok. 50 mg aminokwasu dodać 1 ml kwasu octowego i 0,5 ml 5% roztworu NaNO_2 . Po dokładnym wymieszaniu obserwuje się wydzielanie pęcherzyków azotu. Całość należy ogrzewać do wrzenia w celu usunięcia pojawiających się brunatnych tlenków azotu (resztki tlenków azotu usuwa się przez ogrzewanie do wrzenia mieszaniny z niewielką ilością siarczanu hydrazyny). Do gorącego jeszcze roztworu dodać 2 ml stęż. H_2SO_4 (OSTROŻNIE!), a następnie 1 kroplę alkoholowego roztworu odpowiedniego fenolu. Obserwuje się powstanie intensywnie zabarwionego produktu. Przykładowo, w przypadku glicyny powstaje czerwono-fioletowy produkt z gwajakolem, dla alaniny – czerwony produkt z gwajakolem, cytrynowo-żółty z kodeiną, pomarańczowo-żółty z p-krezolem.

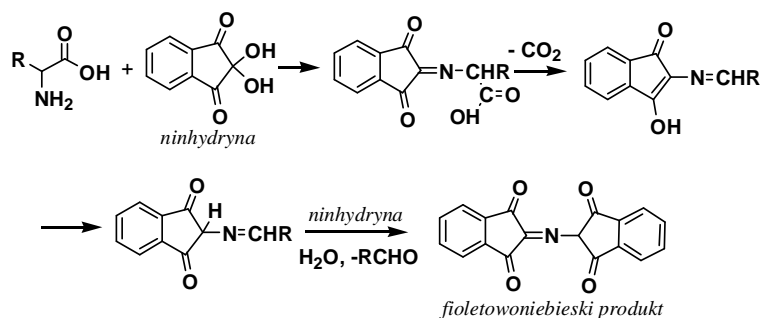


Rys. 97. Zabarczenia produktów próby Chellego poddanych działaniu p-krezolu w obecności stęż. kwasu siarkowego(VI).

(1 – Lys, 2 – Pro, 3 – Trp, 4 – Tyr, 5 – Phe, 6 – Arg, 7 – His, 8 – Ser, 9 – Cys, 10 – cystyna, 11 – Met, 12 – Gly).

○ Reakcja z ninhydryną

Ninhydryna daje purpurowoniebieskie produkty, reagując z aminokwasami zawierającymi pierwszorzędową grupę aminową przy łańcuchu alifatycznym. Reakcja daje wynik pozytywny także dla innych związków zawierających pierwszorzędową grupę aminową, w tym także peptydów z wolną (tzn. nieosłoniętą lub niezacylowaną jak w peptydach cyklicznych) grupą aminową oraz białek. Przebieg reakcji przedstawia Rys. 98.



Rys. 98. Przebieg reakcji α -aminokwasów z ninhydryną

Wykonanie próby:

Do 1 ml odczynnika ninhydrynowego dodać kilka miligramów aminokwasu. Po wymieszaniu mieszaninę ogrzewać do wrzenia. Obserwuje się powstawanie purpurowoniebieskiego lub szaroniebieskiego zabarwienia roztworu.

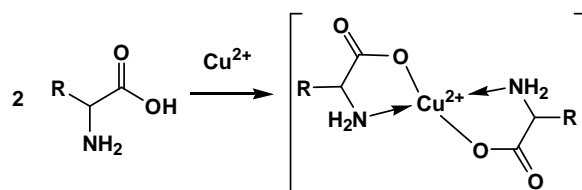
○ Reakcja z siarczanem miedzi(II) lub chlorkiem żelaza(III)

Roztwory wodne aminokwasów, zadane niewielką ilością roztworu siarczanu lub chlorku miedzi(II) przyjmują ciemnoniebieskie zabarwienie od tworzącego się związku kompleksowego. Chlorek żelaza(III) daje natomiast z wodnymi roztworami aminokwasów związki o bardziej zróżnicowanych zabarwieniach, które zanikają po zakwaszeniu (Rys. 100.)

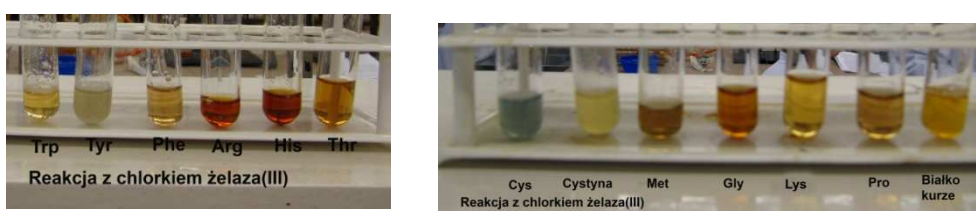
Wykonanie próby:

Do ok. 1 ml wodnego roztworu aminokwasu dodać kroplami 10% roztwór CuSO_4 lub 5% roztworu FeCl_3 . Obserwuje się powstawanie ciemnoniebieskiego zabarwienia roztworu w przypadku reakcji z jonami miedzi(II) lub jasnożółtego, pomarańczowego, czerwonego lub jasnobrażowego dla reakcji z jonami żelaza(III). Cysteina z jonami żelaza(III) daje produkt o barwie indygo.

Uwaga: roztwór badanego aminokwasu powinien mieć odczyn zbliżony do obojętnego.

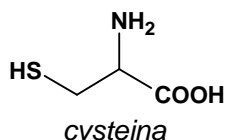


Rys. 99. Tworzenie kompleksów α -aminokwasów z jonami miedzi(II)



Rys. 100. Wyniki reakcji wybranych aminokwasów z roztworem FeCl_3 . Od lewej: Trp, Tyr, Phe, Arg, His, Thr, Cys, cystyna, Met, Gly, Lys, Pro, białko kurze.

- **Wykrywanie cysteiny**



- Reakcja octanem ołowiu(II) w środowisku alkalicznym

Cysteina i cystyna ogrzewane w środowisku zasadowym ulegają rozkładowi. Zawarta w nich siarka ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które z jonami Pb^{2+} dają czarny osad siarczku ołowiu(II). Metionina tej reakcji nie daje.

Wykonanie próby:

Do ok. 10 mg dokładnie sproszkowanej próbki chlorowodoru cysteiny lub cystyny, rozpuszczonej w 0,5 ml wody dodać po 1 ml 30% wodnego roztworu NaOH i 0,1 ml 2% roztworu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Całość ogrzewać kilka minut na wrzącej łaźni wodnej. Powstaje czarny osad PbS .

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Cysteina w roztworze obojętnym w reakcji z chlorkiem żelaza(III) daje produkty o barwie indygo. Barwa jednak szybko zanika na skutek utleniania się cysteiny do cystyny.

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg dokładnie sproszkowanej próbki chlorowodoru cysteiny, rozpuszczonej w 1 ml wody dodać po jednej kropli 5% wodnego roztworu FeCl_3 i 25% roztworu amoniaku. Powstaje nietrwałe fioletowoczerwone zabarwienie. Próbie można również poddawać hydrolizaty peptydowe o odczynie wcześniej doprowadzonym do obojętnego za pomocą 25% roztworu amoniaku.

- Reakcja z kwasem fosforowolframowym

Cysteina redukuje kwas fosforowolframowy, dając w rezultacie produkty o zabarwieniu szaroniebieskim. Wiele aminokwasów także ulega utlenianiu w tych warunkach (Rys. 101.). Cystyna nie ulega tej reakcji.

Wykonanie próby:

Ok. 10 mg dokładnie sproszkowanej próbki chlorowodoru cysteiny, zadać kilkoma kroplami roztworu kwasu fosforowolframowego. Powstaje szaroniebieskie zabarwienie.



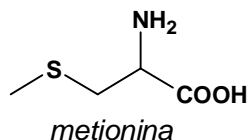
Rys. 101. Wyniki działania kwasu fosforowolframowego na wybrane aminokwasy. 1 - Arg (kolor szary) , 2 - His, 3 - Trp (kolor brązowy), 4 - Tyr, 5 - Phe, 6 - Pro, 7 - Ser, 8 - Lys (kolor szaroniebieski), 9 - Met (kolor cytrynowożółty), 10 - cystyna, 11 - Cys (kolor szaroniebieski), 12 - Gly.

○ Reakcja z *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminą

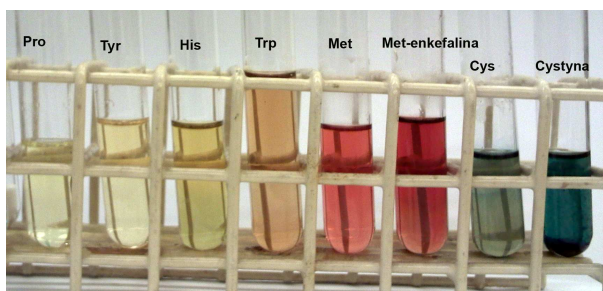
Wykonanie próby:

Do 1 ml ok. 0,1% roztworu cysteiny dodać 0,5 ml roztworu 0,2 g chlorowodoru *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminy ($(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \times \text{HCl}$), w 100 ml wody, a następnie kroplę 5% roztworu FeCl_3 . Podczas ogrzewania obserwuje się powstawanie trwałego ciemnoniebieskiego zabarwienia. Cystyna i jej pochodne, siarczki nieorganiczne, a także kwasy tioglikolowy i tiomlekowy tej reakcji nie dają.

● **Wykrywanie metioniny**



Metionina w środowisku alkalicznym w obecności glicyny reaguje z nitroprusydkiem sodowym, dając czerwono zabarwione produkty o nieustalonej strukturze. W tych samych warunkach cysteina i cystyna dają produkty o trwałym zabarwieniu szaroniebieskim, tryptofan – o lekko brązowym, a histydyna - o czerwonym, które szybko zanika (Rys. 102.). Pozostałe aminokwasy tej reakcji nie ulegają.

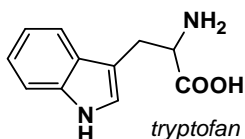


Rys. 102. Wykrywanie metioniny poprzez reakcję nitroprusydkiem sodowym (reakcji obecności glicyny). Od lewej próby kolejno dla: Pro, Tyr, His, Trp, Met, hydrolizatu peptydu zawierającego metioninę, Cys, cystyny.

Wykonanie próby:

Do ok. 10-20 mg dokładnie sproszkowanej próbki rozpuszczonej w 1 ml wody dodać kolejno 0,5 ml 40% roztworu NaOH , następnie 1 ml 1% roztworu glicyny i po wymieszaniu 0,3 ml świeżo sporządzonego 10% roztworu nitroprusydku sodu. Całość ogrzewać na łaźni wodnej o temp. 35-40 °C przez 5-10 minut, a następnie po ochłodzeniu dodać 2 ml stęż. kwasu solnego. W przypadku obecności metioniny pojawia się czerwone zabarwienie.

● **Wykrywanie tryptofanu**

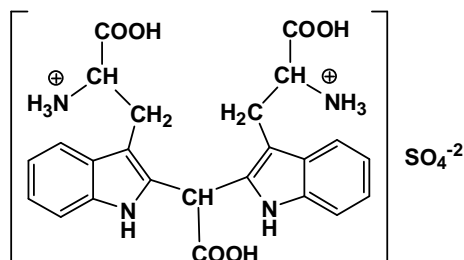


○ Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa (z kwasem glioksalowym na wykrywanie pierścienia indolowego)

W wyniku tej reakcji powstaje niebieskofioletowy pierścień na pograniczu warstw, pochodzący od produktu katalizowanej kwasowo kondensacji układu indolowego (obecnego w łańcuchu bocznym tryptofanu) z kwasem glioksalowym ($\text{HOOC}-\text{CHO}$) (Rys. 103.).

Wykonanie próby:

Do rozcieńzonego roztworu tryptofanu (np. ok. 0,1%) dodać 1 ml roztworu kwasu glioksalowego (przygotowanie – patrz IX.1.), po czym po ściance próbówki 1 ml stęż. kwasu siarkowego(VI). Na granicy warstw pojawia się niebieskofioletowa obrączka.

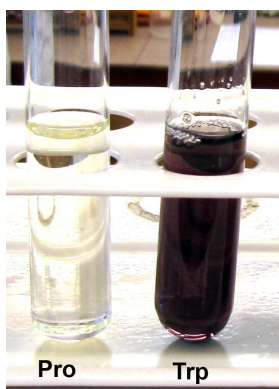


Rys. 103. Struktura produktu reakcji tryptofanu z kwasem glioksalowym w warunkach próby Adamkiewicza-Hopkinsa

○ Reakcja Voiseneta

Wykonanie próby:

Ok. 1 ml 1% wodnego roztworu tryptofanu zadać 1 kroplą 2,5% roztworu aldehydu mrówkowego oraz 4 ml stęż. kwasu solnego i pozostawić na ok. 5 minut. Po tym czasie dodawać kroplami 0,05% roztwór NaNO₂. W przypadku obecności tryptofanu obserwuje się zmianę barwy na fioletowobrunatną. Inne aminokwasy aromatyczne, jak tyrozyna i fenyloalanina dają produkty o barwie żółtawej.



Rys. 104. Wyniki reakcji Voiseneta dla proliny (negatywna) i tryptofanu (pozytywna)

○ Reakcja z wodą bromową

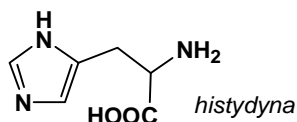
Wykonanie próby:

Wodny roztwór tryptofanu, zadany kilkoma kroplami wody bromowej (unikać nadmiaru) lub wody chlorowej daje zabarwienie czerwone do czerwono-fioletowego. Podczas wytrząsania z octanem etylu z dodatkiem alkoholu amyloвого lub wyłącznie z tym alkoholem utworzony barwnik przechodzi do warstwy organicznej.

○ Kondensacje z aldehydami aromatycznymi w stęż. kwasach mineralnych

Tryptofan (stały lub jego stężony roztwór) po zadaniu odczynnikami Ehrlicha przyjmuje zabarwienie czerwono-fioletowe, z roztworem waniliny w kwasie siarkowym daje zabarwienie czerwone, a z aldehydem 4-nitrobenzoesowym w kwasie siarkowym prowadzi do produktu kondensacji o barwie zielonej.

- **Wykrywanie histydyny**



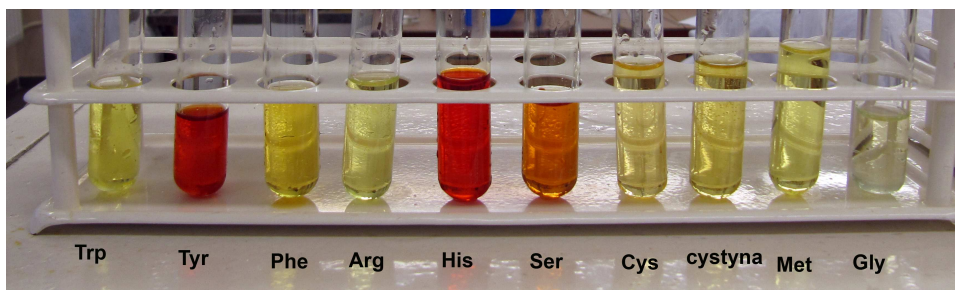
- Sprzęganie z solami diazoniowymi (reakcja Pauliego)

Wykonanie próby:

Bezpośrednio przed wykonaniem próby przygotować osobno dwa zimne (łaznia lodowa) roztwory:

- (1) 0,5% roztwór kwasu sulfanilowego w rozcieńczonym kwasie solnym (5 ml stęż. HCl rozcieńczyć wodą destylowaną do 100 ml);
- (2) 5% roztwór wodny NaNO_2 .

Do 1 ml zimnego wodnego roztworu histydyny (lub peptydu/białka zawierającego histydynę) dodać 1 ml 10% wodnego roztworu Na_2CO_3 , po czym całość ochłodzić na łaźni lodowej. Zmieszać ze sobą powoli po 1 ml zimnych roztworów (1) i (2), po czym dodać powoli (kroplami, mieszając bagietką) tak otrzymany roztwór zdiazowanego kwasu sulfanilowego do roztworu histydyny z Na_2CO_3 . Powstaje ciemnoczerwone zabarwienie lub wydziela się czerwonowiśniowy osad barwnika.



Rys. 105. Wybrane aminokwasy poddane reakcji z odczynnikami Pauliego

- Reakcja biuretowa

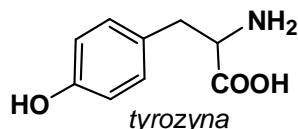
Histydyna ulega reakcji biuretowej [2]. Wykonanie - patrz wyżej.

- Reakcja specyficzna dla histydyny

Wykonanie próby:

Do roztworu 10-20 mg histydyny w kwasie solnym wprowadzić, ogrzewając łagodnie, niewielką ilość chloranu(V) potasu, po czym roztwór odparować prawie do sucha. Następnie dodać świeżo sporządzonej wody chlorowej i śladową ilość kwasu azotowego. Pozostałość po odparowaniu do sucha poddać działaniu par amoniaku. Powstaje ciemnoróżowe zabarwienie, które po dodaniu niewielkiej ilości roztworu NaOH przechodzi w czerwonofioletowe.

- **Wykrywanie tyrozyny**



- Reakcja nitrozowania

Wykonanie próby:

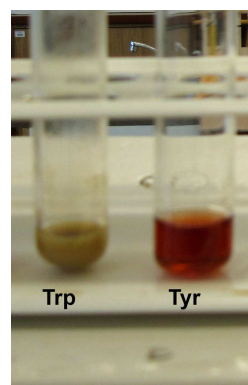
Kilka mililitrów roztworu tyrozyny zadać 0,5 ml 0,04 N kwasu solnego oraz 0,2 ml 1% roztworu NaNO_2 i ogrzewać przez 10 minut na łaźni wodnej. Powstaje zabarwienie żółte, przechodzące w różowe, fioletowe, a w końcu w zielone. Po wytrząsaniu z alkoholem amylowym fioletowy barwnik przechodzi do warstwy organicznej. Tryptofan podobnych zabarwień nie daje, a adrenalina barwi się na kolor rubinowoczerwony.

○ Reakcja z odczynnikiem Millona

Tyrozyna daje z odczynnikiem Millona produkt o czerwonym zabarwieniu. Za pozytywny przebieg reakcji odpowiedzialne jest obecne w tyrozynie ugrupowanie fenolowe. Odczynnik Millona w reakcji z tryptofanem strąca szarobrazowawy osad soli rtęci(II). (Rys. 106.).

Wykonanie próby:

Kilka kropli roztworu tyrozyny (lub peptydu zawierającego tyrozyne) zadać 2-3 kroplami odczynnika Millona. Powstaje czerwone zabarwienie, a czasami i czerwony osad. W niektórych przypadkach zabarwienie może pojawić się dopiero po ogrzaniu mieszaniny reagującej na wrzącej łaźni wodnej.



Rys. 106. Tyrozyna i tryptofan w reakcji z odczynnikiem Millona

○ Próba Mörnera

Wykonanie próby:

Niewielką ilość tyrozyny lub jej roztworu ogrzewa się z 2-3 ml odczynnika (przygotowanie - patrz niżej). Występuje natychmiast trwałe zielone zabarwienie, charakterystyczne dla grupy fenolowej w tyrozynie. Próba jest negatywna dla fenoli jedno- i wielowodorotlenowych oraz białek z zawartością tyrozyny.

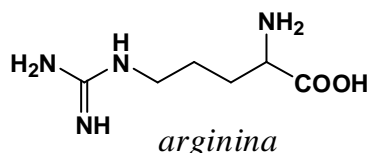
Przygotowanie odczynnika:

Zmieszać 0,1 ml 40% formaliny z 4,5 ml wody i 5,5 ml stęż. kwasu siarkowego(VI). Mieszanina jest trwała.

○ Sprzęganie z solami diazoniowymi (reakcja Pauliego)

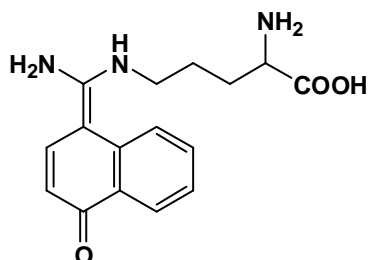
Patrz – wykrywanie histydyny.

● **Wykrywanie argininy**



○ Reakcja Sakaguchi

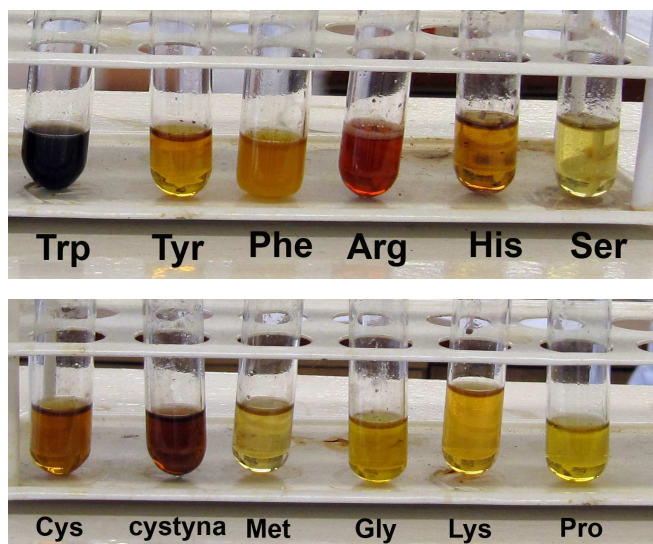
Niepodstawiona grupa guanidynowa, obecna w argininie, zarówno wolnej, jak i obecnej w połączeniach peptydowych, w reakcji z utlenionym uprzednio przez podbromin sodowy 1-naftolem tworzy czerwony związek o strukturze:



Niektóre inne aminokwasy w warunkach tej reakcji mogą ulegać utlenianiu, dając produkty o barwach zbliżonych do żółtej lub brązowej o różnej intensywności. Roztwory zawierające tryptofan - wręcz czernieją (Rys. 107.).

Wykonanie próby:

Do 2 ml oziębionego w wodzie z lodem ok. 5% roztworu argininy lub białka dodać 2-3 krople 5% roztworu 1-naftolu w etanolu (odczynnik Molischa), dokładnie wymieszać, a następnie dodać 10 kropli roztworu podbrominu sodu (przygotowanie – patrz rozdz. IX.1.). Powstająca czerwona barwa wskazuje na obecność pochodnych guanidyny (w tym przypadku - argininy).



Rys. 107. Wybrane aminokwasy poddane reakcji Sakaguchi

- **Wykrywanie glicyny**



Poniższa reakcja jest charakterystyczna dla glicyny, jako jedynej spośród monoaminokwasów oraz dla wielu aminokwasów zasadowych.

Wykonanie próby:

Do 10 ml ok. 1% roztworu glicyny dodać 20 kropli 20% roztworu NaOH oraz 10 kropli nasyconego wodnego roztworu aldehydu o-fitalowego. Po 10 sekundach intensywnego wytrząsania dodać 20 kropli stęż. kwasu solnego. Obserwuje się wytrącanie fioletowego lub szarego osadu. W bardziej rozcieńczonych roztworach powstaje niebieskie, fioletowe lub czerwone zabarwienie.

2.9.3. Identyfikacja nieznanego związku peptydowego

Wiele biologicznie aktywnych związków organicznych stosowanych w medycynie to połączenia zawierające w swych strukturach wiązania peptydowe. Ogólnie, można je podzielić na trzy grupy:

- związki liniowe i cykliczne o budowie czysto peptydowej, których łańcuchy główne to odpowiednie sekwencje reszt aminokwasów białkowych połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi (przykłady – patrz Tabela 6 w rozdz. VII);
- ich analogi w różny sposób zmodyfikowane strukturalnie, np. zawierające w łańcuchach głównych oprócz wiązań peptydowych wiązania innego rodzaju (np. estrowe, laktonowe) lub reszty aminokwasów niebiałkowych;

- związki będące strukturalnymi połączeniami fragmentów peptydowych i niepeptydowych (np. glikopeptydy, lipopeptydy).

Analiza identyfikacyjna związków należących do dwóch ostatnich grup musi na wstępie obejmować wykrycie obecności specyficznych dla danego analitu połączeń strukturalnych (np. w glikopeptydach - fragmentu peptydowego, zwanego aglikanem oraz części cukrowej czyli glikanu). Wymaga to zwykle przeprowadzania reakcji, które w niepodważalny sposób dowiodą obecności każdego z tych swoistych ugrupowań. W dalszej części niniejszego rozdziału zostanie scharakteryzowany jedynie sposób klasycznej analizy jakościowej połączeń peptydowych (peptydów lub ich fragmentów w w/wym. związkach mieszanych). Analizę fragmentów o charakterze niepeptydowym, z uwagi na ich ogromną różnorodność strukturalną, można, zależnie od potrzeb, zaplanować w oparciu o informacje zawarte w innych rozdziałach tego podręcznika lub korzystając z innych źródeł literaturowych.

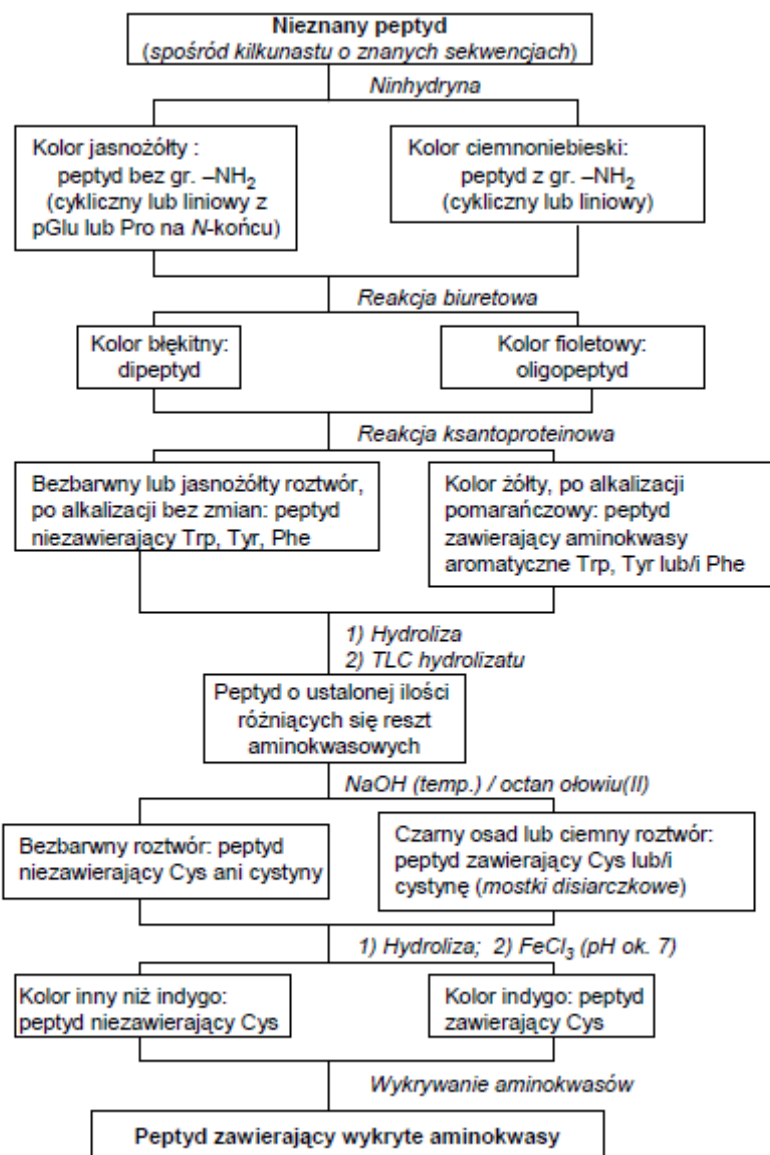
Jednym z głównych elementów analizy identyfikacyjnej związku o budowie peptydowej jest poznanie składu aminokwasowego jego łańcucha. Badając związki o niezbyt długich łańcuchach peptydowych (do kilkunastu reszt aminokwasowych) można w wielu przypadkach z powodzeniem stosować metody klasycznej analizy jakościowej. Należy tu jednak zastrzec, że droga ta raczej nie służy określaniu sekwencji aminokwasowej w łańcuchu. Jednak, w sytuacjach, gdy znamy kilka czy kilkanaście sekwencji, z których jedna należy do identyfikowanego przez nas peptydu, można ją często znaleźć drogą dedukcji. Aby było to stosownej kolejności.

Analizie poddaje się zarówno sam peptyd, jak też i jego hydrolizat (zależnie od potrzeb). Propozycję toku analizy przedstawia Rys. 108.

Identyfikacji niektórych reszt aminokwasowych w badanym związku można dokonać dwiema drogami - poddając odpowiednim reakcjom sam peptyd lub jego hydrolizat. Dotyczy to zwłaszcza reakcji obejmujących przemiany w obrębie łańcuchów bocznych poszczególnych aminokwasów. Istnieje bowiem szereg reakcji, które są specyficzne tylko dla wybranych ugrupowań strukturalnych. Tą drogą można wykryć obecność: histydyny (His), tyrozyny (Tyr), fenyloalaniny (Phe), tryptofanu (Trp), argininy (Arg), cysteiny (Cys) i cystyny. Po hydrolizie peptydu dodatkowo można zidentyfikować lizynę (Lys), glicynę (Gly), metioninę (Met) oraz serynę (Ser) i treoninę (Thr).

Analizę warto dodatkowo uzupełnić o chromatografię TLC hydrolizatu peptydowego, co pozwoli na określenie w nim ilości różnych reszt aminokwasowych. Warto pamiętać, że w hydrolizatach (a tym samym i na chromatogramach) nie wykryjemy kwasu piroglutaminowego (pGlu), glutaminy (Gln) i asparaginy (Asn), gdyż obecne w ich łańcuchach bocznych

ugrupowania amidowe ulegną przekształceniu w grupy karboksylowe, dając odpowiednio kwasy - glutaminowy (Glu) i asparaginowy (Asp).



Rys. 108. Przykład toku identyfikacji związku peptydowego

Tam, gdzie poszukiwana sekwencja jest jedną z kilku czy kilkunastu znanych, tak zebrane dane pozwalają zazwyczaj na wytypowanie tej najbardziej prawdopodobnej.

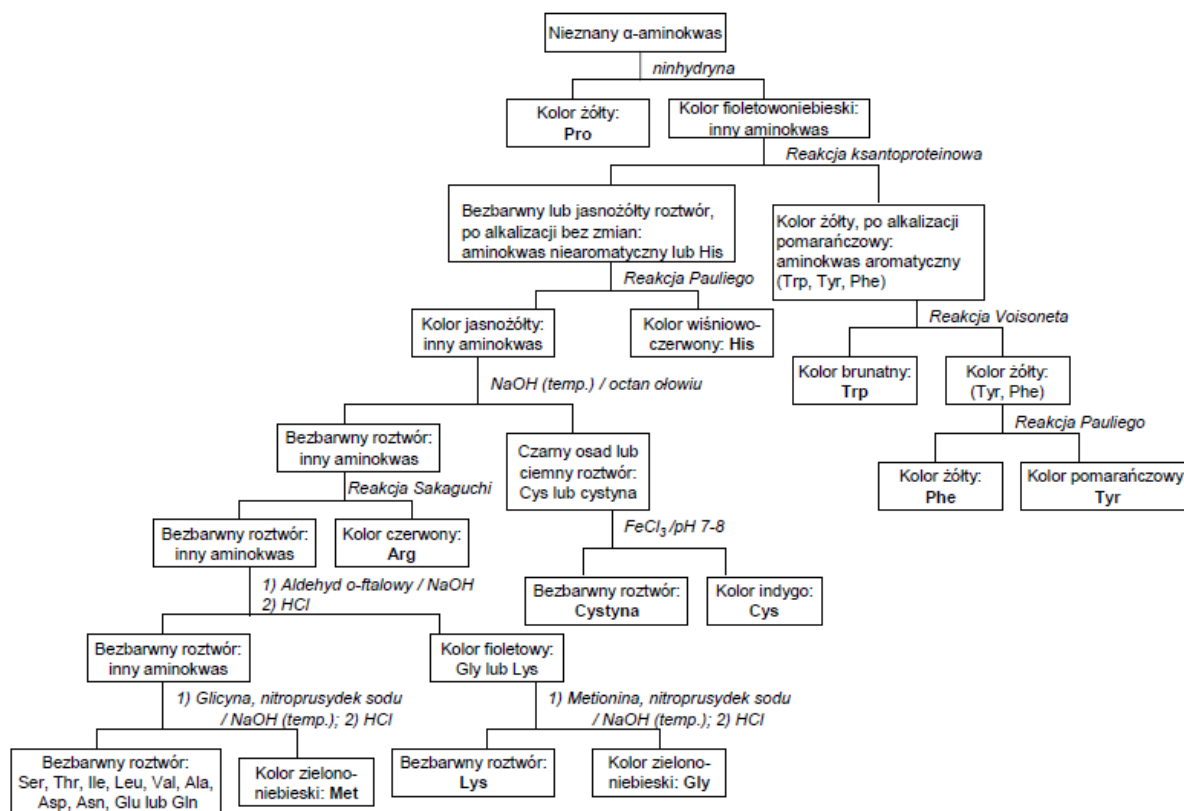
Zidentyfikowanie innych, niż wyżej wymienione, reszt aminokwasów białkowych w związku peptydowym niestety wymaga zastosowania dodatkowych, bardziej złożonych technik analitycznych (np. instrumentalnych, chromatograficznych, enzymatycznych), względnie prostej chromatografii (np. TLC), ale przeprowadzanej wobec wzorców aminokwasowych.

2.9.4. Identyfikacja nieznanego aminokwasu

Poznanie przebiegu reakcji charakterystycznych dla poszczególnych aminokwasów (patrz – rozdz. IV.2.9.2.), ułatwia właściwe zaplanowanie toku analizy identyfikacyjnej dla tej grupy związków. Dobrym przygotowaniem do wykrywania obecności poszczególnych reszt aminokwasowych w peptydzie może być umiejętność identyfikacji pojedynczego nieznanego aminokwasu białkowego. Przykładowy tok takiej analizy przedstawia Rys. 109.

Niestety, jak widać na Rys. 109., tylko nieliczne aminokwasy bez dodatkowych grup funkcyjnych w swych strukturach mogą zostać zidentyfikowane na drodze prostych reakcji barwnych. Należy do nich jedynie glicyna (Gly) oraz prolina (Pro). Aminokwasy o charakterze kwasowym, kwas asparaginowy (Asp) oraz kwas glutaminowy (Glu), wprawdzie nie dają specyficznych dla siebie reakcji barwnych o charakterze diagnostycznym, ale o ich obecności z dużym prawdopodobieństwem można wnioskować na podstawie słabokwaśnego odczynu roztworów wodnych badanych próbek. Identyfikacji aminokwasów takich, jak: walina (Val), leucyna (Leu), izoleucyna (Ile), a także asparagina (Asn) i glutamina (Gln) można dokonać np. poprzez charakterystykę ich pochodnych krystalicznych, na drodze analizy spektralnej czy chromatograficznie.

Każdy z aminokwasów, zidentyfikowany zaprezentowaną tu drogą tzw. „kolejnych wykluczeń” należy, celem upewnienia się co do jego tożsamości, poddać dodatkowo innym specyficznym dla niego reakcjom, o ile są znane.



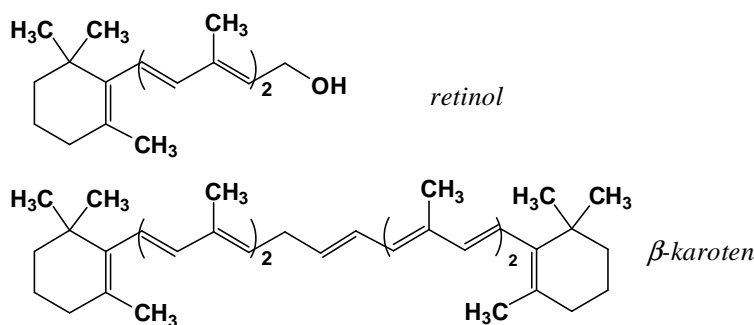
Rys. 109. Przykładowy schemat identyfikacji pojedynczego α -aminokwasu białkowego

2.10. Leki z grupy witamin

Witaminy należą do najrozmaitszych typów związków organicznych i dlatego nie można podać dla nich ogólnych reakcji grupowych. Często klasyfikuje się je do jednej z dwóch grup rozpuszczalności: witamin rozpuszczalnych w wodzie lub rozpuszczalnych w tłuszczach. Grupa związków rozpuszczalnych w tłuszczach obejmuje witaminy z grup m.in. A, D, E i K. Witaminy z grupy B oraz witamina C – to związki rozpuszczalne w wodzie.

2.10.2. Witamina A

Witamina A jest wyższym, nienasyconym alkoholem, zwanym retinolem. Retinol występuje jedynie w organizmach zwierzęcych (nerki, płuca, wątroba, złogi tłuszczowe), gdzie jest powiązany z wyższymi kwasami tłuszczowymi w połączenia typu estrowego. W roślinach natomiast występuje tzw. prowitamina A (jako barwnik typu karotenowego lub karotenoidowego).



Rys. 110. Struktury związków z grupy witaminy A.

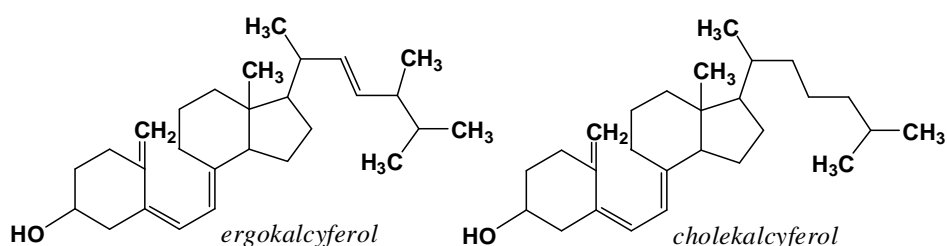
- Wykrywanie witaminy A (retinolu) - reakcja z chlorkiem antymonu(III)

Wykonanie próby

Do 1 ml chloroformowego roztworu, zawierającego 7 μg badanej substancji dodać 2 ml 30% chloroformowego roztworu SbCl_3 . Uwaga: Wszystkie użyte do analizy odczynniki powinny być wolne od domieszek wody i alkoholu. Powstaje niebieskie, szybko zanikające zabarwienie. Reakcja jest także charakterystyczna dla karotenoidów, pochodnych jononu, a także dla niektórych steroli

2.10.2. Witaminy D_2 i D_3

Grupa witamin D – to związki o budowie steroli. Obejmuje ona ergokalcyferol (witamina D_2) i cholekalcyferol (witamina D_3). Witamina D_2 występuje naturalnie w organizmach roślinnych i drożdżach, natomiast witamina D_3 jest pochodzenia zwierzęcego. Zazwyczaj, komercyjne farmaceutyki z zawartością witamin z grupy D są mieszaniną obu w/wym. steroli, które to związki dają praktycznie identyczne wyniki barwnych reakcji analitycznych.



Rys. 111. Struktury związków z grupy witamin D

- Wykrywanie witamin D_2 i D_3 (ergokalcyferolu i cholekalcyferolu)

o Reakcja z bezwodnikiem octowym w obecności steż. kwasu siarkowego

Wykonanie próby:

Ok. 0,5 mg badanej substancji rozpuścić w 5 ml chloroformu, po czym dodać 0,2 ml bezwodnika octowego oraz 0,1 ml steż. H_2SO_4 i całość intensywnie wytrząsnąć. W przypadku obecności witamin z grupy D początkowo pojawia się zabarwienie czerwone, szybko przechodzące w fioletowe, następnie błękitne, a wreszcie w zielone.

○ Reakcja z chlorkiem antymonu(III)

Wykonanie próby:

Do 0,2 ml roztworu zawierającego ok. 2 mg witamin a grupy D w 1 ml chloroformu dodać 4 ml nasyconego na zimno roztworu chlorku antymonu(III) w świeżo przedestylowanym (wolnym od wody i alkoholi) chloroformu. Pojawia się pomarańczowożółte zabarwienie, które po krótkim czasie staje się bardziej intensywne.

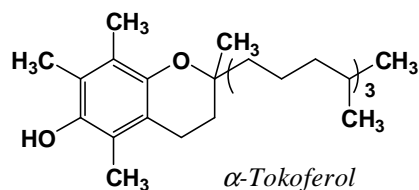
○ Reakcja z sacharozą w obecności stęż. kwasu siarkowego(VI)

Wykonanie próby:

Do ok. 1-2 mg witaminy D₂ dodać w przybliżeniu równą ilość sacharozy, po czym mieszaninę rozpuścić w 1-2 ml bezwodnego etanolu. Po dodaniu 2 kropli stęż. kwasu siarkowego(VI) występuje czerwone zabarwienie, a podczas dodawania następnych 6 kropli rozcieńczonego kwasu siarkowego(VI) – zabarwienie staje się błękitne.

2.10.3. Witamina E

Witamina E to powszechna, wspólna nazwa tokoferoli i tokotrienoli – związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, wśród których najlepiej poznanym jest α -tokoferol. Tokoferole, to pochodne dihydrochromanu, które w położeniu 2 zawierają 16-węglowy łańcuch diterpenowy, a w położeniu 6 - grupę fenolową.



Rys. 111. Struktura α -tokoferolu

• Wykrywanie witaminy E (tokoferoli)

○ Reakcja z chlorkiem żelaza(III) i α, α' -dipirydylem

Wykonanie próby:

Do ok. 1-2 ml etanolowego roztworu witaminy E dodać 1 ml 0,2% etanolowego roztworu FeCl₃, a następnie po dokładnym wymieszaniu 1 ml 0,5% etanolowego roztworu α, α' -dipirydyli. Powstaje intensywnie czerwone zabarwienie od soli α, α' -dipirydylowej tokoferolu z jonami żelaza(III).

○ Reakcja nitrowania

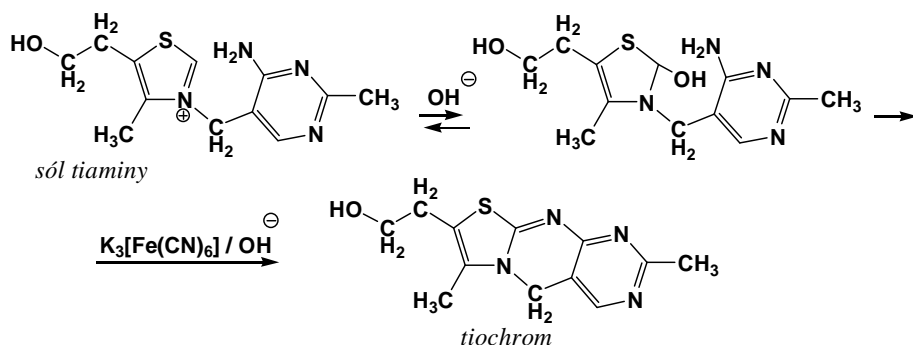
Wykonanie próby:

Do ok. 1 ml witaminy E dodać 0,2 ml stęż. kwasu azotowego(V). Ogrzewać mieszaninę na łaźni wodnej o temp. 75 °C przez 15 minut. Powstaje związek o głęboko czerwonym zabarwieniu.

2.10.4. Witaminy z grupy B

Witamina B₁ (chlorowodorek tiaminy)

Tiamina jest związkiem łatwo ulegającym rozpadowi w środowisku zarówno kwaśnym, jak i alkalicznym, zwłaszcza w obecności czynników o właściwościach utleniających. W środowisku obojętnym lub słabo alkalicznym pod wpływem jonów heksacyjanożelazianu(III) tiamina ulega utlenieniu do tiochromu – związku o silnej niebieskiej fluorescencji.



Rys. 112. Rozkład tiaminy pod wpływem czynników utleniających

- **Wykrywanie witaminy B₁**

- Reakcja z heksacyjanożelazianem(III) potasu

Wykonanie próby:

Rozpuścić ok. 50 mg badanej substancji w 5 ml 2% wodnego roztworu NaOH, dodać 0,5 ml świeżo przygotowanego 0,5% wodnego roztworu K₃[Fe(CN)₆] oraz 5 ml izobutanolu. Całość wytrząsać ok. 2 min., po czym pozostawić do rozdzielania się warstw. W przypadku obecności tiaminy warstwa izobutanolowa (po oddzieleniu od warstwy wodnej i wysuszeniu nad bezw. Na₂SO₄) wykazuje intensywną niebieską fluorescencję, która zanika po zakwaszeniu środowiska i ponownie pojawia się po jego zalkalizowaniu.

- Reakcja z octanem ołowiu(II)

Wykonanie próby:

Rozpuścić ok. 5 mg badanej substancji w mieszaninie 2 ml 10% roztworu NaOH i 1 ml 5% roztworu Pb(CH₃COO)₂. Powstaje żółte zabarwienie, które po ogrzaniu przechodzi w brunatne, a po pewnym czasie wydziela się czarny osad siarczku ołowiu(II).

- Reakcja z kwasem pikrynowym

Wykonanie próby:

Zmieszać 2 ml 0,25% roztworu badanej substancji z 1 ml nasyconego roztworu kwasu pikrynowego. Tworzy się żółty osad pikrynianu tiaminy o temp. topn. 206-208°C.

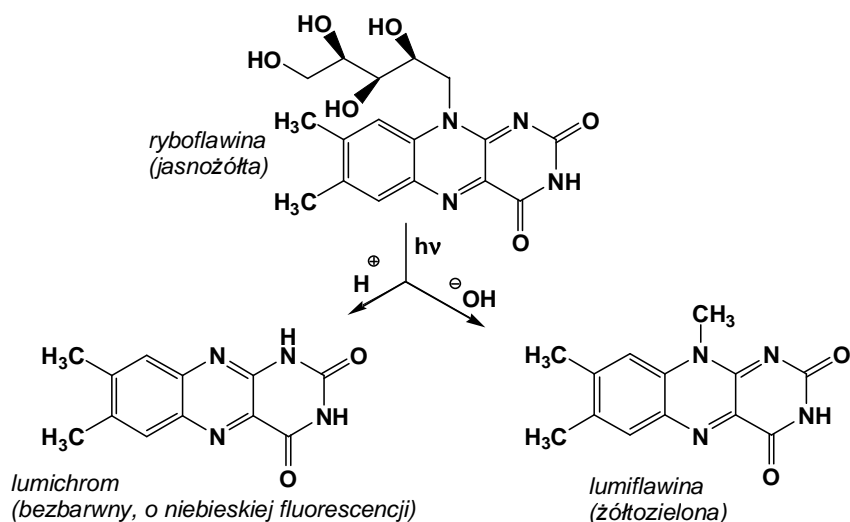
- Reakcja z chlorkiem rtęci(II)

Wykonanie próby:

Do 1 ml 0,25% roztworu badanej substancji dodać 1 ml 5% roztworu HgCl₂. Wydziela się biały osad.

Witamina B₂ (ryboflawina)

Ryboflawina jest jasnożółtą pochodną 7,8-dimetyloizoalloksazyny, która w położeniu N₁₀ zawiera resztę D-rybitolu. W środowisku kwaśnym lub obojętnym, pod wpływem światła ulega ona łatwo rozkładowi do rybitolu oraz wykazującego niebieską fluorescencję lumichromu. Natomiast w roztworach alkalicznych ryboflawina przekształca się pod wpływem światła w lumiflawinę o zabarwieniu żółtozielonym.



Rys. 113. Wpływ pH środowiska na przebieg rozkładu witaminy B₂ (ryboflawiny) w obecności światła

• Wykrywanie witaminy B₂

○ Badanie fluorescencji

Wykonanie próby:

Rozpuścić ok. 1 mg badanej substancji w 100 ml wody. W przypadku obecności ryboflawiny roztwór powinien być jasnożółty i wykazywać zielonożółtą fluorescencję (przy $\lambda = 530$ nm), znikającą po dodaniu nieorganicznych kwasów lub zasad.

○ Reakcja ze steż. kwasem siarkowym(VI)

Wykonanie próby:

Ryboflawina zadana 96% kwasem siarkowym zabarwia się na czerwono.

○ Reakcja z AgNO₃ lub solami rtęci(II)

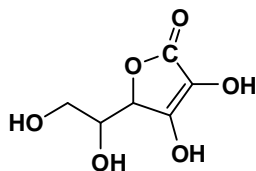
Wykonanie próby:

Do 1 mg badanej substancji dodać 1 ml 2% roztworu AgNO₃ lub soli rtęci(II) i wymieszać. Po kilku minutach tworzy się czerwono zabarwiona sól z ryboflawiną, wypadająca po pewnym czasie w postaci osadu.

○ Reakcje charakterystyczne dla grup alkoholowych

Patrz – lit. np. [1, 2, 7, 8, 9, 10].

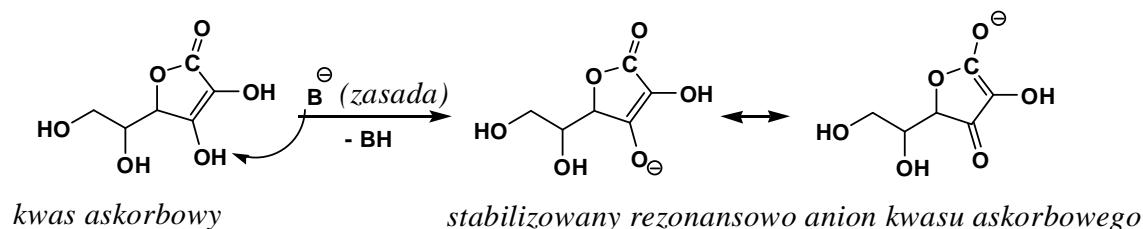
2.10.5. Witamina C (kwas askorbowy)



witamina C (kwas askorbowy)

Kwas askorbowy posiada w swej strukturze ugrupowanie dienolowe, które jest odpowiedzialne za silne właściwości redukujące związku. Produktem jego utlenienia jest kwas dehydroaskorbowy. Dwie grupy enolowe w pozycjach 3 i 4 są zdolne do oddysocjowania

protonów, z czym związany jest kwasowy charakter związku. Zdecydowanie silniejsze właściwości kwasowe ($pK_a = 4,17$) posiada grupa enolowa w położeniu 4, w porównaniu z grupą z położenia 3 ($pK_a = 11,6$), co skutkuje zdolnością tworzenia przez kwas askorbowy monosoli.



Rys. 114. Reakcja kwasu askorbowego z zasadami

Reakcje charakterystyczne

○ Badanie odczynu

Badany związek wykazuje w wodzie odczyn kwaśny (próba wobec lakmusu).

○ Reakcja z odczynnikiem Fehlinga

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać 1 ml odczynnika Fehlinga i ogrzewać łańcuch na wrzącej łańcuch wodnej przez kilka minut. Powstaje ceglastoczerwony osad tlenku miedzi (I).

○ Reakcja z jodem

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, po czym dodawać kroplami 0,1M roztwór jodu. Obserwuje się odbarwienie roztworu.

○ Reakcja z manganianem(VII) potasu

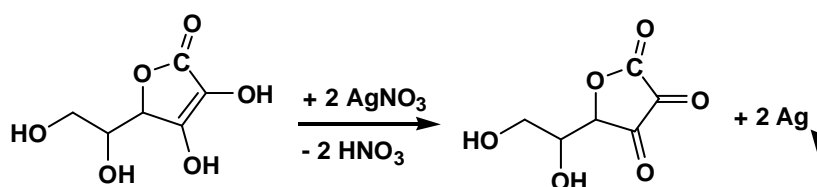
Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać 2 ml 0,5% roztworu $KMnO_4$. Obserwuje się powstawanie brunatnego osadu tlenku manganu(IV), który po dodaniu nadmiaru kwasu askorbowego ulega rozpuszczeniu, a roztwór odbarwia się.

○ Reakcja z azotanem(V) srebra

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, po czym dodać 0,5 ml 2% roztworu $AgNO_3$. Tworzy się czarny osad metalicznego srebra.



Rys. 115. Właściwości redukujące kwasu askorbowego. Reakcja z azotanem(V) srebra

○ Reakcja z nitroprusydkiem sodu

Wykonanie próby:

Około 0,02 g badanej substancji rozpuścić w 1 ml wody, dodać kilka kropli 10% roztworu nitroprusydku sodu oraz 0,5 ml 0,5M roztworu wodnego NaOH. Obserwuje się powstawanie niebieskiego, zmieniającego się w zielone zabarwienia mieszaniny reagującej.

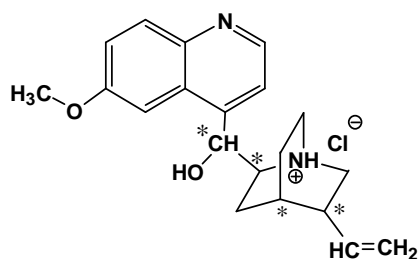
3. Monografie leków prostych

3.1. *Chininum hydrochloricum* (Polfa-Warszawa) – tabletki 300 mg

(tabletkę zawiera 0,285-0,315 g chlorowodoru chininy)

Substancja czynna: Chlorowodorek (2*R*, 4*S*, 5*R*)-[(*R*)-(6-metoksy-4-chinolilo)-hydroksymetylo]-5-winylo-chinu-klidyny

Syn.: chlorowodorek chininy (nazwa tradycyjna).



$C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl \cdot 2 H_2O$ (m.c.z. 396,93)

Właściwości fizyczne:

Patrz rozdz. III.1.1.1.

Działanie i zastosowanie:

Chinina zmniejsza przemianę materii, hamuje czynność enzymów oksydacyjnych, przez co obniża ciepłotę ciała, wywiera działanie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe, pobudza wydzielanie soków trawiennych, rozszerza naczynia krwionośne w skórze, wzmacnia wydzielanie potu (wpływ napotny) oraz skurcze mięśni gładkich, niszczy zarodźce malaryczne; w dużych dawkach spowalnia przewodzenie bodźców w mięśniu sercowym. W małych dawkach działa profilaktycznie w chorobach zakaźnych, zwłaszcza w grypie i przeziębieniu.

Badanie tożsamości leku:

Dokładnie sproszkować dwie tabletki (tj. ok. 2 x 0,3 g substancji czynnej), dodać 20 ml gorącej wody destylowanej, silnie wytrząsnąć w ciągu kilku minut i przesączyć. Przesącz (roztwór A) przeznaczyć do prób na badanie tożsamości, zaproponowanych w rozdz. IV.2.1.2.

Ilościowe oznaczenie zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki, względnie innej jednostkowej porcji leku (o ile nie ma on postaci tabletki).

- Metoda spektrofotometryczna.

Wykonanie:

- Sporządzić dokładną naważkę masy sproszkowanych tabletek, odpowiadającą ok. 0,067 g chlorowodoru chininy, umieścić ją w kolbie miarowej poj. 100 ml i uzupełnić do kreski 0,1 N kwasem solnym. Zawartość

kolby wytrząsać ok. 30 min, po czym przesączyć do suchego naczynia – roztwór (A). Odmierzyć dokładnie 2 ml roztworu (A) do kolby miarowej poj. 50 ml, uzupełnić ją do kreski 0,1 N kwasem solnym – roztwór (B).

- o Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 250$ nm w kuwetach 1 cm, stosując 0,1 N kwas solny jako odnośnik.
- o Celem uśrednienia wyników powtórzyć niniejszą procedurę oznaczania dla co najmniej trzech kolejnych naważek badanego leku.
- o Na koniec, uśrednić otrzymane wyniki wartości absorpcji **A**, a następnie obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkie/jednym gramie badanego leku, wiedząc, że dla chininy w roztworze 0,1 N kwasu solnego przy długości fali $\lambda = 250$ nm współczynnik $E_{1cm}^{1\%} = 770$.

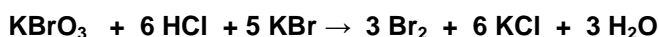
W tym celu można także skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_B \cdot N \cdot m_t) / (770 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: **A** – średnia wartość absorpcji; **V_B** - objętość roztworu (B) w [ml]; **N** – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury $N = 50$); **m_t** – średnia masa jednej tabletki w [g]; **770** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla chininy w roztworze 0,1 N kwasu solnego przy długości fali $\lambda = 250$ nm; **m_n** – masa naważki w [g].

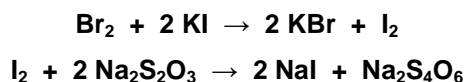
- Metoda bromianometryczna.

Oznaczenie polega na wykorzystaniu silnych właściwości utleniających bromianu potasowego. W środowisku kwaśnym utlenia on związki redukujące (tutaj bromek potasowy) zgodnie z równaniem:



Wywiązany ilościowo brom służy do utleniania w środowisku kwaśnym substancji oznaczanej (np. poprzez bromowanie układu aromatycznego zaktywowanego na reakcję substytucji elektrofilowej, bromowanie wiązań wielokrotnych węgiel – węgiel, utlenianie niektórych innych grup funkcyjnych, jak hydrazynowa, czy enolowa). W przypadku chlorowodoru chininy reakcji bromowania ulega jedynie grupa winylowa. W warunkach wymaganych dla metody bromianometrycznej (środowisko silnie kwaśne) obydwie atomy azotu w chininie są sprotonowane, a zatem pierścień układu aromatycznego jest zdezaktywowany na substytucję bromem wg mechanizmu S_E.

Nadmiar bromu, nieużytego na utlenianie związku organicznego, poddaje się reakcji z jodkiem potasowym, w wyniku której wydziela się wolny jod, a ten z kolei oznacza się ilościowo poprzez zmiareczkowanie mianowanym roztworem tiosiarczanu sodowego.



Wykonanie:

- o W kolbie stożkowej poj. 250 ml z korkiem szlifowym umieścić dokładną naważkę badanego leku zawierającą ok. 0,2 g substancji czynnej, rozpuścić ją w 10 ml wody, dodać 10 ml 5% wodnego roztworu bromku potasu, 10 ml 10% kwasu solnego, 0,1 ml roztworu czerwieni metylowej, całość dokładnie wymieszać, po czym zmiareczkować roztworem bromianu potasowego ($c = 0,02$ mol/l) do zmiany zabarwienia.
- o Następnie dodać 50 ml 1% roztworu jodku potasowego i 150 ml wody, kolbę zamknąć korkiem szlifowym i pozostawić w ciemnym miejscu na okres ok. 5 minut.
- o Wydzielony jod zmiareczkować 0,1 M roztworem tiosiarczanu sodowego, dodając pod koniec miareczkowania 2 ml roztworu skrobi.
- o Wykonać ślepią próbę, tzn. powtórzyć czynności z punktów (a) – (c) bez zawartości badanego leku.

- o Obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkie badanego leku (lub jednym gramie leku jeśli do analizy otrzymano jego sproszkowaną formę).

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Do sproszkowanej ilości tabletek, odpowiadającej ok. 15 mg substancji czynnej, dodać 1 ml 50% wodnego roztworu etanolu, silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: chloroform – aceton - dietyloamina (5 : 4 : 1);

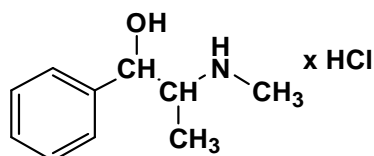
wywoływacz: odczynnik Dragendorffa lub w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

(Rf – ok. 0,30 plama okrągła, pomarańczowa).

3.2. *Ephedrinum hydrochloricum* (Polfa-Warszawa) - tabletki 25 mg

Substancja czynna: Chlorowodorek 1-fenyl-2-metyloaminopropan-1-olu

Syn.: chlorowodorek efedryny (nazwa tradycyjna).



$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO} \cdot \text{HCl}$ (m.cz. 201,09)

Właściwości fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.1.2.

Działanie i zastosowanie:

Lek adrenergiczny, działający na obwodowy układ nerwowy. Zwęża naczynia krwionośne, długotrwale podnosi ciśnienie, przyspiesza czynność serca, stymuluje oddech, rozszerza oskrzela, rozkurcza mięśnie gładkie dróg moczowych, rozszerza źrenice bez porażenia akomodacji. Lek stosowany jest w zapaści, dychawicy skrzelowej, w stanach alergicznych, zatruciach morfiną lub jej pochodnymi.

Badanie tożsamości leku:

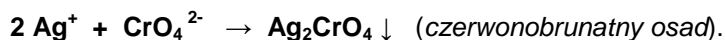
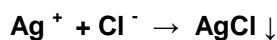
Dokładnie sproszkować ilość tabletek odpowiadającą ok. 0,05 g substancji czynnej, dodać 10 ml wody destylowanej, silnie wytrząsnąć i przesączyć. Przesącz (roztwór A), stanowiący ok. 0,5% roztwór substancji czynnej przeznaczyć do prób na badanie tożsamości zaproponowanych w rozdz. IV.2.1.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda argentometryczna (Mohra)

Metoda polega na oznaczeniu zawartości jonów chlorkowych w leku za pomocą mianowanego roztworu azotanu srebra przy udziale roztworu chromianu(VI) potasu jako wskaźnika. Reakcje przebiegają wg równań:



Oznaczanie przeprowadza się w środowisku obojętnym, co umożliwia powstanie czerwonobrunatnego osadu chromianu(VI) srebra, wskazującego koniec miareczkowania.

Wykonanie:

- Sporządzić dokładną naważkę sproszkowanych tabletek odpowiadającą zawartości ok. 0,075 g substancji czynnej, dodać 10 ml wody destylowanej, dokładnie wymieszać i przesączyć. Osad przemyć trzykrotnie wodą (3 x 5 ml), zbierając wszystkie przesączy w jednej kolbie stożkowej – roztwór (B).
- Do roztworu (B) dodać kilka kropli wodnego roztworu K_2CrO_4 i miareczkować 0,1 N roztworem AgNO_3 do czerwonego zabarwienia.
- Wyznaczyć ilość chlorowodoru efedryny ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO} \cdot \text{HCl}$) w 1 g leku (jeśli do analizy otrzymano sproszkowaną formę leku) lub w jednej tabletkce.
- Celem uśrednienia wyników niniejszą procedurę oznaczania powtórzyć dla co najmniej dwóch kolejno sporządzonych naważek badanego leku.

- Metoda acydymetryczna w środowisku niewodnym

W acydymetrii w środowisku niewodnym stosuje się słabo kwasowe protonowe rozpuszczalniki (tutaj kwas octowy), które w reakcji z silnymi kwasami (np. wobec HClO_4) wykazują właściwości protonobiorców.



Jony chlorowcowe, obecne np. w chlorowcowodorkach amin organicznych, nie są zdolne do odebrania protonu od kwasu octowego. Reakcja zobojętniania musi być zatem poprzedzona wytrącaniem nierozpuszczalnych w kwasie octowym halogenków rtęci(II), a zasada organiczna (B) przechodzi w formę octanu. Miareczkowanie przebiega wg reakcji:



Wykonanie:

- Odważyć dokładnie ilość sproszkowanych tabletek, odpowiadającą 0,1 g substancji czynnej, rozpuścić w 12,5 ml lodowatego kwasu octowego, dodać 2,5 ml roztworu octanu rtęci(II) i miareczkować 0,1 N roztworem kwasu chlorowego(VII) w bezwodnym kwasie octowym wobec fioletu krystalicznego (rozpuszczonego w lodowatym kwasie octowym) jako wskaźnika, do zmiany zabarwienia na niebieskie (przygotowanie wszystkich roztworów – patrz rozdz. IX.1). Wykonać także ślepą próbę. Oznaczenie przeprowadzać pod sprawnie działającym wyciągiem.
- Celem uśrednienia wyników niniejszą procedurę oznaczania powtórzyć dla co najmniej dwóch kolejno sporządzonych naważek badanego leku.
- Wyznaczyć ilość chlorowodoru efedryny w 1 tabletkce leku (lub jednym gramie leku jeśli do analizy otrzymano jego sproszkowaną formę).

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Do dokładnie sproszkowanej ilości tabletek, odpowiadającej ok. 5 mg substancji czynnej, dodać 1 ml 50 % wodnego roztworu etanolu, silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: chloroform – aceton - dietyloamina (5 : 4 : 1);

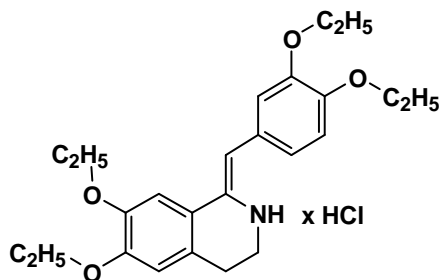
wywoływacz: odczynnik Dragendorffa w temp. pokojowej lub w świetle UV ($\lambda = 254$ nm).
(Rf – ok. 0,45 plama okrągła, pomarańczowa, nietrwała).

3.3. Galospa (FCSP Galenus) - tabletki 40 mg

Substancja czynna:

Chlorowodorek 1-(3,4-dietoksybenzylideno)-6,7-dietoksy-1,2,3,4-tetrahydroizo-chinoliny

Syn.: Chlorowodorek drotaweryny, chlorowodorek izodihydroperparyny., NO-SPA.



Własności fizyczne:

Zielonożółty, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczalny w metanolu, etanolu, dość trudno w wodzie. Współczynnik absorpcji $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 440$ ($\lambda = 241$ nm) w 0,01 N kwasie solnym. Temp. topn. 210 °C (z rozkładem).

Działanie i zastosowanie:

Pólsyntetyczna pochodna papaweryny. Lek spazmolityczny, działający bezpośrednio na mięśnie gładkie. Działa silniej i dłużej od papaweryny. Stosowany jest w przypadkach kolki wątrobowej, żółciowej, kamicy nerkowej, w zapaleniu dróg moczowych, chorobie wrzodowej, niewydolności wieńcowej serca, dusznicy bolesnej oraz przy nadciśnieniu tętniczym.

Badanie tożsamości leku:

Odważyć ilość sproszkowanych tabletek, odpowiadającą ok. 0,08 g substancji czynnej, dodać 10 ml wody, dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie, po czym przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu małego lejka sitowego lub Schotta. Przesącz (roztwór A) przeznaczyć do prób na badanie tożsamości.

- Reakcja z chlorkiem żelaza(III)

Wykonanie próby:

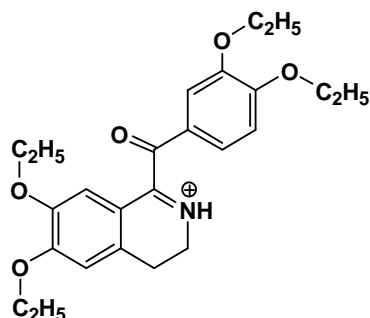
Do około 1 ml roztworu (A) lub ok. 10 mg substancji stałej dodać ostrożnie 2,5 ml stęż. H₂SO₄ i jedną kroplę 5% roztworu FeCl₃. Po ogrzaniu na łaźni wodnej obserwuje się powstawanie zielonofioletowego zabarwienia, pochodzącego od tworzącej się soli kompleksowej pochodnej fenolowej. Pochodna fenolowa powstaje w wyniku acydolitycznego rozszczepienia alifatyczno-aromatycznych grup eterowych.

Po dodaniu mieszaniny reagującej do ok. 0,3 ml stęż. kwasu azotowego(V) zabarwienie zmienia się na brunatnoczerwone od powstałego produktu utlenienia nienasyconego mostka.

- Reakcja Erdmanna

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać ostrożnie 2,5 ml stęż. H₂SO₄ i 3 krople stęż. HNO₃. Powstaje żółte zabarwienie roztworu, zmieniające się w brunatne, jakim charakteryzuje się produkt utlenienia drotaweryny:



- Reakcja wykrywania obecności jonów chlorkowych

Wykonanie próby:

Do 1 ml roztworu (A) dodać ostrożnie 0,1 ml 10% HNO₃ i 1 ml 0,1 N roztworu AgNO₃. W przypadku obecności jonów chlorkowych powstaje biały osad, rozpuszczalny w 10 % roztworze amoniaku.

- Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa

Wykonanie próby:

Do około 1 ml wodnego roztworu badanej substancji dodać 2 ml wody i kilka kropli odczynnika Dragendorffa. Powstaje pomarańczowy osad soli z drotaweryną.

- Badania spektrofotometryczne

Przygotowanie roztworu do badań:

Odważyć dokładnie ilość sproszkowanych tabletek odpowiadającą ok. 0,02 g chlorowodoru drotaweryny do kolby miarowej poj. 100 ml, dodać 50 ml 0,05 N kwasu solnego, intensywnie zamieszać, uzupełnić objętość cieczy kwasem do kreski, przesączyć – roztwór podstawowy (B). Następnie, do kolby miarowej poj. 50 ml pobrać 2,5 ml przesączu, uzupełnić objętość cieczy do kreski za pomocą 0,05 N kwasu solnego, całość dokładnie wymieszać – roztwór (C).

Wykonanie:

Zarejestrować widmo UV dla 0,001% roztworu badanej substancji w 0,05 N kwasie solnym (tj. roztworu C). Widmo absorpcyjne powinno wykazywać maksima absorpcji przy długościach fali: 241 nm, 303 nm i 352 nm. ($E_{1cm}^{1\%}$ przy $\lambda=241$ nm wynosi 440).

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda spektrofotometryczna.

Wykonanie:

- Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu (C) przy długości fali $\lambda=241$ nm w kuwetach 1 cm, stosując 0,05 N kwas solny jako odnośnik.
- Powtórzyć powyższą procedurę pomiaru absorpcji co najmniej dwukrotnie, sporządzając z roztworu podstawowe (B) z kolejnych naważek badanego leku.
- Uśrednić otrzymane wyniki, a następnie obliczyć zawartość W (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkie badanego leku (lub jednym gramie leku jeśli do analizy otrzymano jego sproszkowaną formę), uwzględniając informację, że $E_{1cm}^{1\%}$ przy $\lambda=241$ nm wynosi 440, wielkość sporządzonej naważki i ewentualnie średnią masę tabletki.

W tym celu można także skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_C \cdot N \cdot m_t) / (440 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: A – średnia wartość absorpcji; V_C - objętość roztworu (C) w [ml]; N – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury $N = 40$); m_t – średnia masa jednej tabletki w [g]; **440** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla chlorowodoru drotaweryny w roztworze 0,05 N kwasu solnego przy długości fali $\lambda = 241$ nm; m_n – masa naważki w [g].

- Metoda acydymetryczna w środowisku niewodnym

Zasada oznaczenia – analogiczna, jak dla oznaczania chlorowodoru efedryny.

Wykonanie:

Odważyć dokładnie ilość sproszkowanej masy tabletek, odpowiadającą 0,2 g substancji czynnej, rozpuścić naważkę w 20 ml kwasu octowego, dodać 5 ml bezwodnika octowego, 5 ml roztworu octanu rtęci(II), 0,1 ml roztworu fioletu krystalicznego i miareczkować 0,05 N roztworem kwasu chlorowego(VII) w kwasie octowym do zmiany zabarwienia. Uwaga: przygotowanie roztworów – patrz rozdz. IX.1. Wykonać ślepą próbę. Obliczyć zawartość substancji czynnej w jednej tabletkie badanej próbki leku (w mg).

Oznaczenie tą metodą należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem.

Analiza TLC:

Przygotowanie próbek:

Dokładnie odważyć ilość sproszkowanej tabletki odpowiadającej ok. 5 mg substancji czynnej, dodać 5 ml 50 % wodnego roztworu etanolu, silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złoże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: cykloheksan – aceton (4 : 5);

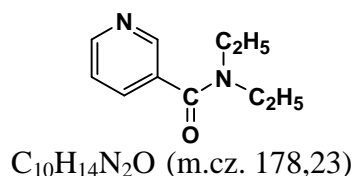
wywoływacz: odczynnik Dragendorffa lub obserwacja w świetle UV ($\lambda = 254$ nm).

(Rf – ok. 0,30 plama owalna, pomarańczowa).

3.4. Cardiamidum (Polfa)

(płyn zawierający w 100 ml 24,5 – 25,5 g kardiamidu i 2,85 – 3,15 g kwasu mlekowego)

Substancja czynna: *N,N*-Dietyloamid kwasu pirydyno-3-karboksyłowego



Własności fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.2.

Działanie i zastosowanie:

Lek analeptyczny, wzmacnia pobudliwość ośrodkowego układu nerwowego (przede wszystkim naczyniowo-ruchowego) i oddechowego. Podnosi ciśnienie krwi, rozszerza naczynia wieńcowe serca, mózgu, nerek i skóry. Działanie krótkotrwałe. Stosowany w przypadkach wstrząsów, zapaści, niewydolności krążenia, w ostrych chorobach zakaźnych, zatruciach barbituranami, morfiną, tlenkiem węgla, alkoholem.

Badanie tożsamości leku:

Patrz rozdz. IV.2.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

- Metoda spektrofotometryczna.

Wykonanie:

- Odmierzyć dokładnie (za pomocą pipety automatycznej) 1 ml roztworu kardiamidu do kolby miarowej poj. 100 ml, dopełnić wodą destylowaną do kreski i całość intensywnie wymieszać - roztwór podstawowy (A).
- Następnie, do kolby miarowej poj. 100 ml pobrać dokładnie 1 ml roztworu (A), uzupełnić objętość cieczy do kreski 1 N kwasem solnym, całość dokładnie wymieszać – roztwór (B).
- Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 261 \text{ nm}$ w kuwetach 1 cm, stosując 1 N kwas solny jako odnośnik.
- Obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w 100 ml badanego leku, uwzględniając informację, że współczynnik $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ w 1N HCl przy $\lambda = 261 \text{ nm}$ wynosi 302.
- Celem uśrednienia wyników powtórzyć niniejszą procedurę oznaczania dla co najmniej trzech kolejnych dokładnie odmierzonych próbek badanego leku.

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Lek w postaci płynu rozcieńczyć etanolem (95%) do zawartości ok. 25 mg kardiamidu w 1 ml roztworu.

Chromatogram:

złoże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

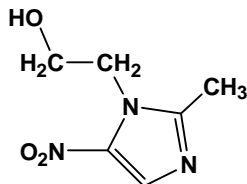
układ rozwijający: cykloheksan – chloroform – kwas octowy (4 : 5 : 1);

wywoływacz: odczynnik Dragendorffa

(R_f – ok. 0,50 plama okrągła, trwała, pomarańczowa).

3.5. *Metronidazol Polpharma* (Polpharma SA) – tabletki 250 mg

Substancja czynna: 2-(2-Metylo-5-nitro-imidazol-1-ylo)-etanol



C₆H₉N₃O₃ (m.cz.171,15)

Własności fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.2.

Działanie i zastosowanie:

Lek o działaniu przeciwpierwotniakowym i przeciwbakteryjnym. Działa na *Trichomonas vaginalis*, a ponadto hamuje rozwój *Lamblija intestinalis* oraz *Entamoeba histolytica*. Działa bakteriobójczo wyłącznie na bakterie beztlenowe z rodzaju *Clostridium*, *Helicobacter*. Stosowany w przypadkach zakażeń rzęsistkowych oraz przy lambliazie, czerwonce pełzakowej oraz zakażeniach bakteriami beztlenowymi w chorobie wrzodowej, posocznicy, zakażeniach pooperacyjnych oraz w stomatologii.

Badanie tożsamości leku:

Odważyć taką ilość sproszkowanych tabletek, która odpowiada 250 mg badanej substancji, dodać 10 ml 0,1 N H₂SO₄, dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie, po

czym przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu małego lejka sitowego lub Schotta – roztwór (A). Przesącz przeznaczyc do prób na badanie tożsamości – patrz rozdz. IV.2.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda spektrofotometryczna.

Wykonanie:

- Odważyć dokładnie ilość sproszkowanych tabletek odpowiadającą ok. 0,01 g substancji czynnej do kolby miarowej poj. 10 ml, dodać 8 ml etanolu (95%), zawartość ogrzać do temp. 40-50 °C, intensywnie zamieszać, ostudzić, uzupełnić objętość cieczy etanolem do kreski. Zawartość kolby przesączyć – roztwór podstawowy (B).
- Następnie, do kolby miarowej poj. 10 ml pobrać dokładnie (przy użyciu pipety automatycznej) 0,1 ml roztworu (B), uzupełnić objętość cieczy do kreski za pomocą etanolu i całość dokładnie wymieszać – roztwór (C).
- Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu (C) przy długości fali $\lambda = 312$ nm w kuwetach 1 cm, stosując 95 % etanol jako odnośnik.
- Celem uśrednienia wyników powtórzyć niniejszą procedurę oznaczania dla co najmniej trzech kolejnych naważek badanego leku.
- Na koniec, uśrednić otrzymane wyniki wartości absorpcji **A**, a następnie obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkce/1 gramie badanego leku, uwzględniając informację, że $E_{1cm}^{1\%}$ w 95% etanolu, przy $\lambda = 312$ nm wynosi dla metronidazolu 537.

W tym celu można także skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_C \cdot N \cdot m_t) / (537 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: **A** – średnia wartość absorpcji roztworu (C) przy długości fali $\lambda = 312$ nm; **V_C** - objętość roztworu (C) w [ml]; **N** – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury **N** = 100); **m_t** – średnia masa jednej tabletki w [g]; **537** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla metronidazolu w etanolu przy długości fali $\lambda = 312$ nm; **m_n** – masa naważki w [g].

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Odważyć dokładnie sproszkowaną ilość tabletek odpowiadającą ok. 5 mg substancji czynnej, dodać 1 ml acetonu, silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: aceton – chloroform – eter dietylowy (5 : 2 : 3);

wywoływacz: 0,1 % wodny roztwór KMnO₄ lub obserwacja w świetle UV ($\lambda = 254$ nm)

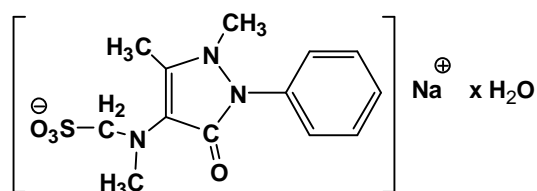
(R_f – ok. 0,50 plama owalna, żółta).

3.6. *Pyralgina* (Polpharma SA) – tabletki 500 mg

Substancja czynna:

Nazwa chemiczna: N-(1-fenyl-2,3-dimetylo-5-okso-3-pirazolin-4-ylo)-N-metyloamino-metanosulfonian sodowy

Syn.: Analgin, Pyralginum, Metamizolum natricum, Dipyrone, Nowalgina



Własności fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.2.

Działanie i zastosowanie:

Lek o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i uspakajającym. Zmniejsza napięcie mięśni gładkich, rozszerza naczynia krwionośne, działa również przeciwzapalnie. Lek ma zastosowanie jako redukujący bóle różnego pochodzenia, w tym: bóle głowy, migrena, nerwobóle, schorzenia reumatyczne, kolka wątrobowa i nerkowa, stany gorączkowe, zapalenie korzonków nerwowych.

Badanie tożsamości leku:

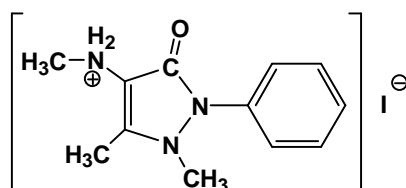
Odważyć ilość sproszkowanych tabletek, odpowiadającą 0,5 g pyralginy, dodać 15 ml wody destylowanej, intensywnie wymieszać, po czym przesączyć. Przesącz przeznaczyć do wykonania następujących reakcji charakterystycznych, jak podano w rozdz. IV.2.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć wagę jednej tabletki.

- Metoda jodometryczna.

Metoda oznaczania polega na tym, że w czasie hydrolizy pyralginy w środowisku kwaśnym (patrz- reakcje charakterystyczne w rozdz. IV.2.2.) jod utlenia utworzony siarczan(IV) do siarczanu(VI), natomiast powstający jodowodór reaguje z produktem hydrolizy (4-N-metyloaminofenazonem), tworząc jego jodowodorek o strukturze:



Miareczkowanie jodem należy rozpocząć natychmiast po rozpuszczeniu badanej próbki w wodzie i dodaniu kwasu solnego. Powstałe po hydrolizie produkty – formaldehyd oraz wodorosiarczan(IV) sodowy mogą częściowo reagować ze sobą, dając związek o strukturze $\text{NaSO}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (nie reagujący z jodem), co spowoduje zmniejszone w stosunku do właściwego zużycie jodu.

Wykonanie oznaczenia:

Odważyć dokładnie ilość tabletek, odpowiadającą zawartości ok. 0,2 g substancji czynnej, dodać 5 ml wody destylowanej, 5 ml 0,02 N kwasu solnego, intensywnie wymieszać i miareczkować 0,1 N roztworem jodu (przygotowanie – patrz rozdz. IX.1.), dodając pod koniec miareczkowania 2 ml roztworu skrobi.

Celem uśrednienia wyników procedurę oznaczania należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, korzystając z kolejno sporządzanych naważek badanego leku.

Przy obliczaniu średniej zawartości substancji czynnej w jednej tabletkie, podawanej w [g] można uwzględnić informację, że 1 ml 0,1 N roztworu jodu odpowiada 0,01757 g jednowodnej pyralginy ($C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$).

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Sporządzić roztwór zawierający 1-5 mg substancji czynnej w 1 ml metanolu i przesączyć.

Chromatogram:

złoże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

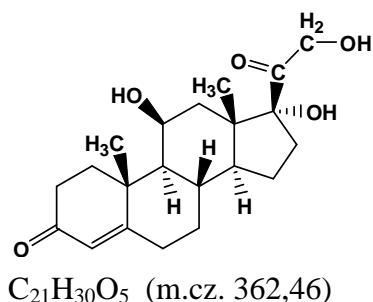
układ rozwijający: dioksan – ksylen – toluen – izopropanol – 25% roztwór NH₃ (1 : 2 : 1 : 4 : 2);

wywoływacze: 5% wodny roztwór FeCl₃ (A), 5% roztwór K₃[Fe(CN)₆] (B) lub obserwacja w świetle UV ($\lambda = 254$ nm). Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu spryskać kolejno roztworem (A), a następnie (B).

(R_f – ok. 0,23 plama okrągła, granatowa, trwała).

3.7. *Hydrocortisonum* (Jelfa) – tabletki 20 mg

Substancja czynna: 11,17-Dihydroksy-17-(2-hydroksyacetylo)-10,13-dimetylo-1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahydrocyklopenta[a]fenantren-3-on



Właściwości fizyczne:

Substancja krystaliczna, biała, trudno rozpuszczalna w etanolu (0,76 g/ml), bardzo trudno rozpuszczalna w eterze etylowym, praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie. Temp. topn. ok. 216 °C (z rozkładem).

Działanie i zastosowanie:

Lek z grupy steroidów, glikokortykoid o działaniu przeciwzapalnym i przeciwalergicznym.

Badanie tożsamości leku:

- Reakcja z kwasem siarkowym(VI)

Wykonanie próby:

Sproszkowaną ilość tabletek, odpowiadającą ok. 1 mg steroidu rozpuścić w 1 ml 96% kwasu siarkowego, dodać ostrożnie 10 ml wody i zamieszać. W przypadku hydrokortyzonu po 5 min. powstaje brązowoczerwone zabarwienie, zmieniające się po rozcieńczeniu wodą na żółtopomarańczowe. Jednocześnie wytrąca się osad. W świetle UV – zielona fluorescencja.

- Reakcja z 2-naftolem

Przygotowanie odczynnika:

1 g 2-naftolu zmieszać z 40 ml 96% kwasu siarkowego i ogrzać na łaźni wodnej do rozpuszczenia osadu.

Wykonanie próby:

Do ok. 1 mg steroidu dodać 1 ml w/wym. „odczynnika naftolowego”. W przypadku hydrokortyzonu roztwór przyjmuje barwę żółtobrazową, która nie zmienia się po rozcieńczeniu wodą.

- Reakcja z 2,4-dinitrofenylohydrazyną

Wykonanie próby:

Do ok. 10 mg steroidu dodać 1 ml odczynnika 2,4-dinitrofenylohydrazynowego (przygotowanie - patrz rozdz. IX.1.) i zamieszać. Obserwuje się powstawanie ciemnopomarańczowego osadu.

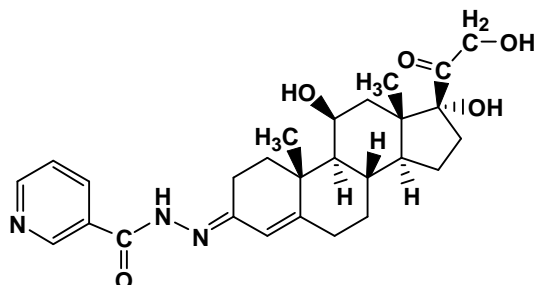
- Reakcja z hydrazidem kwasu izonikotynowego

Przygotowanie odczynnika:

0,05 g hydrazidu kwasu izonikotynowego rozpuścić w bezwodnym etanolu, dodać 1 kroplę 96% kwasu siarkowego i dopełnić do 100 ml bezwodnym etanolem.

Wykonanie próby:

Do ok. 10 mg steroidu dodać 1 ml w/wym. odczynnika i pozostawić w temp. pokojowej do rozpuszczenia, mieszając sporadycznie. Obserwuje się żółte zabarwienie roztworu od powstającego związku o strukturze:



Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda spektrofotometryczna.

- Odważyć dokładnie masę sproszkowanych tabletek, odpowiadającą ok. 5 mg substancji czynnej, rozpuścić ją w ok. 25 ml etanolu, przesączyć bezpośrednio do kolby miarowej poj. 50 ml, przemyć zawartość sączka etanolem (3 x 5 ml), zbierając wszystkie przesącze w w/wym. kolbie. Dopełnić objętość kolby do kreski tym samym rozpuszczalnikiem – roztwór (A).
- Pobrać pipetą automatyczną 1 ml roztworu (A) do kolby miarowej poj. 10 ml, dopełnić objętość roztworu do kreski za pomocą etanolu – roztwór (B).
- Zmierzyć absorbancję roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 240$ nm.
- Celem uśrednienia wyników powtórzyć niniejszą procedurę oznaczania dla co najmniej trzech kolejnych naważek badanego leku.
- Na koniec, uśrednić otrzymane wyniki wartości absorpcji **A**, a następnie obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkce/1 gramie badanego leku, uwzględniając średnią masę tabletki oraz fakt, że wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla hydrokortyzonu w etanolu przy długości fali $\lambda = 240$ nm wynosi 435.

Opcjonalnie, można skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_B \cdot N \cdot m_t) / (435 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: **A** – średnia wartość absorpcji roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 240$ nm; **V_B** - objętość roztworu (B) w [ml]; **N** – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury **N** = 50); **m_t** – średnia masa jednej tabletki w [g]; **435** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla hydrokortyzonu w etanolu przy długości fali $\lambda = 240$ nm; **m_n** – masa naważki w [g].

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Przygotować roztwór substancji badanej o stężeniu ok. 2,5 mg/ml w mieszaninie chloroform – metanol (9 : 1). W razie potrzeby przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy GF₂₅₄ (Merck);

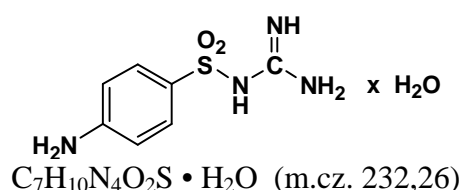
układ rozwijający: chloroform – aceton (4 : 1);

wywoływacze: mieszanina stęż. H₂SO₄ i etanolu (1 : 4) lub obserwacja w świetle UV ($\lambda = 254$ nm). Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu w temp. pokojowej spryskać wywoływaczem i ogrzewać 15 min w temp. 120 °C.

3.8. *Sulgin* (prod. Rosja) – tabletki 0,5 g

Substancja czynna:

Nazwa chemiczna: 1-Sulfanililoganidyna



Własności fizyczne:

Białe, igielkowate kryształy lub biały, krystaliczny proszek, temp. topn. = 190-193 °C (dla substancji bezwodnej), łatwo rozpuszczalny w gorącej wodzie, trudno rozpuszczalny w etanolu i w zimnej wodzie.

Działanie i zastosowanie:

Lek o działaniu bakteriostatycznym, stosowany przy zwalczaniu zakażeń przewodu pokarmowego.

Badanie tożsamości leku:

- Reakcja hydrolizy

Wykonanie próby:

Okolo 50 mg badanej substancji ogrzać do wrzenia z 5 ml 10% roztworu NaOH. Wydziela się zapach amoniaku (odróżnienie od innych sulfonamidów), który barwi na niebiesko umieszczony u wylotu naczynia reakcyjnego uniwersalny papierek wskaźnikowy (uprzednio zwilżony wodą).

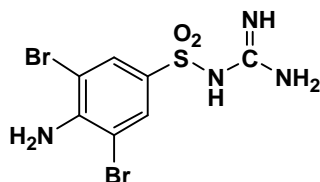
Pozostałe reakcje, potwierdzające tożsamość substancji czynnej w leku należy wykonać wg przepisów zawartych w rozdz. IV.2.4.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Jeżeli badany lek ma postać tabletki, to przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć jej średnią wagę.

- Metoda bromianometryczna

Zasada oznaczania – patrz rozdział IV.3.1. W próbie tej sulfaguanidyna ulega reakcji bromowania, dając dibromopochodną o strukturze:



Wykonanie oznaczenia:

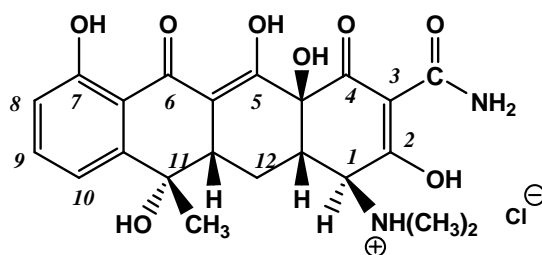
- o Umieścić dokładną naważkę sproszkowanych tabletek, odpowiadającą ok. 0,05 g substancji czynnej w kolbie z korkiem szlifowym, po czym rozpuścić ją w 5 ml 25% roztworu kwasu solnego.
- o Dodać roztwór 1 g KBr w 1,5 ml wody, 10 ml kwasu octowego, po czym intensywnie mieszając dodać 20 ml roztworu bromianu(V) potasu ($c = 0,02 \text{ mol/l}$).
- o Całość pozostawić w ciemnym miejscu przez 5 minut, a następnie dodać 0,5 g jodku potasu.
- o Po upływie 1 minuty miareczkować 0,1 M roztworem tiosiarczianu sodowego, dodając pod koniec miareczkowania 2 ml roztworu skrobi.
- o Równocześnie należy wykonać ślepią próbę, pozwalającą oznaczyć całkowitą ilość bromu, jaka powstaje w warunkach oznaczania.
- o Procedurę oznaczania należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, korzystając każdorazowo z nowosporządzonej naważki leku.
- o Obliczyć średnią zawartość (**W**) monohydratu sulfaguanydiny w jednej tabletkie w [g].

3.9. *Tetracyclinum* (Polfa Tarchomin) – tabletki powlekane 250 mg

Substancja czynna:

Nazwa chemiczna: Chlorek (3-karbamoilo-2,4a,5,7,11-pentahydroksy-11-metylo-4,6-diokso-1,4,4a,6,11,11a,12,12a-oktahydronaftacen-1-ylo)-dimetyloamoniowy

Syn.: Tetracyklina, Chlorowodorek tetracykliny



$C_{22}H_{25}ClN_2O_8$ (m.cz. 480,13)

Właściwości fizyczne:

Żółty, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczalny w wodzie, dość trudno w etanolu, praktycznie nierozpuszczalny w eterze etylowym.

Działanie i zastosowanie:

Lek jest skuteczny w zwalczaniu wielu szczepów bakteryjnych. Tetracyklina zakłóca bakteriom syntezę białek, przez co powstrzymuje proces ich namnażania. Stosowana jest w przypadkach infekcji spowodowanych bakteriami wrażliwymi na tetracyklinę, między innymi przewlekłego zapalenia oskrzeli, zapalenia płuc, zapalenia cewki moczowej, zapalenia dziąseł, infekcji narządów rodnych, jak rzeżączka, kiła, infekcji spowodowanych *chlamydia*. Tetracyklinę stosuje się także w zwalczaniu wielu zakażeń przewodu pokarmowego, przy długotrwałym leczeniu trądzika, a profilaktycznie przed i po zabiegach chirurgicznych.

Potwierdzenie tożsamości leku:

Należy przeprowadzić reakcje analityczne dla tetracyklin, wg przepisów zawartych w rozdz. IV.2.5.3., zwracając uwagę na obserwacje charakterystyczne dla chlorowodoru tetracykliny.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda spektrofotometryczna

Wykonanie:

- Odważyć dokładnie taką ilość sproszkowanych tabletek, która odpowiada 0,1 g zawartości badanej substancji czynnej.
- Rozpuścić w 10 ml 0,36% kwasu solnego, przesączyć bezpośrednio do kolby miarowej poj. 100 ml, przemyć zawartość sączka wodą (3 x 10 ml), zbierając wszystkie przesące w w/wym. kolbie. Dopełnić objętość kolby do kreski tym samym rozpuszczalnikiem – roztwór (A).
- Pobrać 1 ml roztworu (A) do kolby miarowej poj. 100 ml, dodać 5 ml 20% roztworu NaOH i dopełnić wodą objętość roztworu do kreski – roztwór (B).
- Po 6 minutach zmierzyć absorbancję roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 380$ nm. Jako odnośnik należy zastosować roztwór mieszaniny 0,1 ml 0,36% kwasu solnego z 5 ml 20% roztworu NaOH, dopełnionej wodą do kreski w kolbie miarowej poj. 100 ml.
- Procedurę oznaczania należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, korzystając każdorazowo z nowo sporządzonej naważki leku.
- Obliczyć zawartość w [g] chlorowodoru tetracykliny ($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$) w jednej tabletkce (**W**), (ewentualnie w jednym gramie) przyjmując, że jego absorbowalność $E_{1cm}^{1\%}$ w 20% NaOH, przy długości fali $\lambda = 380$ nm wynosi 372.

Opcjonalnie, można skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_B \cdot N \cdot m_t) / (372 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: **A** – wartość absorpcji promieniowania roztworu (B) przy długości fali $\lambda = 380$ nm; **V_B** - objętość roztworu (B) w [ml]; **N** – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury $N = 100$); **m_t** – średnia masa jednej tabletki w [g]; **372** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla chlorowodoru tetracykliny przy długości fali $\lambda = 380$ nm; **m_n** – masa naważki w [g].

- Metoda kolorymetryczna

Metoda wykorzystuje zdolność tworzenia barwnych kompleksów z metalami, tutaj z jonami Fe(III).

Wykonanie:

- W kolbie miarowej poj. 100 ml umieścić dokładną naważkę sproszkowanych tabletek, odpowiadającą 0,05 g substancji czynnej, dodać 10 ml 0,1 N kwasu solnego, dokładnie wymieszać do rozpuszczenia, dopełnić wodą do kreski, ponownie dokładnie wymieszać – roztwór (C).
- Do drugiej kolby miarowej poj. 100 ml odważyć dokładnie 0,05 g wzorcowej tetracykliny, rozpuścić ją w 10 ml 0,1 N kwasu solnego, dopełnić objętość wodą do kreski – roztwór (D).
- Do osobnych trzech kolb miarowych poj. 250 ml pobrać po 3 ml roztworów: (C), (D) oraz 0,01 N kwasu solnego.
- Do każdej z kolb dodać po 10 ml mieszaniny składającej się z 5 ml 1% roztworu FeCl₃ oraz 95 ml wody, po czym uzupełnić do kreski za pomocą 0,01 N kwasu solnego, dokładnie wymieszać i odstawić na 10 minut.
- Zmierzyć wartość absorpcji promieniowania w kuwecie 0,5 cm przy $\lambda = 420$ nm, stosując roztwór z trzeciej kolby, jako odnośnik.
- Procedurę oznaczania należy powtórzyć co najmniej dwukrotnie, korzystając każdorazowo z nowo sporządzonej naważki leku.
- Obliczyć zawartość w [g] chlorowodoru tetracykliny ($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$) w jednej tabletkce.

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Przygotować roztwór badanej substancji o stężeniu ok. 1 mg/ml w metanolu. W razie potrzeby przesączyć.

Chromatogram:

złóże: celuloza (Merck). Przed użyciem płytkę należy spryskać 3,7% roztworem wodnym wersenianu disodowego, doprowadzonym do pH 7 za pomocą 8% roztworu NaOH albo buforem cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,5, po czym wysuszyć ją w temp. 50 °C przez 30 minut.

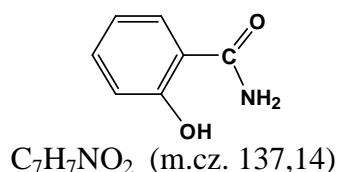
układ rozwijający: octan etylu – aceton – woda (10 : 5 : 1);

wywoływanie: chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej, wysycić parami amoniaku i obejrzyć w świetle UV $\lambda = 365$ nm. Dla chlorowodoru tetracykliny wsp. Rf = 0,63.

3.10. *Urtosal* (Lifepharm Italy) – tabletki 500 mg

Substancja czynna: Amid kwasu salicylowego, salicylamid

Syn.: Sinedol, Salamid



Właściwości fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.6.2.

Działanie i zastosowanie:

Salicylamid działa przeciwgorączkowo, przeciwzapalnie i przeciwbólowo, a nadto posiada mniejszy wpływ drażniący na śluzówkę, niż kwas acetylosalicylowy. Lek ma zastosowanie w znoszeniu bólów różnego pochodzenia, np. w chorobach reumatycznych (zwłaszcza gościecu mięśniowym), w przypadkach nerwobóli (lumbago, zapalenie korzonków nerwowych), po urazowych stanach gorączkowych, grypie i przeziębieniach.

Badanie tożsamości leku:

Sproszkowane dwie tabletki wytrząsnąć z CHCl₃ i przesączyć, po czym przesącz odparować do sucha, a pozostałość przeznaczyć do badań na obecność amidu kwasu salicylowego, jak podano w rozdz. IV.2.6.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

- Metoda spektrofotometryczna

Sporządzanie krzywej kalibracyjnej.

- Sporządzić dokładną naważkę 0,05 g czystego salicylamidu do kolby miarowej poj. 50 ml, dodać 35 ml wody, ogrzać, silnie zamieszać i po ochłodzeniu dopełnić kolbę wodą do kreski, otrzymując tzw. roztwór podstawowy.
- Do pięciu kolb miarowych poj. 50 ml kolejno odmierzyć dokładnie po: 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml oraz 1 ml roztworu podstawowego.
- Do każdej z kolb dodać po 0,5 ml 1% roztworu wodnego FeCl₃, zamieszać, uzupełnić kolbę wodą do kreski i ponownie zamieszać.
- Wykonać pomiar absorpcji promieniowania tak otrzymanych roztworów w kuwecie 1 cm przy długości fali 517 nm, stosując jako odnośnik 0,01% roztwór FeCl₃.

- Sporządzić krzywą kalibracyjną w postaci wykresu zależności stężenia salicylamidu w badanym roztworze od absorpcji.

Wykonanie oznaczenia

- Określić uśrednioną masę jednej tabletki **m** (w gramach).
- Odważyć dokładnie ilość sproszkowanych tabletek odpowiadającą ok. 0,05 g salicylamidu do kolby stożkowej poj. 100 ml, dodać 70 ml wody, ogrzać, silnie zamieszać, przesączyć do kolby miarowej poj. 100 ml (*uwaga: zadbać o dokładne odsączenie i przemycie osadu*) i po ochłodzeniu dopełnić kolbę wodą do kreski, otrzymując tzw. roztwór podstawowy (A).
- Odmierzyć dokładnie 5 ml roztworu do kolby miarowej poj. 50 ml, dodać 0,5 ml 1% roztworu wodnego FeCl₃, zamieszać, uzupełnić kolbę wodą do kreski i ponownie zamieszać – roztwór pomiarowy (B).
- Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu w kuwecie 1 cm przy długości fali 517 nm, stosując jako odnośnik 0,01% roztwór FeCl₃.
- Z wyznaczonej wcześniej krzywej kalibracyjnej odczytać wartość stężenia salicylamidu w mierzonym roztworze.
- Powtórzyć powyższą procedurę oznaczania dwukrotnie.
- Na koniec, uśrednić otrzymane wyniki, a następnie obliczyć zawartość **W** (w gramach) salicylamidu w jednej tabletkie badanego leku.

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Dokładnie sproszkować 0,25 tabletki (0,065 g), dodać 5 ml etanolu (95%), silnie wytrząsnąć i przesączyć. Pobrać 0,5 ml przesącza i dodać 4,5 ml etanolu (95%).

Chromatogram:

złoże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: CHCl₃ – etanol (95%) (9 : 1);

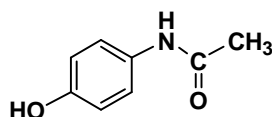
wywoływacze: światło UV; 5% roztwór FeCl₃.

Dla salicylamidu - R_f = 0,71, plama fioletowa.

3.11. APAP (US Pharmacia International, Inc.) – tabletki 500 mg

Substancja czynna: N-(4-Hydroksyfenylo)-acetamid

Syn.: Paracetamol



C₈H₉NO₂ (m.cz.151,06)

Własności fizyczne:

Patrz rozdz. IV.2.6.2.

Działanie i zastosowanie:

Lek jest stosowany do uśmierzania różnego rodzaju bólu (np. zębów, głowy, bólów menstruacyjnych, bólów mięśni oraz reumatycznych), a także w stanach podwyższonej temperatury przy przeziębieniach.

Lek działa w podobny sposób jak kwas acetylosalicylowy, lecz nie powoduje podrażnienia błon śluzowych przewodu pokarmowego. Nie obniża temperatury ciała, gdy ta jest w normie, nie wpływa na czynniki we krwi decydujące o jej krzepliwości i dlatego może być używany przez osoby skłonne do krwawień. Lek jest na ogół dobrze tolerowany przez pacjentów reagujących alergicznie na kwas acetylosalicylowy.

Efekt uśmierzania bólu wynika z przeciwdziałania powstawaniu prostaglandyn (substancji powodujących ból), które produkowane są przez organizm w stanach zapalnych oraz w przypadkach uszkodzeń tkanek.

Badanie tożsamości leku:

Masę sproszkowanych tabletek, odpowiadającą 0,5 g paracetamolu, wytrząsnąć z acetonem (2 x 20 ml), przesączyć, aceton odparować na wyparce rotacyjnej, a pozostałość wysuszyć i przeznaczyć do badań tożsamości leku zgodnie z przepisami zawartymi w rozdz. IV.2.6.2.

Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda spektrofotometryczna
 - Do kolby miarowej poj. 100 ml odważyć dokładnie masę sproszkowanych tabletek, odpowiadającą ok. 0,1 g substancji czynnej, dodać 20 ml chloroformu, wytrząsnąć przez 10 minut, dopełnić do kreski metanolem, całość intensywnie wymieszać i przesączyć - roztwór podstawowy (B).
 - Następnie, do kolby miarowej o poj. 100 ml pobrać dokładnie 1 ml roztworu (B), dodać 0,5 ml 36% kwasu solnego, uzupełnić objętość cieczy metanolem do kreski, całość dokładnie wymieszać – roztwór (C).
 - Wykonać pomiar absorpcji promieniowania roztworu (C) przy długości fali $\lambda = 249$ nm w kuwetach 1 cm, stosując metanol jako odnośnik.
 - Celem uśrednienia wyników powtórzyć niniejszą procedurę oznaczania dla co najmniej trzech kolejnych naważek badanego leku.
 - Obliczyć zawartość **W** (w gramach) substancji czynnej w jednej tabletkce badanego leku, uwzględniając informację, że $E_{1cm}^{1\%}$ dla metanolewego roztworu paracetamolu, przy $\lambda = 249$ nm wynosi 880.

W tym celu można także skorzystać ze wzoru (o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej):

$$W = (A \cdot V_C \cdot N \cdot m_t) / (880 \cdot m_n \cdot 100)$$

gdzie: **A** – wartość absorpcji promieniowania roztworu (C) przy długości fali $\lambda = 249$ nm; **V_C** - objętość roztworu (C) w [ml]; **N** – współczynnik pobrania (dla niniejszej procedury N = 100); **m_t** – średnia masa jednej tabletki w [g]; **880** – wartość $E_{1cm}^{1\%}$ dla paracetamolu przy długości fali $\lambda = 249$ nm; **m_n** – masa naważki w [g].

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Odważyć taką ilość sproszkowanej masy tabletkowej, która odpowiada ok. 20 mg substancji czynnej, dodać 1 ml mieszaniny metanol – woda (1 : 1), silnie wytrząsać przez kilka minut, po czym przesączyć. Chromatogram sporządzić względem 4-chloroacetanilidu, który jest substancją niepożądaną w leku.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy HF₂₅₄ (Merck);

układ rozwijający: aceton – chloroform – toluen (5 : 13 : 2);

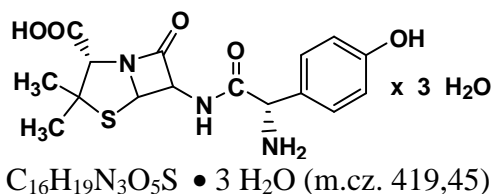
wywoływacz: obserwacja w świetle UV ($\lambda = 254$ nm).

R_f dla 4-chloroacetanilidu – ok. 0,35; R_f dla paracetamolu – ok. 0,20.

3.12. Amotaks (Polfa Tarchomin) - kapsułki 250 mg, 500 mg

Substancja czynna: Kwas (2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[(*R*)-2-amino-2-(4-hydroksyfenylo)acetamido]-3,3-dimetylo-7-okso-4-tia-1-azabicyklo[3.2.0]-heptano-2-karboksylowy, trójwodzian

Syn.: Amoxicillinum, Duomox, Apo-Amoxi, Novamox., Ospamox.



Właściwości fizyczne:

Biały lub prawie biały krystaliczny proszek, dość trudno rozpuszczalny w etanolu i wodzie, praktycznie nierozpuszczalny w eterze etylowym. Skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20} = +290^\circ$ do $+315^\circ$ ($c=2$, woda).

Działanie i zastosowanie:

Antybiotyk β -laktamowy, należący do grupy aminopenicylin, wrażliwy na działanie β -laktamazy. Stosowany w leczeniu infekcji wywołanych bakteriami z grupy: enterokoków, paciorkowców, *Listeria monocytogenes* i innych szczepów bakteryjnych nie wytwarzających β -laktamaz.

Badanie tożsamości leku:

Amoksycylina ulega reakcjom wspólnym dla wszystkich związków o budowie β -laktamowej (patrz rozdz. IV.2.7.2.), a nadto daje pozytywne wyniki w wyniku niżej podanych testów.

- Reakcja z odczynnikiem Fehlinga

Wykonanie próby:

Do 20 mg badanej substancji dodać 2,5 ml wody, dokładnie wymieszać, po czym dodać 0,5 ml odczynnika Fehlinga. Mieszankę reagującą nie ogrzewać. Powstaje intensywnie zielone zabarwienie od tworzącego się kompleksu z jonami Cu^{2+} .

- Reakcja z ninhydryną

Amoksycylina ulega reakcjom charakterystycznym dla aminokwasów. Reszta kwasu 2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-octowego dzięki obecności pierwszorzędowej grupy aminowej pod wpływem ninhydryny ulega utlenieniu do aldehydu aromatycznego. Wydzielający się w wyniku tej reakcji amoniak w następnym etapie kondensuje z kolejną cząsteczką ninhydryny oraz z jej formą zredukowaną, dając produkt o zabarwieniu fioletowym. Przebieg reakcji – analogicznie, jak na Rys. 98.

Wykonanie próby:

Okolo 50 mg badanej substancji rozpuścić w 2 ml wody, dodać 1 ml 0,2% etanolowego roztworu ninhydryny i ogrzewać. Powstaje fioletowe zabarwienie.

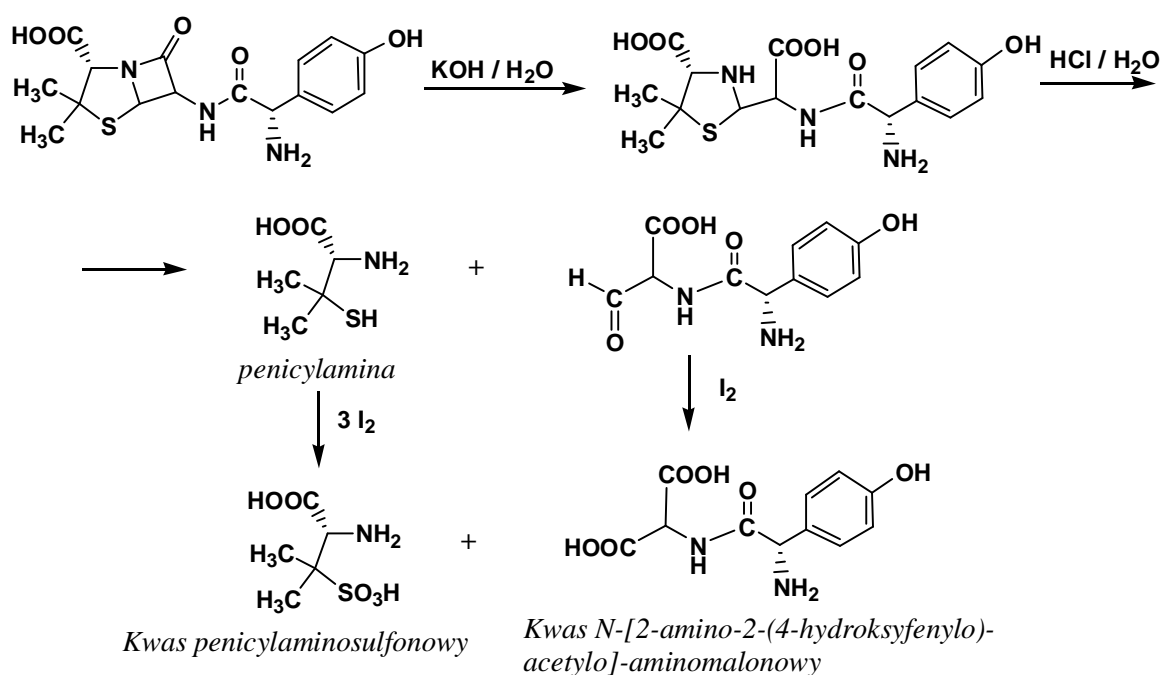
Oznaczanie ilościowej zawartości substancji czynnej w leku:

Przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy oznaczyć średnią wagę jednej tabletki.

- Metoda jodometryczna

Zasada oznaczenia:

W toku oznaczania amoksyliny poddawana jest kolejno hydrolizie zasadowej, po czym powstałe produkty hydrolizowane są w warunkach katalizy kwasowej wobec buforu. W dalszej kolejności, pod wpływem jodu zachodzi utlenianie, prowadzące ostatecznie do kwasu penicylaminosulfonowego oraz kwasu *N*-[2-amino-2-(4-hydroksyfenylo)acetylo]aminomalonowego (Rys. 116.).



Rys. 116. Przemiany amoksyliny podczas jej oznaczania metodą jodometryczną

Utlenianie jodem niezhydrolizowanej wstępnie amoksyliny nie zachodzi, dlatego też użytecznym jest równoległe przeprowadzenie ślepej próby, która umożliwia oznaczenie stopnia ewentualnego zanieczyszczenia leku produktami rozkładu (powstałymi np. podczas przechowywania). Na utlenienie jednego gramorównoważnika amoksyliny zostaje w sumie zużytych osiem gramorównoważników jodu. Przedstawiony na powyższym schemacie przebieg reakcji jest uzależniony od pH środowiska, co wyjaśnia konieczność stosowania buforu.

Wykonanie oznaczenia.

- Do kolby miarowej poj. 100 ml odważyć dokładnie ilość sproszkowanych tabletek odpowiadającą ok. 0,06 g substancji czynnej, dodać 80 ml wody, wytrząsnąć do rozpuszczenia leku, po czym uzupełnić całość do kreski wodą i wymieszać (roztwór A).
- Wstawić kolbę z roztworem A do łaźni lodowej.

- W osobnej kolbie miarowej poj. 100 ml sporządzić roztwór buforowy przez rozpuszczenie 5,44 g octanu sodowego ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) i 2,4 g 96% kwasu octowego w wodzie i dopełnienie objętości tego roztworu wodą do kreski. Roztwór ten także ochłodzić w łaźni lodowej.
- Odmierzyć do kolby stożkowej poj. 50 ml 5 ml roztworu A, dodać 1 ml 1N roztworu KOH, zamknąć korkiem i odstawić na 20 minut (łaźnia lodowa).
- Dodać 1 ml roztworu buforowego, 1 ml 1 N kwasu solnego, 10 ml 0,01 M roztworu jodu i ponownie odstawić zawartość kolby stożkowej zamkniętej korkiem na 20 minut w łaźni lodowej.
- Odmiareczkować nadmiar jodu za pomocą 0,01 M roztworu tiosiarczanu sodowego wobec roztworu skrobi (dodanego w ilości kilku kropel pod koniec miareczkowania).
- Równolegle wykonać ślełą próbę, tj.:
- Pobrać 5 ml roztworu A do kolby stożkowej poj. 50 ml, dodać 1 ml roztworu buforowego, 10 ml 0,01 M roztworu jodu, zamknąć naczynie korkiem i umieścić w łaźni lodowej na okres 20 minut. Nadmiar nie zużytego jodu odmiareczkować za pomocą 0,01 M roztworu tiosiarczanu sodowego wobec skrobi.
- Celem uśrednienia wyników obie procedury miareczkowania powtórzyć co najmniej dwukrotnie.
- Obliczyć średnią zawartość (**W**) substancji czynnej w jednej tabletkie w [g].

Analiza TLC:

Przygotowanie próbek:

Do sproszkowanej ilości leku, odpowiadającej ok. 6 mg substancji czynnej dodać 0,3 ml 4% roztworu NaHCO_3 , silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy G (Merck);

układ rozwijający: octan butylu – kwas octowy – bufor fosforanowy o pH 6,0 – 2-butanol – metanol (15 : 7,5 : 4,5 : 2,7 : 1);

wywoływanie:

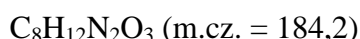
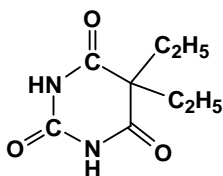
Po wysuszeniu chromatogramu w temp. pokojowej plamy można wstępnie obejrzeć w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$), a następnie płytkę należy umieścić na 15 minut w szczelnie zamkniętej komorze, wypełnionej parami chloru, po czym wywołać plamy odczynnikiem tolidynowym.

Pary chloru uzyskuje się w następujący sposób: w komorze chromatograficznej ze szczelną pokrywą umieścić zlewkę poj. 100 ml zawierającą 15 ml 2% roztworu KMnO_4 i ostrożnie dodać 10 ml kwasu solnego. Komorę zamknąć. Po ok. 15 min. włożyć do niej wysuszone chromatogramy.

3.13. *Descipher Barbitalum* (*Descipher Medicine* TM) – proszek 500 mg

Substancja czynna: Kwas 5,5-dietylobarbiturowy, 5,5-dietyloheksahydropirymidyno-2,4,6-trion.

Syn.: Veronalum , Barbitalum



Właściwości fizyczne:

Bezbarwne, bezzapachowe kryształy, o temp. topn. 188-192 °C, dobrze rozpuszczalne w rozcieńczonych wodnych roztworach wodorotlenków potasowców, a także w metanolu, acetonie, octanie etylu i eterze etylowym, słabo rozpuszczalne w chloroformie i w zimnej wodzie.

Działanie i zastosowanie:

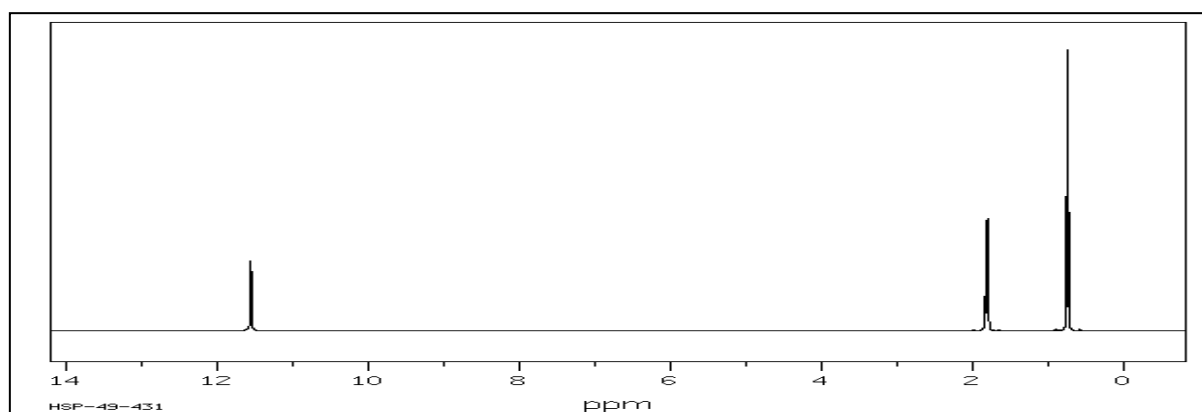
Środek nasenny, silnie uspokajający, obecnie rzadko stosowany. Wywołuje silną lekozależność, zatrucia objawiające się m.in. zaburzeniami psychicznymi, zaburzeniami układu autonomicznego, odczynami skórными, uszkodzeniem narządów mięsaszowych; powoduje niebezpieczne interakcje z wieloma lekami, zwłaszcza działającymi depresyjnie na CNS. Aktywuje enzymy wątrobowe, przez co przyspiesza metabolizm wielu leków obniżając ich skuteczność.

Chemiczne metody identyfikacji:

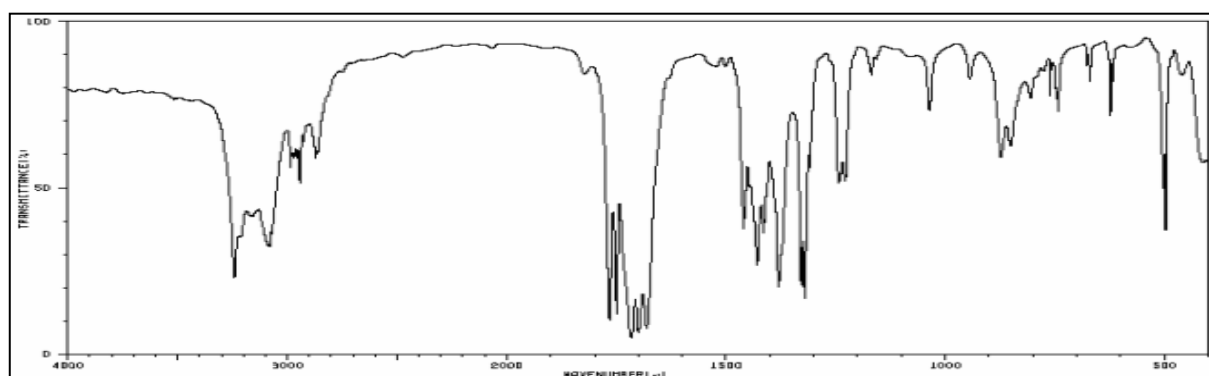
Wyodrębniony z masy leku barbital (np. poprzez wyeluowanie go z masy tabletkowej za pomocą 95% etanolu należy poddać próbom tożsamościowym przedstawionym w rozdz. IV.2.8.2., jakie są wspólne dla barbituranów.

Analiza spektralna:

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku substancji, a następnie porównać je z dostępnymi widmami wzorcowymi.



Rys. 117. Widmo ^1H NMR barbitalu (400 MHz, $c = 0.042 \text{ g} / 0.5 \text{ ml DMSO-d}_6$) [18]



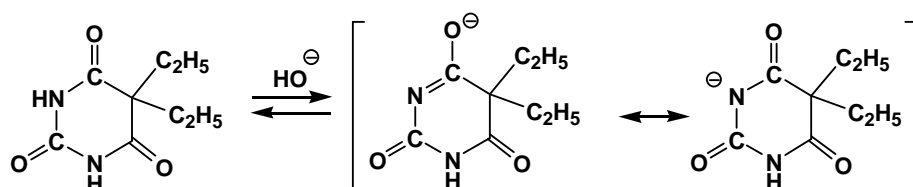
Rys.118. Widmo IR barbitalu (pastylka KBr) [18]

Oznaczanie zawartości substancji czynnej w leku

Zasada oznaczenia:

Zawartość ilościową barbitalu, podobnie jak i innych pochodnych kwasu barbiturowego, ze względu na ich dość trudną rozpuszczalność w wodzie oznacza się w środowisku wodno-etanolowym, stosując metodę alkalimetryczną. Miareczkowanie za pomocą wodnego roztworu NaOH przeprowadza się wobec tymoftaleiny jako wskaźnika (pH zmiany barwy wynosi 9,3-10,3). Przed miareczkowaniem próbkę zawierającą oznaczany barbituran rozpuszcza się w alkoholu (metanol, etanol), który przed użyciem doprowadza się roztworem wodorotlenku sodowego do odczynu niebieskiego zabarwienia wskaźnika.

Metoda oznaczania wykorzystuje charakter kwasowy barbituranów, które ze względu na dużą różnicę pomiędzy wartościami pK_{a1} (ok. 8) i pK_{a2} (ok.12) reagują z zasadą jako kwasy jednozasadowe (Rys. 119).



Rys. 119. Reakcja barbitalu z zasadą

Wykonanie:

Sporządzić dokładną naważkę sproszkowanej ilości leku, odpowiadającej ok. 0,2 g substancji czynnej. Rozpuścić ją w 15 ml etanolu (95%) uprzednio zubożonego wobec tymoftaleiny, intensywnie wymieszać, po czym miareczkować 0,1 N roztworem NaOH do uzyskania niebieskiego zabarwienia. Procedurę oznaczania powtórzyć co najmniej dwukrotnie.

Oznaczyć zawartość barbitalu w [g] w uśrednionej masie jednej porcji leku (np. w 0,500 g proszku).

Analiza TLC:

Przygotowanie próbki:

Do sproszkowanej ilości tabletek, odpowiadającej ok. 1 mg substancji czynnej dodać 1 ml etanolu 95%, silnie wytrząsnąć i przesączyć.

Chromatogram:

złóże: żel krzemionkowy G (Merck);

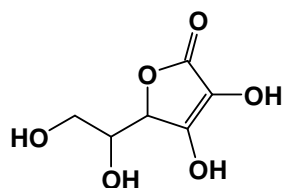
układ rozwijający: chloroform : etanol (95%) : 25% roztwór NH_3 = 16 : 3 : 1;

wywoływanie: Po wysuszeniu chromatogramu w temp. pokojowej należy spryskać go świeżo sporządzoną mieszaniną (1 : 1) 0,2% etanolowego roztworu difenylokarbazonu i 2% etanolowego roztworu chlorku rtęci(II), wysuszyć w temp. pokojowej, a następnie wywołać 2% etanolowym roztworem NaOH, ogrzewając przez 5 min. w temp. 110 °C.

3.14. *Vitaminum C* (GlaxoSmithKline) – tabletki powlekane 100 mg

Substancja czynna: 5-(1,2-Dihydroksyetylo)-3,4-dihydroksy-5H-furan-2-on

Syn.: Witamina C, Kwas askorbowy



$C_6H_8O_6$ (m.cz. 176,12)

Właściwości fizyczne substancji czynnej:

Krystaliczny, biały związek o ostrym, choć przyjemnym kwaśnym smaku, charakteryzujący się temp. topn. 190-192 °C. Substancja łatwo rozpuszcza się w wodzie, etanolu, jest nierozpuszczalna w chloroformie, eterze etylowym i benzenie.

Działanie i zastosowanie:

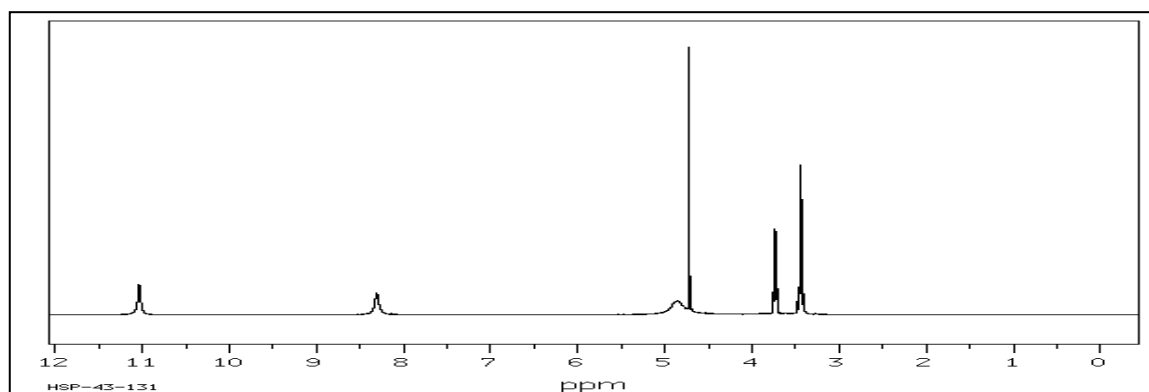
Kwas askorbowy jest witaminą (witamina C), której niedobór w organizmie prowadzi do skorbutu (stan zapalny dziąseł, i wypadanie zębów, zaburzenia procesu kostnienia związane z osłabieniem syntezy kolagenu, kruchość naczyń). Oprócz zastosowania w leczeniu awitaminozy C kwas askorbowy jest także stosowany w przypadkach chorób alergicznych, próchnicy zębów, niedokrwistości, w niektórych zatruciach, a także profilaktycznie przy przeziębieniach.

Chemiczne metody identyfikacji:

Wyodrębniony z masy leku kwas askorbowy należy poddać próbom tożsamościowym przedstawionym w rozdz. IV.2.10.5.

Analiza spektralna:

Należy zarejestrować widma wyodrębnionej z masy leku badanej substancji, a następnie porównać je z dostępnymi widmami wzorcowymi.



Rys. 120. Widmo 1H NMR kwasu askorbowego (400 MHz, $c = 0.05$ g / 0.5 ml $DMSO-d_6$) [18]

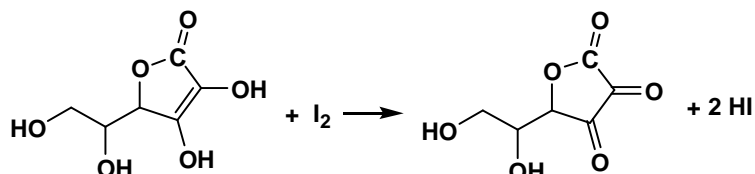
Oznaczanie zawartości substancji czynnej w leku:

Przed wykonaniem oznaczenia należy określić średnią masę jednej tabletki w [g].

Metoda jodometryczna

Zasada oznaczenia:

Podstawą oznaczenia jest reakcja bezpośredniego utleniania kwasu askorbowego za pomocą jodu do kwasu dehydroaskorbowego.



Rys. 121. Utlenianie kwasu askorbowego w warunkach jego oznaczenia metodą jodometryczną

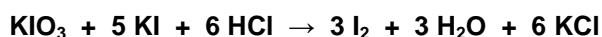
Wykonanie oznaczenia:

- Oznaczyć średnią wagę jednej tabletki leku.
- Sporządzić dokładną naważkę sproszkowanej ilości leku, odpowiadającej ok. 0,06 g substancji czynnej.
- Przenieść ją ilościowo do kolby stożkowej poj. 250 ml, po czym rozpuścić w 50 ml wody przez intensywne wytrząsanie.
- Dodać 10 ml 16% roztworu kwasu siarkowego(VI), po czym miareczkować roztwór za pomocą 0,1 M roztworu jodu do trwałego niebieskiego zabarwienia roztworu skrobi, dodanego pod koniec miareczkowania w ilości 2 ml.
- Celem uśrednienia wyników procedurę powtórzyć co najmniej dwukrotnie z kolejno sporządzanych naważek badanego leku.
- Obliczyć średnią zawartość kwasu askorbowego w [g] w jednej tabletkie.

Metoda redoksymetryczna

Zasada oznaczenia:

Podstawą oznaczenia jest utlenianie kwasu askorbowego za pomocą jodu do kwasu dehydroaskorbowego (równanie reakcji – patrz „Metoda jodometryczna”). Kwas askorbowy reaguje z jodem natychmiast po jego wytworzeniu w wyniku poprzedzającej reakcji jodanu(V) potasowego z jodkiem potasowym, biegnącej w środowisku kwaśnym.



Jod, po utlenieniu całkowitej ilości kwasu askorbowego tworzy szybko ciemnoniebieski kompleks ze skrobią, sygnalizując koniec miareczkowania.

Wykonanie oznaczenia:

- Oznaczyć średnią wagę jednej tabletki leku.
- Sporządzić dokładną naważkę sproszkowanej ilości leku, odpowiadającej ok. 0,05 g substancji czynnej.
- Przenieść ją ilościowo do kolby stożkowej poj. 250 ml, po czym rozpuścić w 25 ml wody przez intensywne wytrząsanie.
- Dodać 0,5 g jodku potasu, a po jego rozpuszczeniu dodać 2,5 ml 1M kwasu solnego oraz 2 ml roztworu skrobi.
- Całość miareczkować za pomocą 0,01M roztworu KIO₃ do trwałego ciemnoniebieskiego zabarwienia.
- Celem uśrednienia wyników procedurę powtórzyć co najmniej dwukrotnie z kolejno sporządzanych naważek badanego leku.
- Obliczyć średnią zawartość kwasu askorbowego w [g] w jednej tabletkie.

V. Identyfikacja leków o nieznanym składzie

Substancje czynne leków prostych (tj. jednoskładnikowych), nawet tych o zbliżonym spektrum działania farmakologicznego, często wykazują względem siebie znaczne zróżnicowanie strukturalne. Stając przed zadaniem identyfikacji substancji czynnej nieznanego leku prostego warto na wstępie opracować taki algorytm postępowania, który pozwoli z każdym kolejno realizowanym krokiem znacząco zawęzić tzw. „obszar poszukiwań”. W przypadkach, gdy identyfikowany lek jest jednym z określonego „zestawu” kilkunastu czy nawet kilkudziesięciu farmaceutyków o znanych (lub podejrzewanych) strukturach ich substancji czynnych (przykładowe zestawienie – patrz rozdz. IX.3.), trafnym punktem wyjścia do analizy może być poznanie składu pierwiastkowego, a także właściwości kwasowo-zasadowych oraz hydrofilowych. Szczegółowy sposób postępowania został omówiony w rozdz. II.

Dysponując kilkoma lub co najwyżej kilkunastoma związkami wyselekcjonowanymi na podstawie identycznego jakościowego składu pierwiastkowego można następnie przystąpić do przeprowadzania testów na obecność podstawowych grup funkcyjnych i specyficznych fragmentów strukturalnych (np. układy aromatyczne, wiązania nienasycone, enolizujące ugrupowania ketonowe i aldehydowe, układy uretanowe, mocznikowe, aminokwasowe), a także prób pozwalających ustalić charakter niektórych z nich (np. właściwości „red-ox” badanej próbki, rzędowość amin, alkoholi czy ruchliwość chlorowców).

Zazwyczaj, po przeprowadzeniu takiej serii badań często jesteśmy już w stanie wytypować (drogą eliminacji) kilka, a czasem nawet jeden związek. Jego tożsamość można potwierdzić dodatkowymi reakcjami, specyficznymi dla grupy związków, do której on należy (o ile istnieją).

Określenie tą drogą najbardziej prawdopodobnej struktury substancji czynnej pozwala na stosunkowo łatwe dobranie warunków wyodrębnienia jej z masy leku (tj. oddzielenia od substancji pomocniczych, oczyszczenia, a następnie oznaczenia właściwości fizykochemicznych (np. temperatury topnienia /wrzenia, rozpuszczalności) i zarejestrowania widm spektralnych. Porównanie rezultatów tych oznaczeń z dostępnymi danymi literaturowymi stanowi zazwyczaj wystarczającą podstawę do oceny tożsamości badanej próbki.

W tym miejscu warto dodać też kilka uwag o charakterze ogólnym. W przypadkach, gdy celem analizy jest potwierdzenie tożsamości leku o spodziewanym (tzn. znanym lub podejrzewanym) składzie, a obecne substancje pomocnicze są trudne do oddzielenia, należy tak dobierać rodzaje reakcji grupowych do testów, aby ich pozytywny wynik świadczył

wyłącznie o obecności danej substancji czynnej. Dotyczy to choćby leków z zawartością cukrów, gdzie przeprowadzanie reakcji na obecność grup karbonylowych (od aldehydów / ketonów) czy alkoholowych na ogół mija się z celem i może prowadzić do błędnych ustaleń co do struktury substancji analizowanej.

Kłopotliwe w interpretacji mogą być także niektóre wyniki analizy próbek z zawartością skrobi lub celulozy, zwłaszcza tam, gdzie reakcje biegają z użyciem stężonego kwasu mineralnego w podwyższonych temperaturach. Reakcjom barwnym towarzyszy tutaj niepożądane zwęglanie próbki, co utrudnia lub wręcz uniemożliwia właściwą ocenę kolorów. W takich przypadkach warto spróbować wszelkich sposobów wyodrębnienia interesującej nas substancji czynnej. Często niezwykle pomocną jest prosta elucja badanego związku za pomocą np. wody (skuteczna w przypadku wielu halogenowodorów), metanolu czy chloroformu w temperaturze pokojowej lub ostatecznie podwyższonej.

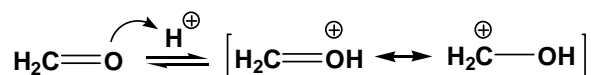
Istotnym źródłem problemów napotykanym w klasycznej analizie jakościowej leków jest niekiedy niska zawartość substancji czynnych w masie badanych próbek. Reakcje analityczne o niskiej czułości dają wówczas wyniki niepewne lub wręcz pozornie negatywne. Mamy wówczas do czynienia z tzw. poziomem stężenia badanej substancji „poniżej progu wykrywalności”. W przypadku zaistnienia podejrzeń co do takiej sytuacji warto niekiedy powtórzyć choćby analizę składu pierwiastkowego, tym razem jednak z użyciem kilkakrotnie większej ilości badanej substancji. Dodatkowo, próby na ewentualną obecność grup funkcyjnych lub specyficznych ugrupowań strukturalnych warto rozpoczynać od przeprowadzania reakcji o wysokiej czułości. Zawsze należy pamiętać o tym, że wynik negatywny jakiegokolwiek jakościowej próby analitycznej nie jest dowodem nieobecności wykrywanego fragmentu strukturalnego.

Wielu niepowodzeń w pracy analitycznej można uniknąć dbając o używanie odczynników o odpowiednio wysokiej czystości (np. świeżo sporządzone, klarowne roztwory, rozpuszczalniki bez niepożądanych domieszek, substancje stałe o czystości co najmniej poziomu cz.d.a.), jak również czystych, najlepiej suchych naczyń laboratoryjnych.

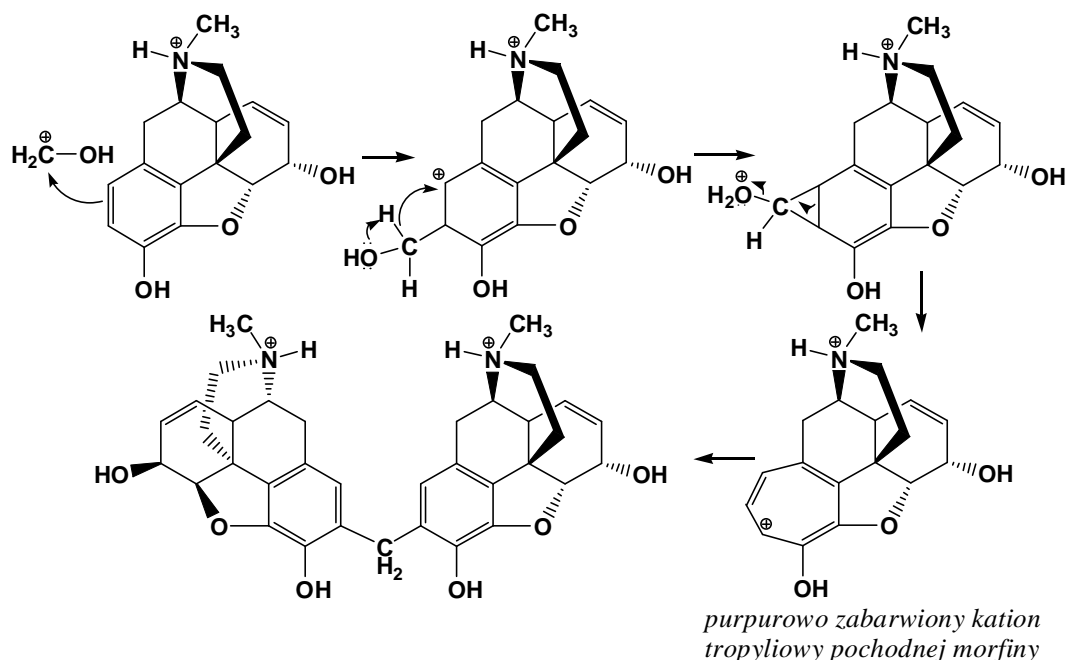
VI. Chemia wybranych odczynników analitycznych

1. Odczynnik Marquisa

Odczynnik Marquisa stanowi bardzo rozcieńczony roztwór formaldehydu w stężonym kwasie siarkowym. Jest on powszechnie stosowany do wykrywania zaktwowanych na substytucję elektrofilową układów aromatycznych – przede wszystkim amin aromatycznych, fenoli i pochodnych imidazolu. Aldehyd mrówkowy w środowisku silnie kwaśnym występuje w stabilizowanej rezonansowo formie sprotonowanej, wykazującej właściwości elektrofilowe.



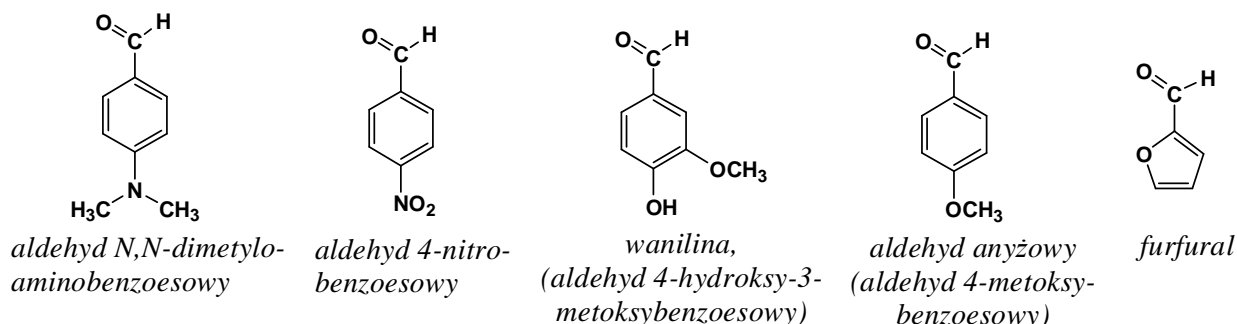
W reakcjach aromatycznej substytucji elektrofilowej z udziałem odczynnika Marquisa obserwuje się natychmiastowe powstawanie produktów o barwie najczęściej od różowej do purpurowofioletowej. Uważa się, że takie zabarwienie mieszaniny reagującej jest charakterystyczne dla tworzącego się przejściowo odpowiednio podstawionego jonu tropyliowego (Rys. 122.) Ostatnim etapem tej przemiany jest reakcja drugiej cząsteczki aromatycznego substratu z kationem tropyliowym, także wg mechanizmu S_{E} . W przypadkach, gdy ostateczny produkt tej reakcji wyróżnia się obecnością w swej strukturze rozległego układu sprzężonych wiązań wielokrotnych, obserwuje się charakterystyczne pogłębianie się powstającej barwy w czasie.



Rys. 122. Przebieg reakcji morfiny z odczynnikiem Marquisa [11]

2. Reakcje z aldehydami aromatycznymi

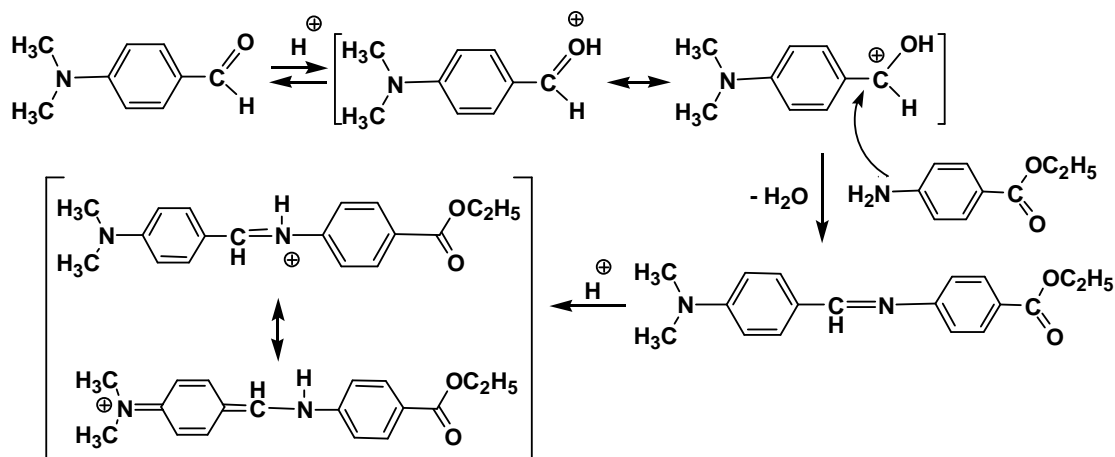
Aldehydy aromatyczne można z powodzeniem zaliczyć do grupy popularnych odczynników analitycznych, jakie znajdują zastosowanie przy identyfikacji szeregu typów związków organicznych.



Rys. 123. Popularne odczynniki analityczne z grupy aldehydów aromatycznych

Większość reakcji z ich udziałem przebiega w środowisku silnie kwaśnym i prowadzi do produktów o charakterystycznym zabarwieniu, niejednokrotnie przyjmujących postać osadu. Aldehydy aromatyczne, jako przedstawiciele związków karbonylowych pozbawionych tzw. protonów α , wykazują w tych warunkach zdolność do kondensacji z połączeniami organicznymi, zawierającymi w swych strukturach ugrupowania elektronodonorowe (np. enolizujące aldehydy i ketony, zaktywowane na substytucję elektrofilową układy aromatyczne, pierwszorzędowe aminy). Podobnie, jak w przypadku aldehydu mrówkowego (patrz rozdz. VI.1.) aldehydy aromatyczne w środowisku silnie kwaśnym występują w stabilizowanej rezonansowo formie sprotonowanej, wykazującej właściwości elektrofilowe.

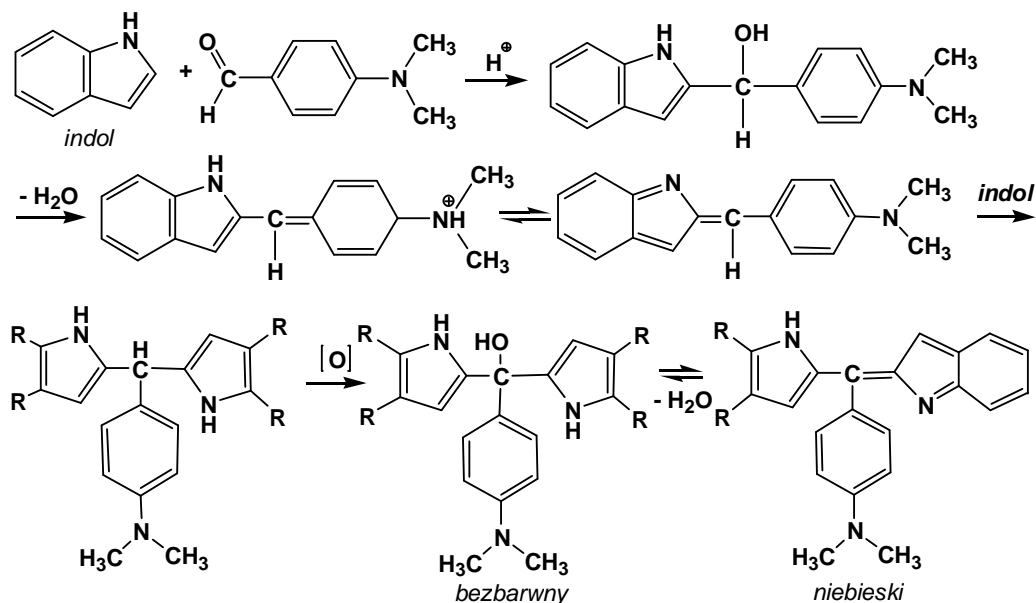
Reakcje aldehydów aromatycznych z aminami pierwszorzędowymi, biegnące w środowisku kwaśnym prowadzą do produktów typu zasad Schiffa. Przykładem może być charakterystyczna, barwna reakcja benzokainy w próbie z **odczynnikiem Ehrlicha**, który jest roztworem aldehydu 4-N,N-dimetyloaminobenzoesowego (PDAB) w 10% kwasie solnym.



Rys. 124. Reakcja aldehydu 4-N,N-dimetyloaminobenzoesowego z benzokainą

Reakcja z odczynnikiem Ehrlicha zachodzi także dla hydrydów (patrz – reakcje *Izoniazydu*, rozdz. IV.2.2.); może służyć również do identyfikacji obecnych w cząsteczce grup nitrowych po ich wcześniejszym zredukowaniu do grup aminowych.

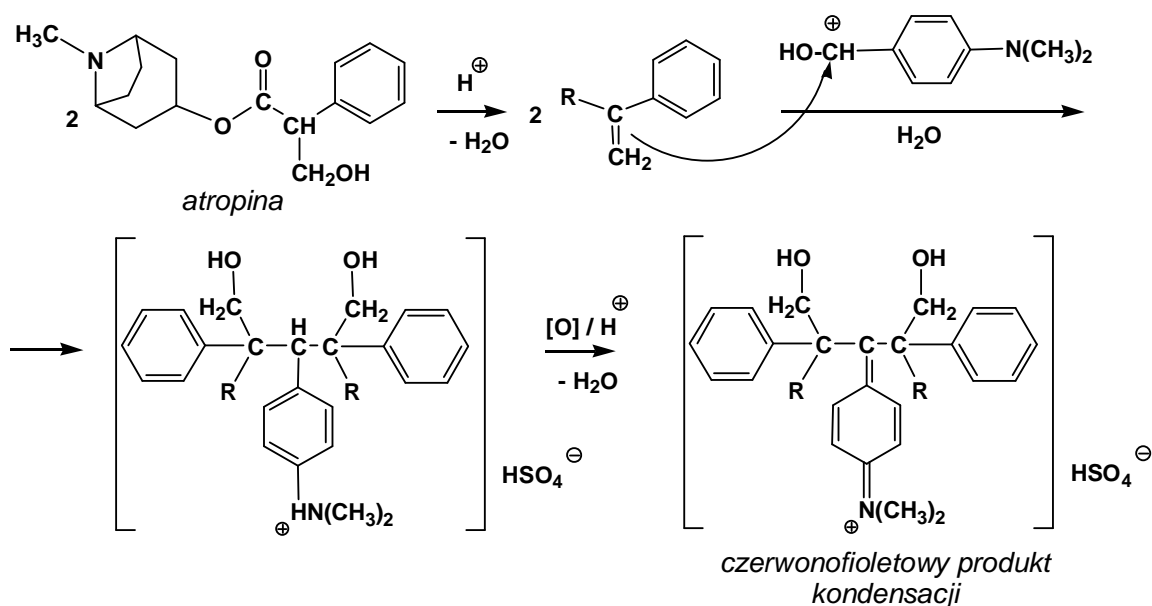
Kwasowo katalizowana reakcja aldehydów pozbawionych protonów α ze związkami posiadającymi w swej strukturze pierścienie aromatyczne przebiega wg mechanizmu aromatycznej substytucji elektrofilowej. Stąd też próba Ehrlicha znajduje zastosowanie do oznaczania m.in. kwasu lizergowego i innych alkaloidów sporyszu, urobilinogenu, indolu i jego pochodnych (np. tryptofanu) czy tetracyklin.



Rys. 125. Barwna reakcja aldehydu 4-N,N-dimetyloaminobenzoesowego z indolem

Odczynnik Ehrlicha stanowi też często jeden ze składników w komercyjnych zestawach testów analitycznych, służących do identyfikacji narkotyków (np. w teście na obecność LSD).

Pewną odmianą odczynnika Ehrlicha jest **odczynnik Wasicky'ego** (roztwór aldehydu 4-N,N-dimetyloaminobenzoesowego w stęż. kwasie siarkowym). Stężony kwas siarkowy(VI) może pełnić w nim potrójną rolę: silnego środka odwadniającego (przyczyniającego się np. do dehydratacji alkoholi), czynnika katalizującego reakcje poprzez protonowanie odpowiednich ugrupowań oraz silnego kwasu, zdolnego do acydolitycznego rozszczepiania niektórych wiązań, jak choćby silnie naprężonych układów cyklicznych (np. ugrupowanie β -laktamowe), czy mostków tlenowych w eterach alkilowo-arylowych. Zatem przebieg reakcji z zastosowaniem odczynnika Wasicky'ego może w wielu przypadkach być bardziej złożony w porównaniu z działaniem odczynnika Ehrlicha, z uwagi na konkurencyjny, równoległy lub następczy charakter ich jednostkowych etapów, związanych z działaniem na badany związek zarówno aldehydu, jak i stężonego kwasu siarkowego.



Rys. 126. Reakcja atropiny z odczynnikiem Wasicky'ego

Reakcja z odczynnikiem Wasicky'ego jest barwną reakcją, często stosowaną w badaniach toksykologicznych jako test wykrywający i rozróżniający alkaloidy, zwłaszcza tropanowe, takie jak kokaina, skopolamina i atropina. Przykładowo, podczas gdy skopolamina, atropina czy hioscyamina dają barwną reakcję Wasicky'ego dopiero po podgrzaniu (najpierw powstaje produkt intensywnie wiśniowoczerwony, potem fioletowy), kodeina i morfina dają ciemnoczerwony produkt już na zimno.

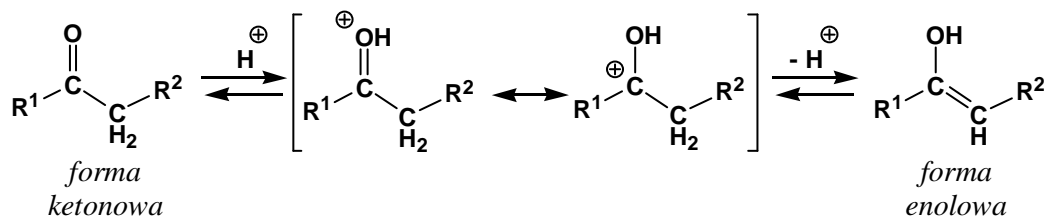
Podobnym typem wykorzystywanej w analityce leków reakcji jest dająca barwne produkty reakcja z furfurałem w środowisku kwaśnym. Dotyczy ona zawierających pierwszorzędową grupę aminową sulfonamidów, pochodnych kwasu p-aminosalicylowego czy np. benzokainy. Reakcje z furfurałem zachodzą często z otwarciem pierścienia furanu i utworzeniem zawierających sprzężone układy wiązań związków typu zasad Schiffa (patrz Rys. 51, rozdz. IV.2.4.).

Kondensacja z pochodnymi furfuralu podstawionymi w pozycji 5 przebiega zwykle bez otwarcia pierścienia furanowego (patrz –Rys. 52, rozdz. IV.2.4.).

W tym miejscu warto też wspomnieć o pewnej odmianie tej reakcji, a mianowicie o **próbie ligninowej**. Reakcję wykrywania amin aromatycznych przeprowadza się na papierze bibułowym czy gazetowym, na którym umieszcza się kroplę roztworu badanego związku, a następnie kroplę stężonego kwasu solnego. Wiązania glikozydowe celulozy ulegają rozszczepieniu pod wpływem kwasu – powstaje glukoza, która następnie w reakcji z pierwszorzędową aromatyczną grupą aminową tworzy barwną zasadę Schiffa.

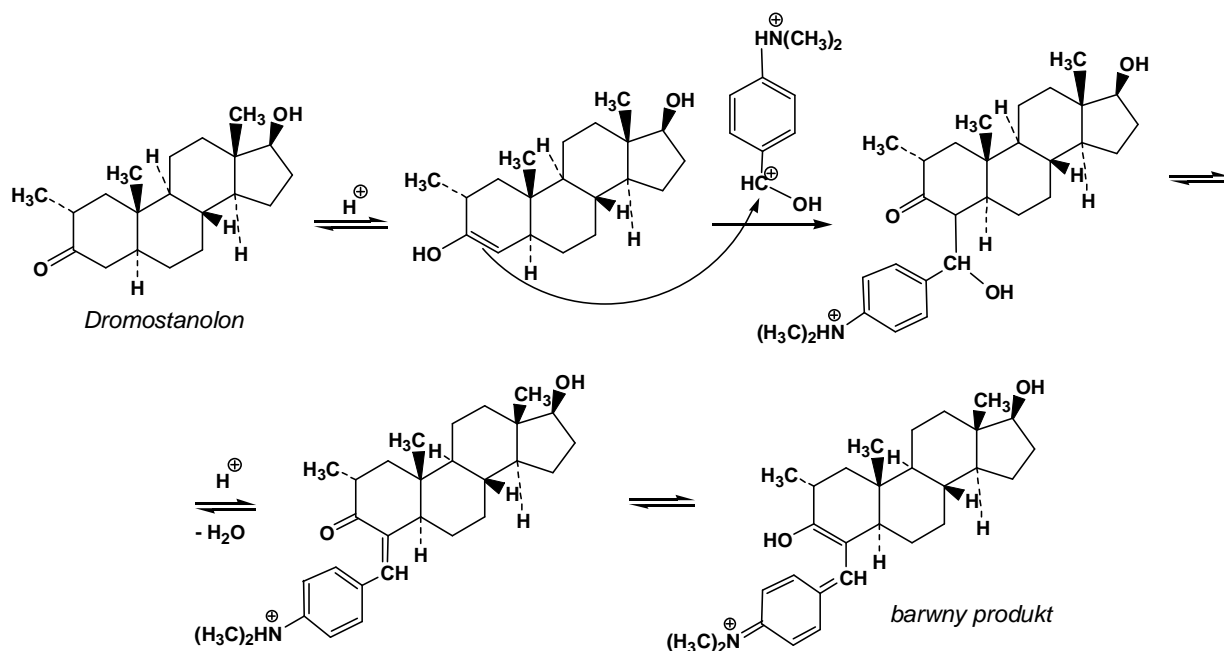
Jak wspomniano na wstępie, reakcje z odczynnikami zawierającymi w swym składzie aldehydy aromatyczne dają także związki zawierające enolizujące ugrupowanie ketonowe,

obecne np. w niektórych lekach steroidowych. Związki takie w środowisku kwaśnym występują w dwóch formach tautomerycznych, ketonowej i enolowej, której wiązanie podwójne węgiel-węgiel pełni rolę donora elektronów w reakcji ze sprotonowanym aldehydem (elektrofilem).



Rys. 127. Równowaga keto-enolowa w środowisku kwaśnym

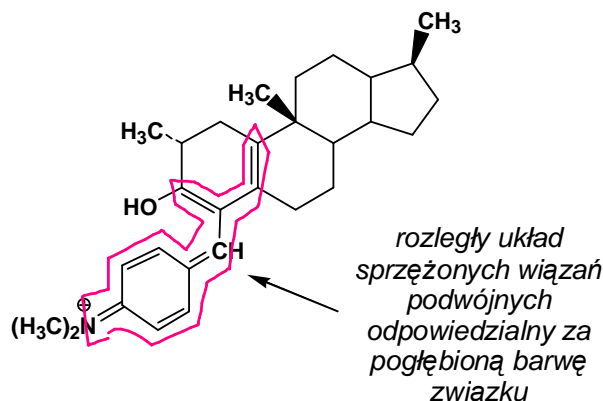
Kwaśno katalizowana kondensacja enolizujących ketonów z aldehydem *N,N*-dimetyloaminobenzoesowym (odczynnik Ehrlicha) może przebiegać analogicznie do przedstawionej poniżej dla syntetycznego anaboliku steroidowego – *Dromostanolonu*.



Rys. 128. Przykład katalizowanej kwasowo reakcji aldehydu aromatycznego z enolizującym ketonem

W przypadku użycia do oznaczania tego związku odczynnika Wasicky'ego, z uwagi na obecność w jego składzie stężonego kwasu siarkowego, można spodziewać się powstawania produktów o strukturach z bardziej rozległym układem wiązań podwójnych, a tym samym i o pogłębionej barwie. Wiązać się to może z dehydratacją analizowanego związku, zachodzącą pod wpływem stężonego kwasu siarkowego wg mechanizmu E1, połączoną z przegrupowaniami tworzącymi się pośrednio karbokationów. Obserwowana niekiedy

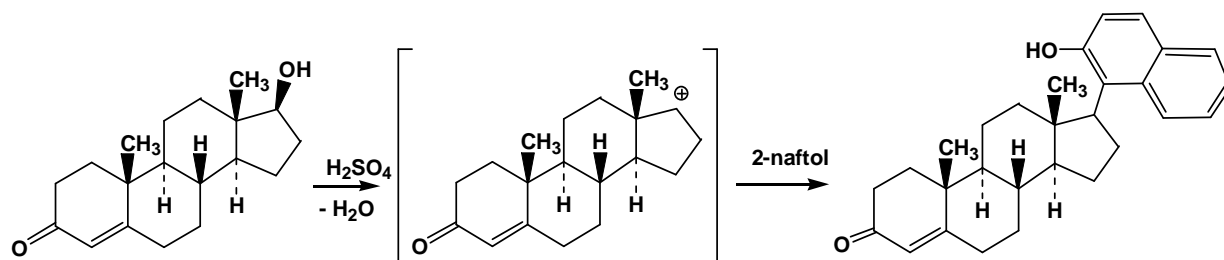
stopniowa zmiana zabarwienia może być uwarunkowana przemieszczaniem się podwójnych wiązań w obrębie układu steranu (przegrupowania karbokationów do innych o podobnej lub wyższej trwałości poprzez migracje anionów wodorkowych oraz grup metylowych). Jednym z prawdopodobnych produktów finalnych wszystkich tu wspomnianych przemian *Dromostanolonu* może być związek o strukturze przedstawionej na Rys. 129.



Rys. 129. Charakterystyczny dla związków barwnych rozległy układ sprzężonych wiązań podwójnych w obrębie steranu i przyległego do niego podstawnika

3. Kondensacje z fenolami w środowisku kwaśnym

Reakcje kondensacji z fenolami w środowisku kwaśnym są jednymi z ważniejszych reakcji charakteryzujących steroidy. Ich przebieg rozpoczyna zwykle protonowanie obecnych w cząsteczce sterolu grup hydroksylowych i utrata cząsteczki wody. Powstające przejściowo karbokationy w swej formie pierwotnej, bądź po przegrupowaniu ulegają substytucji elektrofilowej do podatnego na S_E fenolu. Otrzymane w tej reakcji analitycznej produkty wykazują różne barwy w zależności od badanego sterolu i ewentualnego dodatku wody, która może ulec addycji do obecnych w związku wiązań wielokrotnych. Przykładem tego typu przemian może być jedna z możliwych reakcji testosteronu z 2-naftolem:



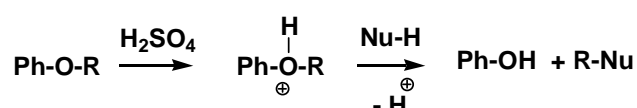
Rys. 130. Reakcja testosteronu z 2-naftolem

4. Reakcje ze stężonym kwasem siarkowym

Stężony kwas siarkowy(VI) (sam, bądź jako składnik odczynnika) może powodować wiele różnorodnych przemian w analizowanych związkach organicznych. Reakcje analityczne, w których związek ulega przemianom pod wpływem stężonego kwasu siarkowego(VI)

wykorzystywane są głównie w analizie tetracyklin i steroidów, które są reaktywne dzięki obecności wiązań nienasyconych oraz grup hydroksylowych w układzie steranu. Ich przebieg rozpoczyna zwykle protonowanie obecnych w cząsteczce grup hydroksylowych i odszczepienie cząsteczki wody, bądź addycja protonu do podwójnego wiązania. Powstały karbokation może następnie ulec przegrupowaniu, eliminacji lub reakcji z nukleofilami obecnymi w środowisku. Możliwe jest także utworzenie sulfonowych pochodnych analizowanych steroidów. Ze względu na ogromną różnorodność, następczy charakter zachodzących reakcji i występowanie sprzężonych układów wiązań zarówno w substratach jak i produktach reakcji, charakteryzują się one występowaniem zmieniających się w czasie charakterystycznych barw.

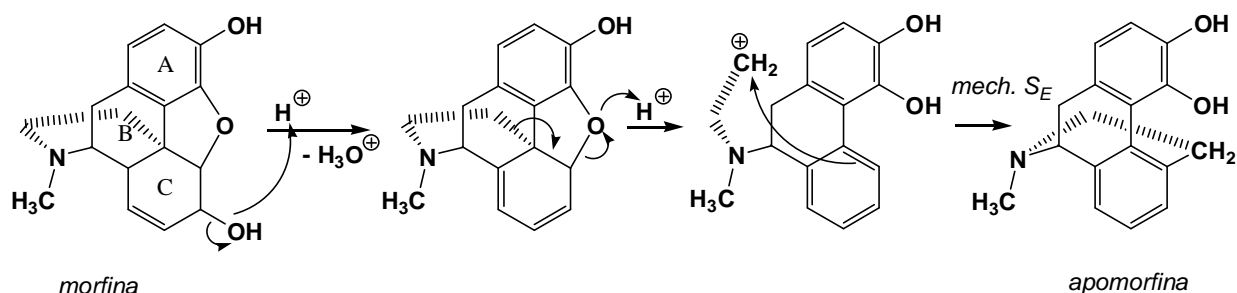
Innym typem reakcji zachodzącej pod wpływem stężonego kwasu siarkowego(VI) jest **rozszczenie eterów alkilowo-arylowych**, zgodnie z równaniem:



Rys. 131. Rozszczepianie eterów alkilowo-arylowych pod wpływem działania stężonego kwasu siarkowego(VI)

Powstały podczas takiego rozpadu fenol stanowi często podstawę identyfikacji związków zawierających tego typu ugrupowanie eterowe.

Pewną odmianą tej reakcji jest rozszczepianie przez stężony kwas siarkowy(VI) mostków tlenowych w alkaloidach i ich syntetycznych analogach należących do pochodnych morfinanu (np. w kodeinie, morfinie, heroinie). Mechanizm przemian jest dość złożony. W pierwszym etapie, po sprotonowaniu drugorzędowej grupy alkoholowej (obecnej w pierścieniu C) następuje dehydratacja (wg mechanizmu E1), a dalej katalizowane kwasowo rozszczepienie mostka tlenowego i aromatyzacja pierścienia C. Utworzenie nowego układu aromatycznego połączone jest z otwarciem mostka etylenoaminowego. Kończącym etapem tych przemian jest zamknięcie nowego pierścienia heterocyklicznego wg mechanizmu S_E do nowopowstałego układu aromatycznego.



Rys. 132. Mechanizm rozkładu pochodnych morfinanu pod wpływem działania stęż. kwasu siarkowego(VI)

Stężony kwas siarkowy(VI) jest również czynnikiem łatwo rozszczepiającym silnie naprężone układy cykliczne, np. czteroczłonowe pierścienie β -laktamowe. Przebieg takiej reakcji został zaprezentowany w rozdz. IV.2.7.2.

Podstawową próbą wykorzystującą reakcje ze stężonym kwasem siarkowym jest **próba Salkowskiego**, w której chloroformowy roztwór steroidu podwarstwa się stężonym kwasem siarkowym. Zabarwienie obu warstw uzależnione jest od typu badanego sterolu.

Stężony kwas siarkowy bierze także udział w przemianach charakterystycznych dla szeregu innych reakcji analitycznych, do których należą np.:

- **reakcja z bezwodnikiem octowym** w obecności stęż. kwasu siarkowego(VI) (**próba Liebermanna-Burcharda**); reakcja ta służy do ilościowego oznaczania cholesterolu w płynach ustrojowych;
- **kondensacja z furfurałem** wobec stężonego H_2SO_4 (patrz rozdz. VI.2.);
- **kondensacja z formaldehydem** wobec stężonego H_2SO_4 (patrz rozdz. VI.1.);
- **kondensacje z fenolami w środowisku kwaśnym** (patrz rozdz. VI.3.);
- **reakcja z kwasem siarkowym(VI) i nadtlenkiem benzoilu**.

W większości tych reakcji następuje odwodnienie analizowanego związku, bądź któregoś z produktów pośrednich, w związku z czym bardzo istotne jest aby używane szkło laboratoryjne było suche.

5. Reakcja Emersona

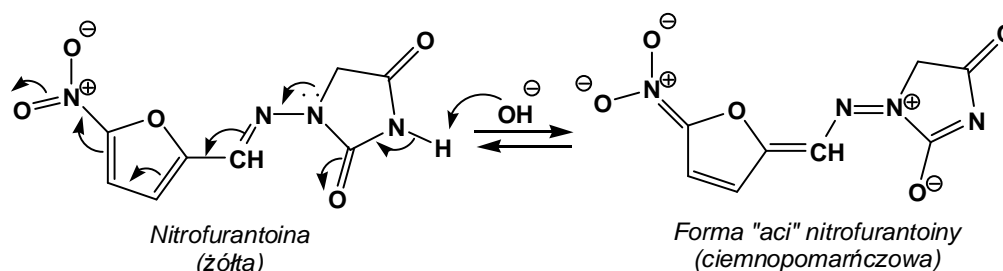
Reakcja Emersona jest barwną reakcją charakterystyczną dla niektórych pierścieni heterocyklicznych. Polega ona na łagodnym utlenieniu pochodnych pirazolinonu za pomocą heksacyjanożelazianu(III) potasu, a następnie kondensacji utworzonego produktu utlenienia z fenolem. Reakcję tę dają na przykład niesteroidowe leki przeciwzapalne z grupy pirazolonów, takie jak: aminofenazon (piramidon), metamizol sodowy (pyralgina) i izopiryna. Przebieg reakcji – patrz Rys. 24 (rozdz. IV.2.2.).

6. Tworzenie aromatycznych związków nitrowych

Wprowadzanie grup nitrowych w określone pozycje pierścieni aromatycznych często skutkuje wyraźną zmianą właściwości chromoforowych powstałych produktów względem substratów, z których powstały. Cechę tę wykorzystuje się czasami w analityce związków organicznych, zwłaszcza tam, gdzie oczekiwaną odpowiedzią danej próby analitycznej ma być pojawienie się nowej barwy mieszaniny reagującej.

W analizie środków leczniczych chemia aromatycznych związków nitrowych najczęściej wykorzystywana jest na trzy sposoby.

W przypadkach, gdy identyfikowany związek posiada w swej strukturze grupę nitrową przy pierścieniu aromatycznym, jego barwa zwykle jest zbliżona do żółtej. Dodatkowo, przy odpowiednim podstawieniu pierścienia grupami protonodonorowymi można wykorzystać zdolność przechodzenia związku nitrowego w środowisku alkalicznym w jego anion „aci”. Za przykład może posłużyć reakcja nitrofurantoiny (substancja czynna leku antybakteryjnego – *Nitrofurantoin*) z wodnym roztworem wodorotlenku sodu.

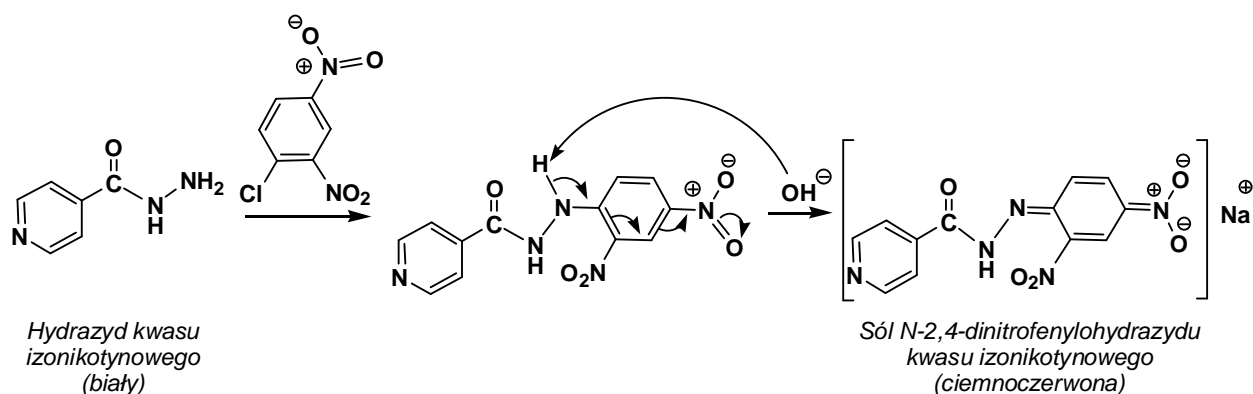


Rys. 133. Równowaga nitro – aci dla nitrofurantoiny

W środowisku alkalicznym równowaga reakcji zdecydowanie przesuwana jest w prawo, a dominująca w tych warunkach forma „aci” odznacza się ciemnopomarańczową barwą.

W sytuacjach, gdy analizowany związek posiada w swej strukturze układ aromatyczny, ale jest pozbawiony podstawnika nitrowego, można dokonać jego wprowadzenia na drodze substytucji elektrofilowej, a następnie, analogicznie jak w poprzednim przypadku, spróbować wykorzystać właściwości kwasowo-zasadowe nowopowstałego produktu. Efedryna poddana nitrowaniu za pomocą azotanu(V) sodu w środowisku stężonego kwasu siarkowego(VI) daje żółtą nitropochodną, która pod wpływem etanolowego roztworu wodorotlenku potasu przekształca się w sól o barwie fioletowej. Jest to **reakcja Vitaliego** (przebieg reakcji – patrz rozdz. IV.2.1.2. w opisie reakcji charakterystycznych dla chlorowodoru efedryny).

Trzeci z kolei przypadek, to analiza związków pozbawionych zarówno grup nitrowych, jak i układów aromatycznych. O ile pozostałe elementy strukturalne badanego związku umożliwiają dobudowanie znitrowanego układu aromatycznego, warto taką próbę podjąć, po czym uzyskany produkt przekształcić znanym już sposobem w jego formę „aci” i zanotować ewentualną zmianę barwy mieszaniny reagującej. Tego typu podejście stosuje się m.in. przy ustalaniu tożsamości leku tuberkulostatycznego o nazwie *Izoniazyd*, którego substancję aktywną stanowi hydrazyd kwasu izonikotynowego. Związek ten w wyniku reakcji z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem, przebiegającej wg mechanizmu aromatycznej substytucji nukleofilowej, daje *N*-(2,4-dinitrofenylo)-podstawioną pochodną hydrazynu, która w warunkach silnie alkalicznych tworzy sól formy „aci” o barwie ciemnoczerwonej.



Rys. 134. Metoda „łączenia” znitrowanych układów aromatycznych z pochodnymi amin

Z innych sposobów wbudowywania ugrupowań nitroaromatycznych można wymienić:

- działanie 2,4-dinitrofenylohydrazyną na związki zawierające grupy aldehydowe lub ketonowe, a także łatworozszczepialne pod wpływem nukleofilu układy cykliczne (np. β -laktamowe);
- reakcje zdiazowanej 4-nitroaniliny lub aldehydu 4-nitrobenzoesowego z innymi związkami aromatycznymi (zwłaszcza silnie zaktywowanymi na aromatyczną substytucję elektrofilową fenolami czy aromatycznymi aminami trzeciorzędowymi);
- kwasowo katalizowane kondensacje aldehydu 4-nitrobenzoesowego z aminami pierwszorzędowymi, hydrazynami, hydrazydami lub enolizującymi ketonami.

7. Tworzenie trudnorozpuszczalnych soli

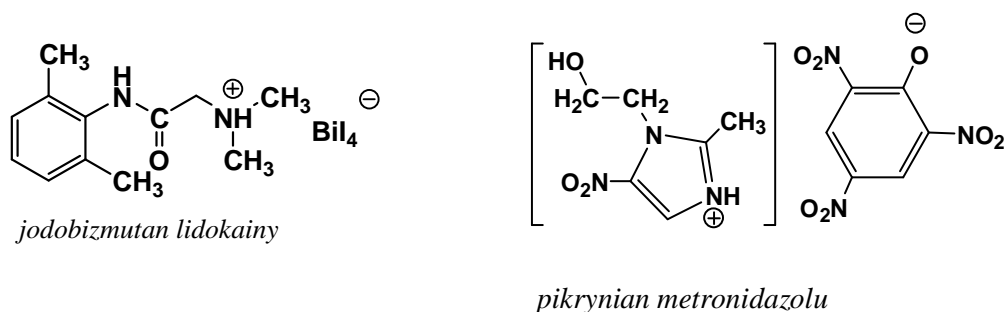
Tworzenie trudno rozpuszczalnych soli jest jedną z bardziej rozpowszechnionych reakcji analitycznych, szczególnie w analizie heterocyklicznych związków azotowych. Dodatnie wyniki kilku reakcji strąceniowych są często podstawą do przypisania badanego związku do określonej grupy związków organicznych (np. alkaloidów).

Do najbardziej popularnych odczynników strącających heterocykliczne związki azotowe należą:

- odczynnik Mayera (jodortęcian potasowy, K_2HgI_4);
- odczynnik Dragendorffa (jodobizmutan(III) potasowy, $KBiI_4$);
- odczynnik Wagnera (roztwór jodu w wodnym roztworze jodku potasowego);
- kwas pikrynowy/ 2,4,6-trinitrofenol (nasycony na zimno roztwór wodny);
- odczynnik Sonnenscheina (kwas molibdenianofosforowy, $H_3PO_4 \cdot 12 MoO_3 \cdot n H_2O$);
- odczynnik Scheiblera (kwas wolframianofosforowy, $H_3PO_4 \cdot 12 WO_3 \cdot n H_2O$);
- kwasy chloro- i jodoplatynowy, H_2PtCl_6 , H_2PtI_6 .

Bardziej szczegółowy przegląd popularnych odczynników strącających heterocykliczne związki azotowe został zaprezentowany w rozdziale IV.2.1.1.

Alkaloidy i niektóre inne azotowe związki heterocykliczne, z racji swego zasadowego charakteru, ulegają w warunkach reakcji strąceniowej protonowaniu tworząc nierozpuszczalną sól z anionem dodanego odczynnika. Protonowaniu może ulec jeden, bądź więcej zasadowych atomów azotu, zależnie od stopnia zróżnicowania ich zasadowości. Nie ulegają protonowaniu atomy azotu pozbawione właściwości zasadowych, np. atom amidowy czy atom azotu w pochodnych pirolu. Jako przykład związków biologicznie czynnych posiadających w swych strukturach kilka atomów azotu o wyraźnie zróżnicowanym charakterze zasadowym można przytoczyć lidokainę czy metronidazol. W reakcjach z wybranymi kwasami tworzą one trudnorozpuszczalne w roztworach wodnych sole zawierające w swych strukturach tylko jeden anion parujący.



Rys. 135. Przykłady struktur soli amin o wyraźnie zróżnicowanej zasadowości atomów azotu

Tylko nieliczne odczynniki strącające dają osady z pochodnymi ksantyny (w tym i z kofeiną).

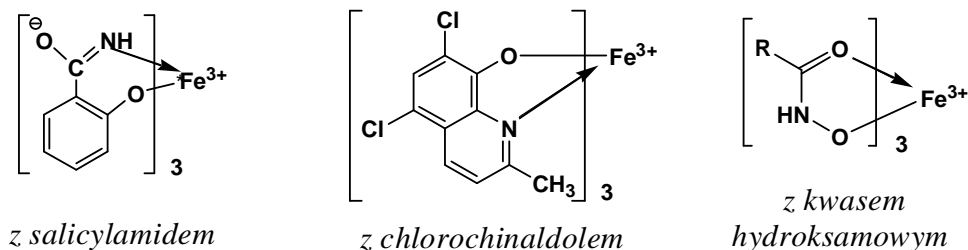
8. Reakcje z jonami żelaza(III)

Kationy żelaza(III) w reakcjach z niektórymi związkami organicznymi dają barwne połączenia, najczęściej o budowie kompleksowej. Do najpopularniejszych grup związków organicznych wykazujących zdolności charakterystycznego kompleksowania jonów żelaza należą fenole, enole, kwasy hydroksamowe i niektóre oksymy. Barwa uzyskiwanego związku kompleksowego zależy od użytego rozpuszczalnika, stężenia reagentów i czasu reakcji. Zwykle jest ono zbliżone do czerwonego lub fioletowego, ale fenole dają też związki kompleksowe o zabarwieniu zielonym, niebieskim czy fioletowym. Zabarwienie zwykle jest nietrwałe i należy je obserwować w chwili powolnego dodawania odczynnika (rozcieńczony roztwór FeCl_3). W przypadku fenoli przebieg reakcji, a tym samym i barwa powstającego produktu, zależy od ich budowy, ilości obecnych przy pierścieniu aromatycznym grup hydroksylowych, a także obecności w pozycji *orto* pierścienia aromatycznego grupy kompleksotwórczej (aldehydowa, ketonowa, karboksylowa, hydroksylowa, sulfonowa,

alkoksyłowa lub karboalkoksyłowa). Fenole pozbawione w pozycjach *orto* takich grup reagują z FeCl_3 jedynie w środowisku wodnym i z utworzeniem prostych soli żelazowych, których zabarwienie często niknie po dodaniu etanolu.

Reakcje barwne z FeCl_3 daje również anilina i niektóre jej pochodne oraz wiele zasad heterocyklicznych, w tym pochodne chinoliny i pirydyny. Wiele kwasów karboksylowych tworzy z kationami Fe^{3+} trudnorozpuszczalne w wodzie barwne sole (osady).

Połączenia jonów Fe^{3+} :



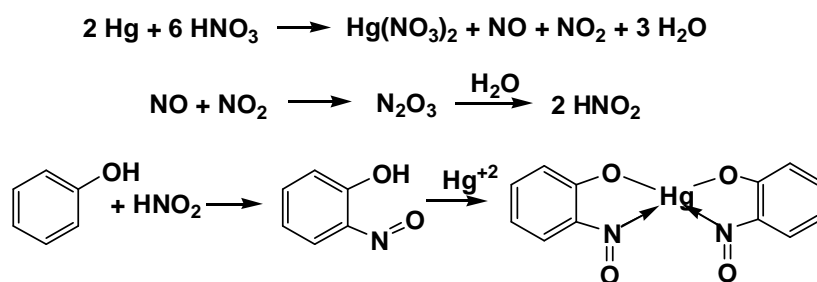
Rys. 136. Przykłady struktur kompleksowych wybranych związków organicznych z jonami żelaza(III)

W analityce leków reakcje z jonami żelaza(III) wykorzystywane są na przykład do identyfikacji kwasu salicylowego, tetracyklin, pochodnych fenylopirazolinonu (*Aminofenazon*, *Propyfenazon*) czy zawierającego układ fenolowy *Chlorchinaldolu*. Estry steroli, po uprzedniej reakcji z hydroksyloaminą i utworzeniu odpowiedniego kwasu hydroksamowego, dają także z jonami żelaza(III) charakterystyczne czerwono-fioletowe związki kompleksowe.

9. Odczynnik Millona

Odczynnik Millona jest otrzymywany przez działanie dymiącym kwasem azotowym na rtęć, a następnie rozcieńczenie uzyskanego roztworu wodą. Służy on do wykrywania obecności pierścieni aromatycznych zaktywowanych na podstawienie elektrofilowe, szczególnie fenolu i jego pochodnych, w których przynajmniej jedna pozycja *orto* musi być niepodstawiona. Podczas reakcji Millona pierścień aromatyczny ulega nitrozowaniu w pozycji *orto*, a uzyskana pochodna tworzy z jonami rtęci Hg^{2+} kompleks o czerwonej barwie.

Reakcja z odczynnikiem Millona jest wykorzystywana m.in. w analityce białek, peptydów i aminokwasów, jako charakterystyczna dla obecności tyrozyny. Służy też do wykrywania kwasu salicylowego i niektórych jego pochodnych.

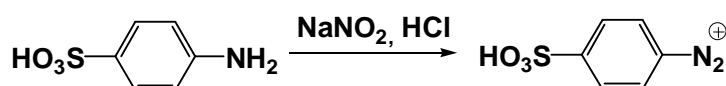


Rys. 137. Reakcja fenolu z odczynnikiem Millona

Niekiedy, w wyniku działania odczynnikiem Millona na badaną próbkę związku organicznego obserwuje się powstawanie białego osadu zamiast spodziewanego czerwono zabarwionego roztworu. Taka sytuacja może mieć miejsce wówczas, gdy głównym produktem reakcji jest trudnorozpuszczalna w wodzie sól z jonami rtęci(II). Jako przykład takich produktów można podać sole rtęciowe niemetylowanych pochodnych barbituranów (patrz Rys. 89 w rozdz. IV.2.8.3.).

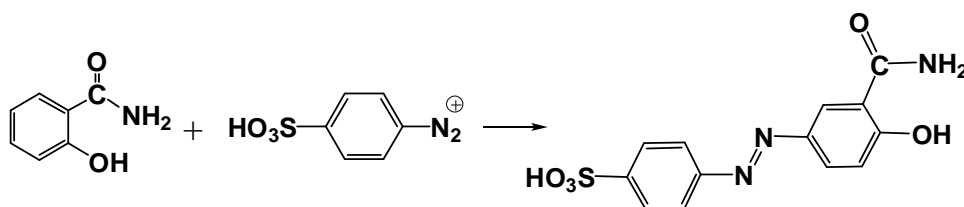
10. Kwas 4-diazobenzenosulfonowy (odczynnik Pauliego)

Kwas p-diazobenzenosulfonowy jest związkiem zawierającym reaktywne ugrupowanie diazoniowe, odpowiadające za przebieg jego większości reakcji analitycznych. Otrzymuje się go *in situ* w reakcji kwasu sulfanilowego (4-aminobenzenosulfonowego) z nadmiarem azotanu(III) sodu w środowisku kwaśnym.



Rys. 138. Otrzymywanie zdiazowanego kwasu sulfanilowego

Jest on głównym składnikiem tzw. **odczynnika Pauliego**, stosowanego powszechnie w analizie jakościowej związków organicznych. Działanie odcynnika polega zwykle na substytucji ugrupowania diazoniowego do silnie zaktywowanych na podstawie elektrofilowe pierścieni aromatycznych (grupa diazoniowa jest słabym elektrofilem).



Rys. 139. Reakcja salicylamidu z kwasem 4-diazobenzenosulfonowym

Odczynnik stosowany jest między innymi w analizie tetracyklin oraz salicylamidu i jego pochodnych.

Z racji obecności silnie zaktywowanych na S_E pierścieni aromatycznych w strukturach niektórych aminokwasów (tyrozyna, histydyna) roztwór kwasu 4-diazobenzenosulfonowego stosowany jest także do wykrywania zawierających te reszty peptydów i białek, z którymi daje barwne związki (na ogół czerwone, zmieniające się po zakwaszeniu na żółtoczerwone). Związki te swą barwę zawdzięczają powstającemu na skutek ataku jonu diazoniowego na pierścień aromatyczny produktu, który wyróżnia się posiadaniem sprzężonego, zwykle dość rozległego układu wiązań podwójnych.

VII. Procedury ćwiczeń

Ćwiczenie 1. Identyfikacja leku o nieznanym składzie

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wykrycie oraz potwierdzenie tożsamości głównej substancji czynnej w nieznanym leku jednoskładnikowym. Struktura nieznanego leku, będącego przedmiotem analizy znajduje się zestawieniu struktur zawartych w załączniku do niniejszej instrukcji ćwiczenia, przygotowanym przez prowadzącego zajęcia (wzór - patrz rozdz. IX.3.).

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analiz jakościowych należy zapoznać się z:

- treścią rozdziałów II, IV.1., IV.2. oraz V;
- reakcjami charakterystycznymi podstawowych ugrupowań związków organicznych, opisanymi w dostępnych podręcznikach analizy jakościowej związków organicznych, np. [7, 8, 9 lub 10];
- zawartością tabeli dostarczonej przez prowadzącego zajęcia, a przygotowanej wg wzoru zaprezentowanego w rozdz. IX.3. (wypełnić polecenie wskazane w jej nagłówku).

Tok analizy

- Dla badanej substancji (przygotowanej do analizy zgodnie z zaleceniami podanymi w rozdz. IV.1.) należy wykonać następujące zadania:
 - ustalić skład pierwiastkowy po stopieniu próbki z sodem;
 - poddać reakcjom grupowym, potwierdzającym (lub wykluczającym) obecność poszczególnych ugrupowań, jakie powinny zostać uwzględnione po teoretycznej analizie danych wprowadzonych do w/wym. tabeli (każdą z reakcji należy przeprowadzać równoległe z próbą na odpowiedniej, znanej substancji wzorcowej); przy przeprowadzaniu reakcji grupowych należy skorzystać z przepisów zamieszczonych w dostępnych podręcznikach z zakresu organicznej analizy jakościowej, np. [1, 2, 7-10];
 - porównać uzyskane wyniki doświadczalne z wstępnie spodziewanymi (tj. wskazanymi w w/wym. tabeli) i wytypować najbardziej prawdopodobne substancje czynne, jakie mogą być przedmiotem analizy; *uwaga: należy upewnić się, czy którakolwiek z substancji pomocniczych (o ile są znane) nie może być przyczyną uzyskania pozytywnych wyników poszczególnych testów.*

- uzupełnić analizę o próby dodatkowe, charakterystyczne dla wytypowanej substancji, wskazane w ostatniej kolumnie tabeli.
- Po przeprowadzeniu wszystkich analiz należy przedstawić ich wyniki prowadzącemu zajęcia do akceptacji. W tym celu:
 - powinny zostać zaprezentowane wszystkie testy kroplowe i próbówkowe (pozytywne, jak i negatywne);
 - powinien zostać przedstawiony szczegółowy tok rozumowania, na podstawie którego wykryto badaną substancję czynną.
- Sporządzić i przekazać prowadzącemu ćwiczenia sprawozdanie z przeprowadzonej analizy wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 2. Analiza znanego leku jednoskładnikowego

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyodrębnienie głównej substancji czynnej z masy określonego leku prostego, a następnie potwierdzenie jej tożsamości i oznaczenie jej ilościowej zawartości w określonej jednostkowej porcji leku (np. jednej tabletki, kapsułce, ampułce itp...). Zebrane wyniki analizy chemicznej leku będą porównane z danymi, jakie podaje odpowiednia monografia leku (patrz rozdz.IV.3.).

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią odpowiedniej monografii leku stanowiącego przedmiot analizy (rozdział IV.3.);
- teoretycznymi podstawami zasady ilościowego oznaczania substancji czynnej leku (rozdział III. oraz ewentualnie dostępne podręczniki omawiające metody analizy ilościowej związków chemicznych);
- podstawowymi informacjami dotyczącymi struktury oraz właściwości chemicznych grupy leków, do których należy analizowana substancja czynna (odpowiedni podrozdział w rozdz. IV.2.);
- mechanizmami działania odczynników analitycznych, opisanych w rozdz. VI..

Tok analizy

Dla badanej substancji (przygotowanej do analizy zgodnie z zaleceniami podanymi w rozdz. IV.1. lub bezpośrednio w monografii leku) należy wykonać niżej wyszczególnione zadania.

- Oznaczyć średnią masę (dla substancji stałych) jednostkowej porcji leku. W tym celu należy zanotować wagę co najmniej trzech kolejno po sobie ważonych

pojedynczych, nieuszkodzonych mechanicznie tabletek, kapsułek, drażetek, zawartości pojedynczych saszetek itp. Wagę należy określać na dokładnością 0,001 g. Obliczyć średnią wartość z uzyskanych oznaczeń.

- Poddać reakcjom charakterystycznym, potwierdzającym tożsamość substancji czynnej, zgodnie z procedurami wskazanymi w monografii leku i porównać uzyskane rezultaty testów z informacjami podanymi w niniejszym podręczniku.
- Uzupełnić analizę jakościową leku o jego badania chromatograficzne (TLC) oraz spektroskopowe, zalecone w monografii.
- Oznaczyć średnią zawartość substancji czynnej we wcześniej określonej jednostkowej porcji leku. Oznaczanie przeprowadzić jedną z metod (o ile opisano kilka) wskazanych w monografii leku. Wybór metody należy skonsultować z prowadzącym zajęcia.
- Po przeprowadzeniu wszystkich analiz należy przedstawić ich wyniki prowadzącemu zajęcia do akceptacji. W tym celu powinny zostać zaprezentowane wyniki analiz ilościowych, a także wszystkie testy kroplowe, próbówkowe (zarówno pozytywne, jak i negatywne), analizy TLC oraz zarejestrowane widma.
- Sporządzić i przekazać prowadzącemu ćwiczenia sprawozdanie z przeprowadzonej analizy wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 3. Reakcje charakterystyczne alkaloidów

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych alkaloidów z różnych grup strukturalnych.

Związki będące przedmiotem analizy

W zadaniu obejmującym praktyczne zapoznanie się z podstawowymi reakcjami, które znajdują zastosowanie przy identyfikacji alkaloidów studenci będą mieli do dyspozycji po jednym związku wzorcowym z każdej grupy strukturalnej, wyszczególnionej w Tabeli 1.

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.1. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Alkaloidy” w lit. [12];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań.

- Poddanie każdego z wzorcowych alkaloidów barwnym i strąceniowym reakcjom analitycznym (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.1.1.) celem poznania ich przebiegu. Szczególną uwagę należy zwrócić na przebieg reakcji specyficznych dla poszczególnych grup strukturalnych alkaloidów. Zalecanym jest, aby studenci realizowali to zadanie w zespołach dwuosobowych, co sprawi, że notowane obserwacje (zwłaszcza testów barwnych) będą bardziej obiektywne. Każdą z reakcji należy wykonywać równolegle (tzn. w tym samym czasie) dla wszystkich badanych próbek, co ułatwi porównywanie wyników.
- Sporządzenie dokładnego opisu wyników (dokonanych obserwacji) wszystkich przeprowadzonych reakcji.

Po zakończeniu ćwiczenia należy sporządzić i przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 4. Identyfikacja alkaloidów i ich syntetycznych analogów

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest identyfikacja próbki nieznanego alkaloidu (lub jego syntetycznego analogu) metodami chemicznej i spektroskopowej analizy jakościowej. Podczas realizacji poszczególnych zadań zostaną wykorzystane wyniki Ćwiczenia 3.

Związki będące przedmiotem analizy

Identyfikacja nieznanego alkaloidu zostanie przeprowadzona dla jednego związku o budowie alkaloidowej, którego próbkę przydzielili prowadzący zajęcia.

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.1. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Alkaloidy” w lit. [12];
- wynikami zebranymi w Ćwiczeniu 3;
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań dla badanej próbki.

- wykonanie przynajmniej jednej próby strąceniowej o pozytywnym wyniku, co ma za zadanie potwierdzić przypuszczenie, że analizowanym związkiem może być alkaloid lub jego syntetyczny analog;
- przeprowadzenie prób grupowych alkaloidów, które pozwolą na zakwalifikowanie badanego związku do określonej grupy strukturalnej (np. pochodnych imidazolu, chinoliny, morfinanu, puryny itp...);

- przeprowadzenie innych reakcji charakterystycznych, które przebiegały pozytywnie dla substancji wzorcowej z ustalonej grupy strukturalnej (patrz – wyniki Ćwiczenia 3);
- sprawdzenie obecności/nieobecności w strukturze badanego związku grup alkoholowych, fenolowych, pierwszorzędowych aromatycznych grup aminowych, ugrupowań eteru alkilowo-arylowego, wiązań nienasyconych, a także określenie rzędowości grup aminowych;
- przeprowadzenie reakcji specyficznych (o ile istnieją) dla poszczególnych „przedstawicieli” alkaloidów z oznaczonej grupy strukturalnej (patrz rozdz. IV.2.1.3.);
- zarejestrowanie widm IR, NMR i ich analiza pod kątem określenia struktury badanego związku (rodzaj widm do zarejestrowania należy wcześniej skonsultować z prowadzącym zajęcia).

Po zakończeniu ćwiczenia należy sporządzić i przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 5. Testy diagnostyczne alkaloidów

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych alkaloidów z różnych grup strukturalnych, a następnie próba selekcji tych testów pod kątem wartości diagnostycznej w stosunku do całej grupy badanych związków.

Związki będące przedmiotem analiz

Przedmiotem analizy będą cztery alkaloidy i/lub ich syntetyczne analogi, wybrane spośród zestawionych w Tabeli 1. O wyborze zdecyduje prowadzący zajęcia. Badane związki są substancjami recepturowymi, mającymi najczęściej postać soli (chlorowodorków lub siarczanów).

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.1. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Alkaloidy” w lit. [12];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych, opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań.

- Poddanie każdego z przeznaczonych do badania czterech różnych alkaloidów barwnym i strąceniowym reakcjom analitycznym celem poznania ich przebiegu. Zestaw reakcji do przeprowadzenia należy wcześniej skonsultować z prowadzącym zajęcia. Procedury ich wykonania – patrz rozdz. IV.2.1.1.

- Sporządzenie dokładnego opisu ich wyników (dokonanych obserwacji).
- Dokonanie oceny przeprowadzonych testów pod kątem ich przydatności do identyfikacji i odróżniania każdego z badanych alkaloidów względem pozostałych.
- Zaproponowanie (o ile to będzie możliwe) podstawowego zestawu testów diagnostycznych (reakcji tożsamościowych) dla identyfikacji poszczególnych alkaloidów względem pozostałych z nich.
- Zaprojektowanie graficznego schematu analizy (przykład schematu – patrz rozdz. IV.2.9.3.), na podstawie którego można będzie zidentyfikować każdy z czterech badanych alkaloidów.

Zalecanym jest, aby studenci realizowali to ćwiczenie w zespołach dwuosobowych, co sprawi, że notowane obserwacje (zwłaszcza testów barwnych) będą bardziej obiektywne. Każdą z reakcji należy wykonywać równolegle (w tym samym czasie, z zastosowaniem identycznych warunków) dla wszystkich czterech badanych próbek, co ułatwi porównywanie wyników.

Po zakończeniu ćwiczenia należy przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie sporządzone wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 6. Identyfikacja i rozróżnianie tetracyklin

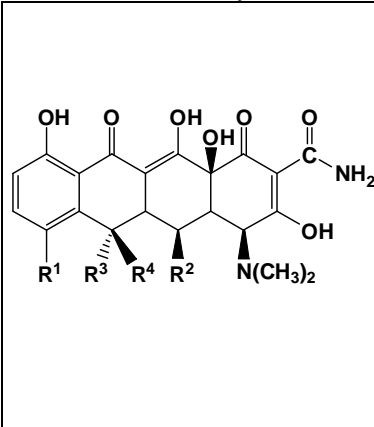
Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych związków z grupy tetracyklin, a następnie wskazanie tych o najlepszej wartości diagnostycznej dla rozróżniania tetracyklin pomiędzy sobą.

Związki będące przedmiotem analiz

Przedmiotem analizy będą jednoskładnikowe leki tetracyklinowe, wybrane spośród zestawionych w Tabeli 4, która ewentualnie może zostać zweryfikowana/ uzupełniona przez prowadzącego zajęcia o inne farmaceutyki z tej grupy (o ile będą dostępne komercyjnie).

Tabela 4. Wybrane leki z grupy tetracyklin naturalnych i półsyntetycznych

	R ¹	R ³	R ⁴	R ²	Nazwa substancji czynnej leku	Analizowane leki
	H	OH	CH ₃	H	tetracykliny chlorowodorek	TETRACYCLINUM, 250 mg /1 draż.
H	OH	H	H	Limecyklina*)	TETRALYSAL®, 150 mg / 1 tbl.	
H	H	CH ₃	OH	doksycykliny monowodzian	DOXYCYCLINUM, 100 mg / 1 kps.	
H	H	CH ₃	OH	doksycykliny chlorowodorek	DOTUR®, 100 mg /1 kps.	
N(CH ₃) ₂	H	H	H	minocykliny dichlorowodorek	MINOCYCLIN®, 50 mg /1 kps.	
H	OH	CH ₃	OH	oksytetracykliny chlorowodorek	OKSYTETRACYKLINA, proszek 5% lub 50%	

*) W strukturze limecykliny grupa amidowa jest podstawiona jedną grupą -CH₂-NH-CH(COOH)-(CH₂)₄-NH₂

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.5. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Tetracykliny” w lit. [6];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie następujących zadań:

- wyizolowanie poszczególnych tetracyklin z masy leku (tj. oddzielenie ich od substancji pomocniczych i wypełniających);
- poddanie każdej z wyodrębnionych tetracyklin barwnym reakcjom analitycznym (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.5.);
- sporządzenie dokładnego opisu ich wyników (dokonanych obserwacji);
- dokonanie oceny przeprowadzonych testów pod kątem ich przydatności do identyfikacji i odróżniania każdej z badanych tetracyklin wobec pozostałych;
- zaproponowanie (o ile to będzie możliwe) podstawowego zestawu testów diagnostycznych (reakcji tożsamościowych) dla identyfikacji poszczególnych tetracyklin względem pozostałych z analizowanego zestawu.

Zalecanym jest, aby studenci realizowali to zadanie w zespołach dwuosobowych, co sprawi, że notowane obserwacje (zwłaszcza testów barwnych) będą bardziej obiektywne. Każdą z reakcji należy wykonywać równolegle (w tym samym czasie) dla wszystkich badanych próbek, co ułatwi porównywanie wyników.

Po zakończeniu ćwiczenia należy sporządzić i przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 7. Identyfikacja i rozróżnianie steroidów

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych związków o budowie sterydowej, a następnie wskazanie tych o najlepszej wartości diagnostycznej dla rozróżniania poszczególnych sterydów pomiędzy sobą.

Związki będące przedmiotem analiz

Przedmiotem analizy będą cztery jednoskładnikowe leki sterydowe, wybrane spośród zestawionych w Tabeli 5, która ewentualnie może zostać zweryfikowana/uzupełniona przez

prowadzącego zajęcia o inne farmaceutyki z tej grupy strukturalnej (o ile będą dostępne komercyjnie).

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.3. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Hormony o budowie steroidowej” w lit. [6] i rozdziałem „Steroidy” w lit. [12];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

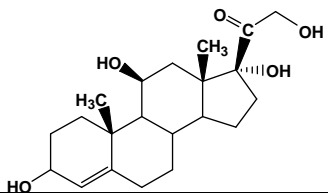
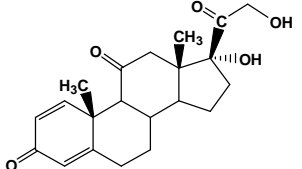
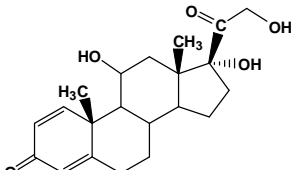
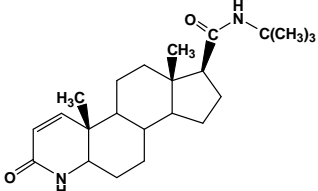
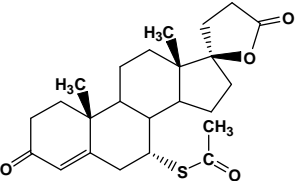
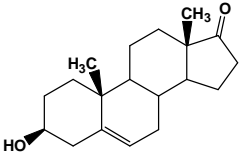
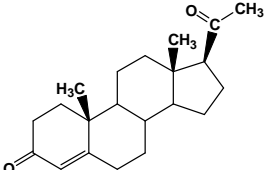
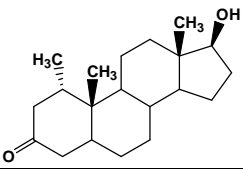
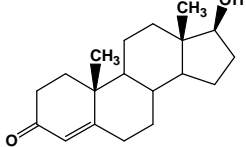
Ćwiczenie obejmuje wykonanie następujących zadań:

- wyizolowanie poszczególnych steroidów z masy leku (tj. oddzielenie ich od substancji pomocniczych i wypełniających) – patrz rozdz. IV,2.3.2.;
- poddanie każdego z wyodrębnionych steroidów barwnym reakcjom analitycznym (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.3.3.);
- sporządzenie dokładnego opisu ich wyników (dokonanych obserwacji);
- dokonanie oceny przeprowadzonych testów pod kątem ich przydatności do identyfikacji i odróżniania każdego z badanych steroidów wobec pozostałych z analizowanego zestawu.

Zalecanym jest, aby studenci realizowali to zadanie w zespołach dwuosobowych, co sprawi, że notowane obserwacje (zwłaszcza testów barwnych) będą bardziej obiektywne. Każdą z reakcji należy wykonywać równoległe (w tym samym czasie) dla wszystkich badanych próbek, co ułatwi porównywanie wyników.

Po zakończeniu ćwiczenia należy sporządzić i przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Tabela 5. Wybrane leki steroidowe

Lp.	Struktura substancji czynnej	Nazwa substancji czynnej	Analizowany lek
1.		Hydrokortyzon	Substancja recepturowa
2.		Prednizon	ENCORTON®, 5 mg / tbl.
3.		Prednizolon	Substancja recepturowa
4.		Finasteryd	FINASTER®, 5 mg / tbl.
5.		Spirolakton	VEROSPIRON®, 20 mg / tbl.
6.		Dehydroandrosteron	BIOSTERON®, 25 mg / tbl.
7.		Progesteron	PROGESTERONUM, 25 mg / 1 ml (1 ampułka)
8.		Masterolon	PROVIRON-25®; 25 mg / tbl.
9.		Testosteron	TESTOSTERONUM PROLONGATUM, 100 mg / 1 ml (ampułka)

Ćwiczenie 8. *Reakcje charakterystyczne związków peptydowych*

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych, jakie znalazły zastosowanie do identyfikacji związków o budowie peptydowej oraz aminokwasów stanowiących ich pojedyncze elementy strukturalne. Zadaniem finalnym ćwiczenia będzie identyfikacja nieznanego peptydu, wybranego z listy (*przygotowanej przez prowadzącego zajęcia*) kilkunastu znanych peptydów biologicznie aktywnych.

Związki będące przedmiotem analizy

W zadaniu obejmującym praktyczne zapoznanie się z podstawowymi reakcjami aminokwasów i peptydów, które znajdują zastosowanie przy ich identyfikacji studenci będą mieli do dyspozycji zestaw związków wzorcowych (pojedynczych aminokwasów, dipeptydu, jednego peptydu o łańcuchu głównym składającym się z co najmniej trzech reszt aminokwasowych oraz roztwór wodny białka kurzego). Do identyfikacji nieznanego związku peptydowego zostanie przydzielona jedna z kilkunastu substancji, których tabelaryczne zestawienie przygotuje i udostępni studentom prowadzący zajęcia. W zestawieniu tym będą podane szczegółowe sekwencje aminokwasowe wszystkich możliwych związków, wśród których znajdować się będzie identyfikowany peptyd. Przykładowe zestawienie identyfikowanych związków peptydowych prezentuje Tabela 6.

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z treścią rozdziału IV.2.9. niniejszego podręcznika oraz orientacyjnie z rozdziałem „Peptydy” w lit. [12], a także ze strukturami i trójliterowymi symbolami α -aminokwasów proteinogenicznych.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań.

- Poddanie każdego z wzorcowych związków: pojedynczych aminokwasów, dipeptydu oraz oligopeptydu (lub opcjonalnie roztworu białka kurzego) reakcjom analitycznym o charakterze identyfikacyjnym (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.9.1. i IV.2.9.2.). Szczególną uwagę należy zwrócić na przebieg reakcji specyficznych dla poszczególnych aminokwasów. Każdą z reakcji należy przeprowadzać równoległe dla wszystkich związków wzorcowych, jakie zostały przydzielone przez prowadzącego ćwiczenia, porównując i notując poczynione obserwacje.
- Identyfikacja nieznanego związku o budowie peptydowej, którego sekwencja znajduje się w zestawieniu przygotowanym przez prowadzącego zajęcia (przykładowe zestawienie - patrz Tabela 6). W tym celu należy wykonać niżej wyszczególnione zadania.

- Przeprowadzić reakcje charakterystyczne pozwalające potwierdzić strukturę oligopeptydową badanego związku (reakcja biuretowa) oraz wykryć w nim obecność wolnych grup aminowych (reakcja z ninhydriną - patrz rozdz.IV.2.9.1.).
- Wykonać analizę TLC dla wcześniej otrzymanego hydrolizatu badanego peptydu. Analiza TLC pozwoli na przybliżone określenie ilości różniących się od siebie reszt aminokwasowych, jakie wchodzi w skład łańcucha badanego peptydu. Należy ją wykonać stosując warunki podane w procedurze „Analiza TLC hydrolizatów peptydowych” (rozdz. IV.2.9.1.).
- Poddać hydrolizat reakcjom, które pozwolą na wykrycie zawartych w nim reszt aminokwasowych (patrz rozdz.IV.2.9.2.). Poszczególne reakcje można przeprowadzać równoległe z analogicznymi próbami dla odpowiedniego wzorca, co często ułatwia interpretację wyniku.
- W oparciu o uzyskane rezultaty prób chemicznych oraz posiadane zestawienie tabelaryczne (np. Tabela 6) związków mogących być przedmiotem analizy wytypować sekwencję zidentyfikowanego peptydu.
- Przedstawić prowadzącemu zajęcia wyniki analiz oraz szczegółowe rozumowanie, na podstawie którego zidentyfikowano zawartość badanej próbki.

Po zakończeniu ćwiczenia należy przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie sporządzone wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Tabela 6. Wybrane fizjologicznie aktywne związki o budowie peptydowej

Lp.	Nazwa	Sekwencja
1.	Tuftsyna	Thr-Lys-Pro-Arg
2.	Metionylenkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
3.	Leucyloenkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
4.	Melanoliberyna (MSF)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn
5.	Melanostatyna (MIF II)	Pro-His-Phe-Arg-Gly
6.	Proktolina	Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr
7.	ACTH (4-10)	Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly
8.	Angiotensyna II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
9.	Oksytocyna	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂
10.	Wazopresyna	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂
11.	Bradykinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
12.	Gonadoliberyna (GRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
13.	Somatoliberyna (SRF)	Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala
14.	Substancja P	Arg-Pro-Lys-ProGln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
15.	Gramicydyna S	c(Val-Orn-Leu- _D Phe-Pro-Val-Orn-Leu- _D Phe-Pro)
16.	Antamanid	c(Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-Phe-Phe-Pro)

Ćwiczenie 9. *Reakcje charakterystyczne barbituranów*

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych pochodnych kwasu barbiturowego, zwanych barbituranami.

Związki będące przedmiotem analizy

W zadaniu obejmującym praktyczne zapoznanie się z podstawowymi reakcjami, które znajdują zastosowanie przy identyfikacji barbituranów studenci będą mieć do dyspozycji związki organiczne wyszczególnione w Tabeli 3 (rozd. IV.2.8.1.), a zwłaszcza: kwas barbiturowy, barbital, fenobarbital oraz allobarbital.

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.8. niniejszego podręcznika oraz rozdziałem „Pochodne kwasu barbiturowego” w lit. [6];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań.

- Dla kwasu barbiturowego przeprowadzić reakcje, które są wspólne dla wszystkich barbituranów (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.8.2.) celem poznania ich przebiegu.
- Dla odpowiednio podstawionych pochodnych kwasu barbiturowego przeprowadzić reakcje rozróżniające poszczególne barbiturany (zestaw reakcji – patrz rozdz. IV.2.8.3.).
- Sporządzić dokładny opis wyników (dokonanych obserwacji) wszystkich przeprowadzonych reakcji.

Po zakończeniu ćwiczenia należy przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie sporządzone wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

Ćwiczenie 10. Analiza witamin

Cel ćwiczenia

Celem pierwszej części ćwiczenia jest poznanie przebiegu podstawowych reakcji analitycznych, które są charakterystyczne dla grup witamin, jakie zostały ujęte w rozdz. IV.2.10. Druga część niniejszego ćwiczenia obejmie identyfikację nieznaną substancji należącej do grupy poznanych wcześniej witamin.

Związki będące przedmiotem analizy

W zadaniu obejmującym zarówno praktyczne zapoznanie się z podstawowymi reakcjami, które znajdują zastosowanie przy identyfikacji witamin, jak i identyfikację nieznaną witaminy studenci będą mieli do dyspozycji substancje omówione w rozdz. IV.2.10. w postaci komercyjnie dostępnych leków prostych.

Zakres wymaganych wiadomości wstępnych

Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy należy zapoznać się z:

- treścią rozdziału IV.2.10. niniejszego podręcznika oraz z rozdziałem „Witaminy” w lit. [6];
- mechanizmami działania odczynników analitycznych opisanych w rozdz. VI.

Tok analizy

Ćwiczenie obejmuje wykonanie niżej podanych zadań.

- Dla witamin z poszczególnych grup przeprowadzić reakcje charakterystyczne (patrz rozdz. IV.2.10.1. do IV.2.10.5.) celem poznania ich przebiegu. Odnotować zaobserwowane różnice w przebiegu reakcji poszczególnych grup witamin z tymi samymi odczynnikami.

- Opracować graficznie schemat postępowania (wzór – patrz rozdz. IV.2.9.4.), który przy wykorzystaniu doświadczeń zdobytych w trakcie realizacji poprzedniego punktu pozwoli na efektywną identyfikację nieznannej substancji z grupy witamin. Zwrócić szczególną uwagę na podział witamin ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie oraz na wytypowanie prób różnicujących poszczególne grupy witamin.
- Dokonać identyfikacji przydzielonej przez prowadzącego zajęcia próbki nieznannej witaminy.
- Przedstawić prowadzącemu zajęcia wyniki analiz oraz szczegółowe rozumowanie, na podstawie którego zidentyfikowano zawartość badanej próbki.

Po zakończeniu ćwiczenia należy przekazać prowadzącemu zajęcia sprawozdanie sporządzone wg stosownego formularza, zamieszczonego w rozdziale IX.2.2.

VIII. Literatura źródłowa i uzupełniająca

- [1] M. Struszyński, „*Jakościowa analiza organiczna*”, PWN, Warszawa 1960.
- [2] K. H. Bauer, „*Analiza związków organicznych*”, PWT, Warszawa 1957.
- [3] M. Gorczykowa, A. Zejc (red.), „*Ćwiczenia z chemii leków*”, Collegium Medicum UJ, Kraków 1996.
- [4] A. Kraczkowska, I. Olędzka, D. Rajzer, E. Sell, „*Chemiczne metody identyfikacji środków leczniczych*”, Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk 2002.
- [5] „*Farmakopea polska V*”, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 1996.
- [6] A. Zejc, M. Gorczyca (red.), „*Chemia leków*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.
- [7] A. Vogel, „*Preparatyka organiczna*”, WNT, Warszawa 1984.
- [8] Z. Jerzmanowska, „*Analiza jakościowa związków organicznych*”, PZWL, Warszawa 1967.
- [9] R. Walczyna, J. Sokołowski, G. Kupryszewski, „*Analiza związków organicznych*”, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 1996.
- [10] J. Woliński, J. Terpiński, „*Organiczna analiza jakościowa*”, PWN, Warszawa 1973.
- [11] L. Smart (ed.), „*Separation, purification and identification*”, RSC, Cambridge UK 2002.
- [12] A. Kołodziejczyk, „*Naturalne związki organiczne*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [13] C. Dickson, „*Medicinal Chemistry Laboratory Manual. Investigations in Biological and Pharmaceutical Chemistry*”, CRS Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 1999.
- [14] M. Gajewska, J. Jarzębiński, „*Chemiczna analiza leków jednoskładnikowych. Cz. I*”, wyd. II, Wydawnictwa Akademii Medycznej w Warszawie, Warszawa 1977.
- [15] L. G. Wade, Jr., „*Organic Chemistry*”, Fourth edition, Prentice Hall International, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA 1999.
- [16] M. Jones, Jr., „*Organic Chemistry*”, Second edition, W. W. Norton & Company, New York, London, 2000.
- [17] J. M. Stewart, J. D. Young, „*Solid phase peptide synthesis*”, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois 1984.

Źródła ilustracji:

- [18] „*Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)*”;
http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/cre_index.cgi
- [19] www.msph.dps.mo.gov/MSHPWeb/Patrol.Divisions/CLD/DrugChemistry/pretesting.html

Pozostałe fotografie i rysunki – Regina Kasprzykowska

IX. Załączniki

1. Przygotowanie wybranych odczynników analitycznych

Odczynnik difenylkarbazonowy z chlorkiem rtęci(II) (do wykrywania barbituranów metodą TLC):

Roztwór (A): 2% roztwór chlorku rtęci(II) w etanolu

Roztwór (B): 0,2% roztwór difenylkarbazonu w etanolu.

Roztwory (A) i (B) zmieszać przed użyciem w równych ilościach. Po spryskaniu chromatogramów na fioletowym tle pojawiają się różowe plamy barbituranów.

Odczynnik 2,4-dinitrofenylohydrazynowy:

Rozpuścić 2 g 2,4-dinitrofenylohydrazyny w 15 ml stęż. kwasu siarkowego(VI), dodać 150 ml etanolu (95%), wymieszać, po czym dopełnić całość wodą destylowaną do objętości 500 ml i przesączyć.

Odczynnik Dragendorffa:

Roztwór (A): 850 mg zasadowego azotanu(V) bizmutowego(II) rozpuścić w 40 ml wody i w 10 ml 96 % kwasu octowego.

Roztwór (B): 8 g jodku potasowego rozpuścić w 20 ml wody.

Roztwory (A) i (B) zmieszać bezpośrednio przed użyciem w równych ilościach.

Odczynnik Ehrlicha:

Rozpuścić 0,1 g aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10 ml 10% kwasu solnego. Sporządzić na krótko przed użyciem.

Odczynnik Erdmanna:

10 kropli kwasu azotowego ($d = 1,25 \text{ g/ml}$) dodać do 20 ml stęż. kwasu siarkowego(VI).

Odczynnik Fehlinga:

Roztwór (A): rozpuścić 3,46 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ w wodzie i dopełnić roztwór do objętości 50 ml wodą;

Roztwór (B): rozpuścić 17,3 g winianu sodowo-potasowego i 5,0 g wodorotlenku sodowego w 40 ml wody, ogrzać do wrzenia, pozostawić do ochłodzenia, po czym uzupełnić wodą pozbawioną CO_2 do objętości 50 ml.

Zmieszać jednakowe objętości roztworów (A) i (B) tuż przed użyciem.

Odczynnik Fröhdego:

Sporządzić (na krótko przed użyciem) roztwór 0,1 g molibdenianu sodowego, Na_4MoO_4 lub 0,5 g molibdenianu amonowego, $(\text{NH}_4)_4\text{MoO}_4$, w 10 ml stęż. kwasu siarkowego.

Odczynnik izatynowy (do wykrywania aminokwasów metodą TLC):

0,5 g izatyny oraz 0,75 g octanu cynku rozpuścić w 50 ml izopropanolu przez ogrzewanie do ok. $80 \text{ }^\circ\text{C}$, po czym po ochłodzeniu dodać 0,5 ml kwasu octowego. Odczynnik przechowywać w lodówce.

Odczynnik z jodoplatynianem(IV) potasowym:

0,3% roztwór kwasu chloroplatynowego (H_2PtCl_6) zmieszać przed użyciem z 6% roztworem jodku potasowego w stosunku 1 : 1 (v/v). Chronić od światła.

Odczynnik Mandelina:

Rozpuścić 0,1 g dokładnie sproszkowanego wanadianu(V) amonowego ($\text{NH}_4\text{VO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) w 20 ml stęż. kwasu siarkowego(VI).

Odczynnik Marquisa:

2 krople formaliny (ok. 38% wodny roztwór formaldehydu) dodać do 4 ml stężonego kwasu siarkowego(VI). Sporządza się bezpośrednio przed użyciem.

Odczynnik Mayera:

1,35 g chlorku rtęciowego rozpuścić w 100 ml 5% roztworu jodku potasowego.

Odczynnik Millona:

1 g rtęci rozpuścić w 1 ml dymiącego HNO_3 , po czym rozcieńczyć za pomocą 2 ml wody.

Odczynnik ninhydrynowy:

0,2 g ninhydryny rozpuścić w 100 ml etanolu (95%). Przechowywać w ciemnej butelce.

Odczynnik Rosenthalera i Türka:

Rozpuścić 0,1 g arsenianu(V) potasowego w 10 g stęż. kwasu siarkowego(VI).

Odczynnik Schiffa:

Rozpuścić 0,5 g parafuksyny w 500 ml wody destylowanej. Osobno kolejne 500 ml wody destylowanej nasycić dwutlenkiem siarki. Oba tak otrzymane roztwory połączyć ze sobą, przesączyć, po czym pozostawić na ok. 12 godzin.

Odczynnik Sakaguchi (do wykrywania ugrupowań guanidynowych metodą TLC):

Roztwór (A): 0,1% roztwór 8-hydroksychinoliny w acetonie;

Roztwór (B): mieszanina 0,2 ml bromu i 0,5 M roztworu NaOH.

Chromatogramy spryskuje się najpierw roztworem (A), po czym po wysuszeniu roztworem (B). Powstają pomarańczowe lub czerwone plamy.

Odczynnik Sonnenscheina (kwas molibdenianofosforowy):

Rozpuścić 4 g kwasu molibdenianofosforowego ($12 \text{ MoO}_3, \text{H}_3\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$) w małej ilości wody, dopełnić wodą do 40 ml, ostrożnie dodać, oziębiając 60 ml kwasu siarkowego (96%).

Odczynnik toolidynowy:

Rozpuścić 0,16 g o-toluidyny w 30 ml lodowatego kwasu octowego, dodać 1 g jodku potasu i uzupełnić wodą do 500 ml.

Odczynnik Wagnera:

Roztwór 5%-owy jodu w 10% wodnym roztworze jodku potasowego.

Odczynnik Wasicky'ego:

Rozpuścić 2 g aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 3,3 ml stęż. kwasu siarkowego i ostrożnie dodać 0,4 ml wody. Odczynnik sporządza się krótko przed użyciem.

Roztwór czerwieni metylowej:

50 mg czerwieni metylowej rozpuścić w mieszaninie 1,86 ml 0,1 N NaOH i 50 ml etanolu (96%), po czym dopełnić wodą do 100 ml.

Roztwór fioletu krystalicznego:

Rozpuścić 0,5 g fioletu krystalicznego w bezw. kwasie octowym i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100 ml.

Roztwór jodu (0,05 M, mianowany):

Rozpuścić 12,7 g jodu i 20 g jodku potasu w wodzie i uzupełnić wodą do 1000 ml (kolba miarowa).

Oznaczanie miana: do 20,0 ml roztworu jodu dodać 1 ml 12% roztworu kwasu octowego i 30 ml wody, po czym tak otrzymany roztwór zmiareczkować 0,1 M roztworem tiosiarczanu sodu wobec roztworu skrobi jako wskaźnika.

Roztwór jodu (0,05 M) z jodkiem potasowym:

Do 10 ml 0,5 M wodnego roztworu jodu dodać 0,6 g jodku potasowego i uzupełnić wodą do 100 ml. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Roztwór kwasu 4-diazobenzenosulfonowego:

Około 0,2 g kwasu sulfanilowego rozpuścić w 10 ml wody, ochłodzić na łaźni lodowej i mieszając dodawać dodac powoli 1 ml 10% zimnego roztworu NaNO_2 . Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Roztwór kwasu chlorowego(VII) (0,1 M) w bezwodnym kwasie octowym:

Do kolby miarowej poj. 1000 ml, zawierającej 900 ml lodowatego kwasu octowego dodać 8,5 ml kwasu chlorowego(VII) (70-73%), wymieszać, po czym dodać 30 ml bezwodnika octowego. Całość uzupełnić do kreski za pomocą lodowatego kwasu octowego i po wymieszaniu pozostawić na 24 godziny.

Tak otrzymany roztwór służy do rozcieńczania za pomocą lodowatego kwasu octowego, o ile zajdzie potrzeba sporządzania roztworów o mniejszym stężeniu.

Roztwór kwasu fosforowolframowego:

Ogrzewać pod chłodnicą zwrotną 10 g wolframianu sodu z 8 ml kwasu fosforowego(V) i 75 ml wody. Po ochłodzeniu uzupełnić wodą do 100 ml.

Roztwór kwasu glioksalowego:

Do oziębionej mieszaniny 1 g pyłu magnezowego w wodzie dodać powoli 25 ml 8% kwasu szczawowego. Po odsączeniu osadu szczawianu magnezu, przesącz zakwasić 10 ml lodowatego kwasu octowego i dopełnić wodą do 100 ml.

Roztwór 2-naftolu (alkaliczny):

Rozpuścić 0,5 g 2-naftolu w 4 ml 8,5% roztworu NaOH i uzupełnić wodą do 10 ml. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Roztwór podbrominu sodu:

Do 10 ml 5% roztworu NaOH dodać kroplami 0,2 g bromu. Przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Roztwór octanu rtęci(II):

Rozpuścić 3,19 g octanu rtęci(II) w bezw. kwasie octowym i uzupełnić takim samym rozpuszczalnikiem do 100 ml.

Roztwór skrobi:

1 g skrobi rozpuszczalnej rozetrzeć z 5 ml zimnej wody, po czym mieszając wlać do 100 ml wrzącej wody. Roztwór używany do miareczkowań powinien być świeżo przygotowany.

Roztwór 2% tiocyjanianu kobaltu(II):

Metoda 1: Rozpuścić 1,0 g tiocyjanianu kobaltu(II) w 50 ml wody i 50 ml gliceryny.

Metoda 2: Rozpuścić 1,4 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i 0,9 g NH_4SCN w 100 ml wody i 100 ml gliceryny.

2. Formularze sprawozdań

2.1. Identyfikacja nieznanego leku prostego

Imię i nazwisko

data.....

SPRAWOZDANIE Z ANALIZY PRÓBKII NIEZNANEGO LEKU.....

(kod analizowanej próbki)

1. Wygląd analizowanej próbki.

a) Postać leku: tabletki, kapsułki, czopki, maść, płyn, proszek, inna (podać jaka).....

b) Zwięzły opis cech charakterystycznych:

2. Sposób przygotowania próbki do analizy (zwięzły opis w punktach):

3. Wynik analizy po stopieniu próbki z sodem (należy przedstawić wyniki wykrywania obecności azotu, siarki i fluorowców, określenia rodzaju fluorowców oraz stopnia ich ruchliwości – o ile zostały wykryte).

a)

Próba lub reakcja z:	Obserwacje	Wniosek
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

b) W badanej próbce wykryto obecność:

c) Przedmiotem analizy mogą być następujące leki (proszę wymienić nazwy komercyjne i przedstawić wzory strukturalne ich substancji czynnych):

Badana próbka może być jednym z następujących leków (*proszę wymienić ich nazwy*):

5. Równania przeprowadzonych reakcji, których wynik był pozytywny (*tzn. potwierdził tożsamość substancji czynnej badanego leku*)

• Reakcja z:

a) równanie zachodzącej reakcji:

b) obserwacje:

• Reakcja z:

a) równanie zachodzącej reakcji:

b) obserwacje:

• Reakcja z:

a) równanie zachodzącej reakcji:

b) obserwacje:

• Pozostałe reakcje (*równania dalszych reakcji, o ile było ich więcej, należy przedstawić na dodatkowej kartce*)

6. Rezultat analizy.

a) Badanym lekiem jest (*podać nazwę*):

.....

b) Nazwa systematyczna i wzór strukturalny substancji czynnej:

.....

7. Uwagi dotyczące analizy, podsumowanie, wnioski (*na osobnej kartce proszę przedstawić precyzyjnie tok rozumowania, który pozwolił wytypować lek będący przedmiotem analizy oraz uwzględnić w dyskusji wpływ ewentualnej obecności poszczególnych substancji pomocniczych, o ile są znane, na wyniki poszczególnych testów*).

2.2. Analiza znanego leku jednoskładnikowego

Imię i nazwisko.....

Data.....

SPRAWOZDANIE Z ANALIZY LEKU JEDNOSKŁADNIKOWEGO

Nazwa leku.....

Producent:.....

1. Postać leku: tabletki, kapsułki, czopki, maść, płyn, proszek.

2. Zawartość substancji czynnej (deklarowana przez producenta) w jednej porcji lekumg
w (np. tabletki, fiole, tubki, czopki, ml płynu itp.)

3. Średnia masa jednej porcji leku (np. tabletki) w gramach.....

4. Nazwa i wzór strukturalny substancji czynnej:

.....

5. Sposób przygotowania próbki do analizy (zwięzły opis w punktach):

6. Próby potwierdzające tożsamość leku.

• Reakcja z:
równanie zachodzącej reakcji:

obserwacje:

• Reakcja z:
równanie zachodzącej reakcji:

obserwacje:

• Reakcja z:
równanie zachodzącej reakcji:

obserwacje:

- Reakcja z:
równanie zachodzącej reakcji:

obserwacje:

- Reakcja z:
równanie zachodzącej reakcji:

obserwacje:

7. Oznaczenie zawartości substancji czynnej w leku.

a) Metoda oznaczania:

b) Na czym polega zasada oznaczenia?

c) Zwięzły opis procedury (w punktach):

d) Wyniki oznaczeń (bezpośrednio po wykonaniu ćwiczenia uzyskane wyniki zestawić w poniższej tabeli i przedstawić je prowadzącemu ćwiczenia do akceptacji)

Lp.	Masy tabletek (jednostkowych porcji leku)	Masy naważek	Zebrane wyniki (np. pomiarów absorbancji, miareczkowań itp.)	Inne

Podpis prowadzącego zajęcia:.....

e) Obliczenie zawartości substancji czynnej:

Wyniki:

- w badanej odważce (1)mg, (2).....mg, (3).....mg; średnia.....mg.
- średnia w jednostkowej średniej porcji leku: mg
- średnia zawartość %-owa w stosunku do ilości deklarowanej przez producenta: %

Dokładny sposób obliczenia (bez korzystania z gotowego wzoru zamieszczonego w opisie procedury, o ile prowadzący zajęcia nie zaleci inaczej)). W przypadku niewystarczającej ilości miejsca poniżej sposób obliczeń należy przedstawić na osobnej kartce):

średnia masa jednej porcji leku (np. tabletki):

8. Analiza TLC.

Typ złoża:

Układ rozwijający:

Sposoby detekcji:

a)

b)

Chromatogramy wraz z opisem:

<p>Miejsce na wklejenie chromatogramu</p>	<p>Miejsce na wklejenie chromatogramu</p>
---	---

9. Uwagi dotyczące przeprowadzonej analizy, podsumowanie, wnioski (przedstawić na osobnej kartce)

2.3. Reakcje charakterystyczne związków wybranej grupy

Imię i nazwisko:

Data:

„Reakcje charakterystyczne związków z grupy.....”

(Sprawozdanie z wykonania ćwiczenia)

I. Próbki będące przedmiotem analizy

Nazwa związku (1) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (2) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (3) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (4) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (5) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (6) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (7) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (8) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (9) i wzór strukturalny:

Nazwa związku (10) i wzór strukturalny:

II. Sposób wyodrębniania substancji czynnej z masy próbki, np. leku (jeżeli którykolwiek z analizowanych związków był przed analizą wyodrębniany z masy leku, w tym punkcie należy przedstawić zwięzły opis procedury, np. w punktach, wraz z uwzględnieniem dokładnych ilości próbki poddanej obróbce oraz wszystkich użytych odczynników, a także podaniem wydajności wyodrębnionej substancji czynnej).

III. Wyszczególnienie przeprowadzonych reakcji analitycznych (proszę tylko je wymienić, przypisując każdej z nich odpowiedni symbol literowy).

A -

B -

C -

D -

E -

F -

G -

H -

I -

J -

K -

L -

M -

IV. Równania reakcji dla prób pozytywnych (tam, gdzie to możliwe proszę zaproponować przebieg każdej reakcji, która dała pozytywną odpowiedź oraz jej najbardziej prawdopodobne produkty; równania reakcji przedstawić na osobnej kartce, którą należy dołączyć do niniejszego sprawozdania).

V. Wyniki (proszę zestawić obserwacje z przeprowadzonych prób analitycznych w poniższej tabeli).

Reakcja	Wynik reakcji (obserwacje) ze związkiem:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A										
B										
C										
D										
E										

W przypadku przeprowadzenia innych reakcji niż oznaczone symbolami A-E proszę powielić niniejszą niewypełnioną tabelę, a następnie kontynuować jej wypełnianie.

VI. Wnioski i uwagi (proszę przedstawić je na osobnej kartce, dołączonej do niniejszego sprawozdania).

2.4. Testy diagnostyczne związków wybranej grupy

Imię i nazwisko:

Data:

„Testy diagnostyczne związków z grupy.....”

(Sprawozdanie z wykonania ćwiczenia)

I. Próbki będące przedmiotem analizy

Nazwa próbki (1):

Postać próbki:

Wzór strukturalny i nazwa substancji czynnej:

Nazwa próbki (2):

Postać próbki:

Wzór strukturalny i nazwa substancji czynnej:

Nazwa próbki (3):

Postać próbki:

Wzór strukturalny i nazwa substancji czynnej:

Nazwa próbki (4):

Postać próbki:

Wzór strukturalny i nazwa substancji czynnej:

II. Sposób wyodrębniania substancji czynnej z masy próbki, np. leku (zwięzły opis procedury, np. w punktach, wraz z uwzględnieniem dokładnych ilości próbki poddanej obróbce oraz wszystkich użytych odczynników, a także podaniem wydajności wyodrębnionej substancji czynnej).

III. Wyszczególnienie przeprowadzonych reakcji analitycznych (proszę tylko je wymienić, przypisując każdej z nich odpowiedni symbol literowy).

A -

B -

C -

D -

E -

F -

G -

H -

I -

J -

K -

L -

IV. Równania reakcji dla prób pozytywnych (tam, gdzie to możliwe proszę zaproponować przebieg każdej reakcji, która dała pozytywną odpowiedź oraz jej najbardziej prawdopodobne produkty; równania reakcji przedstawić na osobnej kartce, którą należy dołączyć do niniejszego sprawozdania).

V. **Wyniki** (proszę zestawić obserwacje z przeprowadzonych prób analitycznych w poniższej tabeli).

Reakcja	Obserwacje			
	Substancja (1)	Substancja (2)	Substancja (3)	Substancja (4)
	A			
	B			
	C			

Obserwacje	Substancja (4)			
	Substancja (3)			
	Substancja (2)			
	Substancja (1)			
Rak- cja				

W przypadku przeprowadzenia większej ilości reakcji proszę powielić niniejszą pustą tabelę, a następnie wypełnić ją kolejnymi informacjami.

VI. Dyskusja wyników. Poniżej (na dołączonej osobnej kartce) należy dokonać oceny przeprowadzonych testów pod kątem ich przydatności do identyfikacji i odróżniania każdego z badanych związków wobec pozostałych. Na koniec należy zaproponować (o ile to będzie możliwe) podstawowy zestaw reakcji diagnostycznych (tj. tożsamościowych), który powinien być wystarczający do identyfikacji poszczególnych substancji względem pozostałych. Przedstawić propozycję schematu analizy (w formie graficznej – wzór patrz rozdz. IV.2.9.4.) pozwalającej na jednoznaczną identyfikację każdego związku z badanego zestawu.

2.5. Identyfikacja związków wybranej grupy

Imię i nazwisko:

Data:

„Identyfikacja związków z grupy.....”

(Sprawozdanie z wykonania ćwiczenia)

I. Oznaczenia próbek będących przedmiotem analizy (proszę podać symbole próbek, które należy zidentyfikować oraz nazwy i struktury substancji wzorcowych, o ile były stosowane).

Identyfikowana próbka (1):

Identyfikowana próbka (2):

Identyfikowana próbka (3):

Identyfikowana próbka (4):

Wzorzec (1):

Wzorzec (6):

Wzorzec (2):

Wzorzec (7):

Wzorzec (3):

Wzorzec (8):

Wzorzec (4):

Wzorzec (9):

Wzorzec (5):

Wzorzec (10):

II. Plan analizy (Proszę zaproponować graficzny schemat postępowania, które doprowadzi do zidentyfikowania i ustalenia struktury analizowanych związków. Wzór takiego schematu można znaleźć w rozdz. IV.2..9.3.).

III. Reakcje charakterystyczne, wspólne dla wszystkich związków z badanej grupy (proszę wymienić najważniejsze z nich oraz tam, gdzie to możliwe przedstawić równania zachodzących przemian).

A –

B –

C –

D –

E –

F –

IV. Reakcje specyficzne dla zastosowanych wzorców (proszę wymienić najważniejsze z nich oraz tam, gdzie to możliwe przedstawić równania zachodzących przemian).

A –

B –

C –

D –

E –

F -

V. Wyniki reakcji wspólnych (proszę zestawić obserwacje z przeprowadzonych prób analitycznych w poniższej tabeli).

Reakcja	Wynik reakcji (obserwacje) z próbką / wzorcem:													
	Pr. (1)	Pr. (2)	Pr. (3)	Pr. (4)	Wz. (1)	Wz. (2)	Wz. (3)	Wz. (4)	Wz. (5)	Wz. (6)	Wz. (7)	Wz. (8)	Wz. (9)	Wz. (10)
III.A														
III.B														
III.C														
III.D														
III.E														
III.F														

W przypadku przeprowadzenia innych reakcji niż oznaczone symbolami III.A-F proszę powielić niniejszą niewypełnioną tabelę, a następnie kontynuować jej wypełnianie.

Wnioski:

VI. Wyniki reakcji specyficznych (proszę zestawić obserwacje z przeprowadzonych prób analitycznych w poniższej tabeli).

Reakcja	Wynik reakcji (obserwacje) z próbką / wzorcem:													
	Pr. (1)	Pr. (2)	Pr. (3)	Pr. (4)	Wz. (1)	Wz. (2)	Wz. (3)	Wz. (4)	Wz. (5)	Wz. (6)	Wz. (7)	Wz. (8)	Wz. (9)	Wz. (10)
IV.A														
IV.B														
IV.C														
IV.D														
IV.E														
IV.F														

W przypadku przeprowadzenia innych reakcji niż oznaczone symbolami A-F proszę powielić niniejszą niewypełnioną tabelę, a następnie kontynuować jej wypełnianie.

Wnioski:

VII. Wyniki analizy chromatograficznej TLC (proszę tu wkleić wykonane chromatogramy lub ich zeskanowane/sfotografowane obrazy oraz dokładnie je opisać)

Wnioski:

VIII. Analiza spektralna identyfikowanych związków (proszę zwięźle zinterpretować widma spektroskopowe badanych związków, o ile zostały zarejestrowane; widma dołączyć do niniejszego sprawozdania).

IX. Wnioski, uwagi (proszę przedstawić je na osobnej kartce, dołączonej do niniejszego sprawozdania).

3. Zestawienie danych do identyfikacji substancji czynnej w nieznanym leku (Ćwiczenie 1)

Zawartość niżej przedstawionej Tabeli 7 ma charakter przykładowy. Prowadzący zajęcia powinien przed ćwiczeniami indywidualnie ją zaktualizować, proponując własny zestaw dostępnych leków, jaki będzie przedmiotem analiz dla danej grupy studentów. Liczba leków powinna zawierać się w przedziale 16-30. Wskazany jest, aby w zaproponowanym zestawie znalazło się kilka grup substancji czynnych, zróżnicowanych pod względem jakościowego składu pierwiastkowego.

Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Tabela 7. Zestawienie leków do identyfikacji (Ćwiczenie 1)

(Uwaga: Przed przystąpieniem do przeprowadzania analizy leku należy wypełnić kolumny zatytułowane „Obecne pierwiastki / gr. funkcyjne (reakcje grupowe)”. W tym celu, dla każdego ze związków należy oznaczyć (np. krzyżykiem) te pola, które odpowiadają spodziewanym pozytywnym wynikom poszczególnych testów. W kolumnie 7 należy podać pierwiastki, jakich wykrycia można się spodziewać po stopieniu próbki z sodem.)

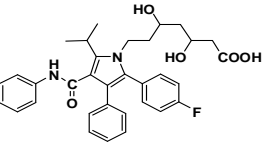
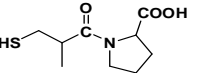
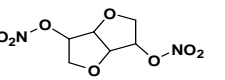
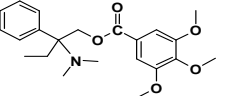
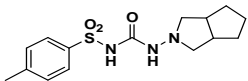
Lp.	Nazwa leku	Substancja czynna	Struktura	Rozpuszczalniki subst. czynnej	Ważniejsze substancje pomocnicze (mogące mieć wpływ na przebieg niektórych prób)	Obecne pierwiastki / gr. funkcyjne (reakcje grupowe)													Propozycje dodatkowych testów (potwierdzających tożsamość wykrytej substancji czynnej)
						Pierw.: N, S, chlorowce (r-cje po stapianiu z Na)	Ester (NH ₂ OH, FeCl ₃)	Eter alkilowo-arylowy (stęż. H ₂ SO ₄ + FeCl ₃ , ogrzew.)	Uretan, mocznik (fenylohydrazyna + Ni ²⁺)	Fenol, enol (FeCl ₃)	I-rz. amina aromatyczna (diazowanie + sprzęganie z fenolami)	Układ arom.zaktyw. na S _N (odcz. Ehrlicha lub furfural w kw. octowym)	Gr. sulfonamidowa (stap. z Na ₂ CO ₃ i wykryw. jonów siarczanowych)	Beta-laktam (1. hydrol. rozc.HCl i identyfik. aldehydów i aminokw., 2. stęż. H ₂ SO ₄ + kondens. z fenolami, 3. NH ₂ OH + FeCl ₃)	Aminokwas (1. ninhydryna, 2. roztwór	Keton, enol (2,4-dinitrofenylohydrazyna)	Gr. aminowa I-rz., III-rz., (odcz. Dragendorffa lub inne r-cje strąceniowe)	Czynny cmorowiec (AgNO ₃ + rozpuszczanie osadu w stęż.NH ₃)	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Atoris	Atorwastatyna		DMSO	brak danych														1) Hydroliza w 25% HCl (5 min., temp. wrzenia); 2) wykrywanie gr.NH ₂ aromat.
2	Captopril	Kaptopril		woda, etanol chloroform	brak danych														Wykryw. gr.-SH (r-cja z nitroprusydkiem sodu / NH ₃)
3	Cardonit prolongatum	Dwuzotan izosorbitu		aceton, etanol, eter etylowy	brak danych														Difenyloamina w H ₂ SO ₄ = niebieskie zabarwienie
4	Debridat	Maleinian trimebutyny		gorąca woda, etanol	laktoza														
5	Diabezidium, Gliclazide, Diaprel	Gliclazidium		gorący etanol	laktoza														R-cje na obecność sulfonamidów

Tabela 7. (c.d.)

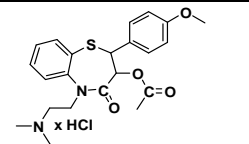
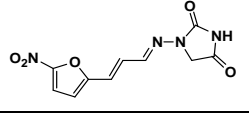
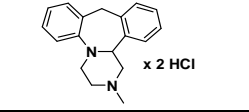
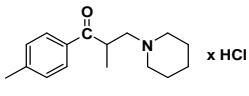
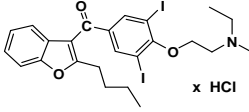
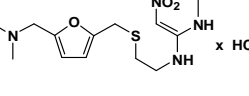
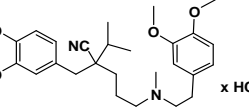
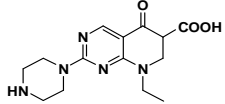
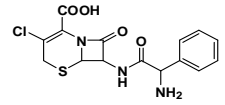
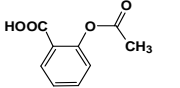
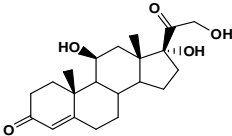
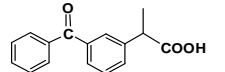
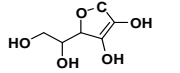
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
6	Dilzem, Oxicardi, Olicard	Chlorowodorek dilitazemu		woda, metanol, chloroform	laktoza, kwas stearynowy															
7	Furaginum	Furagina		aceton, etanol (95%)	brak danych															Do roztworu w DMF dodać 1 kr. KOH / EtOH = pomarańczowe zabarwienie (forma "aci")
8	Lerivon	Chlorowodor ek mianseryny		gorąca woda	brak danych															
9	Mydocalm	Chlorowodor ek tolperisonu		gorący aceton, gorąca woda	laktoza															
10	Opacorden	Chlorowodore k arniodaronu		chloroform, metanol	brak danych															Wykrywanie jodu
11	Ranigast	Chlorowodo rek ranitydyny		woda, kwas octowy																Wykrywanie gr. -NO ₂
12	Staveran	Chlorowodorek werapamilu		metanol	brak danych															

Tabela 7. (c.d.)

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
13	Urolin	Kwas pipemidowy		kwasy solne	brak danych														Wykryw. alif.amin 2 rz.: rozpuścić w H ₂ O, dodać 1 ml aldehydu octowego, NaHCO ₃ , 2 kr. 1% nitroprusydku sodu = niebieskie zabarw.	
14	Vercef	Cefaklor		woda	benzoesan sodu, kwas cytrynowy,															R-cje na obecność beta-laktamów i aminokwasów, 2 mg bad. subst. + 0,25 ml AcOH + 0,1 ml CuSO ₄ (10%) + 0,05 ml NaOH (8%) = jasnozielone zabarwienie
15	Aspirin	Kwas acetylosalicylowy		etanol	brak danych															
16	Hydrocortisonum	Hydrokortizon		etanol	brak danych															Reakcje charakt. dla steroidów (m.in. stęż. H ₂ SO ₄ + badanie fluorescencji)
17	AP0-keto	Ketoprofen, Kwas 2-(3-benzoylofenyl)propionowy		eter etylowy, etanol, aceton, chloroform	brak danych															Badanie pH, reakcja z roztw. NaHCO ₃
18	Vitaminum C	Kwas askorbowy		woda, etanol	brak danych															Wykryw. wł. redukujących, badanie pH



X. Skorowidz

- 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen, **49, 53, 156**
- 2,4-Dinitrofenylohydrazyna, **132, 157**
- 2-Naftol, **51, 74, 81, 84, 85, 95, 132, 153**
- 4-Acetyloaminofenol
 - utlenianie, **90**
- 4-Nitrobenzenodiazoniowa sól, **89, 157**
- Acetyloaceton, **40**
- Acetylu chlorek, **65**
- Aldehyd
 - 4-dimetyloaminobenzoesowy, **30, 40, 48, 78, 150**
 - 4-nitrobenzoesowy, **108, 157**
 - anyżowy, **73**
 - benzoesowy, **48**
 - mrówkowy, **30, 74**
 - o-ftalowy, **111**
- Aldehydy aromatyczne, **149**
- Alkaloidy
 - metodyka analizy, **28**
 - odczynniki strącające, **29**
 - podział i struktura chemiczna, **25**
 - reakcje barwne, charakterystyka, **30**
 - reakcje barwne, wykonanie, **31**
 - reakcje strąceniowe, charakterystyka, **29**
 - reakcje strąceniowe, wykonanie, **30**
 - rozpuszczalność, **26**
- Aminofenazon, **44**
 - analiza spektralna, **46**
 - reakcje charakterystyczne, **44**
 - właściwości fizyczne, **44**
 - właściwości redukujące, **44**
- Aminokwasy
 - identyfikacja, **114**
 - reakcje ogólne, **104**
- Amoksycylina
 - oznaczenie ilościowe w leku, **140**
 - reakcje charakterystyczne, **139**
 - właściwości fizyczne, **139**
- Amotaks
 - analiza TLC, **141**
 - działanie i zastosowanie, **139**
 - monografia leku, **139**
- Analiza
 - kroplowa, **30**
- Analiza wstępna, **9**
 - badania rozpuszczalności, **10**

- próby płomieniowe, **9**
- próby spalania, **9**
- rozpoznawanie fluorowca, **15**
- stapianie z sodem, **13**
- wykrywanie azotu, **14**
- wykrywanie fluorowców, **14**
- wykrywanie pierwiastków, **13**
- wykrywanie siarki, **14**
- Anilina
 - pochodne, **79**
- Antymonu(III) chlorek, **66, 116, 117**
- APAP
 - analiza TLC, **138**
 - działanie i zastosowanie, **137**
 - monografia leku, **137**
- Arginina
 - wykrywanie, **110**
- Arsenian(V) potasowy. *Patrz* Odczynnik Rosenthalera i Türka
- Barbital
 - analiza spektralna, **142**
 - oznaczenie ilościowe w leku, **143**
 - właściwości fizyczne, **141**
- Barbiturany, **95**
 - reakcje charakterystyczne, **96**
 - reakcje rozróżniające, **98**
 - rozkład, **96, 98**
 - rozpuszczalność, **96**
 - sole rtęci(II), **98**
 - sole srebrne, **98**
 - struktura, **95**
 - tworzenie soli, **97**
 - układy nienasycone, bromowanie, **99**
 - układy nienasycone, utlenianie, **99**
- Benzoilu nadtlenek, **155**
- Benzokaina
 - analiza, **80**
 - analiza spektralna, **82**
 - właściwości fizykochemiczne, **80**
- Benzolu nadtlenek, **65**
- Bezwodnik
 - octowy, **43, 65, 116, 155**
- Bezwodnik octowy. *Patrz* Próba koralinowa
- Błękit pruski, **14, 45**
- Cardiamidum
 - analiza TLC, **128**
 - działanie i zastosowanie leku, **127**
 - monografia leku, **127**
 - oznaczanie ilościowe, **128**
- Chinidyna, **33**
- Chinina, **42**
 - odróżnianie od chinidyny, **34**

reakcja specyficzna, **34**

Chininum hydrochloricum
analiza TLC, **123**
działanie i zastosowanie leku, **121**
monografia leku, **121**

Chininy chlorowodorek, **33**
analiza spektralna, **35**
opis struktury, **33**
oznaczanie ilościowe, **121**
reakcje charakterystyczne, **34**
właściwości fizyczne, **33**

Chlorkowe jony
wykrywanie, **126**

Chlorochinaldol
reakcje charakterystyczne, **47**
właściwości fizyczne, **47**

Chromu pięciotlenek, **42, 56**

Cynku chlorek, **65, 79**

Cyny(IV) chlorek, **66**

Cysteina
wykrywanie, **106**

Czynność fluorowca, **16**

Descipher Barbitolum
analiza TLC, **143**
działanie i zastosowanie, **142**
monografia leku, **141**

Dromostanolon, **152**

Drotaweryny chlorowodorek
analiza spektrofotometryczna, **126**
oznaczanie ilościowe w leku, **126**
reakcje charakterystyczne, **125**
struktura, **125**
właściwości fizyczne, **125**

Efedryny chlorowodorek
analiza spektralna, **38**
odróżnianie od efetoniny, **38**
opis struktury, **36**
oznaczanie ilościowe, **123**
reakcje charakterystyczne, **36**
utlenianie, **37**
właściwości fizyczne, **36**

Ephedrinum hydrochloricum
analiza TLC, **124**
działanie i zastosowanie leku, **123**
monografia leku, **123**

Etenzamid, **82**
analiza spektralna, **83**
reakcje charakterystyczne, **83**
właściwości fizyczne, **82**

Etery
alkilowo-arylowe, rozszczepianie, **154**

Fenol, **45, 58**
Fenole, **155**
 kondensacje, **155**
Fluoresceina, **15**
Fluorescencja, **31, 119**
Formaldehyd, **155**
Furfural, **65, 74, 81, 84, 86, 151, 155**
Galospa
 analiza TLC, **127**
 działanie i zastosowanie leku, **125**
 monografia leku, **125**
Glicyna
 wykrywanie, **111**
Glukoza, **31, 79**
Grupy rozpuszczalności, **10**
Heksacyjanożelazian(III) potasu, **37, 42, 45, 58, 118, 155**
Histydyna
 reakcja specyficzna, **109**
 wykrywanie, **109**
Hydrocortisonum
 analiza TLC, **133**
 działanie i zastosowanie leku, **131**
 monografia leku, **131**
Hydrokortyzon
 oznaczenie ilościowe, **132**
 reakcje charakterystyczne, **131**
 właściwości fizyczne, **131**
Hydroksyloaminy chlorowodorek, **95**
Indol, **107**
Izoniazyd, **156**
 analiza spektralna, **49**
 reakcje charakterystyczne, **48**
 rozkład, **49**
 utlenianie, **48**
 właściwości fizyczne, **48**
Jod, **45**
Jod w roztworze jodku potasowego, **40**
Jodobizmutan(III) potasowy. *Patrz* Odczynnik Dragendorffa
Jodoplatynian potasowy, **50**
Jodortęcian potasowy. *Patrz* Odczynnik Mayera
Jodu roztwór
 reakcja z, **120**
Kobaltu(II) azotan, **71**
Kobaltu(II) chlorek, **43**
Kobaltu(II) tiocyjanian, **42**
Kofeina, **39, 42**
 analiza spektralna, **41**
 reakcja specyficzna, **40**
 reakcje charakterystyczne, **39**
 reakcje strąceniowe, **40**
 utlenianie, **39**

właściwości fizyczne, **39**

Kokaina, 42

Kwas

- 4-aminobenzoowy, **84**
- 4-aminosalicylowy, **85**
- 4-diazobenzenosulfonowy, **78, 93, 160**
- acetylosalicylowy, **87**
- askorbowy, **144**
- azotowy (III), **104**
- azotowy(V), roztwór w kwasie siarkowym(VI). *Patrz* Odczynnik Erdmanna
- chloroplatynowy, **30, 157**
- fosforowolframowy, **106**
- glioksalowy, **107**
- hydroksamowy, reakcja z jonami żelaza(III), **81**
- izonikotynowy, **49**
- jodoplatynowy, **157**
- molibdenianofosforowy. *Patrz* Odczynnik Sonnenscheina
- nikotynowy, hydrazyd, **132**
- pikrynowy, **29, 51, 118, 157**
- salicylowy, **88**
- salicylowy, pochodne, **79**
- siarkowy(VI), stężony, **31, 33, 64, 78, 99, 119, 131, 153**
- wolframianofosforowy. *Patrz* Odczynnik Scheiblera

Kwas 4-aminobenzoowy

- analiza spektralna, **84**
- reakcje charakterystyczne, **84**
- właściwości fizyczne, **84**

Kwas 4-aminosalicylowy

- analiza spektralna, **86**
- reakcje charakterystyczne, **85**
- właściwości fizyczne, **85**
- wyodrębnianie, **85**

Kwas acetylosalicylowy

- analiza spektralna, **87**
- reakcje charakterystyczne, **87**
- właściwości fizyczne, **87**

Kwas askorbowy

- analiza spektralna, **144**
- oznaczenie ilościowe w leku, **145**
- właściwości fizyczne, **144**

Kwas salicylowy

- analiza spektralna, **89**
- reakcje charakterystyczne, **88**
- właściwości fizyczne, **88**

Kwas siarkowy

- stężony, mechanizmy działania, **153**

Leki nieznane

- analiza, **146**

Lidokaina, 43

Manganian(VII) potasu, 46, 56, 120

Metionina

wykrywanie, **107**

Metoda
Volharda, **24**

Metronidazol
analiza spektralna, **51**
oznaczanie ilościowe, **129**
reakcje charakterystyczne, **50**
właściwości fizyczne, **50**
wyodrębnianie, **51**

Metronidazol Polpharma
analiza TLC, **129**
działanie i zastosowanie leku, **128**
monografia leku, **128**

Miedzi (II) octan, **49**

Miedzi(II) siarczan, **36, 47, 53, 71, 105**

Morfina
reakcja z odczynnikiem Marquisa, **148**

N,N-Dimetylo-p-fenylenodiamina, **107**

Niketamid
analiza spektralna, **54**
hydroliza, **53**
reakcje charakterystyczne, **52**
właściwości fizyczne, **52**
związek kompleksowy, **53**

Ninhydrina, **37, 101, 104, 139**

Nitrofurantoina, **156**

Nitroprusydek sodu, **14, 31, 107, 120**

Odczynnik
2,4-dinitrofenylohydrazynowy, przygotowanie, **177**
difenylokarbazonowy z chlorkiem rtęci, przygotowanie, **177**
Dragendorffa, **29, 34, 46, 49, 50, 52, 55, 59, 79, 126, 157**
Dragendorffa, przygotowanie, **177**
Ehrlicha, **48, 72, 73, 81, 84, 86, 91, 108, 149**
Ehrlicha, przygotowanie, **177**
Erdmanna, **30**
Erdmanna, przygotowanie, **177**
Fehlinga, **48, 120, 139**
Fehlinga, przygotowanie, **177**
Fröhdego, **30**
Fröhdego, przygotowanie, **177**
izatynowy, przygotowanie, **177**
Mandelina, **30, 89**
Mandelina, przygotowanie, **178**
Marquisa, **30, 32, 65, 89, 148**
Marquisa, przygotowanie, **178**
Mayera, **29, 50, 53, 59, 79, 157**
Mayera, przygotowanie, **178**
Millona, **59, 89, 100, 110, 159**
Millona, przygotowanie, **178**
ninhydrinowy, przygotowanie, **178**
Pauliego, **160**

Rosenthalera i Türka, **30**
Rosenthalera i Türka, przygotowanie, **178**
Sakaguchi, przygotowanie, **178**
Scheiblera, **29, 157**
Schiffa, **59**
Schiffa, przygotowanie, **178**
Sonnenscheina, **29, 157**
Sonnenscheina, przygotowanie, **178**
tolidynowy, przygotowanie, **178**
Tollensa, **48**
Wagnera, **29, 75, 157**
Wagnera, przygotowanie, **178**
Wasicky'ego, przygotowanie, **178**
Wasicky'ego, **30, 32, 78, 150**
z jodoplatynianem (IV) potasowym, przygotowanie, **177**
Ołowiu(II) octan, **14, 102, 106, 118**
Ołowiu(IV) tlenek, **31**
Oznaczenia
acydymetryczne w środowisku niewodnym, **124, 127**
alkacymetryczne, **19**
alkacymetryczne w środowisku niewodnym, **19**
alkacymetryczne w środowisku wodnym, **19**
argentometryczne, **23, 124**
bromianometryczne, **22, 122, 133**
jodometryczne, **23, 130, 140, 145**
kolorymetryczne, **18, 135**
redoksymetryczne, **21, 145**
spektrofotometryczne, **17, 121, 126, 128, 129, 132, 135, 136, 138**
strąceniowe, **23**
Papaweryna, **43**
Paracetamol, **90**
analiza spektralna, **91**
oznaczenie ilościowe w leku, **138**
reakcje charakterystyczne, **90**
właściwości fizyczne, **90**
Peptydy, **100**
analiza TLC hydrolizatów, **103**
hydroliza, **103**
identyfikacja, **111**
reakcje ogólne, **100**
Pilocarpina, **42**
Pochodne
aniliny, reakcje charakterystyczne, **80**
azoksybenzenu, **98**
chinoliny, **26, 32**
imidazolu, **26, 31**
indolu, **26**
izochinoliny, **26, 31**
kwasu salicylowego, reakcje charakterystyczne, **80**
morfinanu, **26**
morfinanu, rozszczepianie mostków tlenowych, **154**

nitrowe, metody syntezy, **155**
N-metylowe barbituranów, wykrywanie, **99**
penicylin, reakcje charakterystyczne, **94**
piperydiny, **26**
pirolu, **26**
pirydiny, **26**
puryny, **26, 32**
steroidów, **26**
tropanu, **26**
β -laktamowe, opis struktury, **93**

Propyfenazon
analiza spektralna, **56**
reakcje charakterystyczne, **55**
utlenianie, **56**
właściwości fizyczne, **55**
właściwości zasadowe, **55**
związek kompleksowy z pięciotlenkiem chromu, **56**

Próba
Beilsteina. *Patrz* Próby płomieniowe
Chellego, **104**
cyrkonowo-alizarynowa, **15**
eozynowa, **15**
koralinowa, **32, 43**
Lassaigne'a. *Patrz* Analiza wstępna: wykrywanie azotu
Liebermanna-Burcharda, **155**
ligninowa, **68, 74, 151**
Mörnera, **110**
rezorufinowa, **86**
Salkowskiego, **64, 155**

Przygotowanie próbek
ogólnie, **25**

Pyralgina
analiza spektralna, **60**
analiza TLC, **131**
działanie i zastosowanie, **130**
hydroliza, **59**
monografia leku, **129**
oznaczanie ilościowe, **130**
reakcje charakterystyczne, **57**
utlenianie, **58**
właściwości fizyczne, **57**
właściwości zasadowe, **58**

Reakcja
Adamkiewicza-Hopkinsa, **107**
biuretowa, **101, 109**
bromowania, **75, 93**
diazowania i sprzęgania, **51, 74, 81, 84, 85, 91, 109, 110**
Emersona, **45, 58, 155**
Erdmanna, **126**
erytrochinowa, **33**
hydrolizy alkalicznej, **87, 92, 133**

hydrolizy kwasowej, **59, 90, 92, 103**
jodoformowa, **37, 53, 81**
ksantoproteinowa, **102**
Liebermanna-Burcharda, **65**
mureksydowa, **32, 40**
nitrowania, **102, 117**
nitrowania, **75**
nitrozowania, **109**
Parri, **97, 98**
Pauliego, **109, 110**
równowagi keto-enolowej, **152**
Sakaguchi, **110**
talejochinowa, **32, 35**
utleniania 4-aminofenolu, **90**
Vitaliego, **30, 31, 36, 69, 75, 156**
Voiseneta, **108**
z fenolami, **104, 153**
Zwikkera, **97, 98**

Reakcja specyficzna
chinina, **42**
kofeina, **42**
kokaina, **42**
lidokaina, **43**
papaweryna, **43**
pilokarpina, **42**

Reakcje
strąceniowe, **157**
utleniania, **37**

Rezorcyna, **74, 95, 99**

Rozpuszczalniki
rodzaje, **20**

Roztwór
2-naftolu (alkaliczny), przygotowanie, **179**
białka kurzego, przygotowanie, **100**
czerwieni metylowej, przygotowanie, **178**
fioletu krystalicznego, przygotowanie, **179**
jodu mianowany, przygotowanie, **179**
jodu z jodkiem potasowym, **75**
jodu z jodkiem potasowym, przygotowanie, **179**
kwasu 4-diazobenzenosulfonowego, przygotowanie, **179**
kwasu chlorowego(VII) w kwasie octowym bezw., przygotowanie, **179**
kwasu fosforowolframowego, przygotowanie, **179**
kwasu glioksalowego, przygotowanie, **179**
octanu rtęci(II), przygotowanie, **179**
podbrominu sodu, przygotowanie, **179**
skrobi, przygotowanie, **180**
tiocyanianu kobaltu(II), przygotowanie, **180**

Rtęci
sole, **119**
Rtęci(II) azotan(V), **99**
Rtęci(II) chlorek, **40, 98, 118**

Ryboflawina. *Patrz* Witamina B2
Sacharoza, **117**
Salicylamid, **92**
 analiza spektralna, **93**
 oznaczenie ilościowe w leku, **136**
 reakcje charakterystyczne, **92**
 właściwości fizyczne, **92**
Sodu azotan(III), **58, 89, 98**
Srebra azotan(V), **14, 45, 58, 98, 119, 120**
Srebra azotan(V)/b, **16**
Stapianie z sodem, **13**
Steroidy
 reakcje charakterystyczne, **61**
 struktura, **60**
 testy analityczne, **64**
 wyodrębnianie z masy leku, **63**
Sulfaguanidyna, **133**
 oznaczenie ilościowe w leku, **133**
 reakcje charakterystyczne, **133**
 właściwości fizyczne, **133**
Sulfonamidy
 budowa, **66**
 reakcje charakterystyczne, **66**
 reakcje wspólne, **66**
 rozróżnianie, **67**
 tworzenie stopów, **72**
 właściwości kwasowo-zasadowe, **66**
 wyodrębnianie, **70**
Sulgin
 działanie i zastosowanie, **133**
 monografia leku, **133**
Testosteron, **153**
Tetracyclinum
 analiza TLC, **136**
 działanie i zastosowanie, **134**
 monografia leku, **134**
Tetracykliny
 właściwości kwasowo-zasadowe, **76**
 reakcje charakterystyczne, **76**
 struktura, **75**
 wyodrębnianie, **77**
Tetracykliny chlorowodorek
 oznaczenie ilościowe w leku, **135**
 właściwości fizyczne, **134**
Tiaminy chlorowodorek. *Patrz* Witamina B1
Tlenek wapnia, **87**
Tryptofan
 wykrywanie, **107**
Tyrozyna
 wykrywanie, **109**
Urtosal

- analiza TLC, **137**
- działanie i zastosowanie, **136**
- monografia leku, **136**
- Vitaminum C
 - działanie i zastosowanie, **144**
 - monografia leku, **144**
- Wanadan(V) amonu, **89**, *Patrz* Odczynnik Mandelina
- Wanilina, **108**
- Witamina A
 - charakterystyka, **115**
 - wykrywanie, **116**
- Witamina B1
 - charakterystyka, **117**
 - wykrywanie, **118**
- Witamina B2
 - charakterystyka, **118**
 - wykrywanie, **119**
- Witamina C
 - charakterystyka, **119**
 - wykrywanie, **120**
- Witamina E
 - charakterystyka, **117**
 - wykrywanie, **117**
- Witaminy, **115**
- Witaminy B
 - charakterystyka, **117**
- Witaminy D
 - charakterystyka, **116**
 - wykrywanie, **116**
- Woda bromowa, **108**
- Woda chlorowa, **15, 108, 109**
- Woda utleniona, **40**
- Wodorotlenek sodu, **78, 83**
- Wskaźniki
 - oksydacyjno-redukcyjne, **22**
 - specyficzne, **22**
- Wykrywanie
 - bromu, **15**
 - chloru, **15, 47**
 - cysteiny, **102**
 - cystyny, **102**
 - fluorowców, **14**
 - fluoru. *Patrz* Próba cyrkonowo-alizarynowa grupy nitrowej, **51**
 - jodu, **15**
 - ugrupowania sulfonowego, **72**
- Zasady heterocykliczne
 - trudnorozpuszczalne sole, **157**
- Żelaza(II) siarczan(VI), **14**
- Żelaza(III)
 - jony, reakcje barwne, **158**

jony, związki kompleksowe, **159, 160**
Żelaza(III) chlorek, **31, 44, 45, 47, 55, 58, 78, 83, 85, 87, 88, 90, 92, 105, 106, 117, 125**
 α, α' -Dipirydył, **117**