

1. Sprawdzenie wiedzy i przygotowania do ćwiczeń przez prowadzących.

2. Analiza organoleptyczna substancji roślinnych:

Crataegi fructus, Myrtilli fructus siccus, Rosae pseudo-fructus, Sambuci fructus, Cyani flos, Hibisci flos, Malvae arboreae flos, Malvae sylvestris flos, Papaveris rhoeados flos, Bistortae rhizoma, Tormentillae rhizoma, Quercus cortex, Juglandis folium, Salviae folium

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 roztworem FeCl₃) oraz (w uzasadnionych przypadkach) na obecność antocyjanów (z roztworem KOH, odwracalną dodatkiem roztworu HCl), a obserwację zanotować.

..... – kwiat ketmii szczawiowej (FP XII)

roślina (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

Myrtilli fructus –

roślina (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

Rosae –

rośliny (łac./pl.):

rodzina (łac./pl.):

Juglandis –
roślina (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

..... – liść herbaty (FP XII)
roślina (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

..... – kora dębu (FP XII)
rośliny (łac./pl.):
rodzina (łac./pl.):

4. Sporządzenie wyciągu (ćwiczenie indywidualne):

Przy sporządzaniu wyciągów garbnikowych uwzględnić: *Galla* (ewentualnie gotowa *Gallae tinctura*), *Quercus cortex*, *Tormentillae rhizoma*, *Bistortae rhizoma*, *Theae folium*, *Crataegi fructus*, *Myrtilli fructus*, *Salviae folium*.

Do TLC

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

Podpisane próbówki wstawić do płuczki ultradźwiękowej (pok. A002) na 15 min.

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

Do wykonywania reakcji mikrochemicznych

Około 0,5 g rozdrobnionej substancji garbnikowej lub proszku roślinnego zalać w probówce ok. 2-3 mL wrzątku z wody destylowanej. Podpisane próbówki wstawić do łaźni wodnej (90°C, pod dygestorium) na 15 min.

5. Analiza chromatograficzna związków garbnikowych i ich składowych w wyciągach z substancji roślinnych metodą TLC:

Nanieść wyciągi i wzorce (**kwasy galusowe, tanina, katechiny**) na płytkę do TLC. Wysuszyć.

Rozwinąć chromatogram w komorze pionowej.

Faza stała: żel krzemionkowy Si 60, **Faza ruchoma:** (CH₂Cl₂ / CH₃COOEt / HCOOH = 6 / 10 / 1). **Czas rozwinięcia chromatogramu:** ok. 15 min.

Odwiać resztki fazy ruchomej suszarką pod dygestorium. Chromatogram wysuszyć w 100-105°C, spryskać roztworem FeCl₃. Analizować w świetle widzialnym (porównanie R_f rozkładu plam i ich barw).

Ponownie wysuszyć w suszarce powietrznej i spryskać kolejno:

1) roztworem 1% waniliny (w MeOH) ; 2) stężonym roztworem HCl (36%).

W razie potrzeby ogrzać w suszarce do TLC.

Ponownie analizować w świetle widzialnym (porównanie R_f rozkładu plam i zmian ich barw). Zapisać wnioski.

Obserwacje: Dla wzorców zaobserwowano następujące parametry (po wywołaniu / upochodnieniu)

kwasy galusowe (R_f:, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,), **tanina** (R_f: -, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,), **katechiny** (R_f:, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,).

W wyciągu z potwierdzono obecność następujących składników:

1. (R_f:, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,), **2.** (R_f:, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,), **3.** (R_f:, barwa po upochodnieniu FeCl₃ (VIS):, barwa po upochodnieniu waniliną w HCl (VIS):, wzgl. intensywność:,). Ponadto, w wyciągu badanym zaobserwowano:

Wniosek:

6. Analiza chromatograficzna związków antocyjanowych w wyciągach z substancji roślinnych metodą TLC oraz przesiewowe badanie ich aktywności przeciwrodnikowej:

Nanieść wyciągi na płytkę do TLC. Wysuszyć. Rozwinąć chromatogram w komorze pionowej.

Faza stała: żel krzemionkowy Si 60, **Faza ruchoma:** (CH₃COOEt / CH₃COOH / HCOOH / H₂O = 100 / 11 / 11 / 26).

Czas rozwinięcia chromatogramu: ok. 30 min.

Odwiać resztki fazy ruchomej suszarką. Analizować w świetle widzialnym (porównanie R_f rozkładu plam i ich barw). Zaznaczyć plamy o barwach typowych dla antocyjanów (czerwone, fioletowe itp.).

Następnie spryskać 0,05-0,1% roztworem stabilnego wolnego rodnika (DPPH[•]) w MeOH (każdorazowo należy przygotować świeży roztwór!). Ponownie analizować w świetle widzialnym (zmiany barw niektórych plam).

Obserwacje: W wyciągu z zaobserwowano obecność związków barwnych (np. antocyjanów) o następujących parametrach: **1.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **2.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **3.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **4.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **5.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **6.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,), **7.** (R_f:, barwa (VIS):, wzgl. intensywność:,).

W warunkach doświadczenia, wysoką aktywność przeciwrodnikową wykazały związki: **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, inne** (wybierz, można wskazać kilka).

Wniosek:

7. Reakcje mikrochemiczne (ćwiczenie indywidualne):**Reakcja grupowa antocyjanów:**

Do pięciu probówek odmierzyć po ok. 1 mL każdego z roztworów buforowych. Pasteurówką dodać do każdego z nich po ok. 5 kropeł badanego wyciągu antocyjanowego (do uzyskania wyraźnego zabarwienia). Wymieszać. Zanotować w tabeli zmiany barw.

Przygotować dwie dodatkowe serie, dodając do każdej probówki jako ostatniego składnika kilka kropeł (np. 2) roztworu AlCl_3 w jednej z nich i kilka kropeł roztworu FeCl_3 w kolejnej. Zanotować w tabeli zmiany barw.

Pierwszą serię (bez dodatków) pozostawić do końca ćwiczenia.

wyciąg z:	pH=1	pH=4	pH=7	pH=10	pH=13
.....					
.....					
+ AlCl_3					
+ FeCl_3					

Wniosek 1:

.....

.....

Stabilność antocyjanów w środowisku o silnym odczynie zasadowym lub kwaśnym:

Przed końcem ćwiczenia przygotować ponownie roztwór badanego wyciągu w buforach o pH =1 i pH =13.

Porównać barwy świeżej i starej serii.

Następnie zakwaszyć roztwory w buforze alkalicznym, a zalkalizować roztwory w buforze kwaśnym odpowiednimi ilościami roztworów HCl i KOH. Zanotować w tabeli zmiany barw.

wyciąg z:	pH=1 (wyciąg świeży)	pH=1 (wyciąg stary)	pH=13 (wyciąg świeży)	pH=13 (wyciąg stary)
.....				
.....				
+ HCl				
+ KOH				

Wniosek 2:

.....

.....

Schematyczny przebieg reakcji manifestującej się zmianą roztworów barwy antocyjanów podczas zmiany środowiska z kwaśnego do zasadowe:

grupa:

Poniższe reakcje wykonano na wyciągu wodnym z:Zanotować w tabeli zmiany barw i inne obserwacje.**Reakcja grupowa polifenoli z FeCl₃**Do ok. 0,5 mL wyciągu z badanej substancji garbnikowej dodać kilka kropeł 2% roztworu FeCl₃. W razie potrzeby rozcieńczyć wodą do względnej przezroczystości.

Zabarwienie niebieskie, granatowe, niebieskozielone lub brunatne wskazuje obecność polifenoli.

Reakcja grupowa garbników z białkiem:

Do ok. 0,5 mL wyciągu z badanej substancji garbnikowej dodać kilka kropeł 1% roztworu żelatyny.

Powstanie osadu wskazuje potencjalną obecność garbników.

Reakcja grupowa garbników z odczynnikiem Mitchella:Do ok. 0,5 mL wyciągu z badanej substancji garbnikowej dodać ok. 0,5 mL odczynnika Mitchella (wodny roztwór Fe₂(SO₄)₃ i winianu sodowo-potasowego). Zagotować w płomieniu palnika i ochłodzić. W razie potrzeby rozcieńczyć wodą do względnej przezroczystości.

W obecności garbników powstaje czerwony, fioletowy lub czarny osad nierozpuszczalny w gorącej wodzie.

Reakcja grupowa garbników katechinowych (skondensowanych) i floroglucydów:

Do 0,5 mL wyciągu z badanej substancji dodać kilka kropeł 1% roztworu waniliny i kilka kropeł stężonego roztworu HCl. Intensywnie czerwone zabarwienie wskazuje na obecność związków zawierających w swojej strukturze pierścień floroglucyny.

wyciąg z:	reakcja z FeCl ₃	reakcja z białkiem	reakcja z odczynnikiem Mitchella	reakcja z waniliną w HCl
.....				
.....				

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

8. Analiza mieszanki rozdrobnionych substancji roślinnych i proszku roślinnego (zakres ćwiczeń I-IV, próba).

1. substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....

2. substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....

3. substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....

4. substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....

5. substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....

Obserwacja mikroskopowa sproszkowanej substancji roślinnej (*rysunek z opisem*):

Przeprowadzone reakcje mikrochemiczne i interpretacja ich wyników:

.....

.....

Identyfikacja sproszkowanej substancji roślinnej:

substancja (łac./pl.).....

gatunek / gatunki (łac./pl.)

rodzina (łac./pl.).....