**Izolacja flawonoidów z tkanek *Ruta graveolens* hodowanych w kulturze *in vitro***

MATERIAŁY I ODCZYNNIKI:

Moździerz o szorstkiej powierzchni

Probówki typu falcon o objętości 15 ml

Probówka typu eppendorff o objętości 1,5 ml

Szklana kulka o średnicy 0,5 cm

Szalki wagowe

Łyżka laboratoryjna

Piasek kwarcowy

Pipety szklane 1 ml, 5 ml,

Pipeta automatyczna 1000 μl

Końcówki do pipet 1000 μl

Aaceton, 0,1 M kwas solny, heksan

INSTRUKCJA WYKONANIA:

1. Odważyć 0,5- 1,5 grama materiału roślinnego,
2. Utrzeć go w moździerzu ze szczyptą piasku kwarcowego,
3. Przenieść zhomogenizowaną tkankę do 15 mililitrowej, zakręcanej probówki typu falcon, w której znajduje się szklana kulka,
4. Moździerz przepłukać 4 ml acetonu, przelać do probówki oraz dodać 0,5 ml 0,1 M kwasu solnego
5. Zakręcić probówkę i wytrząsać zawartość przez około minutę,
6. Do usyskanej zawiesiny dodać 8 ml heksanu (POD WYCIĄGIEM!)
7. Zakręcić probówkę i wytrząsać zawartość przez około minutę,
8. Zwirować przy 10.000 rpm przez 5 minut
9. Delikatnie zebrać dolną warstwę organiczną i przenieść ją do nowej probówki,
10. Opisać probówkę z ekstraktem roślinnym i zachować do dalszych analiz.

**Wykrywanie obecności flawonoidów w badanej próbce**

MATERIAŁY I ODCZYNNIKI:

Probówki typu Eppendorf, 2.0 ml

Pipeta automatyczna 1000 μl

Końcówki do pipet 1000 μl

Mikrokapilara szkalana

Roztwór wzorcowy (rutyna w wodzie destylowanej 1 mg/ml)

Wodny 3% roztwór chlorku glinu (AlCl3)

Wodny 2% roztwór azotynu sodu (NaNO2)

Wodny 1M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)

INSTRUKCJA WYKONANIA:

1. Opisać trzy probówki Eppendorf 2,0 ml: pierwszą "Wzorzec", drugą "0", trzecią "Ekstrakt"
2. Do probówki "Wzorzec" wlać 0,1 ml roztworu wzorcowego i dolać 0,1 ml wody destylowanej
3. Do probówki "Ekstrakt" wlać 0,1 ml badanego roztworu i dolać 0,1 ml wody destylowanej
4. Do probówki "0" wlać 0,2 ml wody destylowanej
5. Do kazdej z probówek dodać po 0,1 ml 2% roztworu azotynu sodu (NaNO2),
6. Wymieszać zawartość probówek przez odwracanie
7. Po 5 minutach dodać do probówek po 0,1 ml 3% roztworu chlorku glinu (AlCl3),
8. Wymieszać zawartość probówek przez odwracanie
9. Po kolejnych 5 minutach dodać do probówek po 0,1 ml 1 M roztworu wodorotlenku sodu (NaOH). Wymieszać przez odwracanie

**Chromatografia cienkowarstwowa faz odwróconych**

INSTRUKCJA WYKONANIA:

Komorę do chromatografii napełnić mieszaniną rozwijającą do wysokości około 1 cm, przykryć i pozostawić w temp. pokojowej, aby wypełniła się parami rozpuszczalników.

Położyć na stole płytkę do chromatogarfii cienkowarstowej (dłuższą krawędzią w górę) .

Miękkim ołówkiem delikatnie narysować u dołu linię na wysokości 2 cm. Wzdłuż lini, od lewej strony, zaznaczyć punkt. Będzie to miejsce, na które zostanie naniesiona pierwsza próba. Następnie co około 1 cm, licząc od pierwszego punktu, nanosić kolejne punkty (na 1 płytce powinny zmieścić się 3). Ponumerować punkty w kolejności od 1-3 (wzorzec, próba ślepa, ekstrakt roślinny). U góry płytki delikatnie wpisać swoje inicjały.

Za pomocą mikrokapilar nanieść wzorzec, próbę ślepą oraz ekstrakt roślinny na wyznaczone punkty. W celu przyspieszenia tego procesu można na utworzoną kropkę dmuchać. Po wyschnięciu należy czynność powtarzać aż do naniesienia roztworu o objętości 2/3 wysokości kapilary (około 20 μl). Po nałożeniu prób na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej umieścić ja w komorze zawierającej mieszaninę rozwijającą, w której nastąpi rozdział flawonoidów. Po rozwinięciu chromatogramu należy obejrzeć płytkę w UV o długościach fali kolejno 254 nm i 366 nm. Po obrysowaniu śladów flawonoidów. Płytki zostaną pokryte mieszaniną wywołującą, a następnie ogrzane w 120°C w celu wizualizacji flawonoidów. Po wyprażeniu płytek należy ponownie obejrzeć płytkę pod UV o długości fali 366 nm.

**Identyfikacja flawonoidów na podstawie analizy widma UV**

 Do probówki typu eppendorf 2,0 ml nanieść 200 μl uzyskanego ekstraktu flawonoidów i dodać 1,8 ml metanolu.

 Uzyskany roztwór przenieść do spektrofotometrycznej kuwety kwarcowej i dokonać pomiaru absorbancji w zakresie od 220 do 500 nm (tryb vavelnght scan). Uzyskane widmo absorpcyjne porównać z widmem uzyskanym w analogiczny sposób dla roztworu wzorcowego rutyny.

ZASADY BEZPIECZEŃSTWA PRZY EKSTRAKCJI ZWIĄZKÓW CZYNNYCH Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Podczas wykonywania ekstrakcji flawonoidów z tkanki roślinnej należy **zachować szczególną ostrożność**. Do izolacji związków czynnych z roślin wykorzystywany jest aceton oraz heksan, które zgodnie z zasadami bezpieczeństwa w karcie charakterystyki, zostały zaklasyfikowane jako produkty wysoce **łatwopalne, trujące, wybuchowe, szkodliwe, działające drażniąco** na oczy i drogi oddechowe. Izolację należy wykonywać **w rękawiczkach nitrylowych**, które nie ulegają rozpuszczeniu pod wpływem kontaktu z rozpuszczalnikami organicznymi.

oprac. mgr Max Rykaczewski, 2015, zmodyfikowane. Kopiowanie w całości lub części, tylko za zgodą autora.