**Біохімія лікарських рослин Лабораторне заняття № 10**

**Тема: Сполуки з одним та двома ароматичним ядром (Прості феноли та їх похідні, флавоноїди)**

**Перелік питань для самопідготовки по темам за схемою: Прості феноли та їх похідні, флавоноїди.**

1. Визначення та класифікація. 2.Фізико-хімічні властивості.

1. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук в рослинній сировині.
2. Розповсюдження у рослинному світі (де містяться та значення для рослини).
3. Біогенез (біосинтез в рослинному організмі).
4. Біологічна дія сполук. Основні сполуки, які знайшли застосування в медицині.
5. Рослини, які містять ці сполуки. Їх застосування в медицині та народному господарстві.

**Навчальні завдання:**

**ЗАВДАННЯ 1. Виконати лабораторну роботу:**

**Методи виділення флавоноїдів та якісні реакції (див. додаток)**

**ЗАВДАННЯ 2.** Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть ***загальну схему метаболізму утворення* простих фенолів, флавоноїдів** із зазначенням проміжних продуктів*.*

**ЗАВДАННЯ 3. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить простих фенолів, флавоноїдів та узагальніть результати у вигляді таблиці.**

**Якісні реакції на прості феноли / флавоноїди**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Назва реакції** | **Реактиви** | **Результат реакції (забарвлення/осад)** | **Хімізм реакції** |
| **1** |  |  |  |  |
| **2** |  |  |  |  |
| **3** |  |  |  |  |
| **4** |  |  |  |  |
| **5** |  |  |  |  |
| **6** |  |  |  |  |

**Зробіть висновки**

**Методичні вказівки до практичного заняття по темі: "Флавоноїди"**

***Мета роботи:*** познайомитися з властивостями бензо-у-пірону; навчитися проводити якісний та кількісний аналіз на його похідні; навчитись оцінювати рослини на можливість використання в сировини, в різноманітних сферах народного господарства.

*Флавоноїди* дуже поширені в рослинному світі, особливо серед вищих рослин. Ця група речовин тепер набуває великого теоретичного і практичного значення. Основна маса флавоноїдів знаходить застосування в медичній практиці як речовини, що мають Р-вітамінну активність; деякі з них виявляють жовчогінну, діуретичну та інші дії. У рослинах флавонові речовини містяться, головним чином, у вигляді глікозидів.

Флавоноїди - це похідні феніл-бензо-у-пірону і відрізняються один від одного ступенем відновлюваності або окислюваності у-піронового ядра, що називається хромоном.

Флавоноїди сполуки мають різні угрупування, що зумовлює наявність великої кількості різноманітних реакцій, які застосовуються для вивчення як усієї групи в цілому, так і окремих підгруп флавоноїдів.

**Якісні реакції на ф лавон о їди**

Для якісних реакцій на флавоноїди використовують водні або спиртові витяжки з рослинного матеріалу, а також розчини виділених флавонових речовин. Для деяких реакцій на цю групу речовин можна використати як сирий, так і сухий рослинний матеріал.

П р и го т у ва н н я ви т я ж ки зрослинної сировини: 1 г здрібненої сировини (трава гречки, бутони софори японської, квітки пижми та ін.) поміщають у колбу місткістю 25 мл і заливають 10 мл етилового спирту. Колбу з’єднують із зворотним холодильником і нагрівають на водяній бані протягом 10 хвилин з моменту кипіння спирту у колбі. Після охолодження отриманий витяг фільтрують через паперовий фільтр.

1. *Реакція з концентрованою соляною кислотою.* Флавоноїди-при взаємодії з концентрованою соляною кислотою утворюють інтенсивне жовте забарвлення або жовті кристали, які добре розчиняються в 1 %-ному розчині лугу. Цій реакції заважають антоціани і катехіни. Перші дають червоне забарвлення, яке маскує жовтий колір, другі - осади.
2. *Реакція з їдкими лугами і концентрованим аміаком.* З їдкими лугами, концентрованим аміаком і карбонатами лужних металів флавони, флаванони, флавоноли, флаваноноли утворюють інтенсивне жовте забарвлення, яке при нагріванні переходить в оранжеве або червоне; халкони і аурони дають червоне або пурпурове забарвлення. Чисті катехіни не зафарблюються, але у присутності навіть невеликої кількості домішок (продуктів окислення) з’являється жовте забарвлення. Антоціани в присутності аміаку або карбонату натрію дають синє або фіолетове забарвлення. Для цих реакцій застосовують 10%-ний розчин лугу або карбонату лужного металу. Треба враховувати, що аналогічні реакції дають оксикумарини але при цьому утворюється червоне або пурпурове забарвлення.
3. *.3 1%-ним ваніліном у концентрованій соляній кислоті* катехіни утворюють червоно-малинове забарвлення.
4. *Реакція з трихлористою сурмою.* 5-оксифлавони і 5-оксифлавоноли, взаємодіючи утворюють комплексні сполучення жовтого або червоного кольору.
5. *При обробці середнім оцтовокислим свинцем* спиртових розчинів флавонів, халконів, ауронів, що містять вільні ортогідроксильні угрупування в кільці В, утворюються забарвлені осади як червоного, так і синього кольорів.
6. *Ціанідиноеа реакція.* При додаванні до спиртового екстракту флавоноїдів 2-3 краплин концентрованої соляної кислоти і кількох стружок металічного магнію утворюється червоне або червоно-фіолетове забарвлення. Замість соляної кислоти можна використати оцтову кислоту; тоді при наявності флавоноїдів можуть виникати різні забарвлення (червоне, синє, зелене та ін.).
7. *Реакція Вільсона з борно-лимонним реактивом.* До 2 мл досліджуваної витяжки з рослинного матеріалу добавляють 8 мл лимонно-борного реактиву (в 4-кратній кількості порівняно з досліджуваним розчином). Суміш залишають на 5 хв. При кімнатній температурі; при наявності флавоноїдів виникає стійке лимонно-жовте забарвлення, яке зберігається протягом кількох годин. Для контрольного визначення, яке потрібне для врахування власного забарвлення досліджуваного розчину, замість розчину борної кислоти добавляють такий самий об’єм ацетону. Ця реакція може бути використана для кількісного колориметричного визначення флавоноїдів.

*Приготування витяжки для реакції Вільсона.* Рослинний матеріал висушують у сушильній шафі при температурі 60°С протягом кількох годин до повного видалення вологи, потім подрібнюють і просівають крізь сито *з* отворами діаметром 1 мм. З приготовленого таким способом матеріалу беруть наважку близько 1 г, кладуть її в патрон з фільтрувального паперу і екстрагують сухим хлороформом для видалення пігментів і смол. Після екстрагування сухий вміст пакету кількісно переносять у колбочку і кип’ятять з 30 мл абсолютного метанолу із зворотним холодильником протягом 30 хв.

Після закінчення екстрагування вміст колбочки кількісно переносять у мірну колбу на 50 мл, доводять до позначки сухим метанолом, а потім фільтрують крізь сухий фільтр. 10 мл фільтрату переносять у невелику колбочку і відганяють спирт досуха. Плівку, що залишилася на дні колбочки, обробляють 1 мл сухого метанолу і розчин кількісно переносять у мірну колбу на 25 мл, старанно промиваючи сухим ацетоном, і доводять ним до позначки. При добавлянні ацетону в колбі випадає дрібний пластівцевоподібний осад. Розчин з мірної колби фільтрують у суху колбу, звідки беруть проби для якісного і кількісного визначення флавоноїдів. При наважці 1 г кожний мілілітр фільтрату відповідає 0,008 г рослинного матеріалу. Реакції заважає наявність слідів води, яка спричиняє крайню нестійкість комплексу.

1. *Реакції з солями важ ких металів.* При взаємодії флавоноїдів зсолями окисного заліза виникає зелене забарвлення різних відтінків, зрідка коричневого або пурпурного. Для реакцій використовують 3-5%-ний спиртовий розчин хлорного заліза. З солями алюмінію багато флавоноїдів утворюють забарвлені продукти, що інтенсивно флюоресцирують в ультрафіолетовому світлі. Для реакцій використовують 1 %-ний спиртовий розчин трихлористого алюмінію.
2. *З солями цирконію в присутності лим онної кислоти* флавоноїди утворюють лимонно-жовте забарвлення, яке добре флюоресцирує в ультрафіолетовому світлі. 0,5 - 1 мг флавоноїду розчиняють у 10 мл метанолу і добавляють 1 мл 2 %-ного метанольного розчину солі цирконію. З солями берилію флавоноїди утворюють сполуки, які флюоресціюють в ультрафіолетовому світлі, дещо відмінно від флюоресценції самих флавоноїдів. Для реакції використовують 1 %-ний розчин солей берилію.

**Хроматографічні методи дослідження флавоноїдів**

Тепер для виділення і дослідження флавоноїдів все частіше використовують хроматографічні методи.

Флавоноїди звичайно екстрагують із свіжого рослинного матеріалу гарячим 70°етиловим спиртом, метанолом або водою. Для екстрагуванню флавонів можна використати 96 й спирт. Утворені екстракти фільтрують і за допомогою капілярної піпетки наносіть на папір. Екстракти з листків спочатку обробляють петролейним ефіром для видалення хлорофілу, який заважає хроматографуванню.

В якості хроматографічних систем можуть бути використані водні, спиртові, фенольні, вуглецеві розчинники. Водні розчинники: 15 %-на оцтова кислота. Спиртові розчинники: н-бутанол - оцтова кислота - вода (4:1:5) або в інших співвідношеннях. Фенольні розчинники: фенол або м-крезол, насичені водою, і оцтова кислота (50:48:2 за о б’ємом).