

grupa:

1. Sprawdzenie wiedzy i przygotowania do ćwiczeń przez prowadzących.

2. Analiza organoleptyczna substancji roślinnych:

Betulae folium, Arnicae flos, Crataegi folium cum flore, Helichrysi flos, Sambuci flos, Tiliae flos, Equiseti herba, Hyperici herba, Polygoni avicularis herba, Viola herba cum flore, Ononidis radix, Meliloti herba

Analiza organoleptyczna służy ocenie *morfologii/anatomii* (wybierz) substancji roślinnych.

3. Analiza mikroskopowa proszków roślinnych:

Preparaty mikroskopowe należy wykonać na gorąco w odczynniku prześwietlającym. Korzystając z rycin, rozróżniać cechy grupowe i charakterystyczne poszczególnych proszków (rysować tylko charakterystyczne). Kończąc pracę z preparatem, wykonać reakcję ogólną na obecność fenoli (z r-em FeCl₃), a obserwacje zanotować.

Analiza mikroskopowa służy ocenie *morfologii/anatomii* (wybierz) substancji roślinnych.

..... – kwiat arniki/kupalnika (FP XII)

roślina (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

Helichrysi inflorescentia –

roślina (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

Sambuci flos –

rośliny (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

III – FLAWONOIDY , KUMARYNY , FURANOCHROMONY

student:

grupa:

Equiseti herba –
roślina (łac./pl.): *Equisetum arvense* –
rodzina (łac./pl.):

Hyperici herba –
roślina (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

..... – ziele rdestu ptasiego (FP XII)
roślina (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

..... – ziele nostrzyka (FP XII)
rośliny (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

grupa:

4. Oznaczanie zawartości flawonoidów w *Betulae folium*, *Equiseti herba*, *Polygoni avicularis herba*, *Sambuci flos*, *Solidaginis herba*, *Solidaginis virgaureae herba* wg zmodyfikowanej metody FPXII

Sporządzenie ekstraktu. Umieścić zalecaną naważkę* sproszkowanej substancji roślinnej w zakręcanej probówce, dodać 15,0 ml 70% MeOH i wymieszać za pomocą wytrząsarki. Ekstrahować 15 min w płuczce ultradźwiękowej. Ponownie wymieszać i odwirować (3 min) część roztworu w probówce typu Eppendorf.

Oдноśnik. W kuwecie plastikowej umieścić 100 µL supernatantu pobranego z nad osadu za pomocą pipety automatycznej, a następnie dodać pipetą szklaną 2,0 mL roztworu lodowatego kwasu octowego (5% V/V) w metanolu.

Roztwór badany. W kuwecie plastikowej umieścić 100 µL supernatantu pobranego z nad osadu za pomocą pipety automatycznej, a następnie dodać pipetą szklaną 2,0 mL 2% roztworu chlorku glinu w roztworze lodowatego kwasu octowego (5% V/V) w metanolu.

Oznaczenie. Po około 30 min. zmierzyć absorbancję roztworu badanego przy 425 nm wobec odnośnika. Sprawdzić jak zmienia się absorbancja próbki mierzona po kilku minutach od pierwszego pomiaru

Obliczyć procentową zawartość O-glikozydów flawonoidowych w przeliczeniu na hiperozyd, wg poniższego wzoru:

$$\frac{A \times 1,26}{m}$$

przyjmując absorbancję właściwą dla hiperozydu równą 500.

A – absorbancja roztworu badanego przy 425 nm,

m – masa badanej substancji roślinnej, w gramach.

* **Zalecane naważki (odważyć z dokładnością ±0,005 g):** *Betulae folium* – 0,100 g, *Equiseti herba* – 0,400 g, *Polygoni avicularis herba* – 0,400 g, *Sambuci flos* – 0,300 g, *Solidaginis herba* i *S. virgaureae herba* – 0,100 g

Zawartość minimalna wg. FPXII: *Betulae folium* – min. 1,5%, *Equiseti herba* – min. 0,3%, *Polygoni avicularis herba* – min. 0,3%, *Sambuci flos* – min. 0,8%, *Solidaginis herba* – min. 2,5%, *S. virgaureae herba* – w zakresie 0,5-1,5%

Wynik:

.....

Wniosek:

.....

W celu oznaczenia obecności/zawartości (wybierz) markera analitycznego/czynnego/obie odpowiedzi są prawidłowe (wybierz) w ćwiczeniu posłużono się metodą

Wykonana analiza jest zaliczana do grupy badań jakościowych/iłościowych (wybierz).

5. Sporządzenie wyciągu (ćwiczenie indywidualne - flawonoidy, kumaryny):

Około 0,5 g rozdrobnionej substancji lub proszku roślinnego zalać w probówce ok. 2 mL 70% MeOH.

Podpisane próbki wstawić do płuczki ultradźwiękowej (pok. A002) na 15 min. W międzyczasie przygotować zapas kapilar i wykonać analizę mikroskopową (pkt. 9, w przypadku otrzymania proszku roślinnego).

Na płytkę/płytki do TLC nanosić **pasmowo** ok. 2 kapilary klarownego wyciągu (25-50 pociągnięć kapilarą).

Reakcje mikrochemiczne (z roztworem FeCl₃) wykonywać na pozostałej części wyciągu, rozcieńczonej wodą do względnej przezroczystości, lub bezpośrednio na zwilżonej MeOH substancji roślinnej.

6. Odróżnianie owoców aminka większego i aminka egipskiego:

Kilka owoców (*Ammi majoris fructus*, *Ammi visnagae fructus*) zalać w probówce ok. 1 mL nasyconego roztworu KOH i pozostawić na około 15 minut. Zaobserwowane zmiany zanotować.

Wynik reakcji wyciągu z roztworem KOH:

.....

.....

grupa:

7. Analiza chromatograficzna: wykrywanie glikozydów flawonoidowych w wyciągach z substancji metodą TLC:

Nanieść wyciągi i wzorce (**kwercetyna, rutyna, hiperozyd**) na płytkę do TLC. Wysuszyć.

Rozwinąć chromatogram w komorze pionowej.

Faza stała: żel krzemionkowy Si 60,

Faza ruchoma: (CH₃COOEt / CH₃COOH / HCOOH / H₂O = ... / ... / ... / ...). Ok. 30 min.

Odwiać resztki fazy ruchomej suszarką pod dygestorium. Chromatogram wysuszyć w 100-105°C.

Analizować w świetle UV 254 nm, 366 nm (porównanie R_f, rozkładu plam i barw ich fluorescencji).

Wywołać 2% roztworem AlCl₃ w metanolu. Analizować ponownie w świetle widzialnym i UV 366 nm (porównanie R_f rozkładu plam i ich barw). Zapisać wnioski.

Obserwacje:

Dla wzorców zaobserwowano następujące parametry (przed i → po wywołaniu / upochodnieniu)

kwercetyna (R_f:, barwa (VIS): →, barwa (UV₃₆₆): →, wzgl.

intensywność:), **hiperozyd** (R_f:, barwa (VIS): →, barwa (UV₃₆₆): →

....., wzgl. intensywność:), **rutyna** (R_f:, barwa (VIS): →, barwa (UV₃₆₆):

..... →, wzgl. intensywność:).

W wyciągu z potwierdzono obecność następujących składników:

1. (R_f:, barwa (VIS): →, barwa (UV₃₆₆): →, wzgl.

intensywność:), **2.** (R_f:, barwa (VIS): →, barwa (UV₃₆₆):

..... →, wzgl. intensywność:), **3.** (R_f:, barwa (VIS): →

....., barwa (UV₃₆₆): →, wzgl. intensywność:).

Ponadto, w wyciągu badanym zaobserwowano:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Wynik reakcji Shinody przeprowadzonej na wzorcach:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

grupa:

Reakcja z $AlCl_3$:

Na bibułę nakropić kapilarą do TLC po dwie plamy z własnego wyciągu i z wzorców (j.w.). Po wysuszeniu, jedną plamę z każdej pary zwilżyć kilkoma kroplami 2% roztworu $AlCl_3$ w metanolu. Po wysuszeniu obserwować powstałe zabarwienie w świetle dziennym i UV 366 nm w porównaniu do odnośnika.

Większość flawonoidów daje w tej reakcji zabarwienie żółte wykazujące brunatną, żółtą lub żółto-zieloną fluorescencję w UV (barwa zależy od budowy cząsteczki).

Chalkony tworzą kompleksy barwy pomarańczowo-czerwonej.

Schematyczny przebieg reakcji (*wskaz barwny i fluoryzujący produkt*):

Wynik reakcji z roztworem $AlCl_3$ przeprowadzonej na wzorcach i badanym wyciągu:

.....
.....
.....
.....

Reakcja z $FeCl_3$:

Do 0,5 mL własnego wyciągu dodać kilka kropeł roztworu $FeCl_3$. Reakcję można wykonać również na bibule (j.w.) lub bezpośrednio na preparacie mikroskopowym. Obserwować powstałe zabarwienie w świetle dziennym.

W razie potrzeby rozcieńczyć właściwym rozpuszczalnikiem.

Flawonoidy tworzą z $FeCl_3$ kompleksy barwy zielonej, brązowej lub brunatno-czerwonej.

Z $FeCl_3$ reaguje wiele związków fenolowych.

Wynik reakcji z roztworem $FeCl_3$ przeprowadzonej na badanym wyciągu:

.....
.....
.....

9. Analiza otrzymanego proszku (ćwiczenie indywidualne):

W przypadku otrzymania proszku roślinnego, analizować go zgodnie z instrukcjami z klucza do oznaczania sproszkowanych substancji roślinnych i własnymi notatkami. W przeciwnym razie - pominąć ten akapit.

Obserwacja mikroskopowa (*rysunek z opisem*):

Wniosek:
.....
.....

(*jeżeli dotyczy*) Według FP XII otrzymaną substancję roślinną standaryzuje się na zawartość
..... za pomocą metody/metod