

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  $\text{FeCl}_3$ ), 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 nostryka (FP XII)  
roślina (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 FeCl<sub>3</sub>) 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. Wsuszyć.

Rozwinąć chromatogram w komorze pionowej.

Faza stała: żel krzemionkowy Si 60,

Faza ruchoma: (CH<sub>3</sub>COOEt / CH<sub>3</sub>COOH / HCOOH / H<sub>2</sub>O = ... / ... / ... / ...). 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<sub>f</sub>, rozkładu plam i barw ich fluorescencji).

Wywołać 2% roztworem AlCl<sub>3</sub> w metanolu. Analizować ponownie w świetle widzialnym i UV 366 nm (porównanie R<sub>f</sub> rozkładu plam i ich barw). Zapisać wnioski.

Obserwacje:

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

**kwercetyna** (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... → ....., barwa (UV<sub>366</sub>): ..... → ....., wzgl.

intensywność: .....), **hiperozyd** (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... → ....., barwa (UV<sub>366</sub>): ..... →

....., wzgl. intensywność: .....), **rutyna** (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... → ....., barwa (UV<sub>366</sub>):

..... → ....., wzgl. intensywność: .....).

W wyciągu z ..... potwierdzono obecność następujących składników:

**1.** ..... (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... → ....., barwa (UV<sub>366</sub>): ..... → ....., wzgl.

intensywność: .....), **2.** ..... (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... → ....., barwa (UV<sub>366</sub>):

..... → ....., wzgl. intensywność: .....), **3.** ..... (R<sub>f</sub>: ....., barwa (VIS): ..... →

....., barwa (UV<sub>366</sub>): ..... → ....., wzgl. intensywność: .....).

Ponadto, w wyciągu badanym zaobserwowano: .....

.....

.....

.....

.....

Wniosek:

Analizowana substancja roślinna (.....)

spełnia/nie spełnia (*wybierz*) wymagania farmakopealne w zakresie tożsamości.

**8. Reakcje mikrochemiczne (ćwiczenie indywidualne - flawonoidy):****Reakcja Shinody:**

Do 0,5 mL zestawu świeżych roztworów wzorców (luteoliny, kwercetyny, naryngeniny i chalkonu - jeden zestaw na grupę) dodać niewielką (!) ilość opiłków magnezu. Dodać kilka kropeł stężonego roztworu HCl (pod dygestorium) i obserwować powstające z czasem zabarwienie. Układ fenylochromonowy jest redukowany do antocyjanidyn posiadających charakterystyczne barwy. Chalkony i auryony nie dają barwnych związków.

Schematyczny przebieg reakcji (*wskaż barwny produkt*):

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 .....