

**МЕТОДЫ
ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА
ФЛАВОНОИДОВ ВЫСШИХ
РАСТЕНИЙ И ИССЛЕДОВАНИЯ
ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ
РИЗОБАКТЕРИЙ**

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского

**МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ФЛАВОНОИДОВ ВЫСШИХ
РАСТЕНИЙ И ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ
РИЗОБАКТЕРИЙ**

Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета,
обучающихся по направлению подготовки
06.03.01 «Биология»

Издательство Саратовского университета
2015

УДК 19.31
ББК 28.072я73+28.070я73
М54

Составители:

Коннова С.А., Каневский М.В., Алиева З.О., Шувалова Е.П.

**Методы выделения и анализа флавоноидов высших
М 54 растений и исследования их активности в отношении ризобактерий** / Сост. С.А. Коннова, М.В. Каневский, З.О. Алиева, Е.П. Шувалова – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2015. – 31 с. :ил.
ISBN 5-292-03368-5

В методическом пособии представлены лабораторные работы по биохимическим методам исследования вторичных метаболитов растений – флавоноидов, их активности в растительно-бактериальных взаимодействиях. Работы сопровождаются кратким освещением теоретических вопросов, раскрывающих принципы каждой методики, описанием хода исследования и способа представления результатов учебного эксперимента.

Для студентов, магистрантов и аспирантов дневного и заочного отделений биологического факультета. Пособие подготовлено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части (код проекта: 1287) и при частичной поддержке РФФИ проект № 14-04-01658).

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики биологического факультета
Саратовского государственного университета
Доктор биологических наук, профессор *С.А. Степанов*

Печатается по решению методической комиссии
биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 19.31
ББК
28.072я73+28.070я73

Работа издана в авторской редакции

© С.А. Коннова, М.В. Каневский,
З.О. Алиева, Е.П. Шувалова со-
ставление, 2015

Издательство Саратовского университета
2015

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологического факультета, обучающихся по специальности и направлению бакалавриата «Биология».

Пособие имеет целью познакомить читателя с основными методами выделения и исследования вторичных метаболитов растений фенольной природы – флавоноидов. Пособие должно стимулировать развитие у студентов навыков: самостоятельной работы с растительным и бактериальным биологическим материалом в лаборатории; изучения закономерностей химического строения и связанных с ним функциональных особенностей биологически активных веществ; использования аналитических методов в различных областях биохимии; критического анализа и применения полученных знаний к анализу причинно-следственных связей наблюдаемых явлений.

Пособие составлено в соответствии с программами по курсам «Взаимодействие растений и микроорганизмов», «Основы гликологии». Выполнение программы практикума поможет студенту самостоятельно решать небольшие практические задачи при помощи биохимических методов исследования.

Знакомство с пособием позволит студенту получить современные представления о методах исследования опосредованной вторичными метаболитами коммуникации организмов различных уровней организации, для формирования эффективных консорциумов и решения задач биотехнологии, сельскохозяйственной микробиологии и экологии.

ТЕМА 1. ЭКСТРАКЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Фенольные соединения являются гетерогенной группой вторичных метаболитов, которые широко распространены в растительном мире. Это группа гетероциклических природных фенольных соединений, представляющих собой различные производные бензо- γ -пирона, обычно в разных количествах содержатся во всех высших растениях. В настоящее время исследованы структуры более 10000 представителей класса флавоноидов, многообразие которых определяется следующими факторами: степенью окисленности гетерокольца; характером сочленения ароматических колец; степенью их конденсации, природой, положением и количеством заместителей; наличием оптически активных форм. В растениях флавоновые соединения, кроме катехинов и лейкоантоцианов, сравнительно редко встречаются в свободном состоянии. Подавляющее большинство их представлено в виде разнообразных гликозидов.

Флавоноиды привлекают внимание исследователей как физиологически активные вещества с разносторонним спектром действия. Флавоновые соединения изучают химики, фармакологи и клиницисты, физиологи и генетики растений, фитопатологи и другие специалисты.

Многочисленные исследователи занимаются установлением структуры и раскрытием полезных свойств флавоноидов, в частности фармакологической активности.

Флавоноиды – особая группа растительных соединений, проявляющих разнообразную функциональную активность: защита от ультрафиолетового излучения, регуляция транспорта фитогормонов, важная роль в привлечении животных для опыления и распространения плодов и семян, в хемоаттракции и стимуляции азотфиксации ризосферных бактерий, а также защите растений от патогенных организмов.

Флавоноиды растений в качестве сигнальных молекул играют важную роль при контактных взаимодействиях с другими растениями и микроорганизмами. Немаловажно, что флавоноиды способны защищать растения от патогенных организмов, и в то же время они являются аттрактантами для представителей полезной почвенной микрофлоры. Высказано предположение, что синтез флавоноидов мог эволюционно возникнуть в растениях в ответ на необходимость сигналов химической природы.

В настоящее время флавоноиды рассматривают как новый класс гормонов. Корни растений – экологическая ниша и источник питательных веществ для широкого спектра микроорганизмов. Отношения с микроорганизмами могут быть выгодными или пагубными для растения, несмотря на то, что механизмы их формирования подобны и связаны с синтезом флавоноидов. Универсальных решений по методам исследования количества флавоноидов в растениях и выделения флавоноидов из растительного сырья не существует. Это связано с разнообразием структур и как следствие различной растворимостью флавоноидов в воде и органических растворителях. В качестве экстрагента чаще всего используют метиловый или этиловый спирты или их смеси с водой. Как правило, сырье измельчают до равномерного гомогенного состояния (просеивают сквозь сито с определённым размером ячеек – № 2 или 3), заливают разнополярными экстрагентами в соотношении 1:10 (вода, 10, 30, 50, 70, 96 % спирт, ацетон и 50 % водный ацетон, этилацетат, хлороформ, бензол, пентан, гексан, гептан, толуол) и оставляют настаиваться в течение 1-3 дней при

комнатной температуре. Перечисленные экстрагенты позволяют извлекать весь спектр "возможных" фенольных соединений и их производных (гликозиды, агликоны, сложные эфиры, соединения, содержащие группы OH, C=O, COOH, NH(NH₂), жирного и ароматического ряда, неполярные и высокомолекулярные вещества).

Спиртосодержащие экстрагенты выполняют еще одну важную роль: ингибирование ферментных систем растений, что способствует сохранению нативности состава экстрактов корневых вторичных метаболитов фенольной природы.

Флавоноиды широко представлены в растениях гликозидами и агликонами. На практике, учитывая, что гликозиды хорошо растворимы в 70-80% этаноле, а агликоны в 90-95% этаноле, использование для экстракции этанола в убывающей концентрации позволяет более полно извлечь эти соединения из растительного сырья. Наиболее эффективна трехкратная дробная экстракция биомассы этиловым спиртом с последовательной сменой этанола 96, 70 и 40% концентраций в течение 40-60 минут. Ниже представлена процедура подготовки сырья, извлечения и анализа флавоноидов из корней на примере растений пшеницы.

Работа 1. Выращивание растений пшеницы в асептических условиях

В качестве объекта исследования используются растения пшеницы. Учитывая, что ряд микроорганизмов могут продуцировать вещества фенольной природы, для получения вторичных метаболитов растений без риска контаминации бактериальными и грибными метаболитами, пшеницу выращивали в асептических условиях. На предварительном этапе необходимо провести отбор семян пшеницы, выбрать зерновки без видимых сколов и повреждений и провести их стерилизацию.

Стерилизация семян

Многократно промыть необходимое количество семян водопроводной, затем дистиллированной водой.

1. Обработать семена 70% этиловым спиртом в течение 30 секунд, многократно промыть стерильной дистиллированной водой.

2. Обработать семена раствором диацида в течение 5 минут, а затем многократно промыть стерильной дистиллированной водой. Для приготовления диацида растворить отдельно 33 мг этанолртутихлорида и 66 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (по 30 мл), затем их смешать и довести объем жидкости до 100 мл, добавить несколько капель детергента твин-80; хранить в плотно закрытой колбе в темноте.

3. Для проверки стерильности и проращивания семян зерновки поместить на поверхность 1,5 % питательного агара (с гидролизатом кильки) в стерильные чашки Петри, инкубировать в течение 3 суток в климатокамере, при температуре 23°C и световом режиме – 16 часов день:8 часов ночь.

Выращивание растений в климатокамере

Трехдневные проростки без признаков бактериального и грибного инфицирования перенести в микробиологические пробирки с вертикально расположенными пластиковыми опорами с отверстиями для корней (рисунок 1).

Пробирки, для сохранения стерильности, закрыть ватно-марлевыми пробками.

Корни растений погрузить в предварительно проавтоклавированную при 120°C водную среду с макро- и микроэлементами. В качестве питательного раствора использовали среду Фареуса, следующего состава (г/л):

CaCl₂ – 0,1 г; MgSO₄×7H₂O – 0,12 г; KH₂PO₄ – 0,1 г; Na₂HPO₄×2H₂O – 0,15 г; цитрат железа – 0,005 г; Mn, Cu, Zn, B, Mo – в следовых количествах.

При помощи NaOH и H₂SO₄ реакцию среды довести до pH 6,5. Среду стерилизовать в автоклаве 20



Рисунок 1 – Пробирка для выращивания проростков пшеницы в стерильных условиях

минут при 120°C (1 атм). Выкладку семян проводить в ламинарном боксе, в стерильных условиях.

Выращивание растений проводить в климатоканере при температуре 23°C, и световом режиме – 16 часов день: 8 часов ночь, в течение 7 суток, считая от момента внесения семян в пробирки.

Выращивание растений

проводить в

климатоканере при

температуре 23°C, и

световом режиме – 16

часов день: 8 часов ночь, в

течение 7 суток, считая от

момента внесения семян в

пробирки.

Работа 2. Экстракция флавоноидов из растительного материала

Флавоноиды, как и другие фенольные соединения, являются субстратами ферментов-пероксидаз, активирующихся при поранении растений и при других воздействиях. Пероксидазы могут быть нейтрализованы немедленной обработкой растительного материала 96 % кипящим спиртом с последующей экстракцией флавоноидов. Корни растений для сохранности в них флавоноидов могут быть также лиофилизированы.

Лиофилизация — способ сушки веществ, при котором высушиваемый препарат замораживается, а потом помещается в вакуумную камеру, где и происходит возгонка растворителя без перехода в жидкое состояние. При таком способе высушивание происходит без воздействия высоких температур на препарат. Метод лиофилизации позволяет получать сухие ткани, препараты, продукты и т.п. без потери их структурной целостности и биологической активности.

В данном методическом пособии представлена методика выделения флавоноидов из свежевывращенного растительного материала — корней 7-суточных растений пшеницы.

Ход работы:

1. Навеску из измельченных корней растения предварительно взвесить, затем гомогенизировать растиранием в ступке с добавлением небольшого количества кварцевого песка.

2. Гомогенизированный растительный материал поместить в круглодонную колбу с обратным холодильником, залить 96% этиловым спиртом с расчетом 30 мл на 1 грамм сырья.

3. Содержимое колбы кипятить на водяной бане в течение 45-50 минут с момента закипания водно-спиртовой смеси. Не допускать утечки паров спирта при кипячении с обратным холодильником. По истечении времени, колбу с растительным материалом охладить до комнатной температуры.

4. Полученный экстракт профильтровать через фильтр Шотта (стеклянную воронку с пластинкой из пористого стекла) в чистую колбу.

5. Остаток растительного материала залить 70% этанолом, повторить пункты 2-4.

6. Затем процедуру повторить с добавлением 40% этанола.

7. Полученные в результате последовательной трехкратной экстракции водно-спиртовые извлечения перенести в круглодонную колбу со шлифом,

упарить досуха на роторном испарителе, при температуре не выше 40°C.
(правила работы на роторном испарителе см. Приложение 1).

8. Сухой остаток растворить в подогретом 80% этиловом спирте.

До использования экстракты хранить в холодильнике при –20 °С.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Работа 3. Исследование содержания фенольных соединений в экстрактах методом Фолина – Чокальтеу

Определение концентрации фенольных соединений проводится методом Фолина и Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси. Метод основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу, который можно приготовить в соответствии с прописью, приведённой ниже. Реактив состоит из соли фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. В щелочной среде эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, содержание которых оценивается спектрофотометрически.

Приготовление реактива Фолина-Чокальтеу:

100 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г молибденово-кислого натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и 700 мл дистиллированной воды поместить в круглодонную колбу.

Добавить 50 мл концентрированной ортофосфорной кислоты (85%) и 100 мл концентрированной соляной кислоты (38%), кипятить с обратным холодильником в течение 10 часов. Последовательно добавить 150 г сульфата лития (Li_2SO_4), 50 мл воды, несколько капель жидкого брома (Br_2) и продолжать кипятить ещё 15 минут для удаления излишков брома. Охладить, довести объём до 1 л и профильтровать.

Полученный реактив должен иметь соломенно-жёлтый цвет без оттенка зелёного. Наличие зелёного оттенка означает присутствие в нём продуктов реакции восстановления голубого цвета.

Реактив должен храниться хорошо защищённым от пыли, в тёмной склянке.

Ход работы:

1. Подготовить растительные экстракты для определения суммы фенольных соединений.

2. Развести реактив Фолина-Чокальтеу, в соотношении 1 часть реактива и 9 частей дистиллированной воды. Хранить в бутылке из темного стекла.

3. Приготовить раствор 80%-ного этанола. Количество 96% этанола для получения необходимого объема 80% этанола рассчитывается по формуле:

$$V_{96\%} = (V_{80\%} * 80) / 96,$$

где: $V_{96\%}$ - объем этанола, необходимый для получения нужного объема 80% этанола, $V_{80\%}$ - необходимый объем этанола.

4. Приготовить водный раствор Na_2CO_3 (7,5 %).

5. Построить калибровочную кривую для определения концентрации фенольных соединений в экстракте для чего:

5.1. Приготовить сток-раствор галловой кислоты (5 мг галловой кислоты растворить в 10 мл 80%-ного этанола).

5.2. В соответствии с таблицей в пробирки внести определенные объемы сток-раствора галловой кислоты и добавить 80% раствор этанола в объемах, необходимых для получения нужной концентрации. В первой пробирке – контроль на реактивы (см. Таблицу 1).

5.3. В каждую из пробирок внести 1,25 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу. Через 3 минуты (точно) добавить 1 мл 7,5% раствора Na_2CO_3 .

После добавления раствора Na_2CO_3 реакционная смесь приобретает синюю окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации

галловой кислоты в растворе. Построение калибровочной кривой выполняется как минимум в трёх повторностях. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа.

5.4. По истечению времени провести измерение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 765 нм. По результатам измерения оптической плотности растворов построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию галловой кислоты в мг/л, по оси ординат – оптическую плотность раствора.

Таблица 1 – Соотношения реактивов для построения калибровочной кривой по флавоноидам методом Фолина-Чокальтеу

Концентрация, мг/л	Объем сток-раствора галловой кислоты для приготовления пробы, мкл	Объем 80% этанола для приготовления пробы, мкл
Контроль, 0	0,0	250
25	12,5	237,5
50	25	225
100	50	200
150	75	175
200	125	125

Для измерения концентрации флавоноидов в экстрактах:

В пробирку поместить 0,25 мл исследуемого спиртового экстракта, в контрольную пробирку – 0,25 мл 80%-ного этанола и затем во все пробирки добавить по 1,25 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу, а через 3 минуты по 1,0 мл Na_2CO_3 .

Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа, после чего провести измерение оптической плотности на спектрофотомет-

ре при длине волны 765 нм. В качестве стандартного раствора использовать пробу «контроль».

Содержание фенольных соединений в экстракте определить с помощью калибровочной кривой: графика проходящего через начало координат и отражающего зависимость оптической плотности (ось ординат) полученных реакционных смесей от концентрации (ось абсцисс) содержащейся в них галловой кислоты.

Содержание внутриклеточных фенольных соединений в экстрактах рассчитать по формуле:

$$F = (C_F \times V \text{ экстракта}) / (m \times 1000),$$

где: F – общее содержание внутриклеточных фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса;

C_F – концентрация фенольных соединений, рассчитанная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности реакционных смесей, мг-экв галловой кислоты /л;

V экстракта – общий объём экстракта, мл;

m – масса навески, г;

1000 – коэффициент перевода л в мл (объёма экстракта).

ТЕМА 3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЛАВОНОИДОВ В СМЕСИ

Работа 4. Методы предварительной идентификации состава флавоноидов в растительном сырье с использованием ТСХ

В анализе веществ растительного происхождения наибольшее распространение получил метод хроматографии в тонких слоях сорбента. Преимущество данного метода перед хроматографией на бумаге в быстрой и более четком разделении. Флавоноиды идеально подходят для хроматографического анализа. Применение хроматографии с целью качественной характеристики фенольных соединений обусловлено различной растворимостью агликонов и их гликозидов в органических растворителях. Различная подвижность, сорбционная способность, а так же характерная окраска самих веществ в видимом и ультрафиолетовом свете до и после проявления различными хромогенными реагентами позволяют идентифицировать различные классы фенольных соединений.

Многие типы флавоноидов окрашены не ярко, что при небольших концентрациях веществ особенно затрудняет визуализацию. Исходя из этого пластины ТСХ сначала просматривают в УФ-свете, а затем для проявления веществ на хроматограммах часто используют реактивы: пары аммиака, в которых флавоноиды проявляются в виде темных пятен; пары йода, в которых флавоноиды окрашиваются в жёлто-коричневый цвет; опрыскивание хлористым алюминием, приводящее к изменению цветов пятен в УФ-свете: 5% спиртовой раствор хлористого алюминия с последующим нагреванием при 105 °С в течение 5 минут приводит к ярко-желтой окраске пятна флавоноидов в видимом свете и желто-зеленой флуоресценции – в УФ-свете; опрыскивание 5 %-ным раствором $SbCl_3$ в четыреххлористом углероде, при котором появляется желтая или желто-

оранжевая окраска, указывающая на наличие флавонов, флавонолов, флаванонов и изофлавонов, красная или красно-фиолетовая – халконов.

Существует взаимосвязь между строением и хроматографическим поведением флавоноидов: R_f снижается при увеличении количества гидроксильных групп в молекуле; метилирование гидроксильных групп приводит к повышению R_f ; ацетилирование может способствовать как повышению, так и понижению R_f ; гликозилирование обуславливает снижение R_f . Одним из наиболее широко используемых носителей для проведения ТСХ флавоноидов является силикагель. Пластины с тонким слоем силикагеля при подборе соответствующих систем растворителей позволяют успешно разделять самые разные типы веществ фенолового ряда.

Для освоения метода в предлагаемой работе будет использована смесь коммерческих препаратов флавоноидов, различающихся по гидрофобности, строению и свойствам. В качестве исследуемого раствора может быть использован спиртовой экстракт корней 7-ми суточных проростков пшеницы. Как носитель – металлическая пластина с тонким слоем силикагеля.

Ход работы:

1. Приготовить систему растворителей н-бутанол-уксусная кислота-вода в соотношении 1:4:5, залить смесь в хроматографическую камеру и оставить для насыщения парами элюента на 1-2 часа.

2. Подготовить пластинку (9x13 см) с тонким слоем сорбента для нанесения образцов: провести простым карандашом от края пластинки линию старта, отметить точки для дальнейшего нанесения проб, которые должны быть выше уровня растворителя, при помещении пластины в хроматографическую камеру.

3. На линию старта хроматографической пластинки нанести 0,1% растворы свидетелей (рутина, кверцетин, нарингенин) в виде пятен диаметром не более 3 мм, а также образцы спиртовых извлечений из корней.

4. Пластинку в течение 5 минут просушить на воздухе, затем поместить в камеру.

5. Когда фронт растворителя пройдет 11-12 см, пластинку вынуть из камеры, высушить в вытяжном шкафу до исчезновения запаха растворителей и идентифицировать в видимом и УФ-свете при длине волны 254 нм.

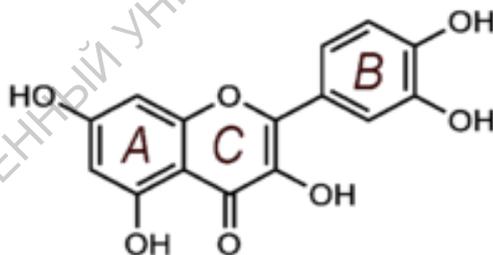
6. Затем хроматограмму опрыснуть 5% спиртовым раствором алюминия хлорида с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 3-5 минут. Пластинку рассмотреть в видимом и УФ-свете, отметить цвет пятен, рассчитать R_f .

7. Сравнить исследуемые и стандартные образцы в видимом и УФ-свете по величинам R_f и цвету пятен от действия специфических проявителей.

Следует иметь в виду, что в названной выше системе растворителей рутин обнаруживается в виде одного доминирующего пятна желтовато-коричневого цвета, переходящего после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ в коричневый (с $R_f=0,61-0,67$); кверцетин – в виде темно-желтого пятна, переходящего после обработки раствором проявляющего реагента в ярко-желтое (с $R_f=0,94-0,95$); нарингенин - в виде коричневого пятна, переходящего после опрыскивания раствором хлорида алюминия в ярко-зеленое (с $R_f=0,95-0,97$).

Работа 5. Анализ состава смесей флавоноидов спектрофотометрическим методом

Спектрофотометрический метод анализа наиболее часто используется для идентификации флавоноидов. Он основан на способности флавоноидов поглощать свет в УФ-области спектра. Метод позволяет установить сумму флавоноидов в присутствии других полифенольных соединений. К оптическому диапазону относят электромагнитные волны с длиной (λ) от 10^2 до 10^6 нм. Его разделяют на три области: ультрафиолетовую – (100-380-400 нм); видимую – (380-400-760 нм); инфракрасную (ИК) – (760- 10^6 нм). Для большинства флавоноидов характерно наличие поглощения с двумя основными максимумами: в районе 320-385 нм (полоса I), которое связано с присутствием в структуре молекулы флавоноида циннамоильной группировки, которая включает кольцо В и прилегающую к нему часть кольца С.



Формула кверцетина

Поглощение в районе 240-280 нм (полоса II) обусловлено бензоильной группировкой, включающей в себя кольцо А и прилегающую к нему часть кольца С. Наличие заместителей в циннамоильной или бензоильной части молекулы флавоноида приводит к сдвигам максимумов поглощения в ту, либо другую сторону. Подобные спектральные свойства позволяют получать предварительные данные о количестве и природе различных за-

местителей, встречающихся в структуре флавоноидов. Для фотометрирования мы используем спектрофотометр «LEKI SS2110UV».

(порядок работы на спектрофотометре см в Приложении 2).

Ход работы:

1. Приготовить спиртовые (96% C_2H_5OH) растворы коммерческих препаратов флавоноидов (рутина, кверцетина, нарингенина (Sigma)) в концентрации 5 мкг/мл.

2. Подготовить спектрофотометр «LEKI SS2110UV» к работе – прогреть, установить режим сканирования в пределах 190-500 нм, шаг сканирования – 1 нм, режим – «поглощение».

3. В кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см залить спиртовые растворы коммерческих препаратов флавоноидов (рутина, кверцетина, нарингенина (Sigma)) соответственно, в контрольную кювету – 80% этиловый спирт.

4. Поместить опытные и контрольную кюветы в кюветодержатель, по контрольной кювете установить «ноль».

5. Отсканировать и определить максимумы поглощения растворов коммерческих препаратов флавоноидов.

6. Оставить кювету с контролем в кюветодержателе, в опытные кюветы вместо спиртовых растворов коммерческих препаратов флавоноидов залить спиртовые экстракты корней.

7. Отсканировать и определить максимумы поглощения спиртовых растворов экстрактов корней.

8. Сопоставить максимумы поглощения всех образцов, выявить совпадения областей поглощения исследуемого материала со стандартными образцами флавоноидов, сделать выводы о наличии фенольных соединений в исследуемом экстракте. При соответствии всех пиков, идентифицировать флавоноиды в экстрактах с использованием коммерческих препаратов в качестве стандартов.

ТЕМА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДОВ

Работа 6. Определение бактериостатической активности флавоноидов методом радиальной диффузии

Среди биологической активности различных флавоноидов распространена бактерицидная активность, которая при высоких концентрациях флавоноидов может сопутствовать другим типам биологической активности фенольных соединений. Для определения бактериостатической активности флавоноидов методом радиальной диффузии препаратов флавоноидов в агаризованую среду необходимо приготовить:

1. Твёрдую (1,8% агара) питательную среду LB следующего состава:

Компоненты среды на 1000 мл, в г

Пептон	10
Дрожжевой экстракт	5
NaCl	5

2. Растворы флавоноидов в диметилформамиде (ДМФА) с диапазоном концентраций 1 – 10 мг/мл.

Среду разлить в стерильные чашки Петри. По застывании среды в агаре сделать лунки диаметром до 3 мм. В лунку поместить 20 мкл раствора исследуемого флавоноида в ДМФА. Дать раствору впитаться в среду. Поверх агара газоном высеять изучаемые культуры микроорганизмов. Использовать взвесь каждой культуры, приготовленную по стандарту мутно-

сти с концентрацией 10^6 клеток/мл. Чашки с культурами инкубировать в течение суток при оптимальной температуре роста. По ширине зон отсутствия роста сделать выводы об уровне бактериостатической активности исследуемого препарата.

Работа 7. Определение бактериостатической активности флавоноидов методом оценки роста бактерий в жидкой среде

Для определения бактериостатической активности флавоноидов методом оценки роста бактерий приготовить жидкую среду МС следующего состава:

Компоненты среды на 1000 мл в г:		
Фосфатный буфер	KH_2PO_4	2
	K_2HPO_4	3
	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	4
	NaCl	0,1
Солевая основа	CaCl_2^*	0,02
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,002
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}^*$	0,2
	$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
Источник углерода	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	5
	Яблочная кислота	
Источник азота	NH_4Cl	2,5

* – Соли кальция и магния готовятся отдельно, в отдельных колбах, в 10 мл растворяют 2 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г CaCl_2 , затем стерилизуют и добавляют непосредственно перед посевом культуры в колбу из расчёта 100 мкл на 100 мл среды.

При помощи 10 М NaOH реакцию среды довести до pH 6,6–6,8.

Непосредственно перед стерилизацией в среду добавить 1 мл раствора витаминов на 1 л среды. Витамины готовили отдельно:

Компоненты среды на 1000 мл в г	
Тиамин	0,04
Биотин	0,05
Пиридоксаль	0,02

В среду добавляли раствор хелата железа из расчёта 10 мл на 1 л среды. Хелат железа готовили следующим образом:

Компоненты среды на 500 мл в г	
FeSO ₄	1
НТК (Нитрилтриуксусная кислота)	2,8

Среду разлить по 5 мл в биологические пробирки. В каждую пробирку внести растворы флавоноидов и инокулят исследуемой культуры. Инокулят вносить в таком количестве, чтобы оптическая плотность раствора составляла 0,2-0,25 (D_0) при $\lambda = 600$ нм. Пробирки с культурами инкубировать в течение суток при оптимальной температуре роста.

Измерить оптическую плотность культур ($D_{\text{культуры}}$) при $\lambda = 600$ нм. Отцентрифугировать. Измерить оптическую плотность супернатанта – культуральной жидкости ($D_{\text{КЖ}}$). Сравнить разность ($D_{\text{культуры}} - D_{\text{КЖ}}$) с начальной оптической плотностью (D_0), сделать вывод о бактериостатической активности исследуемого препарата.

Работа 8. Очистка бактериальных полисахаридов от флавоноидов

Данный метод может быть применён не только для очистки гликополимеров поверхности бактерий, но и для экстракции флавоноидов из культуральной жидкости.

При помощи HCl (25%) реакцию среды раствора, содержащего флавоноиды, довести до pH 1. В полученный раствор добавить этилацетат в соотношении 5:1. В делительной воронке интенсивно встряхивать смесь в течение 5 минут и оставить до расслоения. Водный слой повторно обработать этилацетатом, а органический – водой. Объединённые водные и органические слои сконцентрировать методом ротационного упаривания.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНА И.И. ШУВАЛОВА

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Устройство и правила работы на роторном испарителе

Роторный испаритель (ротационный испаритель) — лабораторный прибор, предназначенный для автоматизации перегонки жидкостей при уменьшенном давлении. Широко применяется в химических лабораториях для упаривания растворителей из смесей веществ, а также для разделения жидкостей.

Роторный испаритель состоит из стеклянной трубки со шлифом, к которому присоединяется перегонная круглодонная колба со шлифом **А**, нагреваемая водяной баней **Б** - нагрев при помощи водяной бани увеличивает давление пара растворителя и также ускоряет испарение. Двигатель **В** приводит колбу во вращение, что позволяет увеличить поверхность жидкости, которая в виде тонкой плёнки смачивает стенки колбы, и тем самым уменьшить время перегонки и мощность нагрева. Пары растворителя поступают в обратный холодильник **Г**, где охлаждаются и конденсируются, стекая в колбу-приёмник **Д**. В верхней части обратного холодильника предусмотрен кран **Е** для откачки воздуха или быстрого сброса вакуума в системе.

Скорость вращения (**1**), сила нагрева (**2**) и индикатор включения водяной бани (**3**) обычно регулируются при помощи элементов управления на панели роторного испарителя.

Понижение температуры кипения растворителя за счёт создания в его системе пониженного давления при помощи водоструйного или вакуумного насоса позволяет удалять растворитель из раствора при более низкой температуре, избегая побочных реакций, которые могут протекать при нагревании смеси. Растворённое вещество при этом остаётся в перегонной колбе, а в колбу-приёмник собирается практически весь упаренный растворитель.



Устройство роторного испарителя
Марки Heidolph

Правила работы на роторном испарителе Heidolph:

1. Включить водяное охлаждение (подать воду в систему охлаждения прибора – обратный холодильник)
2. Включить насос. Включить питание прибора. Включить нагревательную баню и ручкой регулировки температуры бани установить необходимую температуру
3. Во избежание образования пены и выплёскивания содержимого колбы для выпаривания в колбу-приёмник добавить каплю октанола
4. Закрепить колбу для выпаривания на пароотводной трубке, не отпуская колбу, закрыть запорный кран подачи воздуха, после чего колбу для выпаривания можно отпустить
5. Опустить колбу в водяную баню при помощи рычага подъёмного механизма. Ручкой регулировки вращения установить скорость вращения колбы на 80-120 об/мин
6. После упаривания до необходимого объёма повернуть ручку скорости вращения колбы на 0. При помощи рычага подъёмного механизма поднять колбу над водяной баней. Придерживая колбу, включить подачу воздуха (открыть запорный кран) и снять колбу с пароотводной трубки
7. Выключить нагревательную баню
8. Выключить питание прибора
9. Выключить подачу воды
10. Через 20 мин выключить насос

Приложение 2. Устройство и правила работы на спектрофотометре LEKIsan-Pro

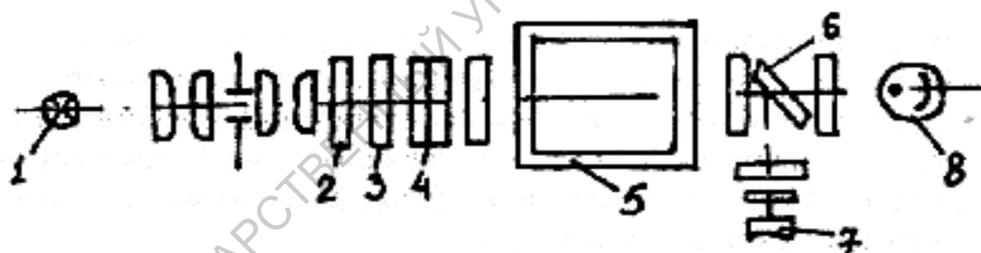
Определение концентрации веществ в растворе с помощью спектрофотометрических приборов основано на способности растворов поглощать часть световой энергии при прохождении через них пучка света. Явление поглощения света описывает закон Ламберта-Бера:

$$D = C \times L,$$

где D – оптическая плотность раствора (экстинкция); C – концентрация растворенного вещества; L – толщина слоя раствора. Таким образом, экстинкция прямо пропорциональна толщине слоя и концентрации раствора.

Принцип работы спектрофотометра

Спектрофотометры предназначены для измерения оптической плотности прозрачных растворов (колориметрия), а также изучения зависимости оптической плотности от длины волны в диапазоне видимого света, ультрафиолетового и инфракрасного излучений. Принципиальная оптическая схема спектрофотометра представлена на рисунке:



- 1 — источник света; 2 — теплозащитный светофильтр;
3 — нейтральный светофильтр; 4 — цветной светофильтр;
5 — кювета с исследуемым раствором или раствором сравнения;
6 — пластина, которая делит световой поток на два потока;
7 — фотодиод; 8 — фотозв элемент

Пучок света от источника 1, проходя сквозь различные светофильтры 2-4, попадает на кюветы и, проходя сквозь них, попадает на фотозв элемент 8. В качестве источников света используются дейтериевые и галогеновые лампы.

Правила работы на спектрофотометре LEKIsan-Pro:

1. Для включения спектрофотометра необходимо нажать кнопку питания, которая расположена на левой боковой панели внизу.

2. Прибор автоматически начнёт самонастройку, прогрев, которые занимают 20-25 минут. По истечении этого времени прибор издаст 3 коротких звуковых сигнала и на дисплее высветится главное меню.

* Если за указанное время калибровка не произошла, перезагрузить прибор (выключить и повторно включить через 1 минуту).

3. Для выбора режима используется цифровая клавиатура.

4. Для выключения прибора надо выйти в главное меню и нажать кнопку питания, которая расположена на левой боковой панели внизу.

Basic mode (стандартный режим)

Стандартный режим позволяет измерять оптическую плотность, поглощение, пропускание. Для выбора режима нажмите на цифровой клавиатуре 1 в главном меню прибора.

1. Для выбора режима измерения нажать «F2», при помощи стрелок вправо и влево выбрать нужный режим: Abs – оптическая плотность, T% - пропускание.

2. Для выбора длины волны нажать на клавишу «SET λ », затем при помощи цифровой клавиатуры задать необходимое значение, нажать «ENTER».

3. Установить кювету с контрольной пробой в кюветодержатель на пути прохождения светового луча.

4. Для обнуления нажать клавишу «ZERO» на клавиатуре.

5. Установить кювету с исследуемым раствором в кюветодержатель. На дисплее высветится значение.

6. Для выхода из режима нажать «Esc/Stop».

Справочные материалы

Таблица 2 – Количество крепких кислот, необходимое для приготовления 1Н водных растворов

Формула	Г-эквивалент	Удельный вес	Концентрация кислоты в %	Кол-во кислоты в мл, необходимое для приготовления 1Н раствора
HCL	36,454	1,175	35,0	88,6
			37,2	82,4
H ₂ SO ₄	49,003	1,84	98,0	27,2
HNO ₃	63,01	1,27	42,9	118,0
CH ₃ COOH	60,02	1,05	100,0	57,0
HClO ₄	100,47	1,76	57,0	10,2

Формула для подсчёта

$$X \text{ (мл)} = \frac{\text{Г-экв} \times 100}{\text{уд. вес} \times \text{конц. кислоты}}$$

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
ТЕМА 1. ЭКСТРАКЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	5
Работа 1. Выращивание растений пшеницы в асептических условиях	7
Работа 2. Экстракция флавоноидов из растительного материала	9
ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	12
Работа 3. Исследование содержания фенольных соединений в экстрактах методом Фолина – Чокальтеу	12
ТЕМА 3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЛАВОНОИДОВ В СМЕСИ	16
Работа 4. Методы предварительной идентификации состава флавоноидов в растительном сырье с использованием ТСХ.....	16
Работа 5. Анализ состава смесей флавоноидов спектрофотометрическим методом ..	19
ТЕМА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДОВ.....	21
Работа 6. Определение бактериостатической активности флавоноидов методом радиальной диффузии.....	21
Работа 7. Определение бактериостатической активности флавоноидов методом оценки роста бактерий в жидкой среде.....	22
Работа 8. Очистка бактериальных полисахаридов от флавоноидов	24
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	25
Приложение 1. Устройство и правила работы на роторном испарителе.....	25
Приложение 2. Устройство и правила работы на спектрофотометре LEKIsan-Pro...	27
Справочные материалы	29
СОДЕРЖАНИЕ	30

Учебное издание

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ФЛАВОНОИДОВ ВЫСШИХ
РАСТЕНИЙ И ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ
РИЗОБАКТЕРИЙ

Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета, обучающихся по направлению подготовки
020400 «Биология»

Составители:

Коннова С.А., Каневский М.В., Алиева З.О., Шувалова Е.П.

Подписано в печать

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс. Печать офсетная.

Усл.печ.л. 3,49(3,75). Уч.-изд.л. 3,3. Тираж 300 экз. Заказ

Издательство Саратовского университета.

410012, Саратов, Астраханская, 83.

Типография Издательства Саратовского университета.

410012, Саратов, Астраханская, 83.