دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دانشکده داروسازی

گروه فارماکوگنوزی

# راهنمای آزمایشگاه فارماکوگنوزی

سال تحصیلی ۹۶-۹۵

بنام خدا

مقررات کار در آزمایشگاه

لطفاً نکات زیر را بدقت مطالعه و اجرا نمائید.

۱- به طور مرتب و در ساعات تعیین شده در آزمایشگاه حاضر شوید.

۲- برای ورود به آزمایشگاه پوشیدن روپوش الزامیست.

۳- قبل از شروع به کار، دستور العمل مربوط به آن را بدقت مطالعه کنید و بعد از پایان کار عملی در هر جلسه نتایج آزمایش هر جلسه را بصورت کتبی تهیه کنید و در همان جلسه به مسئول آزمایشگاه تحویل دهید.

۴- قبل از استفاده از هرگونه مواد شیمیایی برچسب روی شیشه را بدقت بخوانید.

۵- درب شیشه حاوی مواد شیمیایی را بلافاصله پس از استفاده ببندید و آنرا در جای خود قرار دهید.

۶- مواد شیمیایی اضافی را که در بشر یا وسیله دیگری باقی مانده است به شیشه اولیه آن برنگردانید.

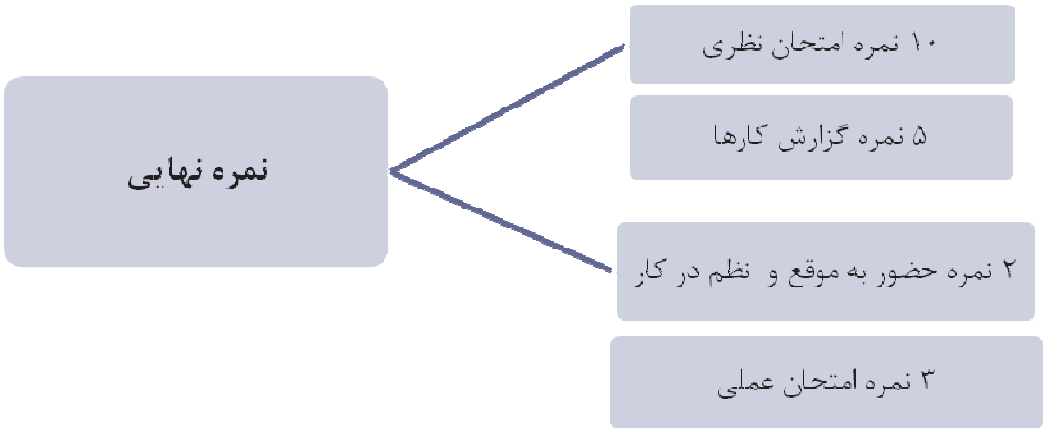
۷- هر گاه روی میز یا کف آزمایشگاه و یا لباس کار خودتان مواد شیمیایی ریخت فوراً آنرا با مقدار زیادی آب بشوئید تا کاملاً پاک شود.

۸- اگر هرگونه حادثه ای برای شما رخ داد، جریان را به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.

۹- برای کار کردن با مواد، گازها و حلال های بودار و سمی حتماً باید آزمایش را در محفظه مجهز به هواکش (هود) انجام دهید.

۱۰-رسوبات و کاغذ صافی را در سطل مخصوص زباله بریزید.

۱۱-قبل از ترک آزمایشگاه وسائل و میز خود را کاملاً تمیز نمائید.



## تعیین مقدار ضریب تورم (Swelling Index)

تعدادی از مواد گیاهی دارویی، خصوصاً صمغ ها و نیز آنهایی که دارای مقادیر مناسبی از موسیلاژ، پکتین و همی سلولز هستند، مصارف دارویی یا درمانی خاصی بخاطر خواص متورم شدنشان دارند. ضریب تورم عبارت از حجم اشغال شده به میلی لیتر است که یک گرم از مواد گیاهی در شرایط مخصوص، متورم شده باشد. این تعیین مقدار بر اساس افزودن آب به یک مادهٔ گیاهی (خواه گیاه تام، خرد شده یا پودر شده) است. در این آزمایش از یک استوانه مدرج درب دار و شیشه ای استفاده شده و مواد گیاهی در آن بمدت یک ساعت مکرراً تکان داده می شوند و سپس مهلت می یابند تا زمان خاصی بیحرکت بمانند. آنگاه حجم مخلوط (به میلی لیتر) خوانده می شود. ابعاد استوانه مدرج خصوصاً قطر داخلی و قسمت درجه بندی شده باید مشخص باشد. مخلوط کردن مواد گیاهی تام با آب به آسانی انجام می شود ولی در مورد مواد خرد یا پودر شده، به تکان دادن شدید نیاز است که مواد گیاهی کاملاً در آب پخش و پراکنده شوند. آزمایش باید در مورد هر ماده حداقل ۳ بار تکرار شود.

### روش کار

یک گرم اسفرزه (*Plantago ovata*) و یک گرم قدومه (*Allysum compstr*) را دقیقاً وزن کرده و جداگانه در دو استوانه مدرج با شرایط زیر منتقل کنید:

قطر داخلی آن حدود ۱۶mm، از ۰ تا ۲۵ml روی آن مدرج و تا ۰/۲ml را هم بتواند اندازه بگیرد.

۲۵ml آب مقطر اضافه کنید و مخلوط را هر ۱۰ دقیقه یکبار تا یک ساعت تکان دهید.

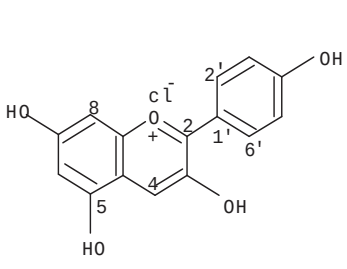
سپس صبر کنید تا ۳ ساعت در حرارت آزمایشگاه ثابت بماند.

حجم اشغال شده توسط موادگیاهی را به ml اندازه بگیرید. حجم متوسط هر بار اندازه گیری را برای یک گرم ماده گیاهی محاسبه کنید.

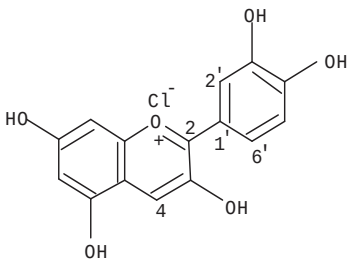
# تجسس آنتوسیانین ها

آنتوسیانین ها مهمترین و فراوان ترین پیگمان های موجود در گیاهان می باشند که همگی در آب محلول بوده و رنگ های قرمز، ارغوانی، بنفش، آبی و صورتی گیاهان را تشکیل می دهند. در اثر افزایش تعداد استخلاف های هیدروکسیل موجود در مولکول آنتوسیانین، رنگ حاصله تیره تر می گردد. بعنوان مثال پلارگونیدین نارنجی مایل به قرمز، سیانیدین قرمز تیره و دلفینیدین آبی مایل به قرمز می باشد. آنتوسیانیدین ها را میتوان با محلول سرد ۱٪ اسید کلریدریک استخراج کرد. رنگ آنتوسیانین ها در pH های مختلف از قرمز تا آبی متغیر است. در pH اسیدی رنگ آنتوسیانین ها قرمز، در pH نرمال بنفش و در pH قلیائی آبی است. این مواد در pH اسیدی فرم کاتیونی و در pH قلیائی فرم آنیونی دارند. لکوآنتوسیانین ها را می توان ضمن گرم کردن نمونه ای از بافت گیاهی با محلول ۲ نرمال اسیدکریدریک در پروپانول بمدت ۱۵-۳۰ دقیقه تشخیص داد، تولید رنگ قرمز یا بنفش که بتدریج قوی تر می گردد نشانه مثبت بودن واکنش است.

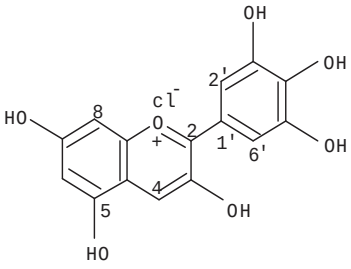
کاتشین ها با کلرید فریک تولید رنگ آبی یا سبز می نمایند ولی این آزمایش اختصاصی نیست. از اینرو با استخراج مواد گیاهی بوسیله بنزن و سپس اتر می توان عصاره غنی از کاتشین بدست آورد که پس از کروماتوگرافی و مجاور نمودن کروماتوگرام با محلول ۳٪ الکلی اسید پارا- تولوئن سولفونیک و گرم کردن، تولید لکه های زرد رنگی می گردد که نشانه وجود کاتشین است.



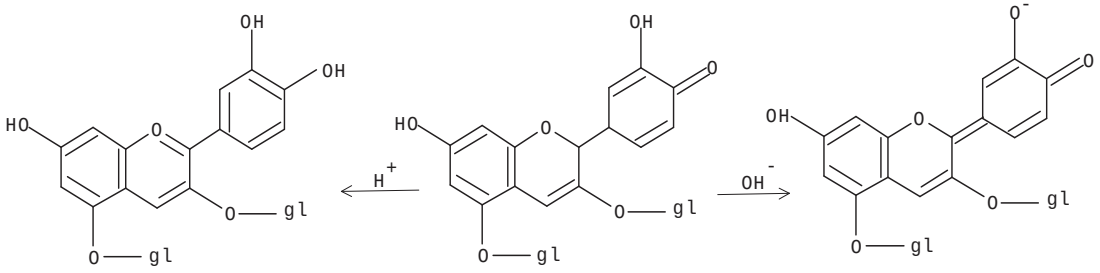
Pelargonidin chloride



Cyanidin chloride



Delphinidin chloride



(pH<3, Red)

(pH=8.5, violet)

(pH<1, Blue)

**شناسایی آنتوسیانین ها**

آنتوسیانین ها بر حسب pH محیط تغییر رنگ می دهند، در محیط اسیدی، قرمز بنفش و در محیط قلیائی، آبی و یا سبز می گردند. آزمایش مربوط نشان دهنده تغییر رنگ آنتوسیانین ها بر حسب pH های متفاوت می باشد. به نظر می رسد که رنگ قرمز به علت تولید فرم کاتیونی آنتوسیانین ها است، در حالیکه رنگ آبی حالت آنیونی را نشان می دهد.

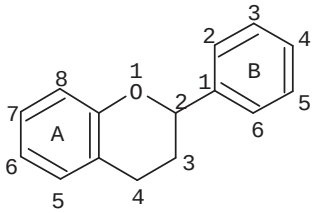
**روش کار**

برای انجام آزمایش مقدار ۱۰ گرم از کلم قرمز شسته شده را به قطعات کوچک تقسیم کرده و در ۱۰۰ml آب بریزید. پیگمان های کلم قرمز را بوسیله جوشانیدن بمدت ۱۵ دقیقه استخراج و حاصل را در یک ظرف مدرج ریخته و حجم آنرا به ۵۰ml برسانید، ۲ml از محلول فوق را در هر یک از ۱۸ لوله آزمایش که محتوی بافر می باشند، بریزید و رنگ های حاصل را ملاحظه کنید. محلول های بافر را طبق جدول زیر در لوله های آزمایش بریزید تا pH های مناسب بدست آیند:

| pH | ml/$Na_3PO_4$ 0.15M | ml/$K_2HPO_4$ 0.15M | ml/$KH_2PO_4$ 0.15M | ml/HCl 0.1M | ml/NaOH 0.1M | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | - | - | 0.5 | 9.5 | - | 1 |
| 3.6 | - | - | 9.5 | 0.5 | - | 2 |
| 4.7 | - | - | 10 | - | - | 3 |
| 5.6 | - | 0.5 | 9.5 | - | - | 4 |
| 5.9 | - | 1 | 9 | - | - | 5 |
| 6.2 | - | 2 | 8 | - | - | 6 |
| 6.5 | - | 3 | 7 | - | - | 7 |
| 6.6 | - | 4 | 6 | - | - | 8 |
| 6.8 | - | 5 | 5 | - | - | 9 |
| 7 | - | 6 | 4 | - | - | 10 |
| 7.2 | - | 7 | 3 | - | - | 11 |
| 7.4 | - | 8 | 2 | - | - | 12 |
| 7.7 | - | 9 | 1 | - | - | 13 |
| 8 | 5.5 | - | 4.5 | - | - | 14 |
| 9.8 | 5 | - | 5 | - | - | 15 |
| 10.7 | 7 | - | 3 | - | - | 16 |
| 11.2 | 7 | 3 | - | - | - | 17 |
| 14 | - | - | - | - | 10 | 18 |

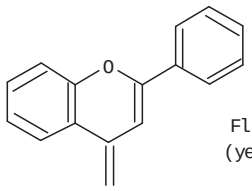
# تجسس فلاونوئیدها

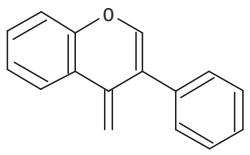
گلوکزیدهای فلاونی و آگلیکونهای آنها را اغلب به نام فلاونوئیدها می نامند. نام آنها از لغت Flavus به معنی زرد گرفته شده و سابقاً ترکیبات طبیعی زرد رنگ را به عنوان فلاونوئید می شناختند. فلاونوئیدها از پیگمان‌های گیاهی بوده که از نظر ساختمانی از مشتقات فلاوان (Flavan) هستند و همگی دارای خواص مشابهی می باشند. تاکنون حدود ۱۰ دسته مختلف فلاونوئید تشخیص داده شده است. آگلیکون های این ترکیبات ساختمان های متفاوتی داشته ولی هسته اصلی آنها دارای ۱۵ کربن است و به صورت $C_6$-$C_3$-$C_6$ نشان داده می شوند:

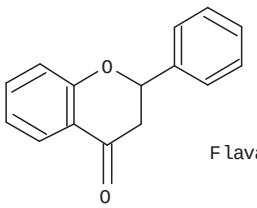


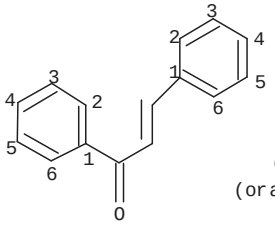

Flavan = 2 phenyl chroman

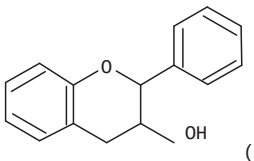
این مواد در گروه های مختلف فلاون ها، ایزوفلاون ها و فلاونون ها، کاتشین ها، آنتوسیانین ها، اورون ها، چالکون ها و ... قرار می گیرند:

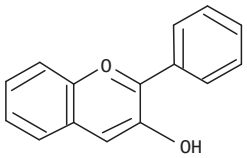

Flavone
(yellow)

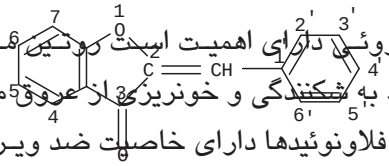

Isoflavone
(yellow)


Flavanone


Chalcone
(orange and red)


Catechin
(flavon-3-0l)


anthocyanin
(Red to Blue)


aurone

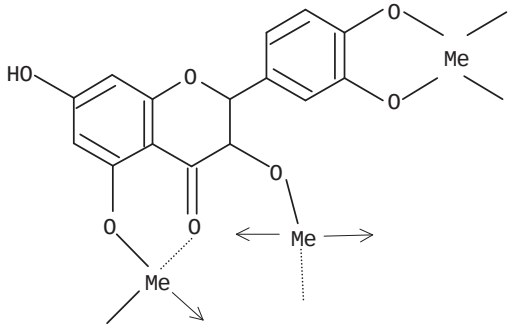
مهمترین ماده فلاونوئیدی که از نظر داروئی دارای اهمیت است روتین می باشد، روتین و هسپریدین را در درمان بیماری های مربوط به شکنندگی و خونریزی از عروق مویین به کار می برند. در سال های اخیر نشان داده شده که فلاونوئیدها دارای خاصیت ضد ویروس، ضدالتهاب و ضدسرطان می باشند، از اینرو تحقیقات دامنه داری روی این مواد انجام گرفته است.

فلاونوئیدها درگیاهان به حالت گلوکزید و به صورت ترکیب با قندها پراکنده می باشند. هر آگلیکون فلاونوئیدی ممکنست در گیاهان به صورت گلوکزیدهای مختلف وجود داشته باشد. به طور کلی این ترکیبات را می توان در تمام اندام های گیاهی تشخیص داد، گل ها و میوه ها و برگ ها حاوی گلوکزیدهای فلاونی بوده در حالی که قسمت های چوبی شده گیاهان دارای آگلیکون فلاونوئیدی هستند.

این اجسام در آب محلول بوده و می توان آنان را به آسانی با الکل استخراج نمود. بهترین حلال برای استخراج فلاونوئیدها از بافت های گیاهی متانول یا اتانول می باشد، این موارد در اثر مجاورت با قلیاها و آمونیاک تغییر رنگ میدهند.

آزمایش مهمی که جهت تشخیص فلاونوئیدها به کار می رود به نام **واکنش سیانیدین** نامیده می شود. اساس این واکنش روی هسته گاما بنزوپیرون قرار دارد. برای این واکنش هرگاه به عصاره الکلی حاوی فلاونوئیدها اسید کلریدریک غلیظ و کمی براده منیزیم افزوده شود بسته به نوع فلاونوئید موجود، رنگ های مختلفی ممکنست حاصل گردد. رنگ معمولاً پس از ۱-۲ دقیقه تشکیل شده و شدت آن بستگی به غلظت فلاونوئید دارد.

در واکنش سیانیدین فلاونول ها، نارنجی تا قرمز و فلاون ها، قرمز تا قرمز تند و فلاونون ها، قرمز تند تا قرمز آتشی می گردند. گزانتون ها با واکنش سیانیدین جواب مثبت می دهند. چالکون ها و اورون ها با واکنش سیانیدین جواب مثبت نمی دهند. مکانیسم این واکنش تشکیل ترکیبات کمپلکس با املاح فلزات سنگین مثل املاح آلومینیوم، منیزیم و روی می باشد.




## روش کار

### تجسس فلاونوئیدها

۱- ۳ گرم علف چای را با ۳۰ میلی لیتر متانول روی بن ماری حرارت داده تا حجم نصف گردد و سپس صاف کنید، صاف شده را مجدداً تا تبخیر کامل حلال روی بن ماری حرارت دهید.

۲- روی عصاره الکلی خشک شده کمی اتردوپترول ریخته، همراه با هم زدن و کمی حرارت ملایم، مخلوط و سپس صاف کنید. عمل استخراج با اتردوپترول را تکرار کرده تا محلول استخراج شده (عصاره اتری) تقریباً بیرنگ گردد. عصاره اتردوپترولی حاوی کلروفیل، رزین ها، چربی و ... می باشد و رسوب حاصل دارای فلاونوئیدها است.

۳- رسوب را در ۱۰ml اتانول ۸۰ درصد حل کرده و سپس صاف نموده، مقدار ۱-۲ ml از صاف شده را در دو لوله آزمایش بریزید.

۴- به یکی از لوله ها مقدار ۰/۵ ml اسید کلریدریک غلیظ و ۱۰mg-۲۰ (نوک اسپاتول) برااده منیزیم بیافزائید.
۵- رنگ های حاصل را در طی ۱۰ دقیقه ملاحظه نمائید. همچنین به رنگ های تولید شده در قسمت کف لوله توجه کنید.
۶- در صورتیکه رنگ مشخصی حاصل گردد لوله سرد کرده و با ۲ml مخلوط مساوی آب و آمیل الکل مخلوط و به شدت تکان دهید و سپس بگذارید تا فازها از یکدیگر جدا گردند. وارد شدن رنگ در فاز آمیل الکلی تائیدی بر وجود ماده فلاونوئیدی می باشد.

# تجسس آلکالوئیدها

به طورکلی آلکالوئیدها ترکیبات آلی ازت داری هستند که اکثراً در گیاهان وجود داشته و تعدادی از آنها نیز در حیوانات یافت می شوند.
آلکالوئیدها به علت دارا بودن عامل آمین اغلب دارای خاصیت بازی هستند و ازت آنها بیشتر در حلقه قرار می گیرد به غیر از بعضی از ترکیبات مثل افدرین و کلشی سین که از این قاعده مستثنی می باشند.

**موارد استعمال**

خاصیت فارماکولوژی آلکالوئیدها بسیار متفاوت می باشد. بعضی مانند مرفین و کدئین ضددرد و مخدر هستند در حالیکه گروه دیگری مانند استریکنین و بروسین محرک سلسله اعصاب مرکزی می باشند؛ آتروپین و هوماتروپین خاصیت میدریاتیک دارند، در حالیکه رزرپین فشار خون را پائین می آورد. در حقیقت آلکالوئیدها قادرند که انواع مختلف فعالیت های فیزیولوژیک را باعث شوند.

**شناسایی کیفی آلکالوئیدها**

آلکالوئیدها در گیاهان معمولاً به صورت نمک و بازهای آزاد یافت می شوند، مواد طبیعی که همراه آنها مشاهده می شوند، اکثراً اسیدهای گیاهی (مثل اسید اگزالیک و مالیک) و تانن ها هستند که جهت شناسایی اختصاصی آلکالوئیدها این مواد قبلاً بایستی جدا گردند.
آلکالوئیدها دارای خواص فیزیکی و شیمیایی مشترک زیادی می باشند، اغلب در آب غیرمحلول یا کم محلول هستند و با اسیدها تولید املاح محلول در آب می نمایند. آلکالوئیدهای آزاد به صورت باز در اتر و کلروفرم محلولند، ولی املاح آنها در این حلال ها غیر محلولند و بدین وسیله آلکالوئیدها را می توان جدا، خالص و تعیین مقدار نمود. جهت استخراج آلکالوئیدها معمولاً از اسید رقیق و الکل استفاده شده و بعد از صاف نمودن، آنها را به صورت نمک از عصاره ها بدست می آورند. این ترکیبات در اثر قلیایی کردن عصاره ها به کمک قلیائی کننده هایی مثل آمونیاک به صورت باز آزاد در آمده و توسط حلال های آلی مثل کلروفرم و اتر قابل استخراج و از مواد دیگری که محلول در آب هستند، جداسازی می شوند. به طور کلی به عنوان ماده قلیایی کننده بیشتر از آمونیاک استفاده می شود، قلیایی کننده های دیگر مثل سود در بعضی از موارد باعث جدا شدن استر آلکالوئیدها (مثل آتروپین و رزرپین) و یا تشکیل فنولات (مثل مرفین و کفالین) شده و به صورت محلول در آب مشاهده می شوند.
برای شناسایی آلکالوئیدها از معرف هایی استفاده می شود که با آنها ایجاد رسوب می نمایند. آلکالوئیدها مانند سایر آمین ها تشکیل املاح مضاعف با ترکیبات جیوه، طلا و پلاتین و سایر فلزات سنگین را می نمایند. این املاح مضاعف اغلب به حالت رسوب هستند و مقداری از آنها قابل تشخیص به روش میکروکریستالوگرافی می باشند. همچنین آزمایش های شیمیایی اختصاصی تری را می توان برای تعیین یک دسته آلکالوئید خاص بکار برد.

محلول های بازی استخراج شده آلکالوئیدها را پس از تبخیر حلال مورد نظر در ۱ تا ۲ قطره اسیدکلریدریک حل کرده و آنها را به صورت نمک های هیدروکلراید در آورده و توسط معرف ها شناسایی می شوند، به طور کلی بر اساس خواص این معرف ها می توان حضور یا عدم حضور آلکالوئیدها را بررسی نمود.

ضمناً قابل توجه است که برای بهتر شناسایی کردن آلکالوئیدها می بایستی همیشه از دو معرف استفاده نمود. مهمترین معرف هایی که جهت شناسایی آلکالوئیدها استفاده می شود عبارتند از: محلول ید (معرف واگنر) ($KI.I_2$)، معرف مایر ($K_2HgI_4$)، معرف دراژندورف ($KBiI_4$) و اسید پیکریک (۲،۴،۶- تری نیتروفنل).

به طور کلی به کمک معرف ها می توان با توجه به رسوب و تغییر رنگی که با آلکالوئیدها حاصل می کنند آنها را شناسایی کرد.

## روش کار

هدف از این آزمایش های جستجوی وجود آلکالوئیدها و در صورت موجود بودن تشخیص بازهای نوع اول، دوم یا سوم از ترکیبات کواترنر می باشند.

**الف) تهیه محلول نمونه و انجام آزمایش مقدماتی**

۱- حدود ۲۰ml از عصاره الکلی گیاه اسفند را برداشته و پس از خشک کردن به آن ۲ml اسید کلریدریک ۲N افزوده و روی بن ماری قرار دهید.

۲- محلول حاصل را سرد کرده و مقدار ۰/۵ گرم کلریدسدیم به آن افزوده و پس از بهم زدن آنرا صاف نمائید. رسوب روی صافی را با مقدار کافی محلول اسیدکلریدریک شسته تا حجم آن به ۱۰ml برسد. از محلول صاف شده ۲ml در دو لوله آزمایش بریزید و بقیه را برای مراحل بعد نگهداری کنید.

۳- به یکی از لوله ها چند قطره معرف میر بیافزائید. حالت اول: در صورتیکه محلول کمی کدر شود (+). حالت دوم: کدورت زیاد ولی رسوبی تولید نمی شود (++). حالت سوم: رسوب فراوان و سنگین تولید می گردد (+++).

به لوله آزمایش دوم حاوی محلول صاف شده چند قطره معرف واگنر بیافزائید و نتیجه را ملاحظه کنید. در صورتیکه رسوب یا کدروتی در هیچ یک از لوله ها تشکیل نگردد می توان نتیجه گرفت که در عصاره مورد آزمایش آلکالوئید وجود ندارد. اگر واکنش تولید شده (+)، (++) یا (+++) باشد، نشانه اینست که در عصاره مورد آزمایش ممکن است آلکالوئید وجود داشته باشد. از اینرو نیاز به آزمایش های تائیدی می باشد.

**ب) جداسازی و آزمایش های تائیدی برای وجود آلکالوئیدها**

۱- در صورتیکه آزمایش های اولیه برای وجود آلکالوئید مثبت باشد، به محلول اسیدی مقدار کافی محلول آمونیاک غلیظ افزوده تا در مجاورت کاغذ تورنسل قلیایی گردد. توجه کنید که آمونیاک غلیظ بسیار خطرناک است و چند قطره از آن برای قلیایی کردن محلول کافی است.

۲- محلول قلیایی حاصل را به یک آمپول دکانتاسیون کوچک منتقل کرده و آنرا سه بار و هر بار با ۱۰ml کلروفرم استخراج نمائید. دقت کنید که از تکان دادن شدید مخلوط برای جلوگیری از تشکیل امولسیون پایدار خودداری نمائید. حاصل استخراج کلروفرم را با یکدیگر مخلوط نموده و سپس حجم آن را از راه تقطیر کم نمائید. قسمت مایی را نیز برای مراحل بعد نگهداری کنید.

۳- به باقیمانده کلروفرمی ۱/۵ml اسیدکلریدریک ۲ نرمال افزوده و روی بن ماری گرم نموده تا حل شود سپس آنرا خنک کرده و بداخل یک لوله آزمایش صاف نموده و صاف شده را بدو قسمت تقسیم نمائید:

به هر کدام از لوله های آزمایش محتوی آلکالوئید معرف میر و واگنر مطابق آزمایش قبلی افزوده و نتیجه را به صورت (+)، (++) و (+++) ثبت نمائید.

**ج) آزمایش جهت آلکالوئیدهای کواترنر یا بازهای آمین اکسیدی**

۱- آلکالوئیدهای کواترنر یا بازهای آمین اکسیدی در صورت موجود بودن، در محلول مایی قلیایی پس از استخراج با کلروفرم باقی می مانند. محلول را به یک بشر کوچک منتقل کرده و مقدار کافی اسید کلریدریک ۲ نرمال بدان افزوده تا در مجاورت کاغذ تورنسل، واکنش محیط اسید مشاهده گردد. در صورت لزوم محلول را صاف کرده تا محلول شفافی بدست آید.

۲- صاف شده را بدو قسمت مساوی تقسیم نموده و به یک نمونه چند قطره معرف میر و به نمونه دیگر چند قطره معرف واگنر افزوده و نتیجه را ملاحظه نمائید.

۳- وجود آلکالوئید کواترنر یا بازهای آمین اکسیدی در صورتی مثبت است که واکنش (++) یا (+++) در هر دو مورد دیده شود.

۴- واکنش (+) در این مرحله نشانه استخراج غیر کامل آلکالوئیدهای نوع اول، دوم، سوم است و نتیجه باید منفی تلقی گردد.

# تجسس گلیکوزیدهای قلبی

به طور کلی استروئیدهای متعددی در گیاهان یافت می شوند که دارای اثر بارز روی عضله قلب می باشند و به همین عنوان آنها را به نام گلیکوزیدهای قلبی ذکر می کنند. تمام گلیکوزیدهای قلبی از دسته استروئیدها بوده و دارای مشخصات ساختمانی زیر هستند:

۱- هسته سیکلوپنتانوپرهیدروفنانترن

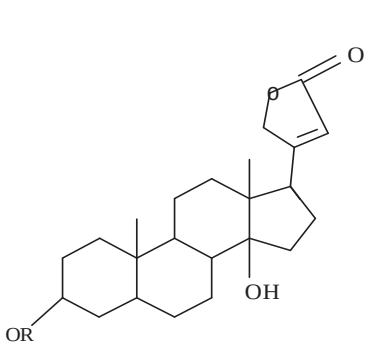
۲- حلقه لاکتونی $\alpha$ و $\beta$ اشباع نشده (پنج یا شش عضوی) در $C_{17}$

۳- عامل هیدروکسیل $\beta$ در $C_{14}$

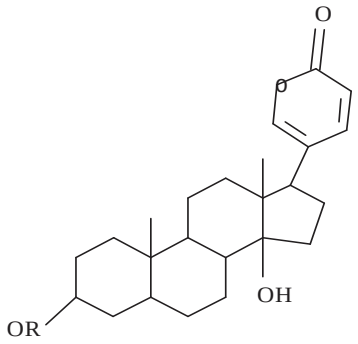
۴- اتصال حلقه های C و D به فرم سیس

۵- یک یا چند قند در $C_3$.

آگلیکون استروئیدی یا ژنین این دسته از مواد به دو دسته تقسیم می شوند: ۱- کاردنولیدها ۲- بوفادینولیدها



Cardenolide



Bufadienolide

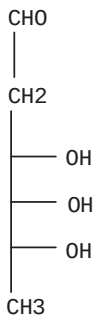
به طور کلی تفاوت حلقه استروئیدی این ترکیبات در $C_{17}$ آنها می باشد.

دسته کاردنولیدها در طبیعت فراوانتر بوده و جزء استروئیدهای ۲۳ کربنی هستند و دارای حلقه لاکتونی پنج عضوی اشباع نشده (گاما- لاکتون) می باشند. کلمه بوفادینولیدها از واژه بوفو (قورباغه) اقتباس شده، آگلیکون آنها دارای ۲۴ کربن بوده و یک حلقه لاکتونی شش ضلعی اشباع نشده (دلتا-لاکتون) به حلقه استروئیدی آنها در $C_{17}$ و در وضع بتا متصل شده است.

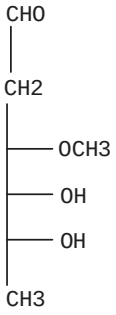
به طور کلی گلیکوزیدهای قلبی اعم از کاردنولید و بوفادینولیدها از نظر ساختمان شیمیایی دارای خصوصیات ویژه ای هستند که در اثر فارماکولوژیک آنها تاثیر بسزائی دارد.

از جمله ویژگی های خاص شیمیایی این دسته ترکیبات این است که اتصال دو حلقه D و C به فرم سیس می باشند که در استروئیدهای موجود در طبیعت کمتر مشاهده گردیده است. اتصال سایر حلقه ها به این قرار می باشد که دو حلقه A و B به فرم سیس و دو حلقه C و B به فرم ترانس اتصال دارند.

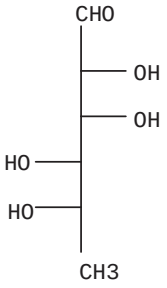
قند موجود در حلقه استروئیدی معمولاً به عامل هیدروکسی در $C_3$ متصل شده و می تواند از یک تا پنج قند به صورت زنجیری روی حلقه قرار گیرد.
از مهمترین قندهای عادی می توان قند گلوکز را ذکر کرد که اغلب در انتهای زنجیر واقع شده است. دسته دیگر قندهای غیرعادی هستند که اختصاصاً همراه چنین ترکیباتی مشاهده می شوند و به نام قندهای دزوکسی شناخته می شوند مثل:




D- Digitoxose




D- Cymarose



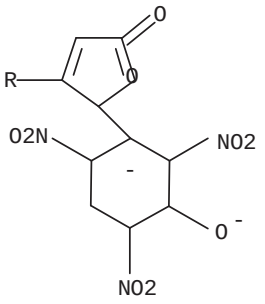

L- Rhamnose

**شناسائی کیفی و استخراج**

از مهمترین روش های شیمیایی جهت شناسائی ترکیبات کاردنولیدها می توان روی دو قسمت حلقه عمل شناسائی را انجام داد:

**الف) شناسائی حلقه لاکتون (واکنش بالجت و کده (Kedde))**

در واکنش بالجت این دسته ترکیبات در مجاورت اسید پیکریک در محیط قلیائی ایجاد رنگ نارنجی می نمایند که در اثر واکنش اسید پیکریک روی حلقه لاکتونی ایجاد می شود. البته در بعضی موارد (وجود آنتراکینون و اسید اسکوربیک در نمونه) جواب مثبت کاذب گرفته می شود.




R = Steroid

در واکنش کده، ۳، ۵ دی نیترو بنزوئیک اسید با حلقه لاکتون موجود در کاردنولیدها در محیط قلیائی ایجاد رنگ آبی مایل به بنفش می نماید که برای مدت حدوداً ۱۰ دقیقه پایدار بوده و بزودی رنگ خود را از دست می دهند.

**ب) شناسائی قند دزوکسی (واکنش گزانیترول)**

از این واکنش می توان اختصاصاً جهت شناسائی قندهای دزوکسی استفاده نمود. در گلیکوزیدهای قلبی که حامل چنین قندهائی نباشند، آزمایش گزانیترول منفی خواهد بود.

قبل از شناسائی این دسته ترکیبات می توان بعضی از مواد زائد همراه را توسط محلول استات سرب رسوب داد و جداسازی نمود و در نهایت توسط محلول های آلی آنها را استخراج نمود.

دسته ترکیباتی که توسط محلول استات سرب ایجاد رسوب می نمایند عبارتند از تانن ها، کلروفیل و فلاونوئیدها. برای بررسی گلیکوزیدهای قلبی در عصاره ها یا تنتورهای هیدروالکلی می بایستی این محلول ها را توسط آب رقیق نمود و بعد با استفاده از محلول استات سرب مواد زائد همراه را رسوب داد. اضافه نمودن آب به محلول های هیدروالکلی باعث افزایش حلالیت استات سرب در این محلول ها می شود.

**موارد استعمال گلیکوزیدهای قلبی**

گلیکوزیدهای قلبی یکی از مهمترین داروهای مؤثر بر نارسائی قلب می باشند. کاربرد این داروها در درمانشناسی به خاطر قدرت این مواد بوده که سبب افزایش نیروی انقباضی سیستولیک می گردد. افزایش قدرت انقباض عضله قلب ضعیف شده سبب می گردد که خون موجود در بطن ها به طور کامل تخلیه شود و زمان انقباض عضله قلب کوتاه شود. بدین طریق عضله قلب زمان کافی برای استراحت بین دو مرحله انقباض خواهد داشت.

**روش کار**

**تجسس قند دزوکسی**

۱- ۵-۴ برگ گیاه را با متانول عصاره گیری کنید. مقدار ۱۰ml از محلول الکلی حاصل از استخراج گیاه را در یک کپسول چینی روی بن ماری خشک کنید.

۲- رسوب را روی بن ماری با اتردوپترول گرم کرده تا ترکیبات رنگی و مواد چربی حل شده و آنرا دکانته نمائید (دو بار تکرار گردد).

۳- به رسوب ml ۳ معرف کلرید فریک (۰/۳ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد کلرید فریک در ۵۰ml اسید استیک خالص) افزوده و پس از مخلوط کردن بداخل یک لوله آزمایش کوچک بریزید.

۴- در حالیکه لوله را به حالت زاویه ۴۵ درجه گرفته اید مقدار ۱-۲ ml اسید سولفوریک غلیظ را به کمک پیپت از کناره لوله وارد نموده تا دو لایه کاملاً متمایز تشکیل گردد. از تکان دادن لوله خودداری نمائید.

۵- در حد فاصل دو لایه حلقه رنگی (ارغوانی) تولید شده نشانه وجود قند دزوکسی می باشد.

# تعیین مقدار آب و رطوبت موجود در بافتهای گیاهی

## ۱) تعیین مقدار آب به روش آزئوتروپی با گزیلن

مقدار نمونه ای که جهت تعیین رطوبت به کار می رود باید به نحوی باشد که برای گیاهان خشک در حدود ۲۰ گرم و برای گیاهان تازه در حدود ۴-۵ گرم باشد که با این روش مقدار تقریبی ۳-۴ میلی لیتر آب اندازه گیری می شود.

### روش کار

اگر گیاه دارویی به صورت ریزوم باشد باید به قطعات کوچک تقسیم و در آسیاب مخصوص زائد آنرا خرد نمود. سپس مقدار معینی از آنرا بدقت وزن کنید (در مورد گیاه خشک برابر ۲۰ گرم و برای گیاه تازه در حدود ۵ گرم) در اینجا از برگ تازه شمشاد استفاده می شود که در یک بالن ۲۵۰ml که حاوی ۲۰۰ml گزیلن بدون آب می باشد، بریزید و دستگاه Dean Stark را به آن وصل نمائید. ابتدا محتوی بالن را به آهستگی تا حد جوش حرارت داده و سپس درجه حرارت را طوری تنظیم کنید که در هر ثانیه ۲ قطره آب تقطیر شود. پس از خارج شدن کامل آب موجود در بافت ها (عدم افزایش حجم آب) حرارت را قطع نموده و آخرین قطرات آب را به کمک میله شیشه ای در قسمت جمع شونده لوله وارد نموده و مقدار آب حاصل را از روی درجات دستگاه Dean Stark بخوانید. اگر نتوانستید از روی درجات دستگاه مقدار آب را محاسبه نمائید می توان از یک مزور ۱۰ml برای تعیین میزان آب خارج شده از گیاه استفاده نمود.

## ۲) تعیین مقدار آب گیاه از طریق وزنی (کم شدن وزن ماده مورد آزمایش)

روش کار:

در یک پلیت شیشه ای ۵ گرم برگ تازه را که بوسیله ترازوی حساس، وزن نموده ریخته و سپس آنرا در اتو ۱۰۰ درجه ی سانتیگراد به مدت چند ساعت قرار داده تا کاملاً خشک شود. مقدار کامل رطوبت هنگامی بدست می آید که پس از چندین بار توزین کپسول چینی محتوی ماده مورد نظر، نقصان وزنی ملاحظه نگردد و سپس درصد مقدار رطوبت را محاسبه نمائید.

# تعیین مقدار خاکستر مواد دارویی

## روش کار

در این روش خاکستر ۲ گرم ماده دارویی خرد شده تعیین می شود.
کروزه را ابتدا در کوره قرار داده پس از آنکه کروزه را از کوره خارج نمودید در دسیکاتور قرار دهید، مراقب باشید تا در اثر تغییر دما کروزه نشکند. سپس آنرا وزن نمائید؛ این عمل را دو بار تکرار کنید تا وزن کروزه تثبیت گردد و ۲ گرم ماده دارویی را به آن اضافه کنید (اگر ماده داروئی خشک نباشد باید آنرا در اتو ۱۰۰ درجه ی سانتیگراد قرار داد، سپس سرد کرده و وزن نمود).

### خاکستر تام

ابتدا ماده دارویی را در کروزه قرار داده و آنرا در کوره بمدت ۳۰ دقیقه قرار دهید تا ایجاد خاکستر سفید کلسیفیه شود، سپس کروزه را در دسیکاتور قرار داده تا سرد شود سپس آنرا وزن کنید.

### خاکستر نامحلول در اسید

خاکستر تام را با ۲۵ سانتی متر مکعب اسید کلریدریک ۱۰٪ در یک بشر ml ۱۰۰ وارد کرده و بمدت ۵ دقیقه حرارت دهید. سپس آن را روی کاغذ بدون خاکستر (Ashless) صاف کرده و دو بار با آب گرم صافی را بشوئید و در اتو ۱۰۰ درجه ی سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه آنرا خشک کنید.
سپس فیلتر را در یک کروزه وزن شده گذاشته، در کوره قرار دهید تا کلسیفیه شود. بعد آنرا در دسیکاتور قرار داده تا سرد شود و سپس آنرا وزن نمائید.
بدین ترتیب خاکستر غیرمحلول در اسید بدست می آید، که می توان از روی آن خاکستر محلول در اسید را نیز محاسبه نمود.

# استخراج اسانس رازیانه و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده آن

اسانس ها ترکیبات معطری هستند که در بخش های مختلف گیاهان وجود دارند و از آنجائی کـه در دمای معمولی و در مجاورت با هوای آزاد تبخیر می شـوند لـذا بـه آنهـا Etheral oils، Volatile oils یا Essential oils گفته می شود.

اسانس ها مخلوط های کمپلکسی از مواد مختلف می باشند اما اکثر ترکیبات موجـود در اسـانس از نظر بیوسنتزی جزء ترپنوئیدها (منو- و سزکویی ترپنوئیدها) هستند و گروه کـوچکی از آنهـا جـزء ترکیبات آروماتیک (فنیل پروپن ها) قرار دارند و لذا بطور کلی می توان گفت این گـروه از ترکیبـات طبیعی مخلوطی از هیدروکربن ها و مشتقات اکسـیژنه آنهـا (الکـل هـا، کتـون هـا، آلدئیـدها، اترهـا، اکسیدها ...) می باشند.

اسانس ها از نظر اجزاء تشکیل دهنده بسیار متفاوتند ولی دارای تعدادی خـواص فیزیکـی مشـترک هستند چون: بوی مشخص، ضریب شکست، فعالیت نوری، عدم امتزاج بـا آب امـا محلـول در اکثـر حلال های آلی.

## روش های استخراج

روش های مختلفی جهت استخراج اسانس هـا وجـود دارد امـا معمـولی تـرین روش تهیـه اسـانس بویژه در مورد اسانس های رسمی (official volatile oil) روش تقطیر (distillation) می باشد. تقطیـر اســانس بــه دو روش بــا آب (water or hydrodistillation) و بــا بخــار (Steam distillation) سال هاست که جهت تهیه اسانس های مختلف بکار می رود. در سـطح آزمایشـگاهی برای استخراج اسـانس هـای سـبکتر از آب از دسـتگاهی بنـام کلـونجر (Clevenger apparatus) استفاده می شود.

حاصل تقطیر (distillate) بدست آمده، مخلوطی از آب و اسانس است که معمـولاً بـه صـورت دو لایه مجزا جمع آوری می شود. اسانس ها در مجاورت با نور و اکسیژن اکسیده و تیره مـی شـوند لذا به منظور جلوگیری از این امر باید آنها را در شیشه های تیره دردار و در محلی تاریـک و خنـک نگه داری نمود.

## روش های جداسازی و شناسایی

امروزه کروماتوگرافی گازی (GC) متداول ترین شیوه جهت آنالیز اسانس هاسـت و بـدین منظـور از ستون های مختلف کاپیلاری با پلاریته های مختلـف اسـتفاده مـی شـود. سـاده تـرین راه بـرای آنالیز و شناسایی اجزاء اسانس توسط GC استفاده از شـاخص هـای خـروج مـواد از سـتون مـی باشـد کـه عبارتنـد از: زمـان بـازداری (Retention time= Rt) و شـاخص بـازداری کـواتس (Kovat's Retention Index= KRI).

استفاده از GC متصل به اسپکتروسکوپ جرمی (MS) ابزاری بسیار دقیـق و قدرتمنـد بـه منظـور شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس ها می باشد و امروزه بطور گسترده ای از دسـتگاه GC/MS در شناسایی ترکیبات اسانسی استفاده می شود.

اگرچه امروزه GC بطور گسترده ای در آنالیز ترکیبات اسانسی بکار می رود اما به هر حال TLC تکنیک ارزان و سریعی است که نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد و در بررسی مقدماتی مواد اسانسی (مثلاً در فارماکوپه ها برای ارزیابی کیفیت و خلوص اسانس ها) کارآیی خوب و قابل توجهی دارد.

## روش کار

### استخراج اسانس

میزان ۷۰g پودر میوه رازیانه را در یک بالون ۱۰۰۰ml ریخته و به آن ۷۰۰ml آب اضافه نمائید و بعد از اتصال بالون به دستگاه کلونجر مدت ۳ ساعت عمل اسانس گیری را انجام دهید. اسانس حاصل را از دستگاه خارج کنید و با مقدار کافی سولفات سدیم انیدر آنرا خشک نمائید.
توجه: دقت نمائید که آبگیری از اسانس به طور کامل و در نهایت دقت صورت گیرد.

### شناسایی

**الف) شناسایی مقدماتی کیفی**

به منظور شناسایی اولیه ترکیبات موجود در اسانس از روش TLC استفاده می شود:

۱- تهیه محلول تست: ۱ml اسانس را با ۹ml تولوئن رقیق نمائید.

۲- فاز ساکن: صفحات استاندارد TLC نوع سیلیکاژل $GF_{254}$

۳- فاز متحرک: تولوئن – اتیل استات (۷:۹۳)

۴- روش TLC: در حدود ۵µl از محلول رقیق شده اسانس را روی پلیت TLC بصورت نقطه ای و به فاصله تقریباً ۲cm از انتهای صفحه بکارید. توسط فاز متحرک کروماتوگرافی را تا ارتفاع تقریباً ۱۵cm انجام دهید و سپس صفحه را خشک نمائید.

۵- ردیابی لکه ها: به سه روش صورت می گیرد:

- استفاده از نور UV با طول موج 254nm
- اسپری معرف وانیلین در اسید سولفوریک و متعاقب آن حرارت در $۱۱۰^{\circ}c$ برای ۵ دقیقه
- اسپری معرف ۲، ۴- دی نیتروفنیل هیدرازین.

۶- تهیه محلول شاهد: در صورتی که استانداردهای اجزاء اسانسی را در اختیار دارید، ۵µl از محلول رقیق شده آنها (۱ حجم از هر نمونه استاندارد را با ۳۰ حجم تولوئن خوب مخلوط نمائید) را نیز مجاور لکه محلول تست بکارید و سپس کروماتوگرافی را انجام دهید.

**ب) شناسایی کیفی و کمی**

در این بخش به منظور جداسازی بهتر و شناسایی دقیق تر ترکیبات موجود در اسانس به ترتیب از روش GC و استفاده از ترکیبات استاندارد و شاخص های خروج مواد از ستون استفاده می شود و متعاقباً با کمک کروماتوگرام حاصل از GC و نمونه های استاندارد بعضی از مواد موجود در اسانس تعیین مقدار می گردند.

# تجسس تانن ها و پلی فنل ها

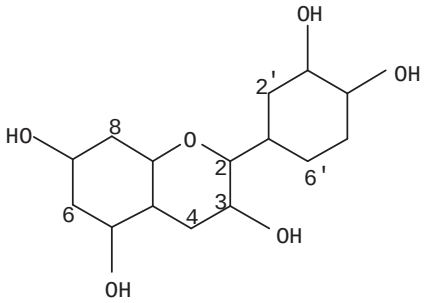
تانن ها دسته بزرگی از مواد آلی طبیعی پیچیده می باشند که به مقدار زیاد، در عالم گیاهی پراکنده بوده و در اکثر تیره های گیاهی یافت می گردند. تانن ها از دسته ترکیبات پلی فنلی طبیعی بدون ازت می باشند که غیر قابل تبلور هستند، اینها با آب و الکل تولید محلولات کلوئیدی می نمایند و دارای طعم قابضی هستند. تانن های حقیقی دارای وزن مولکولی بسیار بالا بوده و قادر به ترکیب با پروتئین ها هستند، در حالیکه پزودوتانن ها وزن مولکولی پائین تری داشته و بندرت با پروتئین ها ترکیب می گردند. دو گروه عمده تانن های حقیقی شامل تانن های هیدرولیز شونده و تانن های کندانسه (غیر قابل هیدرولیز) هستند.

تانن ها باعث رسوب محلول ژلاتین، آلکالوئیدها، نمک فلزات سنگین، آمین ها و آمیدها می شوند و با املاح آهن رنگ آبی تند یا سبز مایل به سیاه تولید می کنند که این خصوصیات جهت شناسایی کیفی و کمی تانن ها استفاده می شود. قابل توجه است که امروزه از روش های پیشرفته کروماتوگرافی جهت شناسائی کیفی و کمی تانن ها استفاده می گردد، البته تانن ها را می توان با کمک روش های رنگ سنجی و اسپکتروفتومتری نیز تعیین مقدار نمود.

طبقه بندی معمولی تانن های موجود در طبیعت به قرار زیر می باشد:

**۱) تانن های کندانسه یا تانن های کاتشول**

این دسته از تانن ها که قسمت اعظمی را تشکیل می دهند از پلی مرهای ترکیبات فنلی بوده که وابسته به فلاونوئیدها هستند (ساختمان مشابهی با فلاونوئیدهای Flavan-3-ol و Flavan-3,4 diol دارند) اما در آب محلول نیستند مثل کاتشین Catechin:



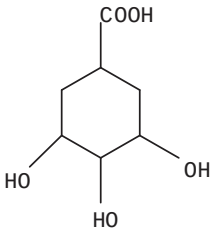

تانن های کاتشول جزء دسته ترکیبات پلی مریزه محسوب می شوند و حداقل از تشکیل دو مولکول از ترکیبات فوق بوجود می آیند. اتصال حلقه ها غالباً توسط کربن های ۶ و ۸ و ۲′ و ۶′ می باشد ولی در مورد پروآنتوسیانیدین ها اتصال بین کربن های ۴ و ۸ انجام می گیرد. این دسته از تانن ها در اثر حرارت از خود ناپایداری نشان داده و بدسته ترکیبات پیچیده غامضی تبدیل می شوند که در آب غیرمحلول بوده و بعنوان تانن های فلوبافن (phelobaphene tannins) معروف می باشند. این مواد دارای کیفیت مصرفی بسیار کمتری نسبت به کاتشول می باشند. تانن های کاتشول یا فلوبوتانن دارای مشخصات زیر می باشند:

- در اثر جوشاندن با اسید کلریدریک (محلول های اسیدی) تولید فلوبافن قرمز غیر محلول (قرمز تانن- پلی مرهای قرمز - قهوه ای) می نمایند.
- با کلرید فریک تولید رنگ سبز ( بعلت وجود دو عامل هیدروکسیل مجاور یکدیگر) می نمایند.

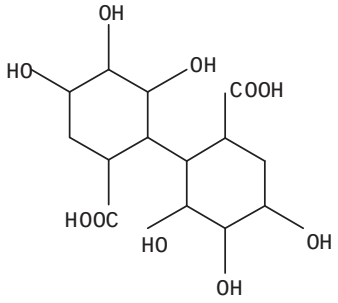
- با آب برم تولید رسوب می نمایند.
- با فرمآلدئید، اسید کلریدریک ایجاد رسوب قرمز می کنند.

**۲) تانن های هیدرولیز شونده یا تانن های پیروگالل**

این دسته از تانن ها قهوه ای رنگ، بی شکل و محلول در آب گرم بوده و تولید محلول های کلوئیدی می نمایند. این دسته ترکیبات استرهای اسید گالیک، دیمر گالیک اسید و یا هیدروکسی دی فنیک اسید همراه با قند (غالباً به صورت ترکیبات گلوکوزیدی) می باشند. از ساده ترین گالوتانن ها می توان، دو ترکیب زیر را نام برد:




1- Galloylglucose




Hexahydroxy di phenicacid

تانن های این دسته دارای مشخصات زیر می باشند:

- در اثر حرارت با آب، اسید کلریدریک رقیق، قلیائی ها و نیز آنزیم ها، هیدرولیز شده و غالباً تولید اسید گالیک یا اسید الاژیک (یا ترکیبات فنلی که معمولاً از مشتقات اسید گالیک می باشند) را می نمایند.
- با آب برم رسوب نمی دهند.
- با فرمالدئید– اسید کلریدریک رسوب نمی دهند.
- با کلرید فریک تولید رنگ آبی (به علت وجود سه عامل هیدروکسیل مجاور یکدیگر) می نمایند.

**موارد استعمال تانن ها**

تانن ها روی بافتهای زنده اثر قابض داشته و این خاصیت اساس اثر درمانی آنها را تشکیل می دهد. مصرف داخلی این مواد در دستگاه گوارش بیشتر به عنوان قابض بوده و در مصرف خارجی بیشتر جهت معالجه سوختگی ها، زخم ها، سرمازدگی پنجه ها، التهابات پوستی، هموروئید و بالاخره ضد عرق مصرف فراوانی را دارند. در درمان سوختگی ها پروتئین بافت ها توسط تانن رسوب کرده و بدین وسیله یک پوشش محافظ با در نظر گرفتن خاصیت آنتی سپتیکی تشکیل می شود. همچنین به عنوان پادزهر آلکالوئیدها محلول تانن ها به علت تشکیل املاح غیرمحلول و تولید رسوب با آلکالوئیدها دارای ارزش زیادی می باشند. از خاصیت ایجاد رسوب بین تانن و پروتئین ها جهت تولید چرم از پوست حیوانات در دباغی سابقاً بخصوص استفاده می شده و به علت رنگ های تندی که با املاح آهن ایجاد می نمایند در صنایع جوهرسازی حائز اهمیت هستند. از تانن ها جهت شناسایی پروتئین، ژلاتین و آلکالوئیدها استفاده می شود. قابل توجه است که تانن ها در

صنایع آرایشی و بهداشتی و صنعت نوشابه سازی نیز استفاده هـای فراوانـی دارد. در سـال هـای اخیر نشان داده شده که این مواد دارای اثر ضدسرطان نیز می باشند.

## روش کار

۱- مقدار ۱۰ گرم نمونه گیاهی را در ۳۰ml متانول بجوشانید (روی بن ماری) تـا حجـم آن نصـف گردد و صاف کنید. صاف شده را خشک کنیـد و بعـد در ۱۰ml آب مقطـر جـوش حـل کنیـد و بگذارید به حرارت آزمایشگاه برسد. ۲-۴ قطره محلول ۱۰٪ کلرید سدیم به محلـول سـرد شـده بیافزائید تا بدینوسیله ترکیبات غیر تانن رسوب داده شود.

۲- محلول را صاف نموده و صاف شده را به مقادیر ml ۳ در چهار لوله آزمایش بریزید.

۳- بهر کدام از لوله های آزمایش از معرف های زیر بیفزائید:

الف) ۴ تا ۵ قطره محلول ۱٪ ژلاتینی به لوله آزمایش ۱ افزوده و تشکیل رسوب را ملاحظه نمائید.

ب) ۴تا ۵ قطره ژلاتین نمک دار (ژلاتین ۱٪ به عـلاوه نمـک کلریـد سـدیم ۱۰٪) بـه لولـه آزمـایش ۲ افزوده و تولید رسوب را ملاحظه نمائید.

ج) ۳ تا۴ قطره محلول کلرید فریک ۱٪ به لوله ۳ افزوده و رنگ و رسوب را ملاحظه نمائید.

د) لوله آزمایش ۴ را بعنوان شاهد به کار برید.

# استخراج، تعیین مقدار و شناسایی کافئین قهوه

کافئین آلکالوئیدی است ازگروه پورین ها، که بمیزان ۱ تا ۳ درصد در برگ چای و ۱ تا ۱/۳درصد در دانه قهوه وجود دارد. کافئین خواص فارماکولوژیک متعددی ازجمله تحریک سیستم اعصاب مرکزی، مدر و ...دارد.

**این آزمایش شامل مراحل زیر می باشد:**

۱- مرحله استخراج: وزن معینی از قهوه را بمدت چند دقیقه در مجاورت آمونیاک قرار داده و بعد با کلروفرم در دستگاه سوکسله استخراج می کنند.

۲- محلول کلروفرمی را تغلیظ کرده، با اسید رقیق مجاور می کنند و سپس صاف می نمایند.

۳- محلول صاف شده را با سود نرمال قلیایی کرده و با کلروفرم استخراج می کنند.

۴- محلول کلروفرمی حاصل را تغلیظ می کنند و کافئین را بدست میآورند.

## روش کار

۵ گرم قهوه بو داده و نرم شده را در یک ظرف شیشه ای ریخته و مخلوطی از ۵ میلی لیتر اتراتیلیک و یک میلی لیتر آمونیاک را تدریجاً به آن بیافزایید و بخوبی مخلوط کنید.

مخلوط حاصل را با دستگاه سوکسله با استفاده از کلروفرم استخراج نمائید.

بعد از تکمیل عمل استخراج، محلول کلروفرمی حاصل را تقطیر کنید بطوریکه همه کلروفرم خارج شود و از باقیمانده بوی این حلال به مشام نرسد و باقیماندهٔ حاصل را با حدود ۱۰ml اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال مجاور کرده و چند لحظه صبر کنید، سپس به آن ۱۰ml آب افزوده و در همان حال صاف کنید. محلول صاف شده را پس از سرد شدن با کمی سود نرمال قلیایی نموده و در یک قیف جدا کننده (آمپول دکانتاسیون)، سه بار با ۱۵m کلروفرم استخراج کنید.

محلول های کلروفرمی را پس از جدا کردن تقطیر نمائید تا حجم آن کم شود و سپس باقیمانده را به یک پلیت شیشه ای که قبلاً وزن شده، منتقل و پس از خارج کردن کامل کلروفرم بوسیلهٔ حرارت غیر مستقیم، آن را وزن کنید. درصد مقدار کافئین را در ۵ گرم قهوه بدست آورید.

جهت اطمینان از کافئین استخراج شده، طیف .I.R آنرا تهیه کرده و با طیف کافئین استاندارد مقایسه کنید.

# جستجوی گلوکوزیدهای سیانوژنتیک

ترکیباتی در گیاهان که سبب آزاد کردن اسید سیانیدریک در اثر هیدرولیز می گردند به علت اثر سمی این ماده روی انسان و حیوانات از نظر سم شناسی و درمانی دارای اهمیت زیادی می باشند.

قسمت اعظم اسید سیانیدریک در گیاهان مولد آن به حالت گلوکوزید می باشد، این گلوکوزید اغلب در گیاهان خانواده روزاسه وجود دارد و وجود آن تاکنون در بیش از ۵۰ تیره گیاهی نشان داده شده است. در هر گیاهی گه گلوکوزید سیانوژنتیک موجود باشد، آنزیم هیدرولیز کننده آن نیز وجود دارد. بهترین آزمایشی که جهت تجسس این گلوکوزیدها در بافت های گیاهی به کار می رود عبارت از واکنش گرینیارد است. گلوکوزیدهای سیانوژنتیک علاوه بر آنزیم های مربوط توسط اسیدهای رقیق نیز هیدرولیز شده و تولید اسید سیانیدریک می نمایند.

## روش کار

### آزمایش گرینیارد

۱- مقدار ۲-۳ عدد نمونه گیاهی را در یک ارلن مایر قرار داده و به آن مقدار کافی آب مقطر افزوده تا کاملاً مرطوب گردد.

۲- کاغذ پیکرات سدیم را با فرو بردن نوارهای کاغذ صافی در محلول تازه تهیه شده پیکرات سدیم تهیه کنید (۵گرم بیکربنات سدیم، ۰/۵ گرم اسید پیکریک و ۱۰۰ میلی لیتر آب)، کاغذها را بوسیله فشردن بین دو کاغذ صافی خشک نمائید.

۳- یک میلی لیتر آب به ارلن مایر محتوی گیاه مرطوب شده بیافزائید (جهت افزایش فعالیت آنزیم).

۴- تکه ای از کاغذ تهیه شده پیکرات سدیم را در بالا و داخل ارلن مایر محتوی گیاه قرار داده و سعی کنید که از تماس کاغذ با ارلن مایر و گیاه داخل آن جلوگیری شود.

۵- در ارلن مایر را روی آن قرار داده و آن را تا حد ۳۵ درجه سانتی گراد حرارت داده و به مدت ۳ ساعت به حال خود بگذارید.

۶- تغییر رنگ کاغذ را ملاحظه نمائید.

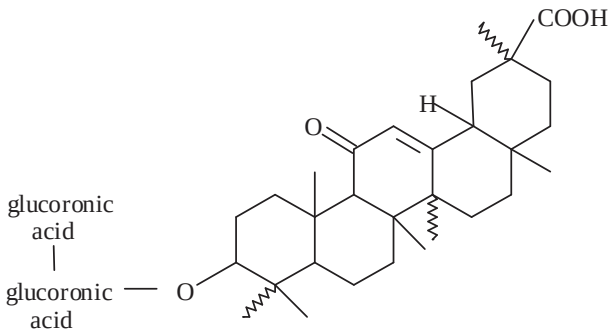
در صورتیکه اسید سیانیدریک تولید شود، پس از ۱۵ دقیقه رنگ زرد کاغذ به قرمز تغییر می یابد و در صورتی که گلیکوزید سیانوژنتیک موجود نباشد رنگ زرد کاغذ بدون تغییر باقی می ماند.

## تعیین مقدار گلیسیریزین در شربت شیرین بیان (به طریقه وزنی)

گلیسیریزین، گلوکوزید اسید گلیسیریتینیک می باشد که در ریشه و ریزوم خشک گیاه گلیسیریزا گلابرا (*Glycyrrhiza glabra*) یا شیرین بیان وجود دارد و در اثر هیدرولیز ایجاد اسید گلیسیریتینیک و ۲ مولکول قند (اسید گلوکورنیک) می نماید.

**روش کار**

۵۰ ml از شربت شیرین بیان را به یک بشر منتقل کنید. با افزودن قطره قطره اسید سولفوریک رقیق (۸ml اسید سولفوریک رقیق معادل ۲ml اسید سولفوریک غلیظ می باشد که ۴ برابر با آب رقیق شده) رسوبی حاصل می شود. رسوب را به کمک قیف بوخنر جدا کرده و با آب مقطر بشوئید تا آب حاصل از شستشو خنثی گردد. آنگاه رسوب را جمع آوری و در کمترین مقدار آمونیاک غلیظ حل نموده و در اتو ۴۰ درجه ی سانتیگراد خشک کنید، باقیمانده گلیسیریزین می باشد.




Glycyrrhizinic acid

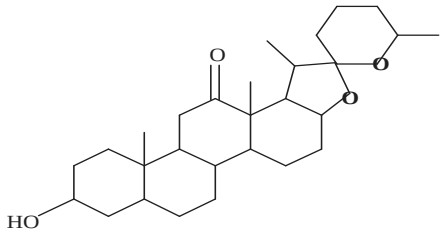
(Glycyrrhizin=mixture of calcium and sodium salts of glycyrrhizinic acid)

# تجسس ترکیبات پلی سیکلیک (ساپونین ها و استرول ها)

تری ترپنوئیدها موادی هستند که ساختمان کربنی آنها از شش واحد ایزوپرن تشکیل شده و از نظر بیوسنتزی از یک هیدروکربن خطی دارای ۳۰ اتم کربن به نام اسکوالن حاصل می شوند. این اجسام دارای ساختمان حلقوی و پیچیده بوده و اکثراً دارای عوامل الکلی، آلدئیدی یا کربوکسیل (اسیدی) میباشند. آزمایشی که معمولاً جهت تشخیص این اجسام به کار می رود واکنش لیبرمن – بورشارد است (انیدریداستیک در اسید سولفوریک غلیظ که سبب ایجاد رنگ آبی – سبز با اکثر تری ترپن ها و استرول ها می گردد). تری ترپن ها را میتوان در چند گروه بررسی نمود: ۱– تری ترپن های حلقوی ۲– گلیکوزیدهای قلبی ۳– استروئیدها ۴– ساپونین ها.

**ساپونین ها**

ساپونین ها بطور کلی در دو گروه ساپونین های استروئیدی و ساپونین های پنج حلقه ای تری ترپنی قرار داد. گروه اول یعنی ساپونین های استروئیدی بیشتر در گیاهان تک لپه ای یافت می شوند مانند هکوجنین در گیاه Agave، گروه دوم یا ساپونین های پنج حلقه ای بیشتر در دولپه ای ها پیدا شده اند مانند اسید گلیسیریتینیک. معمولاً کربن شماره ۳ قسمت غیر قندی (آگلیکون ۵ حلقه ای) این ترکیبات به زنجیر قندی یا واحدهای اسید اورونیک یا هر دوی آنها متصل می گردد.




Hecogenin

ساپونین ها دارای چند خاصیت اختصاصی بوده که می توان آنها را به سهولت تشخیص داد:

۱– ساپونین ها قادر به همولیز نمودن گویچه های قرمز خون می باشند.

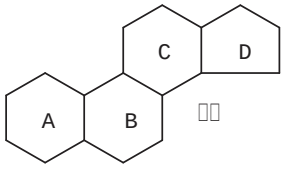
۲– ساپونین ها در محلول های مایی در اثر تکان دادن تولید کف ثابتی می نمایند که حداقل به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است.

۳– ساپونین ها برای حیوانات خونسرد مانند ماهی و حلزون سمی بوده و سبب مرگ آنها می شوند. از این رو از زمان های بسیار قدیم تعداد زیادی از آنها به عنوان مرگ ماهی به کار می روند.

۴– ساپونین ها دارای واکنش رنگی اختصاصی به نام واکنش لیبرمن – بورشارد می باشند.

از آزمایش های اختصاصی فوق جهت تجسس ساپونین ها در مواد گیاهی استفاده می شود.

**استروئیدها یا استرول ها:** استرول ها نیز از تری ترپن ها بوده که دارای ساختمان سیکلوپنتانوپرهیدروفنانترن می باشند (۴حلقه ای هستند).



در گذشته استرول ها را فرآورده های حیوانی می دانستند مانند هورمون های جنسی و اسیدهای صفراوی و ... ولی در سال های اخیر تعداد زیادی از استرول ها را از بافت های گیاهی جدا نموده اند. در حقیقت سه فیتوستروول معروف که در اکثر گیاهان عالی وجود دارند عبارتند از: سیتوسترول، استیگماسترول و کمپسترول. این استرول ها هم به صورت آزاد و هم به حالت گلوکوزید وجود دارند.

این دسته از مواد کمتر از ساپونین ها در طبیعت وجود دارند و بیشتر در گیاهان تیره های تک لپه ای یافت شده اند.

این ترکیبات از نظر اقتصادی دارای اهمیت زیادی می باشند، چون می توان آنها را بعنوان پیش ساز در تهیه کورتیزون و بسیاری از هورمون های استروئیدی مورد استفاده قرار داد. کورتیزون را قبل از کشف این استروئیدها از غدد فوق کلیوی یا از طریق اسیدهای صفراوی در طی ۳۲ مرحله بدست می آوردند که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبود، در حالیکه امروزه این مواد با کمک چند مرحله واکنش بیوترانس فورمیشن از این استروئیدها تولید می گردند.

## روش کار

### ۱) آزمایش تولید کف برای تجسس ساپونین ها

۱- مقدار ۱۰۰ میلی گرم از پودر گیاه مورد آزمایش را در داخل یک لوله آزمایش تمیز و خشک بریزید.

۲- مقدار ۱۰ml آب مقطر بدان افزوده و لوله را بشدت به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید. لوله را به حالت عمودی قرار داده و در طی ۰/۵ ساعت آنرا ملاحظه نمائید.

۳- در صورتیکه کف ثابتی به ارتفاع ۲ سانتی متر از سطح مایع به مدت ۳۰ دقیقه تشکیل گردد نمونه، حاوی ساپونین است.

### ۲) تجسس استرول های اشباع نشده و تری ترپن ها

۱- حدود ۱۰ گرم پودر (ریشه) گیاه چوبک را در ۳۰ml متانول ریخته روی بن ماری قرار دهید تا حجم آن نصف گردد و سپس صاف نموده، صاف شده را تغلیظ کنید تا خشک شود.

۲- به عصاره الکلی خشک شده ۱۰ml اتردوپترول افزوده و به کمک میله شیشه ای بهم زده و می گذاریم بماند تا رسوب ته نشین گردد. محلول روئی را جدا و دور ریخته و مجدداً به رسوب حاصل اتردوپترول افزوده تا قسمت اعظم پیگمان های موجود در عصاره جدا گردد.

۳- مقدار ۱۰ml کلروفرم به رسوب باقیمانده افزوده و بخوبی هم بزنید. سپس کلروفرم را بداخل یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۱۰۰ میلی گرم سولفات سدیم انیدر بیافزائید و پس از تکان دادن آنرا بداخل یک لوله آزمایش کاملاً خشک صاف کنید. صاف شده را به سه لوله آزمایش

خشک تقسیم و به ترتیب ۱، ۲ و ۳ شماره گذاری کنید. لوله شماره ۱ و ۲ برای دو آزمایش و لوله شماره ۳ بعنوان شاهد بکار می رود.

**الف) آزمایش لیبرمن بورشارد برای تجسس استرول های اشباع نشده و تری ترپن ها**

۱- مقدار ۳ قطره انیدریداستیک به لوله شماره ۱ افزوده و به آهستگی تکان دهید تا کاملاً مخلوط گردد.
۲- مقدار ۱ قطره اسید سولفوریک غلیظ افزوده و به آهستگی مخلوط نمائید.
۳- تغییر رنگ را از موقع افزودن اسید سولفوریک غلیظ تا ۱ ساعت بعد ملاحظه نمائید و سپس رنگ های حاصل را با شاهد مقایسه نمائید.

**ب) آزمایش سالکوسکی برای تجسس استرول های اشباع نشده**

۱- اسید سولفوریک غلیظ را طوری به لوله شماره ۲ بیافزائید که تولید یک حلقه نماید. برای این منظور لوله را ۴۵ درجه خم نموده و بوسیله پیپت نوک باریک مقدار ml ۲-۳ اسید سولفوریک غلیظ از کنار لوله وارد نمائید تا هرگونه تغییر رنگی را که در حد فاصل دو محلول حاصل گردد، ثبت نمائید.
۲- لوله را به آهستگی تکان داده تا دو فاز مخلوط گردند و تغییر رنگ را ملاحظه نمائید.
۳- در صورت مثبت بودن واکنش، رنگ قرمز قهوه ای نشانه وجود استرول های اشباع نشده است.

# آنالیز کیفی و کمی مان ترنجبین

ترنجبین مان حاصل از گیاه خارشتر می باشد که یک محصول فرعی طبیعی کربوهیدراتی است. این مان نتیجه فعالیت یک حشره ویژه روی برگ ها و سرشاخه های گیاه خارشتر با نام علمی *Alhagi pseudolhagi* (M.B.) Desv. از خانواده ی نخودیان (Leguminosae) است. ترنجبین از نظر ظاهری به صورت ترشحات گلوله ای شکل ریز و سفید رنگ یا زرد و یا کمی متمایل به قهوه ای است و در صورت ناخالص بودن می توان خارهای نوک تیز و نیز میوه های قرمز رنگ و تسبیحی شکل گیاه را در نمونه دید. به عنوان تقلب قند یا شکر و یا فرآورده های آنها را به صورت قطعاتی شبیه به مان اصلی در آورده و با آن مخلوط می کنند. این مان به دلیل دارا بودن ترکیبات قندی مختلف طعم شیرینی دارد.

## روش کار

### الف) آنالیز کیفی

۱- تهیه عصاره: به منظور بررسی کیفی مان ترنجبین از روش Co-TLC با قندهای استاندارد استفاده می شود.

بدین منظور ۷/۵g ترنجبین دست چین شده را در یک بشر ۱۰۰ml بریزید و به آن ۷۵ ml آب مقطر اضافه کنید و خوب بهم بزنید و سپس توسط قیف بوخنر صاف نمایید. محلول حاصل را روی بن ماری تغلیظ نمائید تا خشک شود و سپس وزن نمائید. عمل خشک کردن را ۳ بار انجام دهید تا وزن تثبیت گردد.

۲- محلول تست: ۰/۵g از عصاره را در ۵ml آب مقطر حل کنید.

۳- محلول های شاهد: ۰/۵g از قندهای استاندارد را در ۵ml آب مقطر حل کنید.

۴- فاز متحرک: n- بوتانول - اسید استیک - دی اتیل اتر - آب (۱:۳:۶:۹)

۵- معرف: ۰/۵ml آنیزالدئید، ۹ml اتانول ۹۵٪، ۰/۵ ml اسید سولفوریک غلیظ و ۱ml اسید استیک گلاسیال را خوب با همدیگر مخلوط کنید معرف را به صورت تازه تهیه نمائید.

۶- Co-TLC: از هر یک از محلول های تهیه شده به میزان تقریبی ۱۰ µL روی صفحه استاندارد TLC نوع سیلیکاژل $GF_{254}$ به صورت نقطه ای و به فاصله ۲cm از انتهای صفحه بکارید. توسط فاز متحرک کروماتوگرافی را تا ارتفاع ۱۵cm انجام داده و سپس آنرا خشک نمائید. روی صفحه TLC معرف را اسپری نمائید، در دمای آزمایشگاه خشک کنید و بمدت ۵ دقیقه در دمای ۱۱۰°c قرار دهید.

**ب) آنالیز کمی**

۰/۴g از عصاره ترنجبین را به یک بالون ژوژه ۵۰ml منتقل نموده و با آب مقطر به حجم برسانید.
سپس ۲ml از محلول تهیه شده را به یک بالون ژوژه ۵۰ml منتقل نموده و با آب مقطر به حجم برسانید.
به روش فوق محلولی با غلظت ۰/۳۲mg/ml از گلوکز استاندارد تهیه نمائید.
به ۱ml از محلول نمونه و استاندارد ۱ml محلول ۵٪w/v فنل اضافه کنید و خوب بهم بزنید و سپس ۵ml اسید سولفوریک غلیظ را به آرامی و بطور مستقیم اضافه نمائید. محلول ها را ۱۰ دقیقه بدون حرکت نگه دارید و سپس بشدت تکان دهید و مجدداً برای ۳۰ دقیقه بدون حرکت نگه دارید. ۱ حجم از هر محلول را با ۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید و جذب آنها را در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه گیری کنید.
توجه نمائید مقدار جذب باید بین ۱-۰/۱ = OD باشد.
جهت صفر نمودن دستگاه از محلول بلانک حاوی ۱ml آب مقطر، ۱ml محلول ۵٪w/v فنل و ۵ml اسید سولفوریک غلیظ استفاده کنید.

# استخراج اسید سیتریک از آبلیمو

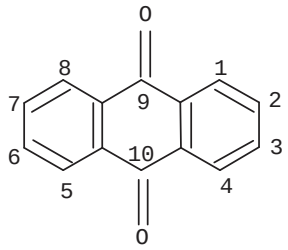
اسیدهای گیاهی به مقدار فراوان در گیاهان به صورت آزاد و یا ترکیب با مواد معدنی یا ترکیبات آلی (املاح آلکالوئیدی) یا به صورت استر یافت می شوند.
نسبت به تعداد گروه های کربوکسیل آنها را به اسیدهای یک ظرفیتی، دو ظرفیتی و یا چندظرفیتی تقسیم می کنند. این اسیدها در واکنش های تنفسی سلول های گیاهی نقش داشته، بعضی مانند اسیدهای سیتریک و مالئیک و سوکسینیک به غلظت نسبتاً زیادی در بافت های گیاهی یافت می گردند و برخی دیگر که کمتر معروفند مانند اسید آلفا- کتوگلوتاریک و اسید سیس- آکونی تیک، به مقادیر کمتری وجود دارند. اسید سیتریک یکی از فراوان ترین اسیدهای موجود در گیاهان بوده و در مقدار زیادی از گیاهان، میوه ها و همچنین در بافت های حیوانی وجود دارد. اسید سیتریک را می توان از میوه مرکبات به صورت ملح کلسیم کم محلول جدا نمود این اسید دارای خاصیت حلالیت غیرعادی بوده به طوریکه حلالیت ملح آن در اثر افزایش درجه حرارت کاهش می یابد.

## روش کار

مقدار ۵۰ml آبلیمو را در یک بشر ۲۵۰ml ریخته و به آن محلول ۱۰٪ سود افزوده و تکان داده تا محلول کمی قلیائی شود. تغییر رنگ مشخصی در این مرحله حاصل شده و رنگ محلول از زرد روشن به قهوه ای مبدل می شود. محلول را از پارچه نازکی عبور داده تا تکه های بافت های گیاهی جدا شده و سپس آنرا به کمک خلأ صاف کنید. ممکن است سوراخ های کاغذ صافی طوری گرفته شود که صاف شدن محلول را مشکل نماید، در چنین حالتی صافی را تعویض نمائید.
محلول صاف شده را اندازه گرفته و آنرا داخل یک بشر ریخته و به ازای هر ۱۰ml از محلول صاف شده، 5ml محلول ۱۰٪ کلرور کلسیم به آن بیافزائید و مرتب آنرا هم زنید، سپس محلول را حرارت داده تا بجوش آید و رسوب متراکم سیترات کلسیم را هنگامیکه محلول هنوز داغ است به کمک خلإ صاف کنید. رسوب حاصله را با مقدار کمی آب جوش شسته و سپس آنرا در مقدار کمی آب سرد حل کرده و سپس حرارت داده تا بجوش آید و مجدداً رسوب را بوسیله خلإ صاف و جمع کنید. بگذارید ملح حاصل را در هوا خشک شود و مقدار درصد آنرا محاسبه نمائید.
اسید سیتریک را می توان از سیترات حاصله به روش زیر تهیه نمود:
ملح خشک شده را وزن کرده، در یک بشر ریخته و مقدار محاسبه شده اسید سولفوریک نرمال را جهت تبدیل ملح به اسید به آن بیافزائید. سپس چند دقیقه صبر کنید تا رسوب سولفات کلسیم غیرمحلول از آن جدا شود و محلول را در بن ماری حرارت داده تا تغلیظ گردد، در این حالت اسیدسیتریک کریستالیزه می گردد.
به علت حلالیت زیاد اسید سیتریک در آب، کریستالیزاسیون آن در غلظت های کم اغلب مشکل می باشد. سپس اسید سیتریک کریستالیزه شده را به کمک خلأ صاف کرده و پس از خشک کردن مقداردرصد آنرا در محلول اولیه محاسبه نمائید.

# تجسس آنتراکینون ها

آنتراکینون ها از مهمترین کینون های طبیعی بوده که بعنوان مواد رنگی و داروئی مصرف می شوند. انتشار این مواد در گیاهان محدود بوده و اکثراً در گیاهان خانواده رامناسه، پولی گوناسه، روبیاسه، لگومینوزها و لیلیاسه یافت می گردند. این دسته از ترکیبات طبیعی در اثر هیدرولیز تولید آگلیکون هائی می نمایند که از مشتقات دی- یا تترا- هیدروکسی آنتراکینون یا ترکیبات وابسته به آن می باشند.




Anthraqinone

**اثر دارویی و موارد استعمال**

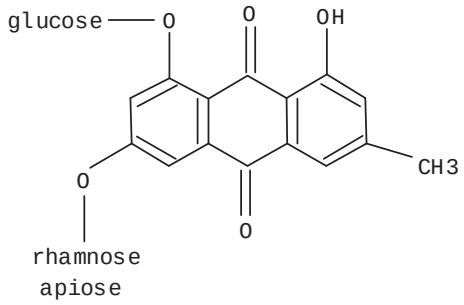
آنتراکینون های آزاد بدون قسمت قندی دارای خاصیت دارویی کمی می باشند و وجود قسمت قندی برای خاصیت بیولوژیک دارو ضروری بنظر می رسد، چون انتقال آگلیکون را به محل اثر در روده بزرگ تسهیل می کند. بدون قسمت قندی، قسمت اعظم آگلیکون طی متابولیسم از بین می رود.

گلی کوزیدهای آنتراکینونی از ترکیبات مسهلی بوده و طرز اثر آنها با افزایش قدرت انقباض عضلات صاف جدار روده و افزایش ترشحات آب و املاح در داخل روده می باشد، اثر دارویی آنها بعد از ۶ الی ۱۲ ساعت ظاهر می شود. باید توجه داشت که گلی کوزیدهای نوع آنترانول و آنترون اثر بسیار شدیدتری نسبت به گلوکوزیدهای آنتراکینونی دارند و زیاد بودن گلوکوزیدهای آنترانول و آنترون در مخلوط گلی کوزیدها اغلب باعث پیچش و ناراحتی دستگاه گوارش می گردد.

**طبقه بندی آنتراکینونها**

به طور کلی آنتراکینون گلی کوزیدها را به دو گروه دسته بندی می نمایند:

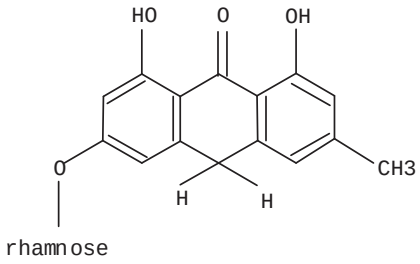
۱- آنتراکینون گلی کوزیدهائی که از ۱، ۸ دی هیدروکسی آنتراکینون ( 1,8-Dihydroxyanthra qinone) مشتق شده اند مثل:



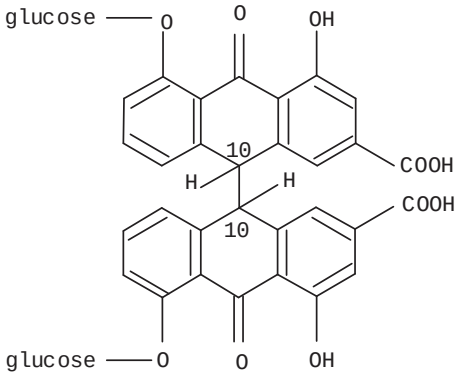

Glucofrangulin A,B

۲- آنتراکینون گلی کوزیدهائی که از مشتقات ۱، ۸ دی هیدروکسی آنترون ( 1,8-Dihydroxy anthrone)می باشند، مثل:

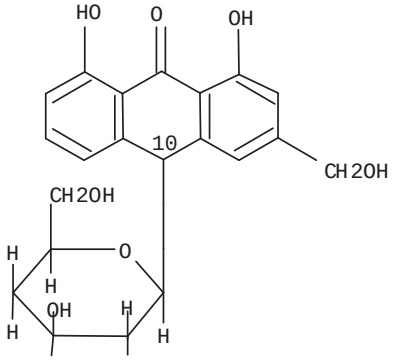
I-Frangularoside




II- Dianthron glycosides (Sennoside A,B)




III- Aloin




قابل توجه است که اتصال قند به حلقه غیرقندی می تواند از طریق اکسیژن یا کربن باشد.

## روش کار

### شناسایی آنتراکینون ها

از مهمترین روش های شناسائی آنتراکینون گلی کوزیدها، واکنش بورن تراگر (Born traeger) می باشد. این ترکیبات (۱، ۸- دی هیدروکسی آنتراکینون) در مجاور قلیائی ها تشکیل فنولات می دهند که دارای رنگ قرمز بوده و در ناحیه ۵۲۰ نانومتر قابل جذب می باشند.

برای شناسایی این ترکیبات در ریشه روبارب و پوست فرانگولا و در فرآورده های دارویی آنها از همین روش بورن تراگر استفاده شده ولی برای شناسائی آنتراکینون های برگ سنا و میوه های آن از روش تغییر یافته بورن تراگر استفاده می شود. برای بررسی Aloin و Aloinosid در صبر زرد از واکنش **شانن** استفاده می گردد.

## روش کار

### آزمایش بورن تراگر

۱- مقدار ۱۰ گرم پودر برگ سنا را در ۳۰ml متانول ریخته روی بن ماری قرار داده تا حجم آن نصف شود. سپس عصاره را صاف کرده و خشک کنید.

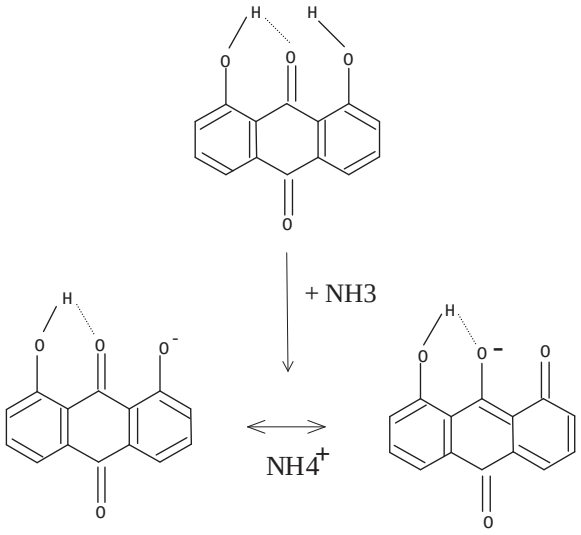
۲- عصاره الکلی بدست آمده را در ۱۰ml آب مقطر حل کرده و سپس صاف نمائید.

۳- محلول صاف شده را با 5ml بنزن در یک آمپول دکانتاسیون تکان داده و بگذارید دو لایه از یکدیگر جدا شوند.

۴- فاز بنزنی را به یک لوله آزمایش منتقل کرده و 5ml محلول آمونیاک به آن افزوده و تکان دهید.

۵- رنگ لایه قلیائی را ملاحظه نمائید (تولید رنگ قرمز نشان مثبت بودن وجود ترکیبات آنتراکینونی می باشد).

### مراحل واکنش بورن تراگر



**آزمایش بورن تراگر تغییر یافته**

۱- مقدار ۰/۳ گرم از نمونه گیاه مورد آزمایش را با ۱۰ml محلول ۰/۵ نرمال پتاس و ۱ml آب اکسیژنه رقیق بمدت ۱۰ دقیقه در بن ماری حرارت دهید.

۲- پس از خنک کردن محلول ۱۰ قطره اسید استیک خالص بدان افزوده تا محیط اسیدی گردد (تورنسل).

۳- محلول اسیدی حاصل را با ۱۰ میلی لیتر بنزن در یک آمپول دکانتاسیون تکان داده و لایه بنزنی را به دو قسمت تقسیم نمائید.

۴- به قسمت اول ۴ml آمونیاک افزوده و مخلوط نمائید و قسمت دوم را بعنوان شاهد نگهدارید.

۵- رنگ حاصل دو لایه قلیائی را ملاحظه نمائید (رنگ قرمز یا صورتی در لایه بنزنی نشانه وجود ترکیبات آنتراکینونی است).

# جداسازی اسانس گل بابونه و تعیین میزان کامازولن با روش اسپکتروفتومتری

## روش کار

### الف) جداسازی اسانس های بابونه با روش تقطیر با آب

مقدار ۵ گرم نمک (کلرید سدیم) را در ۵۰۰ml آب مقطر در یک بالون یک لیتری حل نموده و میزان ۵ گرم گل بابونه به آن اضافه کنید.

بالون را به دستگاه اسانس گیری وصل کرده و عمل تقطیر را برای مدت ۴ ساعت با سرعت ۳/۵ میلی لیتر در دقیقه انجام داده و از ۱ میلی لیتر نرمال پنتان (*n*-Pentan) بعنوان حلال آلی جهت جمع آوری اسانس در قسمت حبابدار دستگاه استفاده نمائید. بعد از گذشت زمان تقطیر، حرارت را متوقف کرده و بعد از مدت ده دقیقه اسانس همراه *n*- پنتان را به خارج هدایت کنید. بعد از تبخیر کامل *n*- پنتان در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، اسانس باقی مانده را تعیین وزنی نمائید.

### ب) تعیین میزان کامازولن با روش اسپکتروفتومتری

برای تعیین میزان کامازولن در اسانس استخراج شده، اسانس را به یک بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری منتقل نموده و با دی کلرومتان به حجم برسانید. طول موج جذب حداکثر محلول تهیه شده را با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین کنید و در پایان جذب محلول تهیه شده را در طول موج ۶۰۳ نانومتر و توسط کووت یک سانتی متری اندازه گیری نمائید. در صورتیکه جذب محلول مورد آزمایش در دستگاه بیشتر از ۰/۸ باشد محلول را به نسبت ۱:۱۰ با استفاده از دی کلرومتان رقیق کنید. در شرایطی که جذب کمتر از ۰/۱ باشد بایستی محلول را تغلیظ نمود. ثابت جذب مولار کامازولن $\varepsilon = ۴۲۰$

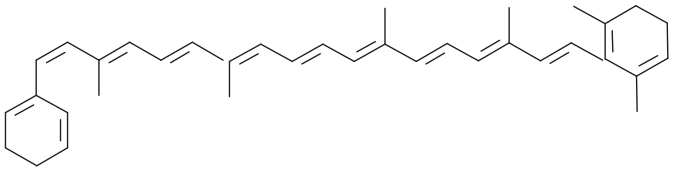
وزن مولکولی کامازولن $M_w$=۱۸۴/۳ می باشد.

$$A= \varepsilon.c.l.$$

# جداسازی لیکوپن و β- کاروتن از گوجه فرنگی

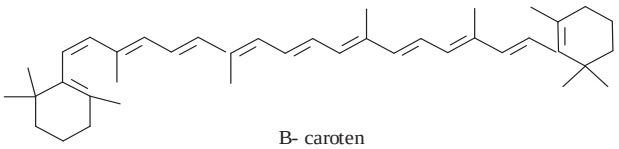
کاروتنوئیدها که تتراترپنوئید (C40) می باشند از فراوانترین پیگمانهای محلول در چربی بوده و در انواع گیاهان یافت می شوند. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع کاروتنوئید شناخته شده است که ما معروفترین و متداولترین آنها، یعنی β- کاروتن و لیکوپن را مورد بررسی قرار می دهیم. خاصیت رنگی و حساسیت آنها در مقابل اکسیژن هوا به علت وفور پیوندهای مزدوج این ترکیبات می باشد که در ساختمان آنها واحدهای متعددی از ایزوپرن شرکت نموده است.

لیکوپن، رنگ قرمز موجود در گوجه فرنگی و میوه جات دیگر است که از هشت واحد ایزوپرن ساخته شده است. بطوریکه یک سیستم کاملاً مزدوج با باندهای دوگانه (مزدوج) دارد و به علت کروموفور بودن دارای رنگ شدیدی می باشد. لیکوپن به عنوان رنگ غذائی استفاده می شود.

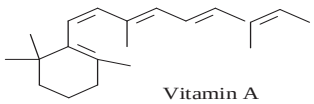


Licopen

β- کاروتن، رنگ زرد موجود در هویج است که در برگ سبز گیاهان و گلها توام با کلروفیل و گزانتوفیل و در میوه جات و نیز در چربی شیر و کره و سرم خون ماده رنگی با شدت کمتری نسبت به لیکوپن می باشد. کاروتن دارای چهار ایزومر (ε , λ , β , α) است که تفاوتشان در طرز تشکیل حلقه و موقعیت بندهای دوگانه می باشد. β- کاروتن برای تهیه ویتامین A بکار می رود.



B- caroten



Vitamin A

توجه کنید که این ترکیبات کاروتنوئید نسبت به اکسیداسیون فتو شیمیائی هوا بسیار حساس می باشند، از این نظر باید محلولها و اجسام جامد را از نور محفوظ نگاهدارید.

از آنجائیکه برای انجام این آزمایش احتیاج به دو نوع کروماتوگرافی (۱- ستونی ۲- نازک لایه) داریم. مختصراً تئوری این دو نوع کرماتوگرافی عنوان می گردد.

کروماتوگرافی: کروماتوگرافی به مجموعه ای از روش ها جهت جدا کردن مواد موجود در مخلوط ها گفته می شود که اساس همه آنها اختلاف وضعیتی این مواد بین دو فاز غیر قابل اختلاط (ثابت، متحرک) می باشد. جدا کردن و تصفیه ترکیبات موجود در گیاهان اغلب از طریق به کاربردن یک یا مجموعه از چند روش کروماتوگرافی انجام می شود. روش انتخابی بستگی به حلالیت یا فراریت جسم مورد نظر دارد.

**کروماتوگرافی ستونی**

با این روش می توان مواد را به کمک باندهای مختلفی که روی فاز ثابت تشکیل می دهند، جدا و خالص نمود. عصاره خام که حاوی ترکیبات زیادی می باشد باندهائی ایجاد می کند که هر کدام شامل تعدادی ترکیبات ساده دیگر می باشند.
بطور کلی به وسیله این روش می توان بیشتر آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی، آنتراکینونها و روغن های فرار و ... را جدا نمود. درستون کروماتوگرافی حرکت مواد بستگی به حلال، ماده جاذب و ماهیت خود عصاره مورد آزمایش دارد.
در کروماتوگرافی ستونی فاز ثابت ممکن است مایع یا جامد (سیلیکاژل، اکسید آلومینیوم، گزیل گور، آلومینا، کربنات سدیم و ...) باشد. داخل ستونهای شیشه ای که به اندازه های مختلف ساخته شده اند، فاز ثابت را ریخته و سپس عصاره ماده خام را که دارای غلظت مناسبی است وارد ستون می نمایند و غلظت توسط حلال مواد را روی ستون حرکت داده که برحسب پلاریته آنها باندهائی به اندازه های مختلف در طول ستون بوجود می آیند. در صورتیکه بخواهند مقدار زیادی از جسم را جدا و خالص نمایند استفاده از این روش کروماتوگرافی ضروری بوده و بدین وسیله می توان مقادیری در حدود گرم از جسم را بدست آورد.

**تین لایر کروماتوگرافی (TLC کروماتوگرافی روی لایه نازک**

تین لایر کروماتوگرافی طریقه بسیار مناسبی برای تعیین یکنواخت بودن مواد شیمیایی و آزمایش فرآورده های خام و خالص نمودن آنها از ناخالصی ها و همچنین بررسی پیشرفت واکنش های شیمیایی است و همراه با سایر روش های تجزیه جهت اثبات یکنواختی نمونه هائیکه از منابع گوناگون بدست می آیند، به کار می رود. چون مقدار نمونه ای که برای این روش به کار می رود بسیار ناچیز می باشد (در حدود میکروگرم) بنابراین، این طریقه در مواردیکه مقدار کمی از جسم مورد آزمایش در دسترس است دارای ارزش زیادی است.
به کار بردن لام میکروسکوپی جهت تین لایر کروماتوگرافی دارای ارزش و اهمیت زیادی است. در این طریقه احتیاج به لوازم گرانقیمت که معمولاً برای پخش لایه جاذب بر روی صفحات شیشه ای لازم است، نبوده و بدین وسیله می توان تعداد زیادی صفحه شیشه ای آغشته به ماده جاذب را در مدت کوتاهی تهیه نمود. صفحاتی را که به طریق مذکور در زیر تهیه می نمایند می توان فوراً بدون خشک کردن به طریقه مخصوص و فعال کردن آنها بوسیله حرارت مورد استفاده قرار داد.
زمان متوسط برای حرکت حلال بر روی لام میکروسکوپی آغشته به لایه جاذب در حدود ۵ دقیقه بوده در حالیکه در مورد صفحات شیشه ای بزرگتر این زمان طولانی تر است.

**تهیه صفحات شیشه ای لایه دار**

در یک شیشه در سمباده دهان گشاد مخلوطی از ۷۰ گرم سیلیکاژل و ۲۰۰ سی سی کلروفرم را بخوبی مخلوط می کنیم تا اینکه سوسپانسیون کاملاً یکنواختی حاصل گردد. لام های میکروسکوپی را با قرار دادن داخل این سوسپانسیون از یک ورقه نازک سیلیکاژل می پوشانیم، سپس می گذاریم تا کاملاً کلروفرم تبخیر شده و یک طرف لام را بوسیله کاغذ یا پارچه نرمی بخوبی تمیز می نمائیم.

این صفحات آغشته به سیلیکاژل فوراً قابل مصرف بوده می توان آنها را در دسیکاتور بمدت طولانی نگهداری نمود. سوسپانسیون باقیمانده را نیز می توان به مدت طولانی نگهداری نمود و بهتر است که سعی شود از تبخیر کلروفرم جلوگیری به عمل آید.

**طرز قرار دادن نمونه بر روی لام**

نمونه ای که بر روی لام قرار داده می شود باید در یک حلال فرار مانند کلروفرم، اتر یا استن حل شده باشد. در این طریقه مقدار بسیار کمی از جسم مورد نیاز بوده و محلول را معمولاً با حل کردن در حدود یک میلیگرم در ۵ یا ۶ قطره از حلال تهیه می نمایند. محلول را به کمک لوله موئینه بسیار نازکی بر روی لایه جاذب و در حدود ۵ میلی لیتر بالاتر از لبه تحتانی لام قرار می دهند. باید توجه داشت که نمونه باید به اندازه کافی از سطح حلال بالاتر قرار داده شده باشد. امکان دارد که بتوان تا حدود ۵ نمونه را بر روی یک لام میکروسکوپی قرار داد.

**پیشروی حلال**

برای پیشروی حلال بر روی لام آنرا در داخل یک محفظه شیشه ای محتوی حلال مناسب قرار داده و با قرار دادن یک باریکه از کاغذ صافی که در جدار محفظه محتوی حلال که بوسیله حلال مرطوب شده است سبب اشباع محفظه از بخار حلال شده و بدینوسیله از تبخیر حلال موجود بر روی لام در طول پیشروی جلوگیری شده و در نتیجه زمان لازم برای پیشروی تقلیل داده می شود.

صعود حلال را تا نقطه مورد دلخواه اجازه داده، سپس صفحه را از محفظه خارج نموده در هوا خشک می کنیم.

**روش کار**

**۱) استخراج لیکوپن و β- کاروتن**

تقریباً ۵ گرم رب گوجه فرنگی را در بالن کوچک قرار داده و به آن ۱۰ میلی لیتر استن می افزائیم و بر روی آن مبرد نصب نمائید و سپس مدت ۵ دقیقه رفلاکس کنید.

مخلوط گرم را بر روی یک قیف کوچک صاف کنید مواد جامد روی کاغذ صافی را مجدداً به بالن منتقل نمائید و عمل استخراج را دو بار دیگر و هر بار با ۱۰ میلی لیتر استن تکرار کنید و بالاخره مواد جامد را دو بار و هر بار با ۱۰ میلی لیتر پترولیوم اتر استخراج نمائید. محصول استخراج را به یک قیف جدا کننده منتقل کنید. به قیف ۱۰۰ میلی لیتر محلول اشباع نمک طعام اضافه کنید و تکان دهید. فاز آبی را جدا کنید و فاز آلی را مجدداً دو بار و هر بار با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر شستشو دهید. محلول استخراجی را با کمک سولفات سدیم بدون آب خشک نمائید و پس از صاف کردن به کریستالیزور کوچک منتقل و بر روی بن ماری تبخیر نمائید تا خشک شود.

**۲) خالص کردن لیکوپن و β- کاروتن بوسیله کروماتوگرافی ستونی**

**الف) تهیه ستون**

یک ستون به طول تقریبی ۳۰ سانتی متر و قطر داخلی ۲ سانتی متر را انتخاب نموده و با حلال بی اثر آلی (بنزن، اتردوپترول) تقریباً $\frac{2}{3}$ از ستون را پر کنید و به کمک یک لوله شیشه ای طویل کمی پشم شیشه را به انتهای ستون فروبرید. در داخل ستون مقداری شن بریزید تا در بالای پشم شیشه یک لایه ۰/۵ سانتی متری از آن تشکیل شود با پائین رفتن شن از داخل مایع حبابهای محبوس هوا خارج می شوند، در حالیکه با وسیله ای (یک مداد) دائماً به ستون می زنید به کمک یک قیف، ماده جاذب (اکسید آلومینیوم یا آلومین) را وارد ستون کنید و هنگام پائین رفتن آلومین ستون را تکان دهید. این عمل به پر شدن یکنواخت ستون کمک می کند. جدار داخلی ستون را با کمی پترولیوم اتر اضافه شوئید تا آلومینای چسبیده شده جدا شود. برای محافظت آلومینهای پر شده یک لایه ۰/۵ سانتی متری شن در بالای ستون قرار دهید (طول لایه آلومین باید بیشتر از ۱۰ سانتی متر باشد) شیر ستون را باز کنید و بگذارید تا حلال خارج شود و درست به بالای لایه شن بالائی برسد در این حال ستون برای قرار دادن نمونه آماده است. دقت نمائید که حلال همواره در ستون در فضای این ماده جاذب باید وجود داشته باشد و تمام حلال را خارج نکنید.

**ب) جداسازی لیکوپن و β-کاروتن**

محصولات استخراج را که به صورت خشک تهیه نموده اید، در حدوداً ۳ میلی لیتر پترولیوم اتر حل نمائید و به صورت قطره قطره به ستون اضافه نمائید و سپس از حلال مناسب برای جداسازی استفاده می نمائیم. حلال مناسب در این آزمایش مخلوط ۱۰٪ استن و ۹۰٪ پترولیوم اتر می باشد که ابتدا لایه نارنجی رنگ (لیکوپن) و سپس لایه زرد رنگ (کاروتن) جدا می گردد. وقتی لایه نارنجی را جدا نمودید برای خارج نمودن لایه زرد رنگ از استن استفاده کنید.با تغییر قطبیت حلالها همه اجزاء را با هم عبور نداده و فرصت عبور طبقات را به ترتیب و با سرعت مناسب می دهید. سپس فازهای رنگی را جدا نموده و در کریستالیزور و در روی بن ماری قرار داده تا حلال آن تبخیر گردد و بعد آنها را در تاریکی قرار می دهیم.

## ۳) بررسی لیکوپن و β- کاروتن بوسیله تین لایرکروماتوگرافی

**الف) تهیه صفحات TLC (کروماتوگرافی روی لایه نازک)**

در کروماتوگرافی لایه نازک، جسم بین فازهای مایع و جامد پخش می شود و بدین جهت در دسته کروماتوگرافی جذبی جامد- مایع قرار می گیرد. جسم فاز جامد را به صورت یک لایه نازک در روی قطعه شیشه پخش می کنند. در این آزمایش فاز جامد مورد استفاده سیلیکاژل یا اکسید آلومینیوم (آلومین) است، که برای تهیه این صفحات سوسپانسیونی از سیلیکاژل در کلروفرم را تهیه نموده و با قرار دادن یک قطره بزرگ روی لام میکروسکوپی و با حرکت دادن لام آنرا روی صفحه پخش می نمائیم. سپس در مجاورت هوا کلروفرم آن تبخیر می شود.

**ب) بررسی مواد رنگی حاصل از کروماتوگرافی ستونی با کمک TLC**

به مواد رنگی حاصل از استخراج و جداسازی با کروماتوگرافی ستونی در حدود ۰/۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه می کنیم تا حل شود. ممکن است به خاطر اکسیداسیون قسمتی از آنها بوسیله هوا و تبدیل شدن به مواد غیر محلول کاملاً حل نشوند ولی برای آزمایشهای متعدد TLC به اندازه کافی مایع رنگین شناور در آنها وجود دارد. کاروتنوئیدها پیگمانهای غیر ثابتی می باشند و به طور سریع اکسیداسیون فتو شیمیایی خود به خود انجام می دهند، البته در ضمن کروماتوگرافی بوسیله بخار حلال محافظت می شوند ( توجه کنید که محلول را دور از نور نگه دارید). بر روی صفحه TLC بوسیله لوله های موئین از مخلوط ها نقطه گذاری می نمائیم. سپس مخلوط های رنگی را بوسیله حلالهای زیر جداسازی نمائید. برای جدا سازی البته باید تانک کروماتوگرافی را آماده نمائید که در اینجا از بشر ۵۰ میلی لیتری استفاده می کنیم. حدود ۲ میلی لیتر از حلال یا مخلوط حلالها را در بشر ریخته و بوسیله در پوشی درب بشر را مسدود نمائید تا فضای آن از بخار حلال اشباع گردد سپس صفحه TLC را در داخل تانک قرار داده و درب بشر را ببندید تا حلال به همراه جسم به قسمت بالای صفحه حرکت کند وقتی قسمت اعظم صفحه را طی کرد، صفحه TLC را از تانک خارج نموده تا حلال آن تبخیر گردد و نتایج را بررسی نمائید.

حلالی مؤثر است که لکه ها را بخوبی جدا نماید، تعیین نمائید که کدام حلال برای جداسازی مناسبتر می باشد؟ در شرایط معین (ماده جاذب، حلال، ضخامت و همگنی لایه) سرعت حرکت ترکیب نسبت به سرعت پیشرفت حلال را Rf می گویند که ویژگی یک ترکیب است. برای تعیین این مقدار مسافتی را که جسم از خط شروع تا قسمت وسط لکه طی کرده اندازه می گیرند و آنرا به مسافتی که حلال پیموده تقسیم می کنند، این مسافتها را با خط شروع یکسانی می سنجند.

$$Rf = \frac{\text{مسافتی که جسم طی کرده}}{\text{مسافتی که حلال طی کرده}}$$

**حلالهای مورد استفاده**

۱- ۲۰٪ بنزن - ۸۰٪ هگزان

۲- ۱۰٪ استن - ۹۰٪ پترولیوم اتر

۳- ۵۰٪ بنزن - ۵۰٪ هگزان

۴- ۹۰٪ بنزن - ۱۰۰٪ پترولیوم اتر

۵- کلروفرم