

VI – ROŚLINY LECZNICZE I ICH PRZETWORY STOSOWANE W REKONWALESCENCJI I CHOROBYCH WIEKU PODESZŁEGO, W TYM W ŁAGODNYM ROZROŚCIE PROSTATY I W CHOROBYCH UKŁADU MOCZOWEGO

1. Analiza organoleptyczna substancji roślinnych (8, praca indywidualna):

Dla każdej z podanych substancji roślinnych zanotować najważniejsze obserwacje organoleptyczne (zapach, smak, barwa, postać), informacje dotyczące potwierdzenia jej tożsamości metodą makroskopową (organoleptyczną) można odnaleźć w farmakopei.

Substancje zawierające saponiny i/lub związki fenolowe o działaniu adaptogennym: *Eleutherococci radix* – korzeń eleuterokoka (żeń-szenia syberyjskiego), *Ginseng radix* – korzeń żeń-szenia.

Substancje zawierające flawonoidy o działaniu moczopędnym: *Betulae folium* – liść brzozy, *Equiseti herba* – ziele skrzypu polnego, *Polygoni avicularis herba* – ziele rdestu ptasiego.

Substancje zawierające związki fenolowe o działaniu odkażającym drogi moczowe: *Vitis idaeae folium* – liść borówki brusznicy, *Uvae ursi folium* – liść mącznicy.

Substancje zawierające fitosterole: *Cucurbitae peponis semen* – nasienie dyni.

2. Odróżnienie korzeni żeń-szenia (*Ginseng radix*) i eleuterokoka (*Eleutherococci radix*) (parami):

Przygotowanie wyciągów:

Otrzymaną substancję roślinną sproszkować (jeśli konieczne) i zalać w probówce ok. 1-2 mL 70% metanolu (70% MeOH). Podpisane próbki wstawić do płuczki ultradźwiękowej (pok. A002) na 5-10 min. Wyciągi zdekantować, przesączyć (lejek z niewielkim zwitkiem waty), lub odpipetować pasteurówką po wyklarowaniu.

Wykrywanie związków fenolowych:

Do każdego z otrzymanych wyciągów dodać kilka kropel roztworu $FeCl_3$ w MeOH. **Fenole** dają zwykle z $FeCl_3$ zabarwienie zielone.

Próba pienienia:

Pozostałą część klarownego (bez surowca) wyciągu dopełnić **wodą destylowaną** do połowy próbki, a następnie energicznie wyklócić, zatykając wylot próbki.

W przypadku obecności **saponin** w substancji na granicy faz powstaje trwała warstwa piany (nawet 15 min.). Nietrwałą pianę mogą dawać również garbniki.

Sporządzić notatkę zawierającą opis przebiegu doświadczeń i ich wynik.

3. Odróżnienie liści borówki czernicy (*Myrtilli folium*), liści borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium*) i mącznicy (*Uvae ursi folium*) (po 3 osoby):

Przygotowanie wyciągów:

Otrzymaną substancję roślinną sproszkować (jeśli konieczne) i zalać w probówce ok. 1-2 mL 70% metanolu (70% MeOH). Podpisane próbki wstawić do płuczki ultradźwiękowej (pok. A002) na 5-10 min. Wyciągi zdekantować, przesączyć (lejek z niewielkim zwitkiem waty), lub odpipetować pasteurówką po wyklarowaniu.

Wykrywanie i wstępna klasyfikacja związków fenolowych:

Do każdego z otrzymanych wyciągów dodać kilka kropel roztworu $FeCl_3$ w MeOH. **Flawonoidy** i **proste fenole** dają zwykle z $FeCl_3$ zabarwienie zielone. **Garbniki** dają zwykle z $FeCl_3$ zabarwienie niebieskie do czarnego.

Wykrywanie lotnych fenoli metodą mikrosublimeracji:

Należy odmierzyć ok. 0,25-0,5g każdej sproszkowanej substancji roślinnej i umieścić ją w gilzy z folii aluminiowej. Gilzy umieścić w podpisanych próbkach a ich wyloty zatkać zwitkami waty. Ogrzewać próbki wystarczająco wysoko nad płomieniem palnika spirytusowego (ok. 10 cm) by ogrzać je, a jednocześnie nie doprowadzić do zbyt szybkiego zwęglenia próbek. Po pojawieniu się białego dymu wewnątrz próbki, ogrzewać jeszcze ok. pół minuty.

Pracować w okularach ochronnych, trzymając próbkę w drewnianej łapie i zwracając uwagę, by wylot próbki był skierowany w stronę gdzie nikogo nie ma; ogrzane próbki umieszczać w statywie.

Po ochłodzeniu próbek wyjąć ostrożnie korki z waty i na wewnętrzną stronę każdego z korków nakropić nieco roztworu $FeCl_3$ w MeOH. Łatwo lotne fenole (np. hydrochinon) dają zabarwienie zielone.

Próba pienienia:

Pozostałą część klarownego (bez surowca) wyciągu dopełnić **wodą destylowaną** do połowy próbki, a następnie energicznie wyklócić, zatykając wylot próbki. W przypadku obecności **garbników** w substancji na granicy faz powstaje nietrwała warstwa piany (<1 min.).

Sporządzić notatkę zawierającą opis przebiegu doświadczeń i ich wynik.

Jak różnią się właściwościami terapeutycznymi liść borówki czernicy i liść borówki brusznicy?

VI – ROŚLINY LECZNICZE I ICH PRZETWORY STOSOWANE W REKONWALESCENCJI I CHOROBYCH WIEKU PODESZŁEGO, W TYM W ŁAGODNYM ROZROŚCIE PROSTATY I W CHOROBYCH UKŁADU MOCZOWEGO

4. Porównanie zawartości flawonoidów w wyciągach otrzymanych z wybranych substancji roślinnych o działaniu moczopędnym, wg zmodyfikowanej metody farmakopealnej (2 substancje roślinne na grupę, praca w parach):

Dla uśrednienia wyniku należy przygotować po trzy naważki z zadanej substancji roślinnej (jedna para przygotowuje jedną naważkę). Zadanie ilościowe – należy pipetować dokładnie zadane objętości.

Przygotowanie wyciągów:

Umieścić **zalecaną naważkę*(m)** 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 po wyważeniu odwirować (3 min) część roztworu w probówkach typu Eppendorf.

* **Zalecane naważki** (odważyć z dokładnością $\pm 0,005$ g):

Betulae folium – liść brzozy – 0,100 g,

Equiseti herba – ziele skrzypu – 0,400 g,

Polygoni avicularis herba – ziele rdestu ptasiego – 0,400 g,

Sambuci flos – kwiat bzu czarnego – 0,300 g,

Solidaginis herba – ziele nawłoci – 0,100 g,

Solidaginis virgaureae herba – ziele nawłoci pospolitej – 0,100 g.

Oдноśnik:

W kuwecie plastikowej umieścić 100 μ L supernatantu pobranego z nad osadu w eppendorffce za pomocą pipety automatycznej, a następnie dodać pipetą szklaną 2,0 mL roztworu lodowatego kwasu octowego (5%) w metanolu. Kuwetę zamknąć parafilmem.

Roztwór badany:

W kuwecie plastikowej umieścić 100 μ L supernatantu pobranego z nad osadu w eppendorffce za pomocą pipety automatycznej, a następnie dodać pipetą szklaną 2,0 mL roztworu chlorku glinu (2%) w roztworze lodowatego kwasu octowego (5%) w metanolu. Kuwetę zamknąć parafilmem.

Oznaczenie:

Odczekać około 30 min. Po tym czasie zmierzyć absorbancję roztworu badanego przy 425 nm (**A**) wobec odnośnika:

Zgłosić prowadzącemu gotowość do pomiaru. Przenieść zawartość kuwety do kuwety szklanej. W pierwszej kolejności dokonać pomiaru dla odnośnika (wyzerować aparat), następnie dla próbek (pomoc prowadzącego lub technika). Zanotować odczyty. Ostrożnie umyć kuwety (pomoc technika).

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.

Uśrednić wynik pomiędzy osobami analizującymi w danej grupie tą samą substancję roślinną, jeśli jest to możliwe.

Zawartość flawonoidów w przeliczeniu na hiperozyd powinna wynosić (wg. FPXII):

Betulae folium – liść brzozy – min. 1,5%,

Equiseti herba – ziele skrzypu – min. 0,3%,

Polygoni avicularis herba – ziele rdestu ptasiego – min. 0,3%,

Sambuci flos – kwiat bzu czarnego – min. 0,8%,

Solidaginis herba – ziele nawłoci – min. 2,5%,

Solidaginis virgaureae herba – ziele nawłoci pospolitej – w zakresie 0,5-1,5%.

Jaki jest cel prowadzenia szczegółowych badań co do obecności i zawartości wybranych substancji chemicznych (markerów) w danej substancji roślinnej przed dopuszczeniem jej do wytwarzania leków?

Sporządzić notatkę zawierającą opis przebiegu doświadczeń i ich wynik. Ocenić jakość surowca w świetle wymagań farmakopei.