Лабораторное занятие № 5

Тема: Исследование флаваноидов в лекарственном растительном сырье (ЛРС)

Цель занятия: Приобретение навыков исследования флаваноидов в лекарственном растительном сырье

Задание:

1. Провести качественные реакции обнаружения флавоноидов в ЛРС: цветки боярышника, пижмы, лабазника, бессмертника.

2. Провести обнаружение флавоноидов в ЛРС методом хроматографии в тонком слое.

3. Провести количественное определение флавоноидов в ЛРС фотоэлектроколориметрическим методом

Необходимые приборы, оборудование, химическая посуда, реактивы:

Реактивы:

70 % этиловый спирт

Методические рекомендации к выполнению лабораторной работы:

***Экстракция флавоноидов***

В колбу на 50 мл поместить 2,0 измельченного до 1 мм сырья, залить 20 мл (цветки бессмертника залить 30 мл) 70 % этилового спирта. Настаивать 24 часа. Затем процедить через ватный тампон в коническую колбу на 30 мл.

***1) Реакции окрашивания:***

· Цианидиновая проба (восстановление флавонолов, флавонов, флавaнонов до антоцианидинов).

В пробирку поместить 1 мл извлечения, добавить 3-4 капли конц. HCl и 1 гранулу металлического цинка. Нагреть до кипения. Наблюдать красное или оранжевое окрашивание.

*- Реакция с раствором едкой щелочи.*

К 1 мл извлечения добавить 2-3 капли 5 % спиртового раствора NаОН. Наблюдать желтое окрашивание (флавоны, флавонолы, флаваноны).

- *Реакция комплексообразования с хлоридом алюминия.*

К 1 мл извлечения добавить 2-3 капли 2 % спиртового раствора хлорида алюминия. Наблюдать желтое окрашивание, флюоресцирующее в УФ-свете.

*2****) Реакция осаждения растворами ацетата свинца:***

К 1 мл извлечения добавить 3 капли раствора основного ацетата свинца. Наблюдать образование желто-оранжевого осадка.

К 1 мл извлечения добавить 3 капли раствора среднего ацетата свинца. При наличии флавоноидов с орто-дигидроксигруппировками образуется осадок.

**Задание 2.** Провести обнаружение флавоноидов в ЛРС методом хроматографии в тонком слое.

Использовать извлечение флавоноидов, оставшееся от проведения качественных реакций.

1) На стартовую линию хроматографической пластинки "Силуфол" нанести капилляром извлечение и "свидетель" (рутин, кверцетин, гиперозид). Пластинку поместить в хроматографическую камеру с системой растворителей:

ЭТАНОЛ:УКСУСНАЯ КИСЛОТА:ВОДА (20:1:1).

2) Хроматографирование вести 20 мин (пробег растворителя 13 см), затем хроматограмму высушить на воздухе под тягой.

3) Отметить окраску пятен в видимом и УФ-свете.

4) Обработать хроматограмму 2 % спиртовым раствором хлорида алюминия и высушить в сушильном шкафу при температуре 90-100о С. Наблюдать окраску пятен в видимом и УФ-свете.

5) Рассчитать для флавоноидов величины Rf и сравнить их со "свидетелями". Хроматограмму зарисовать и результаты занести в протокол.

**Задание 3.** Провести количественное определение флавоноидов в ЛРС фотоэлектроколориметрическим методом.

1) Подготовка ЛРС: сырье измельчить, просеять через сито с диаметром отверстий 1 мм, взять точную навеску 0,5 г и поместить в коническую колбу со шлифом на 100 мл.

2) Экстракция суммы флавоноидов: мерной пипеткой отмерить 50 мл 50 % этанола и внести в колбу с сырьем. Колбу закрыть пробкой, взвесить с точностью до 0,01 г, затем экстракцию вести на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Колбу с извлечением охладить, довести до первоначальной массы 50 % этанолом, перемешать.

3) Фильтрация: полученное извлечение профильтровать через бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 капель, в пробирку.

4) Получение окрашенного комплекса флавоноидов и стабилизация окраски: отмерить 1 мл фильтрата, перенести в сухую пробирку и прилить 3 мл реактива А (состоящего из ацетатного буфера рН=3, 10 % р-ра ацетата натрия на 50 % этаноле, 2 % AlCl3 в 50 % этаноле (1:1:1)). Параллельно приготовить контрольный р-р, состоящий из 2 мл исследуемого извлечения и 6 мл реактива Б (состоящего из 2 мл ацетатного буфера рН=3 и 4 мл 50 % этанола). Оба раствора (исследуемый и контрольный) выдержать в темном месте в течение 10 минут.

5) Фотоэлектроколориметрирование. Измерить оптическую плотность исследуемого р-ра на фоне контрольного р-ра на ФЭК-М в кювете толщиной 5 мм при синем светофильтре № 4. Используя полученное значение оптической плотности, найти содержание суммы флавоноидов в 1 мл р-ра по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору рутина. Рассчитать результаты по формуле:

где:

**m** **-** навеска ЛРС в мкг (1,0 = 106 мкг);

**С** **-** концентрация флавоноидов (мкг/мл), найденная по калибровочному графику;

**U** **-** объем экстрагента, взятого для экстракции флавоноидов (50мл);

**U1-** объем экстракта (1мл);

**W -** влажность ЛРС;

**К -** коэффициент разбавления раствора перед колориметрированием.

**ПРИМЕЧАНИЕ: *При использовании кюветы на 10 мм:***

*· для приготовления рабочего раствора берется 2 мл фильтрата и 6 мл реактива А;*

*· для приготовления контроля - 4 мл фильтрата и 12 мл реактива Б.*

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Классификация и особенности структуры флавоноидных соединений.

2. Физико-химические свойства флавоноидов.

3. Распространение флавоноидов в растительном мире, локализация в растениях по органам и тканям.

4. Методы выделения, очистки и разделения флавоноидов.

5. Анализ (качественный, количественный, хроматографический) ЛРС, содержащего флавоноиды.

6. Биологическая активность флавоноидов. Пути использования ЛРС, содержащего флавоноиды.

Форма отчетности:Работу оформить в виде протокола фитохимического анализа. На основании проведенного анализа дать заключение о качественном и количественном содержании флавоноидов в исследуемом образце.