دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده داروسازی

فارماکوگنوزی عملی (۲)

گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی اردبیل

بسم الله الرحمن الرحيم

مقررات کار در آزمایشگاه

لطفا نکات زیر را در ارتباط با کار عملی در آزمایشگاه رعایت فرمایید:

۱) سر ساعت مقرر در آزمایشگاه حاضر شوید.

۲) پوشیدن روپوش الزامیست.

۳) دستور کار مربوطه را پیش از جلسه مطالعه فرمایید.

۴) قبل از استفاده، برچسب مواد و حلال ها را به دقت بخوانید.

۵) با اسید و باز قوی و مواد فرار و سمی حتما زیر هود شیمیایی کار کنید.

۶) در صورت تماس با مواد و حلال های خورنده محل تماس را با آب فراوان شستشو داده و مراتب را به اطلاع مسئول آزمایشگاه برسانید.

۷) از محل جعبه کمک های اولیه و کپسول آتش نشانی آگاه باشید.

۸) از پوشیدن کفش روباز خودداری کنید.

۹) به نکات ایمنی گفته شده توسط استاد یا مسئول آزمایشگاه توجه کرده و در استفاده از وسایل و مواد حساس دقت لازم را مبذول فرمایید.

۱۰) در پی اتمام کار با همراهی تمام اعضای گروه، وسایل را شسته و قبل از خروج از آزمایشگاه تحویل مسئول آزمایشگاه بدهید.

استخراج و شناسایی کیفی آلکالوییدها

آلکالوییدها دسته مهمی از متابولیت های ثانویه گیاهان هستند که به خاطر داشتن اتم نیتروژن، عموما خاصیت بازی دارند. آلکالوییدها می توانند به فرم های باز آزاد، نمک (در ترکیب با یک اسید آلی)، آمین نوع چهارم (کواترنری)، و N- اکسید در گیاهان حضور داشته باشند.

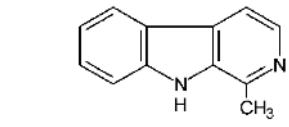
برای استخراج آلکالوییدها از این خاصیت بازی استفاده می شود؛ به این صورت که فرم باز آزاد آن ها در آب نامحلول و در حلال های آلی محلول است. از طرف دیگر با اسیدی کردن حلال آبی یا هیدروالکلی می توان آلکالوییدها را وارد فاز آبی کرد و برای تخلیص بیشتر می توان دوباره با بازی کردن محلول به دست آمده و مجاورت آن با یک حلال آلی (کلروفرم)، آلکالوییدها را وارد فاز آلی کرد. به طور کلی آلکالوییدها به دو روش عمده استخراج می شوند:

۱) خیساندن و بازی کردن پودر گیاه با کربنات کلسیم و سپس استخراج آلکالوییدها با یک حلال آلی که در ادامه با مجاورت عصاره به دست آمده با محلول آبی اسیدی، آلکالوییدها وارد فاز آبی شده و مواد ناخالصی در فاز آلی باقی می مانند. در ادامه می توان با قلیایی کردن مجدد فاز آبی، رسوب خالص تر آلکالوییدها را به دست آورد.

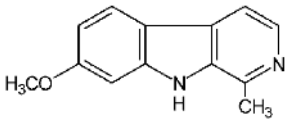
۲) در حالت دوم عصاره گیری با حلال الکلی یا هیدروالکلی اسیدی انجام می شود. در ادامه عصاره را در مجاورت با حلال آلی مانند کلروفرم، قرار می دهند تا ناخالصی ها وارد فاز آلی شوند. در نهایت با بازی کردن عصاره آبی اسیدی، رسوب آلکالوییدی به دست می آید.

برای شناسایی آلکالوییدها و تایید حضور آن ها در عصاره از معرف هایی مانند واگنر (ید در یدید پتاسیم)، مایر (یدید پتاسیو مرکوریک)، و دراژندورف (یدید بیسموت پتاسیم) استفاده می کنند. همه این معرف ها در شرایط اسیدی در حضور آلکالوییدها تولید رسوب رنگی می کنند.

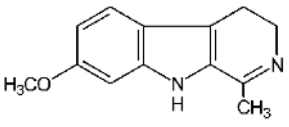
در آزمایش حاضر از روش دوم برای استخراج آلکالوییدهای گیاه اسپند (*Peganum harmala*) استفاده شده و حضور آن ها با معرف های مایر و واگنر تایید می شود. در نهایت با بازی کردن عصاره، آلکالوییدها رسوب می کنند که وزن آن تعیین می شود.



Harmane



Harmine



Harmaline

مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	تعداد برای هر گروه	نام	مقدار برای هر گروه
هیتر	یک عدد	دانه اسپند	۱۰ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	متانول	۵۰ سی سی
ارلن ۲۵۰ سی سی	دو عدد	آب مقطر	۵۰ سی سی
قیف دکانتور	یک عدد	دی کلرومتان یا کلروفرم	۱۰۰ سی سی
لوله آزمایش	چهار عدد		
پیپت و پوآر	یک عدد		
نوار pH متر	سه عدد		
پتری دیش	یک عدد		

کاغذ صافی، معرف های واگنر و مایر، اسید سولفوریک و آمونیاک یا سود غلیظ، منیزیم سولفات، اسپاتول، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) عصاره گیری (Extraction): ۱۰ گرم از دانه های اسپند را برداشته و به روی آن ۱۰۰ میلی لیتر حلال هیدروالکلی (متانول-آب۵۰٪) اضافه کنید. سپس به محلول چند سی سی اسید غلیظ اضافه کنید تا pH آن به ۲ برسد. سپس ارلن حاوی اسپند و حلال اسیدی را روی هیتر قرار دهید تا به مدت یک ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد عصاره گیری کامل شود. بعد از یک ساعت، عصاره را صاف کنید.

۲) شناسایی کیفی: قبل از ادامه آزمایش به دو لوله آزمایش حدود ۵ میلی لیتر از عصاره را ریخته و به یکی چند قطره معرف مایر و به دیگری چند قطره معرف واگنر بیافزایید. نتیجه را به صورت کدر شدن (+)، کدورت زیاد بدون تولید رسوب (++)، و تولید رسوب (+++) گزارش کنید.

۳) جداسازی اولیه (Separation): پس از تایید حضور آلکالویید، عصاره صاف شده را داخل قیف دکانتور ریخته و آن را سه بار و هر بار با ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان یا کلروفرم استخراج کنید. محلول آلی را جدا کرده و به آن منیزیم سولفات اضافه کنید تا آب آن گرفته شده و صاف شود. از فراکشن آلی و آبی ۵ میلی لیتر در داخل لوله آزمایش بریزید و ابتدا به فاز آلی چند قطره اسید اضافه کرده و سپس هر دو فاز آلی و آبی را از نظر حضور آلکالویید مثل مرحله دوم تست کنید.

۴) جداسازی نهایی (Isolation): ابتدا یک پتری دیش یا بشر را وزن کرده و وزن آن را یادداشت کنید. سپس فراکشن آبی را به کمک آمونیاک یا سود بازی کنید تا رسوب آلکالوییدی تشکیل شود. سپس به محلول حاوی رسوب، دی کلرومتان (۱۰ تا ۱۵ سی سی) افزوده و به آرامی هم بزنید تا رسوب مورد نظر در دی کلرومتان حل شود. در نهایت دو فاز ایجا شده را به کمک قیف دکانتور جدا کرده و فاز دی کلرومتانی را در وزن ظرف شده بریزید تا خشک شود. وزن باقیمانده خشک را گزارش کنید.

استخراج و تعیین مقدار کافئین

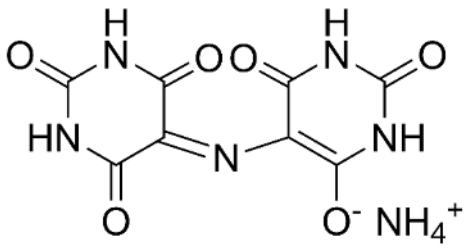
کافئین جزو آلکالوییید های پورینی است که در دو نوشیدنی های رایج یعنی قهوه و چای یافت می شود. میزان کافئین در برگ چای بیشتر بوده و حدود یک تا ۳ درصد است. تئوفیلین و تئوبرومین از دیگر آلکالوییید های پورینی هستند که در چای، قهوه و کاکائو یافت می شوند. با توجه به تفاوت های ساختاری و منشا بیوسنتزی، آلکالوییید های پورینی را گاهی آلکالوییید های کاذب می نامند. این آلکالوییید ها در آب داغ وارد می شوند و می توان آن ها را با آب داغ به سرعت از برگ چای یا پودر دانه قهوه استخراج کرد.

caffeine

theophylline

theobromine

آلکالوییید های پورینی به معرف های معمول مانند واگنر پاسخ مثبت نمی دهند و برای بررسی حضور آن ها باید از تست موروکساید (Murexide) بهره برد که طی آن ترکیب موروکساید (شکل زیر) ایجاد می شود که رنگ بنفش-قرمز دارد.



در آزمایش حاضر کاقئین برگ چای استخراج شده و حضور آن با تست موروکساید تایید می شود. سپس کافئین ابتدا به صورت پودر از عصاره جداسازی شده و درنهایت با کریستالیزاسیون به صورت خالص به دست می آید.

مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	**تعداد برای هر گروه**	**نام**	**مقدار برای هر گروه**
هیتر	یک عدد	چای (کیسه ای)	۲۰ گرم (۱۰ عدد)
قیف شیشه ای	یک عدد	استون	۱۰ سی سی
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد	آب مقطر داغ	۱۵۰ سی سی
قیف دکانتور	یک عدد	دی کلرومتان یا کلروفرم	۸۰ سی سی
بشر ۲۵۰ سی سی	یک عدد		
بشر ۵۰ سی سی یا کوچکتر	یک عدد		
میله شیشه ای	یک عدد		
پتری دیش	بزرگ و کوچک مکمل هم		
شیشه ساعتی	یک عدد		

کاغذ صافی، یخ قالبی، دستکش نسوز یا حوله ای، اسید هیدروکلریک و آمونیاک غلیظ، منیزیم سولفات، کلرات پتاسیم، اسپاتول، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۲۰ گرم برگ چای خشک (معادل ۱۰ عدد چای کیسه ای) را در بشر ریخته و روی آن حدود ۱۵۰ میلی لیتر آب (ترجیحا داغ) بریزید. بشر را روی هیتر با دمای ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده و اجازه بدهید عصاره گیری کامل شود. بعد از ۲۰ دقیقه تفاله را خارج کرده و عصاره صاف شده را کنار بگذارید تا سرد شود (در صورت لزوم عصاره را صاف کنید).

۲) جداسازی اولیه (Separation): عصاره سرد شده را داخل قیف دکانتور ریخته و آن را سه بار و هر بار با ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان یا کلروفرم استخراج کنید. محلول دی کلرومتانی را جدا کرده و به آن منیزیم سولفات اضافه کنید تا آب آن گرفته شود و درنهایت محلول را صاف کنید و محلول صاف شده را حرارت دهید تا حلال آن حذف شده و پودر کافئین ناخالص باقی بماند. وزن پودر به دست آمده را یادداشت کنید.

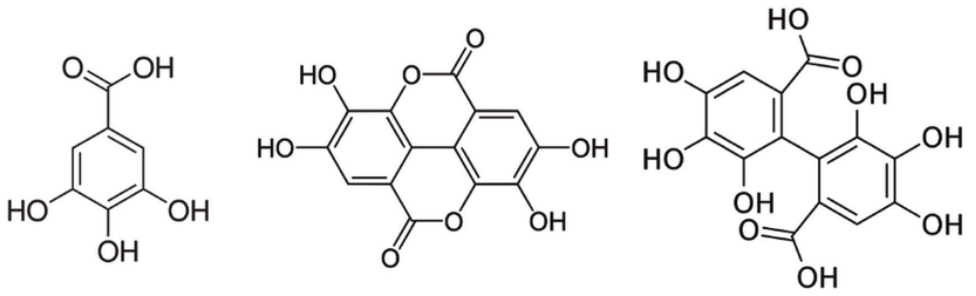
۳) جداسازی نهایی (Isolation): ابتدا دو پلیت شیشه ای مکمل را وزن کنید. سپس پودر به دست آمده را در داخل پلیت شیشه ای ریخته و بر روی آن پلیت دیگری (به صورت معکوس) قرار دهید. روی پلیت بالایی یک بشر حاوی یخ گذاشته از پایین حرارت دهید (حدود ۲۰۰ درجه سانتیگراد). در اثر تصعید کافئین خالص شده در سطح پلیت شیشه ای فوقانی تشکیل خواهد شد. پلیت بالایی را پس از خنک شدن برداشته و وزن کنید. با کم کردن وزن اولیه پلیت بالایی از وزن نهایی، مقدار دقیق کافئین خالص شده را به دست بیاورید.

۴) شناسایی کیفی: قبل از ادامه آزمایش مقدار کمی از پودر را در شیشه ساعت ریخته و سپس به آن به اندازه نوک اسپاتول از کلرات پتاسیم و چند قطره اسید هیدروکلریک غلیظ افزوده و هم بزنید. مخلوط را ابتدا خشک کرده و سپس در معرض بخار آمونیاک قرار دهید. در صورت حضور کافئین رنگ بنفش یا قرمز را ملاحظه خواهید کرد.

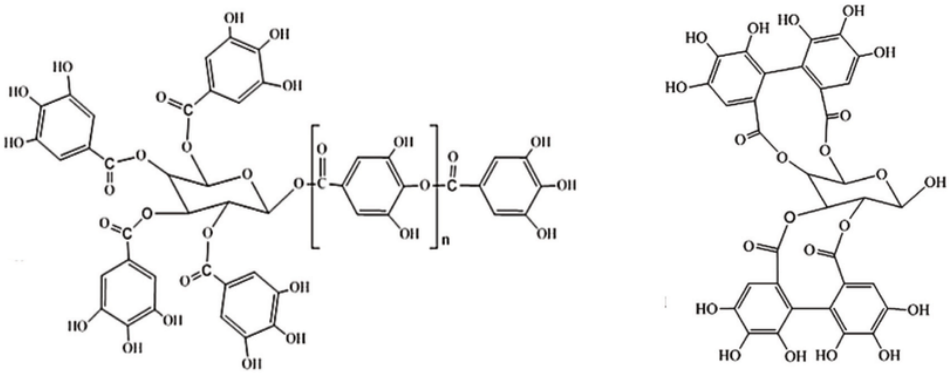
۵) خالص سازی (Purification): پودر کافئین به دست آمده را در یک بشر با کمترین مقدار استون به کمک حرارت و هم زدن حل کنید. سپس محلول را کنار بگذارید تا به آرامی سرد شود. با تبخیر و سرد شدن حلال در طی چند ساعت کریستال های خالص کافئین تشکیل خواهند شد.

استخراج و شناسایی تانن ها

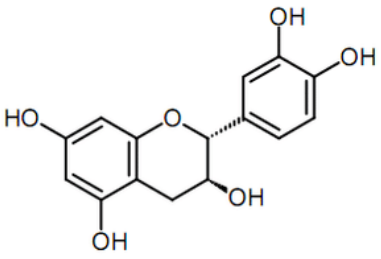
فنول ها به عنوان بزرگترین گروه متابولیت های ثانویه گیاهی، انواع ساختمان های شیمیایی از یک حلقه آروماتیک ساده تا پلیمرهای پیچیده را در برمی گیرند. یکی از گروه های فنولی که در داروسازی مورد توجه است تانن ها می باشند. واژه تانن اولین بار در سال ۱۷۹۶ برای ترکیبات گیاهی به کار رفت که با پروتئین های پوست حیوانات ترکیب شده و ایجاد چرم می کرد. تانن ها به دو دسته قابل هیدرولیز و فشرده تقسیم می شوند. تانن های قابل هیدرولیز از واحد های الاژیک اسید یا گالیک اسید تشکیل شده اند. الاژیک اسید و گالیک اسید را تانن های کاذب می نامند. در مقابل تانن های فشرده از واحد های کاتشین تشکیل شده اند. تانن های فشرده در آب نامحلول بوده و در مجاورت حرارت و اسید تولید فلوبافن های نامحلول می کنند. در حالی که تانن های هیدرولیز شونده در آب گرم محلول بوده و در مجاورت اسید یا باز رقیق به سرعت به گالیک یا الاژیک اسید هیدرولیز می شوند. تانن های هیدرولیز شونده در منابع بسیاری مانند پوست میوه انار، برگ چای و دانه های کاکائو یافت می شوند. برگ و مازو بلوط حاوی هر دو نوع تانن ها می باشد.



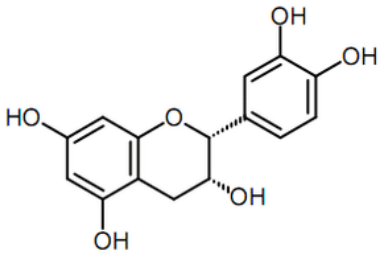
Gallic acid Ellagic acid Hexahydroxydiphenic acid



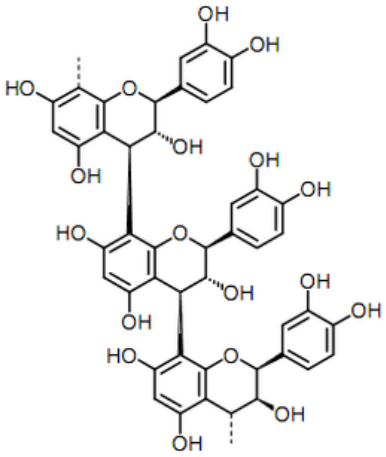
Gallotannin Epigallitannin



Catechin



Epicatechin



Procyanidin (condensed tannin)
Epicatechin-(4→8)-epicatechin-(4→8)-catechin

در آزمایش حاضر از پودر مازو استفاده شده و تانن های آن استخراج و سپس با تست کیفی حضور تانن تایید می شود. در انتها با آزمایش TLC لکه های حاصل از جداسازی عصاره با لکه استاندارد گالیک اسید مقایسه می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

محلول های استاندارد: کلرید سدیم ۱۰ درصد، کلرید فریک ۱ درصد، گالیک اسید ۴ mg/ml

سیستم حلال TLC: کلروفرم ۵۰ میلی لیتر + اتیل استات ۵۰ میلی لیتر + استیک اسید ۱ میلی لیتر

معرف TLC: وانیلین – سولفوریک اسید

وسایل		مواد	
نام	تعداد برای هر گروه	نام	مقدار برای هر گروه
هیتر	یک عدد	مازو	۱۰ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	متانول یا اتانول	۵۰ سی سی
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد	آب مقطر داغ	۳۰ سی سی
بشر ۱۰۰ سی سی	یک عدد		
لوله آزمایش	سه عدد		
کاغذ TLC	۸*۳ سانتی متر		
لوله موئین	دو عدد		
تانک TLC	یک عدد		

کاغذ صافی، چراغ الکلی دو عدد، اسید هیدروکلریک غلیظ، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۱۰ گرم نمونه گیاهی (مازو یا پوست انار یا برگ چای) را در بشر ریخته و روی آن حدود ۵۰ میلی لیتر متانول بریزید. بشر را روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و اجازه بدهید عصاره گیری کامل شود (حجم نصف شود). سپس عصاره را صاف کرده و خشک کنید.

۲) جداسازی اولیه (Separation): عصاره خشک شده را در ۲۰ میلی لیتر آب جوش حل کنید و چند قطره محلول کلرید سدیم ۱۰ درصد به آن اضافه کنید تا ترکیبات غیر تاننی رسوب کنند. سپس محلول صاف شده را برای آزمایش های کیفی زیر بردارید:

۳) شناسایی کیفی:

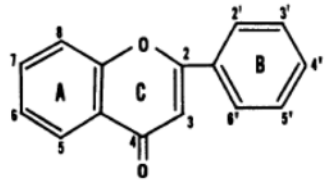
الف) چند میلی لیتر از عصاره را در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۳ تا ۴ قطره محلول کلرید فریک ۱ درصد اضافه کنید. تغییر رنگ و رسوب را گزارش کنید.

ب) به چند میلی لیتر از عصاره، دو تا سه قطره اسید کلریدریک افزوده و بجوشانید. تغییر رنگ و رسوب را گزارش کنید.

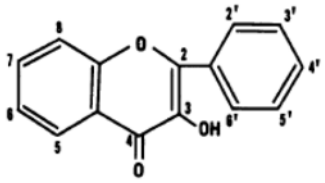
ج) ابتدا چند قطره اسید به عصاره افزوده و تکان دهید. سپس در یک کاغذ TLC ، با استفاده از لوله موئین از عصاره خود و استاندارد گالیک اسید لکه گذاری کنید. سپس در تانک حاوی سیستم حلال کلروفرم: اتیل استات: استیک اسید (۵۰:۵۰:۱) قرار دهید تا جداسازی انجام شود. درنهایت با معرف اسید سولفوریک – وانیلین یا فریک کلراید ۱٪ لکه ها را شناسایی کنید. نتیجه TLC و حضور گالیک اسید را گزارش کنید.

استخراج و شناسایی فلاونوییدها

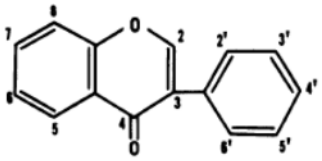
فلاونوئیدها بزرگترین زیر گروه ترکیبات فلاونوئیدی هستند و تاکنون بیش از ۲۰۰۰ ترکیب فلاونوئیدی جداسازی و شناسایی شده اند. فلاون در لاتین به معنای زرد رنگ هست و اغلب این ترکیبات در محلول قلیایی به رنگ زرد دیده می شوند. فلاونوئید ها از ۳ واحد استات و یک واحد فنیل پروپانوئید تشکیل شده اند و ساختمان اصلی آن ها شامل سه حلقه است. با تغییر نوع اتصال حلقه ها و گروه های عاملی می توانند تنوع ساختاری بالایی را ایجاد کنند که با نام های فلاون، فلاونول، فلاوانون، ایزوفلاون و ... شناخته می شوند. ترکیبات چالکونی و آنتوسیانیدینی نیز با ترکیبات فلاونوئیدی از لحاظ بیوسنتز در ارتباط هستند.



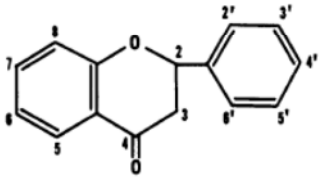
Flavones



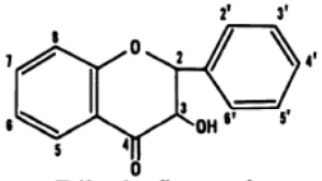
Flavonols



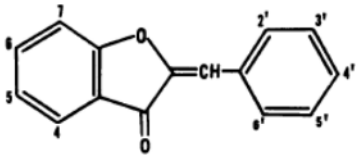
Isoflavones



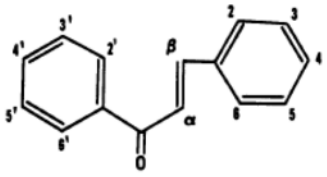
Flavanones



Dihydroflavonols



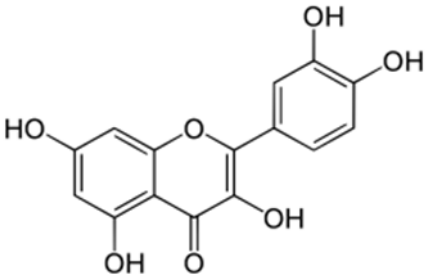
Aurones



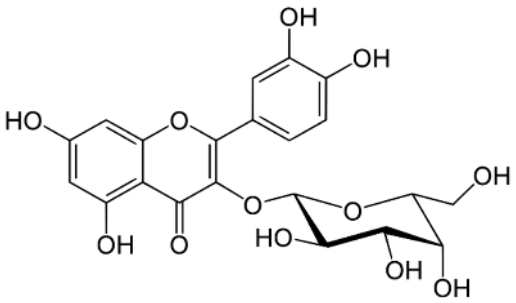
Chalcones

ترکیبات فلاونوئیدی به فرم آزاد و گلیکوزیله یافت می شوند که در اغلب موارد فرم قندی آن ها به صورت O-گلیکوزیله است ولی گاهی به فرم C-گلیکوزیله نیز یافت می شوند. ترکیبات گلیکوزیله در آب و الکل محلولند اما ترکیبات آزاد در حلال های آلی مانند دی کلرومتان و اتر حل می شوند. فلاونوئید ها در گیاهان خانواده های Polygonaceae، Rutaceae، Legominosae، Apiaceae و Asteraceae به وفور یافت می شوند.

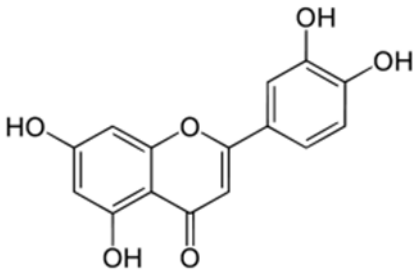
گیاه علف چای (*Hypericum perforatum*) که به داشتن اثرات ضد افسردگی مشهور است غنی از ترکیبات فلاونوئیدی مانند هایپروزید، کوئرستین و لوتئولین است. حضور این ترکیبات را می توان به وسیله تست Shinoda نشان داد. در این جلسه فلاونوئید های گیاه علف چای استخراج شده و توسط تست کیفی شناسایی می شوند.



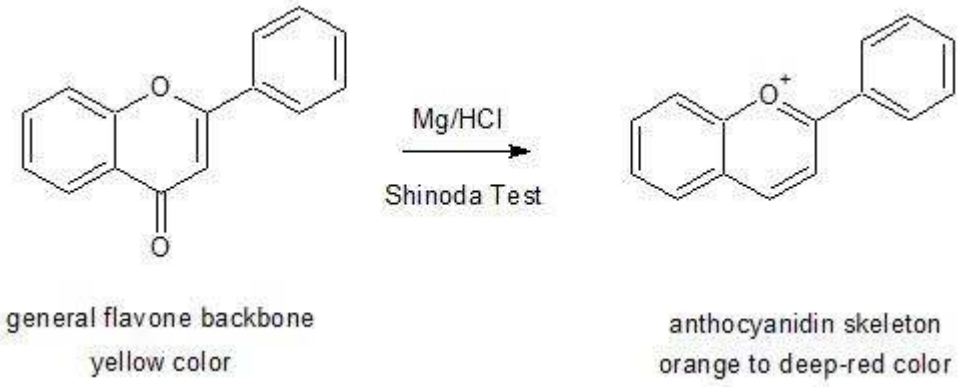
کوئرستین



هایپروزید



لوتئولین



مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	**تعداد برای هر گروه**	**نام**	**مقدار برای هر گروه**
هیتر	یک عدد	علف چای	۳ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	متانول	۳۰ سی سی
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد	پترولئوم اتر	۲۰ سی سی
بشر ۲۵۰ سی سی	یک عدد		
لوله آزمایش با استند	دو عدد		

کاغذ صافی، اتانول ۸۰ درصد حدود ۳۰۰ سی سی، اسید هیدروکلریک غلیظ، براده منیزیم، n-بوتانول یا آمیل الکل حدود ۱۰۰ سی سی، اسپاتول، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

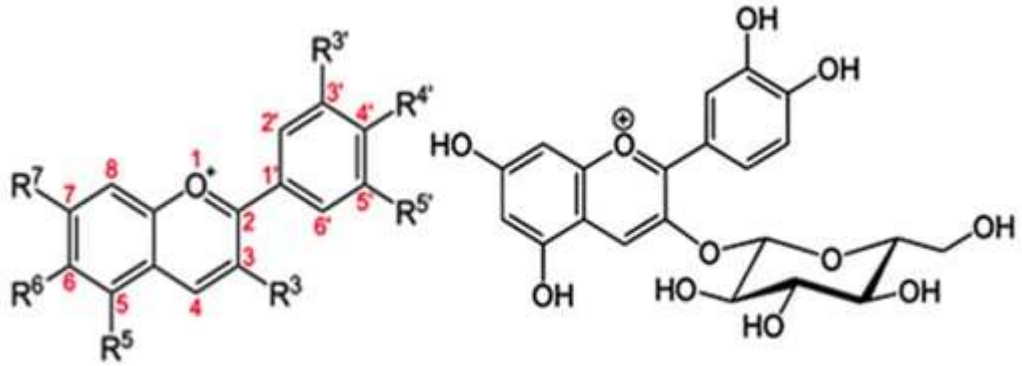
۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۳ گرم علف چای را در بشر ریخته و روی آن حدود ۳۰ میلی لیتر متانول بریزید. بشر را روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و اجازه بدهید عصاره گیری کامل شود (حجم نصف شود). سپس عصاره را صاف کرده و خشک کنید.

۲) جداسازی اولیه (Separation): عصاره خشک شده را دو بار و هر بار با ۱۰ میلی لیتر پترولئوم اترشستشو دهید. و سپس رسوب تمیز شده را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد حل کرده و در صورت لزوم صاف کنید. محلول صاف شده نهایی را برای انجام تست شناسایی در دو لوله آزمایش بریزید.

۳) شناسایی کیفی: یک لوله آزمایش را به عنوان شاهد نگه داشته و در لوله دیگر نیم میلی لیتر HCl غلیظ و نوک اسپاتول براده منیزیم یا روی بریزید. رنگ های حاصل را در طی ده دقیقه مشاهده و گزارش کنید. سپس به محلول سرد شده، ۲ میلی لیتر مخلوط آب:آمیل الکل یا n-بوتانول (۵۰:۵۰) افزوده و تکان دهید. بعد از جدا شدن فاز ها تغییر رنگ فازها را مشاهده و گزارش کنید.

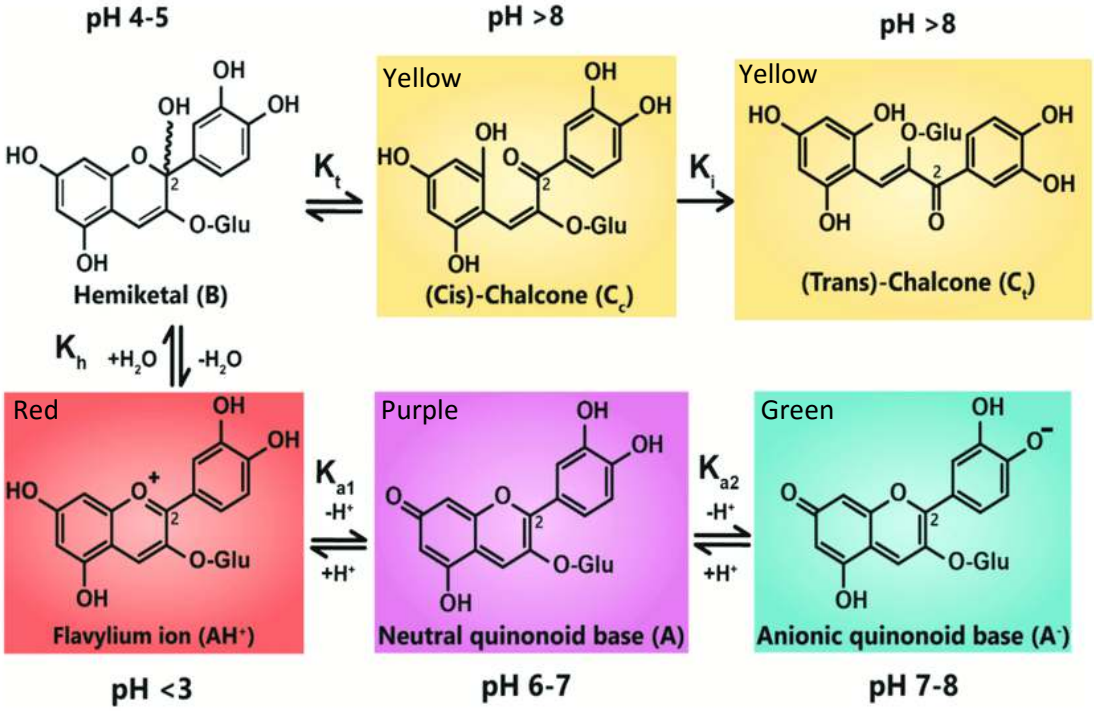
استخراج و شناسایی آنتوسیانین ها

آنتوسیانین ها از لحاظ ساختاری با فلاون ها در ارتباط بوده و در واقع زیر مجموعه ای از ترکیبات فلاونوئیدی هستند. در لغت آنتوسیانین (Antho + Kyanos) به معنای گل آبی است و در طبیعت این ترکیبات مسئول رنگ های متنوع گل و میوه گیاهان هستند. در اغلب مواقع در واقع آنتوسیانین سیانیدین مسئول رنگ تولید شده است که در pH های مختلف تولید رنگ های مختلف می کند. بعد از سیانیدین، پلارگونیدین و دلفینیدین پراکنش بیشتری در طبیعت دارند. در فرم های گلیکوزیله ترکیبات آنتوسیانینی، واحد قندی معمولا به جایگاه ۳ و کمتر به جایگاه ۵ متصل می شود.



		R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6	R7
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	H	OH
Delphinidin	Dp	OH	OH	OH	OH	OH	H	OH
Malvidin	Mv	OCH_3	OH	OCH_3	OH	OH	H	OH
Pelargonidin	Pg	H	OH	H	OH	OH	H	OH
Peonidin	Pn	OCH_3	OH	H	OH	OH	H	OH
Petunidin	Pt	OH	OH	OCH_3	OH	OH	H	OH

این ترکیبات در pH های اسیدی و بازی تغییر رنگ می دهند که از همین مسئله برای شناسایی کیفی استفاده می شود. در گذشته از عصاره غنی از آنتوسیانین ها به عنوان pH متر استفاده می شد.



مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	تعداد برای هر گروه	نام	مقدار برای هر گروه
هیتر	یک عدد	کلم قرمز	۲۰ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	آب مقطر	۲۰۰ سی سی
بشر ۲۵۰ سی سی	دو عدد		
لوله آزمایش با استند	چهارده عدد		
پیپت و پوآر	دو عدد		

کاغذ صافی، اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار ۲۰۰ سی سی، KOH ۱ مولار ۲۰۰ سی سی، پیپت و پوآر، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۲۰ گرم نمونه گیاهی (کلم قرمز یا گل رز) را در بشر ریخته و روی آن حدود ۱۰۰ میلی لیتر آب بریزید. بشر را روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه بجوشانید. سپس عصاره را صاف کرده و در صورت نیاز با آب حجم آن را به ۵۰ میلی لیتر برسانید.

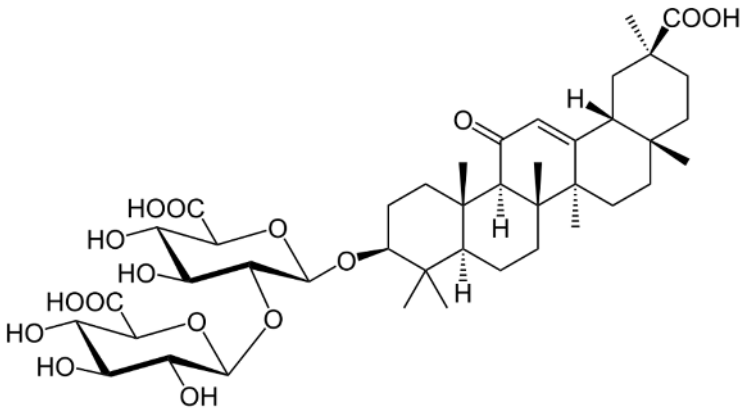
۲) شناسایی کیفی: ۱۴ لوله آزمایش بردارید و از ۱ تا ۱۴ شماره گذاری کنید. به لوله شماره ۱، ۵ میلی لیتر HCl ۰/۱ مولار اضافه کنید و سپس محلول لوله ۲ را با ده برابر رقیق کردن لوله ۱ بسازید (مثلا نیم سی سی از لوله ۱ به اضافه چهار و نیم سی سی آب).

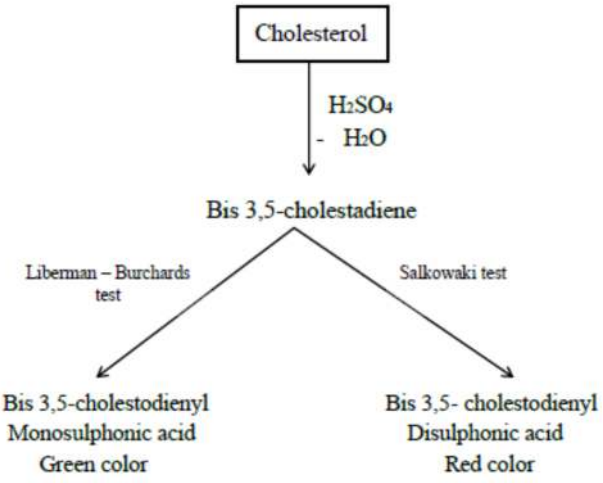
به همین ترتیب محلول لوله ۳ را از محلول ۲، و ۴ را از ۳ و .... تا محلول لوله ۶ را تهیه کنید. به این ترتیب از محلول ۱ تا ۶، دارای pH ۱ تا ۶ خواهند بود. به همین ترتیب با استفاده از KOH ۱ مولار، از لوله ۱۴ تا ۸ ، محلول هایی با pH ۱۴ تا ۸ را بسازید. به لوله آزمایش ۷ نیز فقط آب اضافه کنید تا pH خنثی داشته باشد. بعد از آماده کردن محلول های یک تا ۱۴، به هر کدام از لوله ها حدود ۲ سی سی از عصاره تهیه شده اضافه کرده و تغییر رنگ ها را مشاهده و گزارش کنید.

استخراج و شناسایی ترکیبات ساپونینی

ساپونین ها ترکیباتی با وزن مولکولی بالا هستند که در ساختمان خود دو جزء قندی و غیر قندی حضور دارد. جزء غیر قندی ساپوژنین خوانده می شود و می تواند شامل یک تری ترپن چهار حلقه ای (ساختار استروئیدی) یا یک تری ترپن پنج حلقه ای باشد. در واقع ساپونین ها ترکیبات تری ترپن گلیکوزیله هستند. گیاهان حاوی ساپونین از گذشته های دور جهت مصارف درمانی (شیرین بیان) و بهداشتی (چوبک) استفاده می شوند. این ترکیبات در آب تولید کف می کنند و اثر همولیتیک دارند که به صورت تزریقی می توانند سمی باشند.

ساپونین های استروئیدی اغلب در تک لپه ای ها یافت می شوند (مانند ازملک، یام و سیسال) و در تولید داروهای کورتونی به کار می روند. در مقابل ساپونین های تری ترپنی پنج حلقه ای اغلب در گیاهان دولپه ای از خانواده های اسفناج، آلاله، کاسنی، نخود و مانند آن یافت شده و به ندرت در گیاهان تک لپه ای مشاهده می شود. از گیاهان معروف حاوی ساپونین می توان به چوبک (*Acanthophyllum* spp.) از خانواده میخک اشاره کرد، که ریشه آن به علت تولید کف برای شستشو از قدیم به کار می رود. گیاه چغان یا Gypsophila از همان خانواده نیز کاربردهای درمانی در طب سنتی داشته و همینطور به صورت زینتی استفاده می شود و ریشه آن حاوی ترکیبات ساپونینی می باشد. گیاه شیرین بیان از خانواده نخود نیز که دارای اثرات ضد التهاب بوده و کاربرد فراوانی در طب سنتی و فیتوتراپی دارد، در ریزوم خود حاوی ترکیبات ساپونینی تری ترپنی پنج حلقه ای از جمله گلیسیریزین می باشد.





این ترکیبات قطبیت بالایی دارند و حضور آن ها را می توان با تولید کف یا ایجاد رنگ در تست های لیبرمن بورشارد و سالکوسکی تایید کرد.

مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	**تعداد برای هر گروه**	**نام**	**مقدار برای هر گروه**
هیتر	یک عدد	چغان	۱۵ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	ریشه شیرین بیان	۱۵ گرم
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد	متانول	۴۰ سی سی
بشر ۲۵۰ سی سی	یک عدد	آب مقطر	۵۰ سی سی
میله شیشه ای	یک عدد	کلروفرم	۱۵ سی سی
لوله آزمایش	سه عدد	پترولئوم اتر	۲۰ سی سی

کاغذ صافی ، اسید سولفوریک غلیظ، استیک اسید انیدر، چراغ الکی دو عدد با کبریت، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) شناسایی کیفی: مقدار کمی از نمونه گیاهی پودر شده را داخل یک لوله آزمایش ریخته و ۵ تا ۱۰ سی سی آب به آن اضافه کنید. لوله را ۳۰ ثانیه به شدت تکان دهید و سپس کف تولید شده را از لحاظ ارتفاع و پایداری (طی ۱۵ دقیقه) بررسی کنید. مشاهدات خود را گزارش کنید.

۲) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۱۰ گرم نمونه گیاهی (شیرین بیان، چغان) را در بشر ریخته و روی آن حدود ۳۰ میلی لیتر متانول بریزید. بشر را روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و اجازه بدهید عصاره گیری کامل شود (حجم نصف شود). سپس عصاره را صاف کرده و روی هیتر خشک کنید.

۳) جداسازی اولیه (Separation): عصاره خشک شده را دو بار و هر بار با ۱۰ میلی لیتر پترولئوم اترشستشو دهید. و سپس رسوب تمیز شده را در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل کرده و در صورت لزوم صاف کنید. چند سی سی از محلول صاف شده نهایی را برای انجام تست شناسایی در دو لوله آزمایش کاملا خشک بریزید.

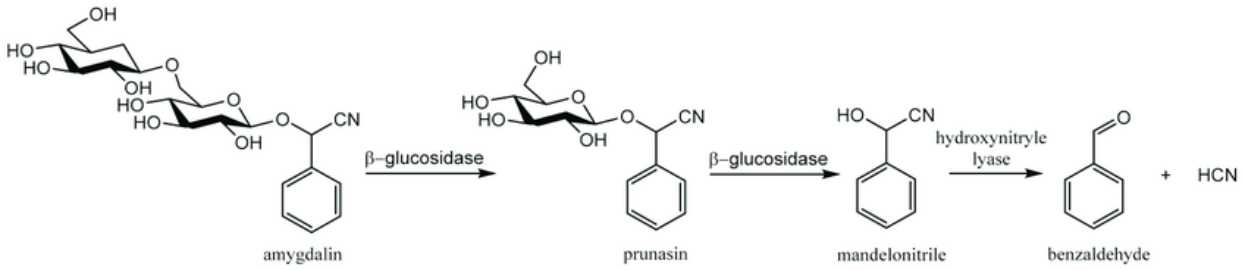
۴) تست لیبرمن بورشارد: در یک لوله آزمایش چند قطره استیک اسید انیدر اضافه کرده و تکان دهید و همراه با آن یک دقیقه حرارت دهید. سپس یک قطره اسید سولفوریک غلیظ افزوده به آهستگی مخلوط کنید. رنگ ایجاد شده و تغییرات آن را گزارش کنید.

۵) تست سالکوسکی: در لوله آزمایش دوم به آهستگی از کناره دیواره چند سی سی اسید سولفوریک غلیظ بیافزایید به طوریکه بین دو فاز یک حلقه مشخص تشکیل شود. رنگ حلقه تشکیل شده را یادداشت کنید. سپس لوله را به آهستگی تکان دهید تا مخلوط شود. . رنگ ایجاد شده و تغییرات آن را گزارش کنید.

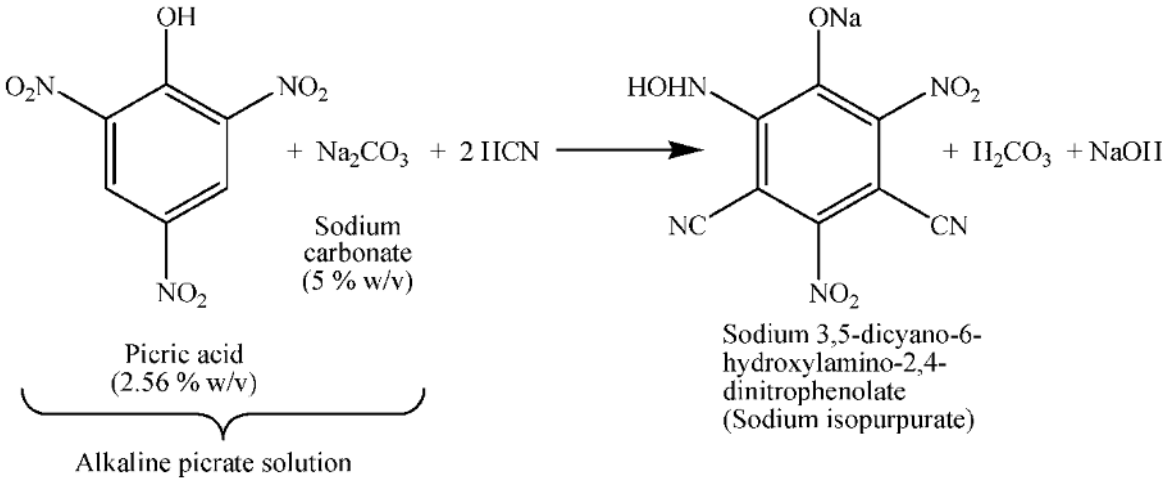
۶) شناسایی کیفی: به باقیمانده عصاره خشک شده حاصل از مرحله ۳، آب افزوده و تکان دهید. مشاهدات خود را گزارش کنید.

استخراج و شناسایی گلیکوزیدهای سیانوژنیک

گلیکوزیدهای سیانوژنیک ترکیبات تلخ و نسبتا سمی هستند که به خصوص در گیاهان خانواده Rosaceae یافت می شوند. در واقع آمیگدالین و ترکیب حاصل از هیدولیز نسبی آن یعنی پرونازین، در هسته و میوه اغلب گیاهان این خانواده مانند هلو، آلو، سیب و بادام یافت می شوند. حضور این ترکیبات از لحاظ کموتاکسونومی مهم بوده و می تواند باعث تمایز بین دو واریته باشد (مانند بادام تلخ و شیرین). این ترکیبات حاوی جزء قندی هستند که می تواند به شکل دی ساکارید (آمیگدالین) یا مونوساکارید (پرونازین) باشد. آنزیم های هیدرولیز کننده این ترکیبات معمولا همراه آن ها در بافت حضور دارند که می توانند در حضور آب به سرعت باعث تجزیه و تولید پروسیک اسید (هیدروژن سیانید) شوند. بنابراین با ردیابی HCN تولید شده می توان حضور این ترکیبات را در بافت گیاهی تایید کرد.



در تست کیفی مربوطه از واکنش بین هیدروژن سیانید و پیکرات سدیم استفاده می شود.



مواد و وسایل مورد نیاز

معرف پیکرات سدیم: بیکربنات سدیم (۵ گرم) + پیکریک اسید (۰/۵ گرم) + آب مقطر (به حجم ۱۰۰ سی سی)

وسایل		مواد	
نام	**تعداد برای هر گروه**	**نام**	**مقدار برای هر گروه**
هیتر	یک عدد	بادام تلخ	۲ تا ۴ عدد
ساعت شیشه ای	یک عدد		
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد		

کاغذ صافی ، معرف پیکرات سدیم، آب مقر با پیست سه عدد، دستمال کاغذی، و چسب به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

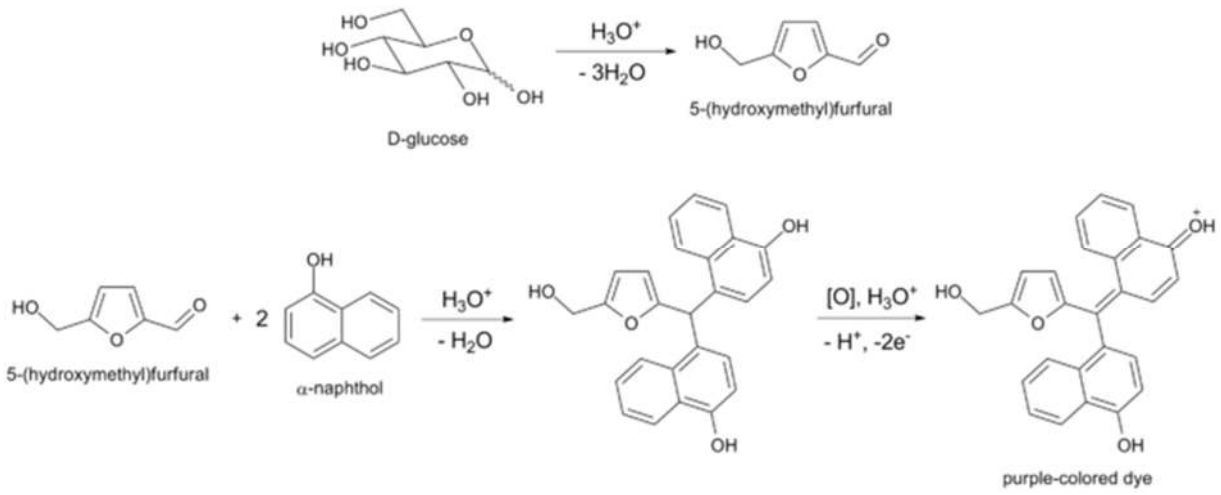
۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۲ تا ۳ عدد بادام تلخ خرد شده را در ارلن ریخته و روی آن چند سی سی آب بریزید تا کاملا مرطوب شود.

۲) شناسایی کیفی: ابتدا یک نوار کاغذ صافی را داخل محلول پیکرات سدیم (۵ گرم بیکربنات سدیم، نیم گرم پیکریک اسید و ۱۰۰ میلی لیتر آب) فروبرده و مایع اضافی آن را بگیرید. سپس کاغذ پیکرات را به ته یک شیشه ساعت چسبانده و در دهانه ارلن مایر قرار دهید به طوری که سیستم کاملا بسته باشد و کاغذ پیکراته از بالا بدون تماس با دیواره ارلن مایر روی نمونه گیاهی مرطوب شده آویزان باشد. حال ارلن مایر را در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار دهید تا کاغذ پیکراته تغییر رنگ دهد. رنگ ایجاد شده را گزارش کنید.

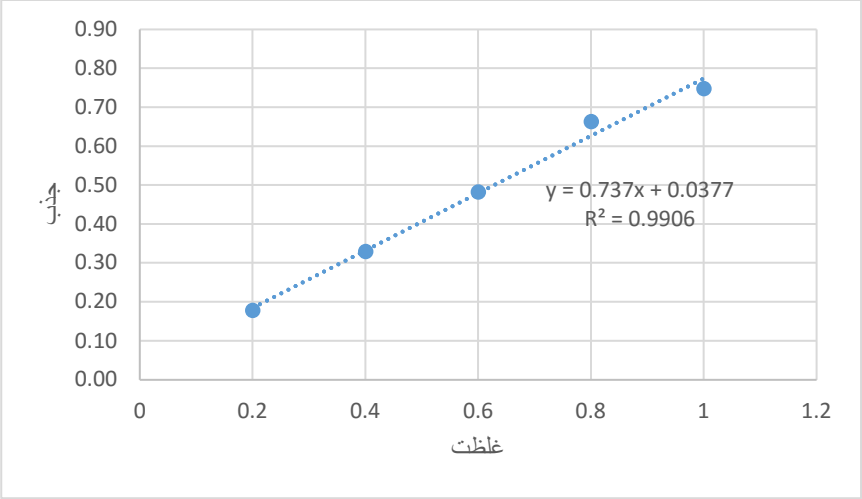
استخراج و استاندارد سازی ترکیبات قندی ترنجبین

ترنجبین که گاهی با نام های گز انگبین و مان نیز شناخته می شود یک محصول کربو هیدارتی است که در اثر فعالیت نوعی حشره در گونه های جنس *Alhagi* تولید می شود. در ایران ترنجبین از سه گونه *A. mannifera*، *A.persarum* و *A. pseudoalhagi* به دست می آید که گونه اول فقط در مناطق جنوبی و گونه های دیگر در مناطق غرب و شمالی ایران نیز رشد پیدا می کنند. ترنجبین به شکل گلوله های ریز و به رنگ سفید و زرد و گاهی قهوه ای است که همراه با آن خار و میوه های قرمز رنگ گیاه نیز به عنوان ناخالصی وجود دارند. ترنجبین در طب سنتی ایران در اغلب فرمولاسیون های سنتی به عنوان شیرین کننده حضور دارد و به تنهایی نیز به عنوان ملین مصرف می شود.

با توجه به این که اغلب ترکیبات موجود در ترنجبین ترکیبات قندی هستند بر اساس گلوکز استاندارد سازی می شود. تست های رنگ سنجی متعددی برای قند ها وجود دارد که یکی از آن ها تست مولیش می باشد.



با استفاده از تست مولیش و محلول استاندارد گلوکز با غلظت های متفاوت می توان مقدار قند تام موجود در ترنجبین را برحسب معادل گلوکز به صورت mgGE/g به دست آورد. برای این منظور ابتدا محلول استاندارد از گلوکز از غلظت های پایین تا بالا تهیه شده و به کمک تست مولیش واکنش رنگی انجام می شود. سپس در طول موج مشخصی جذب محلول ها سنجیده شده و منحنی رگرسیون رسم می شود (غلظت در برابر جذب). در نهایت محلول مجهول (حاصل از ترنجبین) نیز با تست مولیش بررسی شده و مقدار جذب آن در همان طول موج به دست می آید. در نهایت با توجه به فرمول خط رگرسیون به دست آمده از محلول های استاندارد، غلظت معادل گلوکز در نمونه مجهول به دست می آید.



مواد و وسایل مورد نیاز

وسایل		مواد	
نام	**تعداد برای هر گروه**	**نام**	**مقدار برای هر گروه**
هیتر	یک عدد	ترنجبین	۵ گرم
قیف شیشه ای	یک عدد	آب مقطر	۱۰۰ سی سی
ارلن ۲۵۰ سی سی	یک عدد		
بشر ۲۵۰ سی سی	یک عدد		
میله شیشه ای	یک عدد		
لوله آزمایش	سه عدد		
بالن ژوژه ۱۰ سی سی	یک عدد		
پتری دیش	یک عدد		
اسپاتول	یک عدد		

کاغذ صافی ، اسید سولفوریک غلیظ، معرف α-نفتول، و ترازو دقیق به صورت مشترک برای کل کلاس.

روش کار

۱) عصاره گیری (Extraction): ابتدا ۵/۰۰ گرم ترنجبین را در بشر ریخته و روی آن ۳۰ میلی لیتر آب بریزید. مخلوط را به مدت ده دقیقه به هم زده و سپس صاف کنید. سپس عصاره را داخل یک پتری دیش وزن شده ریخته و روی هیتر خشک کنید. دقت کنید دمای خیلی بالا باعث کاراملیزه شدن و سوختن قند خواهد شد. وزن عصاره حاصل را یادداشت کنید.

۲) تهیه محلول جهت اسپکتروفوتومتری: ۱۰۰ میلی گرم از عصاره را برداشته و در ۱۰ میلی لیتر آب حل کنید (محلول استوک). از محلول استوک با غلظت مشخص ۱۰ mg/ml، محلول های رقیق تر ۱ mg/ml و ۰/۱ mg/ml را بسازید.

۳) تست مولیش: برای هر کدام از رقت ها تست مولیش را به این ترتیب انجام دهید. به ۵ سی سی از محلول، ۲ قطره معرف α-نفتول افزوده و هم بزنید. دقت کنید معرف مورد نظر در آب نا محلول بوده و افزودن مقدار زیاد آن باعث کدر شدن محلول تست

خواهد شد. سپس به مخلوط مورد نظر ۱ سی سی اسید سولفوریک غلیظ بیافزایید. و به آرامی تکان دهید تا مخلوط شود. سپس ۵ دقیقه صبر کنید و بعد دوباره محلول را تکان دهید تا کاملا مخلوط شود. در نهایت مقدار جذب UV مخلوط حاصل را در طول موج ۴۹۰ نانومتر در مقایسه با محلول بلانک اندازه گیری کنید.

۴) گزارش مقدار معادل گلوکز: با توجه به داده های مربوط به محلول های استاندارد گلوکز یک منحنی رگرسیون خطی رسم کرده و مقدار گلوکز معادل را برای نمونه مجهول خود حساب کنید. در نهایت نتیجه را به صور میلی گرم معادل گلوکز در گرم عصاره و نمونه گیاه گزارش کنید (mgGE/g).