



فارماکونوزی ۱

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دانشکده داروسازی
گروه فارماکونوزی

راهنمای آزمایشگاه فارماکونوزی



سال تحصیلی ۱۴۰۴

بنام خدا

مقررات کار در آزمایشگاه
لطفاً نکات زیر را بدقت مطالعه و اجرا نمایید.

- 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 برگردانید.
- 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 وسایل و میز خود را کاملاً تمیز نمایید.
- ۱۲- امتحان عملی از بخش های آکالوئید، فلاونوئید، آنتراکینون، تانن، گلیکوزید قلبی، استرول می باشد و امتحان تئوری باید کل روش کار مطالعه شود.

نکته: هنگام ورود به آزمایشگاه روش کار به همراه داشته باشید.

تجسس آکالونیدها

به طور کلی آکالونیدها ترکیبات آلی ازت داری هستند که اکثراً در گیاهان وجود داشته و تعدادی از آنها نیز در حیوانات یافت می شوند. آکالونیدها 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 آکالونیدها 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 رزپین فشار خون را پائین می آورد. در حقیقت آکالونیدها قادرند که انواع مختلف فعالیت های فیزیولوژیک را باعث شوند.

شناسایی کیفی آکالونیدها

آکالونیدها 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 آکالونیدها این مواد قبلاً بایستی جدا گردند. آکالونیدها 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. آکالونیدهای آزاد به صورت باز در اتر و کلروفرم محلولند، ولی املاح آنها در این حلال ها غیر محلولند و بدین وسیله آکالونیدها را می توان جدا، خالص و تعیین مقدار نمود. جهت استخراج آکالونیدها معمولاً از اسید رقیق و الک 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 آکالونیدها (مثل آتروپین و رزپین) و یا تشکیل فنولات (مثل مرفین و کفالین) شده و به صورت محلول در آب مشاهده می شوند.

برای شناسایی آکالونیدها از معرف هایی استفاده می شود که با آنها ایجاد رسوب می نمایند. آکالونیدها 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

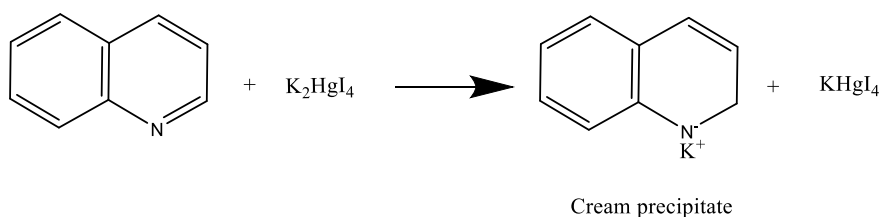
تشخیص به روش میکروکریستالوگرافی می باشند. همچنین آزمایش های شیمیایی اختصاصی تری را می توان برای تعیین یک دسته آلکالوئید خاص بکار برد.

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.

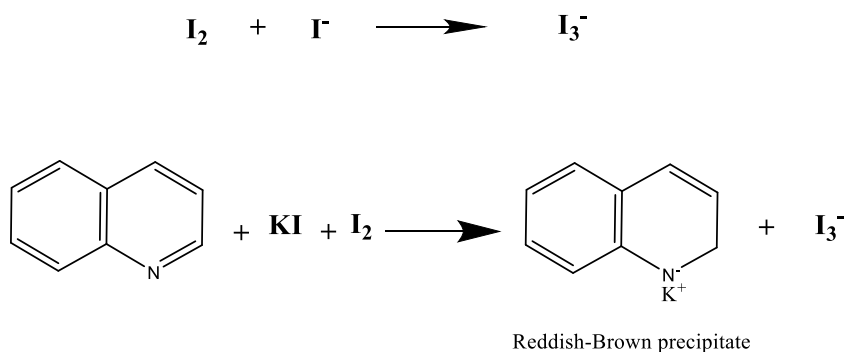
ضمناً قابل توجه است که برای بهتر شناسایی کردن آلکالوئیدها می بایستی همیشه از دو معرف استفاده نمود. مهمترین معرف هایی که جهت شناسایی آلکالوئیدها استفاده می شود عبارتند از: محلول ید (معرف واگنر) ($KI.I_2$)، معرف مایر (K_2HgI_4)، معرف دراژندورف ($KBiI_4$) و اسید پیکریک (۲،۴،۶-تری نیتروفلن).

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.

Mayer's Reaction



Wagner's Reaction



هدف از این آزمایش های جستجوی وجود آلكالوئیدها 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 داخل بشر ریخته و روی هات پلیت قرار می دهیم تا کاملاً خشک شود.
- ۲- پس از خشک کردن به آن ۲ml اسید کلریدریک ۲N افزوده، محلول حاصل را سرد کرده و مقدارنوک اسپاتول کلرید سدیم 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- یکی از لوله ها به عنوان شاهد و به یکی دیگر از لوله ها چند قطره معرف میر بیافزائید و نتیجه را ملاحظه کنی در صورتیکه رسوب یا کدروتی در هیچ یک از لوله ها تشکیل نگردد می توان نتیجه گرفت که در عصاره مورد آزمایش آلكالوئید وجود ندارد در صورت مشاهده رسوب در 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 (+++). نشانه اینست که در عصاره مورد آزمایش ممکن است آلكالوئید وجود داشته باشد. از اینرو نیاز به آزمایش های تائیدی می باشد.

ب) جداسازی و آزمایش های تائیدی برای وجود آلكالوئیدها

- ۱- در صورتیکه آزمایش های اولیه برای وجود آلكالوئید مثبت باشد، به محلول اسیدی مقدار کافی محلول آمونیاک غلیظ افزوده تا در مجاورت کاغذ تورنسل قلیایی (آبی رنگ) 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 قیف 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 پائیدار خودداری نمائید. حاصل استخراج کلروفرم را با یکدیگر مخلوط نموده و سپس روی هات پلیت قرار دهید تا کاملاً خشک شود. قسمت مایی را نیز برای مراحل بعد نگهداری کنید.
- ۳- به باقیمانده کلروفرمی ۲ml 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:

یک لوله به عنوان شاهد و به لوله دوم محتوی آکالوئید معرف میر مطابق آزمایش قبلی افزوده و نتیجه را به صورت (+)، (++) و (+++) ثبت نمائید.

ج) آزمایش جهت آکالوئیدهای کواترنر یا بازهای آمین اکسیدی

۱- آکالوئیدهای 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 اسیدی (قرمز رنگ)، واکنش محیط اسید مشاهده گردد. در صورت لزوم محلول را صاف کرده تا محلول شفاف بدست آید.

۲- از محلول صاف شده ۲ ml در یک لوله به عنوان شاهد و ۲ ml در لوله دوم به عنوان محتوی آکالوئید، معرف میر مطابق آزمایش قبلی افزوده

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

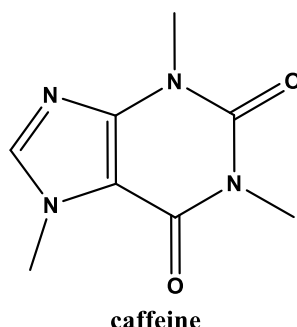
واکنش (+) در این مرحله نشانه استخراج غیر کامل آکالوئیدهای نوع اول، دوم، سوم است و نتیجه باید منفی تلقی گردد.

استخراج تعیین مقدار و شناسایی کافئین قهوه

کافئین آلکالوئیدی است از گروه پورین ها، که بمیزان ۱ تا ۳ درصد در برگ چای و ۱ تا ۱/۳ درصد در دانه قهوه وجود دارد. کافئین خواص فارماکولوژیک متعددی از جمله 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.
- ۳- محلول کلروفرمی حاصل را تغلیظ می کنند و کافئین را بدست می آورند.



روش کار

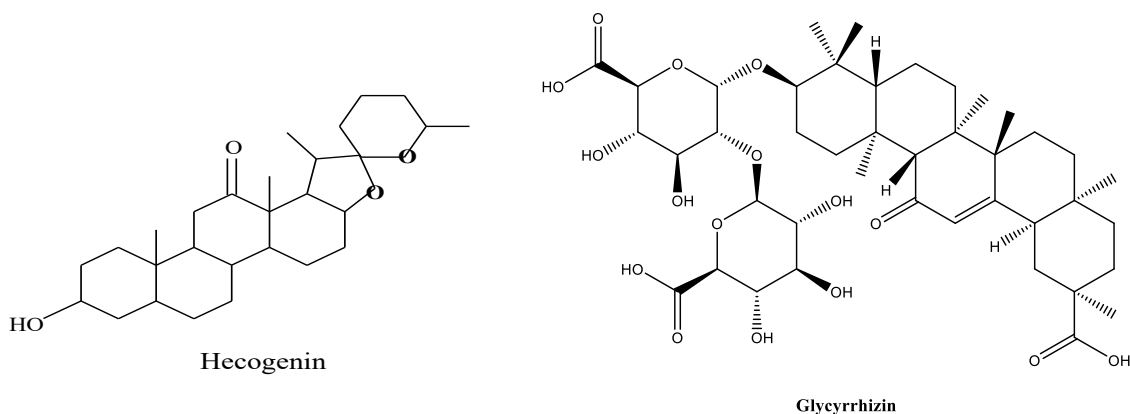
۵ گرم قهوه بو داده و نرم شده را در یک پاکت کاغذی ریخته و ۵ میلی لیتر آمونیاک را تدریجاً به آن بیافزایید و بخوبی مخلوط کنید و انتهای پاکت کاغذی را منگنه کنید. مخلوط حاصل را با دستگاه سوکسله با استفاده از کلروفرم استخراج نمائید. بعد از تکمیل عمل استخراج، محلول کلروفرمی حاصل را تقطیر کنید بطوریکه همه کلروفرم خارج شود و از باقیمانده بوی این حلال به مشام نرسد و کاملاً خشک شود، باقیمانده حاصل را با حدود ۱۰ ml اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال مجاور کرده و چند لحظه صبر کنید، سپس به آن ۱۰ ml 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 (قیف دکانتاسیون)، سه بار با ۱۰ ml کلروفرم استخراج کنید. محلول های کلروفرمی را به یک پلیت شیشه ای که قبلاً وزن شده منتقل نمایید و روی بن ماری قرار دهید تا کاملاً خشک شود، بعد از خشک شدن پلیت را دوباره وزن نمایید. درصد مقدار کافئین را در ۵ گرم قهوه بدست آورید.

تجسس ترکیبات پلی سیکلیک (سپونین 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- سپونین ها.

سپونین ها

سپونین ها بطور کلی در دو گروه سپونین های استروئیدی و سپونین های پنج حلقه ای تری ترپنی قرار داد. گروه اول یعنی سپونین های استروئیدی بیشتر در گیاهان تک لپه ای یافت می شوند مانند هکوجنین در گیاه Agave، گروه دوم یا سپونین 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.

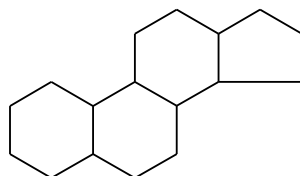


سپونین ها دارای چند خاصیت اختصاصی بوده که می توان آنها را به سهولت تشخیص داد:

- ۱- سپونین ها قادر به همولیز نمودن گویچه های قرمز خون می باشند.
- ۲- سپونین 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 سیکلوپنتانوپرهایدرو فنانترن می باشند (۴ حلقه ای هستند).

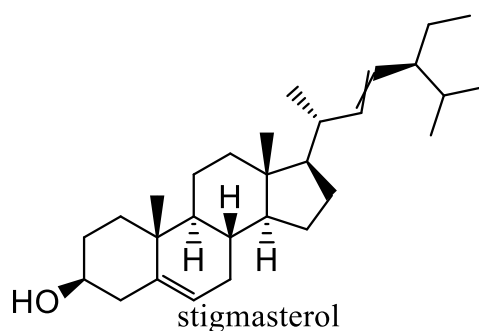
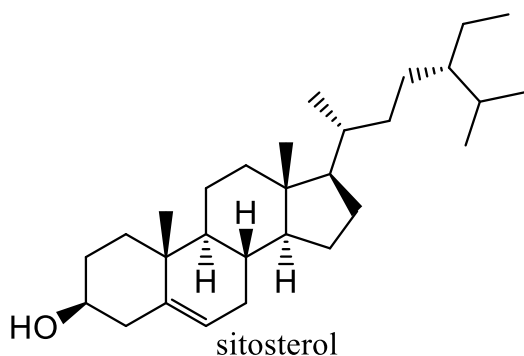


Steroid main structure

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 فیتوسترول 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.



۱) آزمایش تولید کف برای تجسس ساپونین ها

- ۱- مقدار نوک اسپاتول از پودر گیاه (چوبک) مورد آزمایش را در داخل یک لوله آزمایش تمیز و خشک بریزید.
- ۲- مقدار ۱۰ ml آب مقطر بدان افزوده و لوله را بشدت به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید. لوله را به حالت عمودی قرار داده و در طی ۵/۰ 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 ترین ها

- ۱- حدود ۵ گرم پودر (ریشه) گیاه چوبک را در ۴۰ ml متانول ریخته روی هات پلیت قرار دهید تا حجم آن نصف گردد و سپس صاف نموده، صاف شده را تغلیظ کنید تا خشک شود.
- ۲- روی عصاره الکلی خشک شده ۵ ml اتردوپترول ریخته و دکانته (سرریز کردن یا جداسازی (decantation) فرایندی برای جداسازی مخلوطی از مایعات غیر قابل امتزاج و یا مخلوطی از یک مایع و جامد مانند یک سوسپانسیون است. طی این فرایند لایه رویی که چگالی کمتری دارد یا رسوب آن ته نشین شده است سرریز شده و بیرون ریخته می شود و لایه زیرین که مایعی چگال تر یا رسوب است بر جای می ماند) نمایید.
- ۳- 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
- ۴- مقدار ۱۰ ml کلروفرم به رسوب باقیمانده افزوده و بخوبی هم بزنید. سپس کلروفرم را بداخل یک لوله آزمایش ریخته و به آن تا آگیری کامل 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 الف و ب و لوله شماره ۳ بعنوان شاهد بکار می رود.

الف) آزمایش لیبرمن بورشارد برای تجسس استرول های اشباع نشده و تری ترین 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.

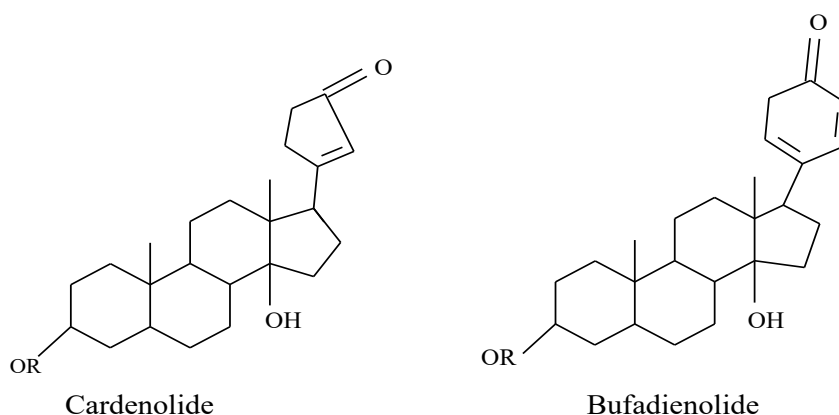
ب) آزمایش سالکوسکی برای تجسس استرول های اشباع نشده
۱- اسید سولفوریک غلیظ را طوری به لوله شماره ۲ بیافزائید که تولید یک حلقه نماید. برای این منظور لوله را ۴۵ درجه خم نموده و بوسیله پیپت نوک باریک مقدار ۲-۳ ml اسید سولفوریک غلیظ از کنار لوله وارد نمائید تا هرگونه تغییر رنگی را که در حد فاصل دو محلول حاصل 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.

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 سیکلوپنتانوپرهایدرووفنانترین
 - ۲- حلقه لاکتونی α و β اشباع نشده (پنج یا شش عضوی) در C_{17}
 - ۳- عامل هیدروکسیل β 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- بوفاداینولیدها



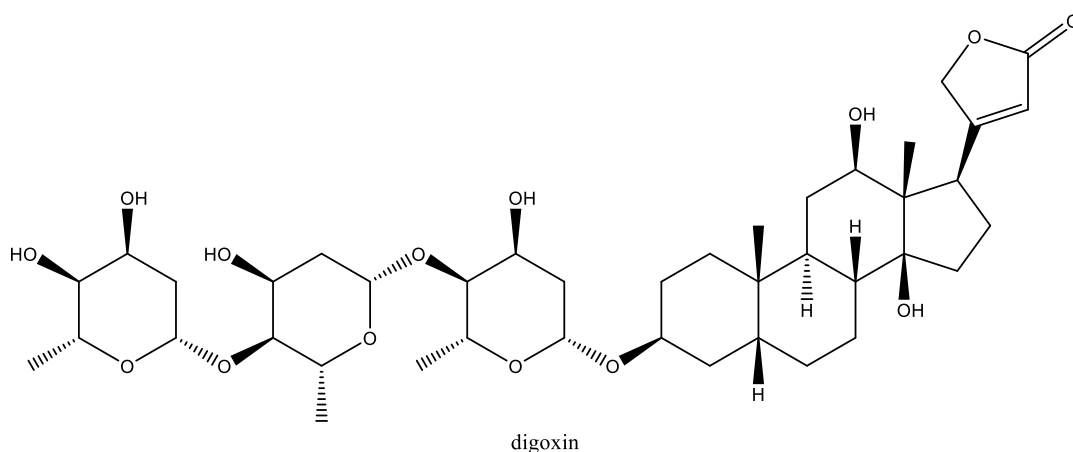
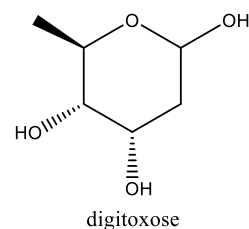
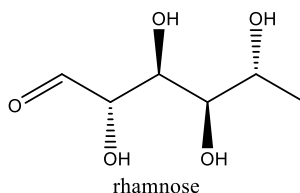
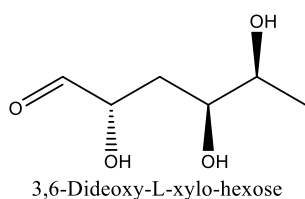
به طور کلی تفاوت حلقه استروئیدی این ترکیبات در C_{17} آنها می باشد. دسته کاردنولیدها در طبیعت فراوانتر بوده و جزء استروئیدهای ۲۳ کربنی هستند و دارای حلقه لاکتونی پنج عضوی اشباع نشده (گاما- لاکتون) می باشند. کلمه بوفاداینولیدها از واژه بوفو (قورباغه) اقتباس شده، آگلیکون آنها دارای ۲۴ کربن بوده و یک حلقه 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 بوفاداینولیدها 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 C و D 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 C₃ 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:

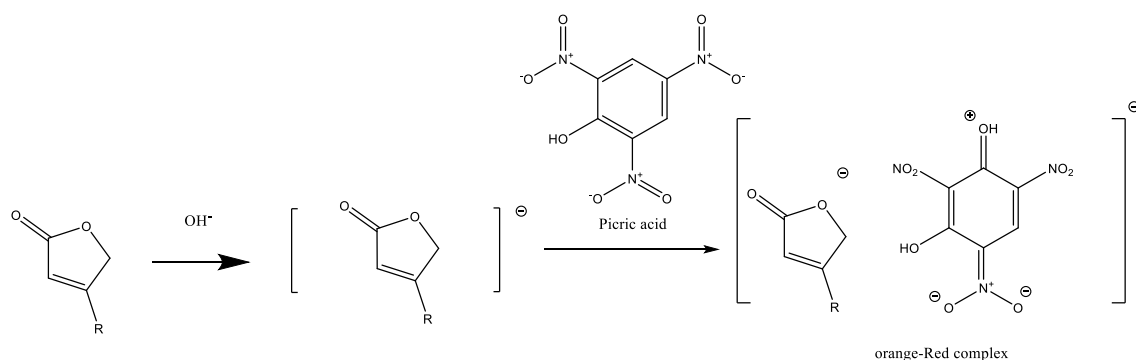


شناسائی کیفی و استخراج

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.



Baljet Reaction

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 گزانیترو)

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

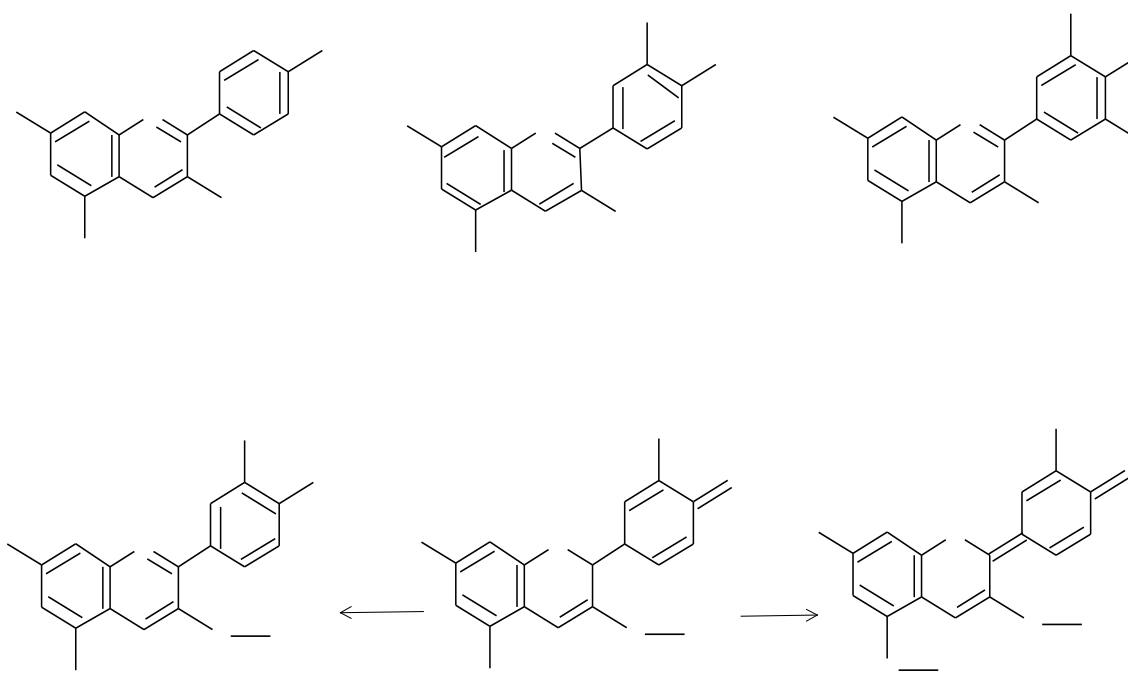
روش کار

تجسس قند دزوکسی

- ۱- ۴-۵ برگ گیاه را تقریباً با ۴۰ ml متانول روی هات پلیت حرارت داده تا حجم نصف گردد و سپس صاف کنید، صاف شده را مجدداً تا تبخیر کامل حلال روی هات پلیت حرارت دهید تا کاملاً خشک شود.
- ۲- روی عصاره الکلی خشک شده ۵ml اتردوپترویل ریخته و دکانته نمایید.
- ۳- عمل استخراج با اتردوپترویل را تکرار کرده تا محلول استخراج شده (عصاره اتری) تقریباً بیرنگ گردد. عصاره اتردوپترویلی حاوی کلروفیل، رزین ها، چربی و ... می باشد.
- ۴- به رسوب ۴ ml معرف کلرید فریک (۰/۳ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد کلرید فریک در ۵۰ ml اسید استیک خالص) افزوده و پس از مخلوط کردن آن را به دو لوله آزمایش به صورت حجم مساوی بریزید. یک لوله به عنوان شاهد در نظر بگیرید
- ۵- لوله دوم را در حالیکه به زاویه ۴۵ درجه گرفته اید مقدار ۱-۲ ml اسید سولفوریک غلیظ را به کمک pipette از کناره لوله وارد نموده تا دو لایه کاملاً متمایز تشکیل گردد. از تکان دادن لوله خودداری نمایید. در حد فاصل دو لایه حلقه رنگی (ارغوانی) تولید شده نشانه وجود قند دزوکسی می باشد.

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 اسیدکلریدریک 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٪ الکی اسید پارا- تولوئن سولفونیک و گرم کردن، تولید لکه های زرد رنگی می گردد که نشانه وجود کاتشین است.



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.

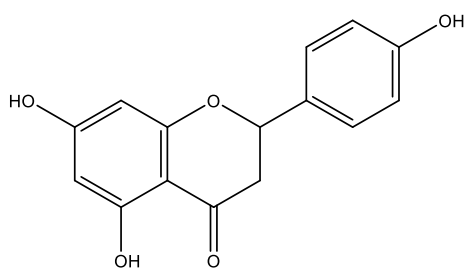
روش کار

برای انجام آزمایش مقدار ۱۰ گرم از کلم بنفش را به قطعات کوچک تقسیم کرده و در ۴۰ml آب بریزید. پیگمان های کلم بنفش را بوسیله جوشانیدن بر روی هات پلیت بمدت ۱۵ دقیقه استخراج و بعد از صاف کردن، ۲ml از محلول فوق را در هر یک از ۷ 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:

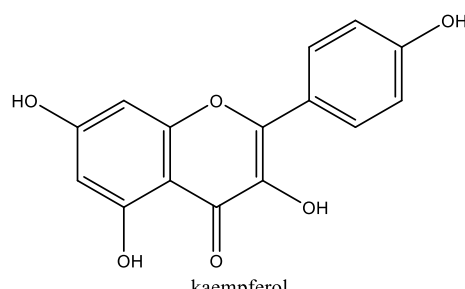
pH	ml/ Na_3PO_4 0.15M	ml/ K_2HPO_4 0.15M	ml/ KH_2PO_4 0.15M	ml/HCl 0.1M	ml/NaOH 0.1M	شماره لوله
2	-	-	0.5	9.5	-	1
3.6	-	-	9.5	0.5	-	2
4.7	-	-	10	-	-	3
6.2	-	2	8	-	-	4
7.7	-	9	1	-	-	5
10.7	7	-	3	-	-	6
14	-	-	-	-	10	7

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 پیگمان های 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:

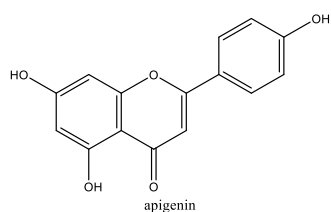


Flavanone

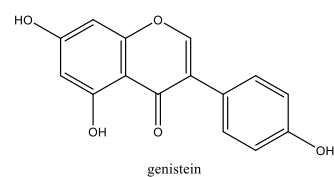
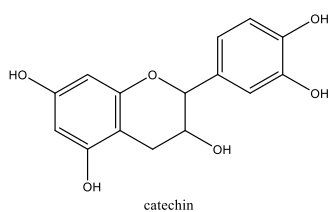


Flavonols

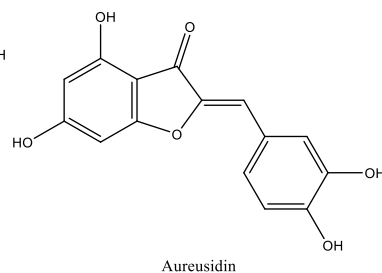
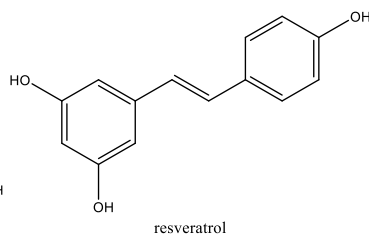
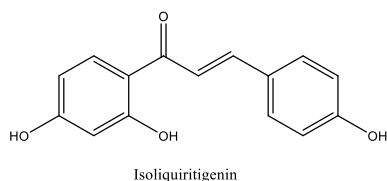
این مواد در گروه های مختلف فلاون ها، ایزوفلاون ها و فلاونون ها، کاتشین ها، آنتوسیانین ها، اورون ها، چالکون ها و ... قرار می گیرند:



Flavones



Isoflavones



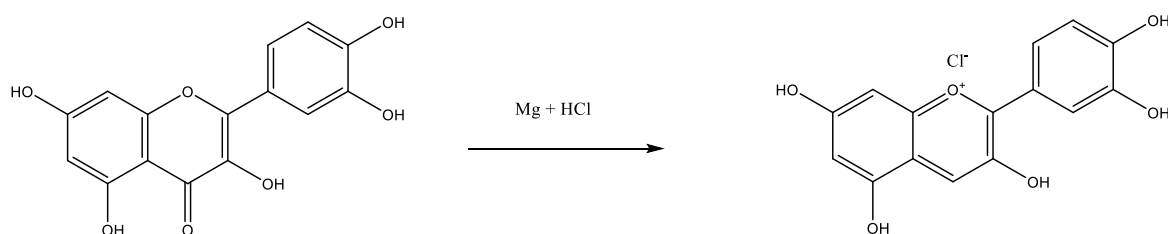
مهمترین ماده فلاونوئیدی که از نظر داروئی دارای اهمیت است روتین می باشد، روتین و هسپریدین را در درمان بیماری های مربوط به شکنندگی و خونریزی از عروق موئین به کار می برند. در سال های اخیر نشان داده شده که فلاونوئیدها دارای خاصیت ضد ویروس، ضدالتهاب و ضدسرطان می باشند، از اینرو تحقیقات دامنه داری روی این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

فلاونوئیدها در گیاهان 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.



Shinoda Test (Cyanidin Reaction)

تجسس فلاونوئیدها

- ۱- ۳ گرم علف چای را تقریباً با ۴۰ ml متانول روی هات پلیت حرارت داده تا حجم نصف گردد و سپس صاف کنید، صاف شده را مجدداً تا تبخیر کامل حلال روی هات پلیت حرارت دهید تا کاملاً خشک شود.
- ۲- روی عصاره الکلی خشک شده ۵ml اتردوپترول ریخته و دکانته (سرریز کردن یا جداسازی) (decantation) فرایندی برای جداسازی مخلوطی از مایعات غیر قابل امتزاج و یا مخلوطی از یک مایع و جامد مانند یک سوسپانسیون است. طی این فرایند لایه رویی که چگالی کمتری دارد یا رسوب آن ته نشین شده است سرریز شده و بیرون ریخته می شود و لایه زیرین که مایعی چگال تر یا رسوب است بر جای می ماند) نمایید.
- ۳- 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.
- ۴- رسوب را در ۱۰ ml اتانول ۸۰ درصد با کمک میله شیشه ای حل کرده و سپس صاف نموده، مقدار ۲ ml از صاف شده را در دو لوله آزمایش بریزید.
- ۵- یک لوله به عنوان شاهد
- ۶- در لوله دیگر به ۲ ml از محلول صاف شده ۰/۵ ml اسید کلریدریک غلیظ و ۲۰-۱۰ mg (نوک اسپاتول) براده منیزیم بیافزائید. رنگ های حاصل را در طی چند دقیقه ملاحظه نمائید. همچنین به رنگ های تولید شده در قسمت کف لوله توجه کنید.
- ۷- در یک لوله دیگر ۲ ml مخلوط مساوی آب و آمیل الکل مخلوط و بگذارید تا فازها از یکدیگر جدا گردند. سپس محتویات لوله حاوی اسید کلریدریک و براده منیزیم را به این لوله اضافه می کنید. وارد شدن رنگ در فاز آمیل الکلی تأییدی بر وجود ماده فلاونوئیدی می باشد.

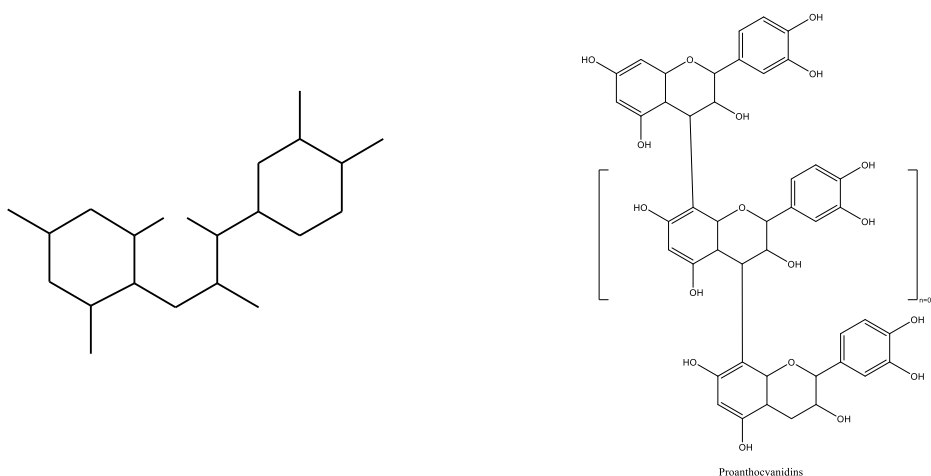
تجسس تانن ها و پلی فنل ها

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 شناسایی 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-3,4 و Flavan-3-ol دارند) اما در آب محلول نیستند مثل کاتشین Catechin:

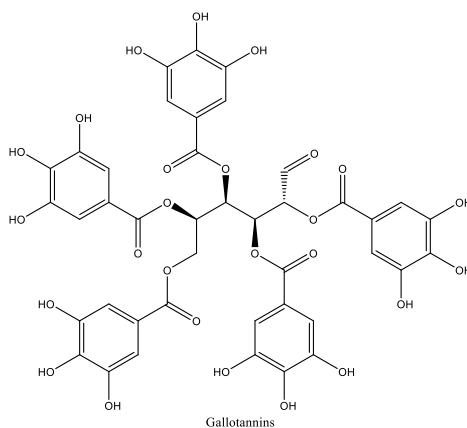
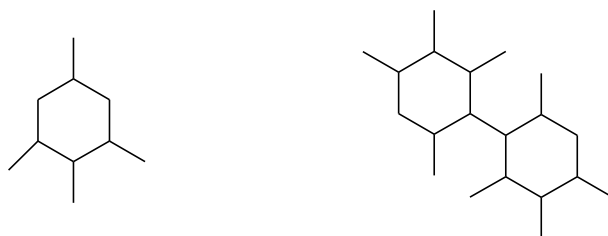


تانن های کاتشول جزء دسته ترکیبات پلی مریزه محسوب می شوند و حداقل از تشکیل دو مولکول از ترکیبات فوق بوجود می آیند. اتصال حلقه ها غالباً توسط کربن های ۶ و ۸ و ۲' و ۶' می باشد ولی در مورد پروآنتوسیانیدین ها اتصال بین کربن های ۴ و ۸ انجام می گیرد. این دسته از تانن ها در اثر حرارت از خود ناپایداری نشان داده 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 پیروگال

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:



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 الازیک (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

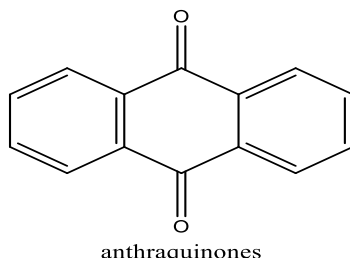
تانن ها روی بافتهای زنده اثر قابض داشته و این خاصیت اساس اثر درمانی آنها را تشکیل می دهد. مصرف داخلی این مواد در دستگاه گوارش بیشتر به عنوان قابض بوده و در مصرف خارجی بیشتر جهت معالجه سوختگی ها، زخم ها، سرمازدگی پنجه ها، التهابات پوستی، هموروئید و بالاخره ضد عرق مصرف فراوانی را دارند. در درمان سوختگی 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 های فراوانی دارد. در سال های اخیر نشان داده شده که این مواد دارای اثر ضدسرطان نیز می باشند.

روش کار

- ۱- مقدار ۳ گرم نمونه گیاهی را در ۴۰ ml متانول روی هات پلیت حرارت داده تا حجم نصف گردد و سپس صاف کنید، صاف شده را مجدداً تا تبخیر کامل حلال روی هات پلیت حرارت دهید تا کاملاً خشک شود .
- ۲- بعد در ۱۰ ml آب مقطر جوش با کمک میله شیشه ای حل کنید
- ۳- ۲-۴ قطره محلول ۱۰٪ کلرید سدیم بیافزائید تا بدینوسیله ترکیبات غیر تانن رسوب داده شود.
- ۴- محلول را صاف نموده و صاف شده را به مقادیر ۲ ml در چهار لوله آزمایش بریزید.
- ۵- 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) ۴ تا ۵ قطره ژلاتین نمک دار (۲ قطره ژلاتین ۱٪ به علاوه ۲ قطره نمک کلرید سدیم ۱۰٪) به لوله آزمایش ۲ افزوده و تشکیل رسوب را ملاحظه نمائید.
(ج) ۳ تا ۴ قطره محلول کلرید فریک ۱٪ به لوله ۳ افزوده و کاملاً مخلوط کنید و رنگ لوله را ملاحظه نمائید.
(د) لوله آزمایش ۴ را بعنوان شاهد به کار برید.

تجسی آنتراکینون ها

آنتراکینون ها از مهمترین کینون های طبیعی بوده که بعنوان مواد رنگی و دارویی 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.



اثر دارویی و موارد استعمال

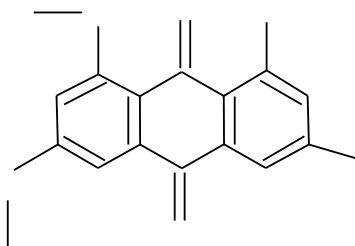
آنتراکینون های آزاد بدون قسمت قندی دارای خاصیت دارویی کمی می باشند و وجود قسمت قندی برای خاصیت بیولوژیک دارو ضروری بنظر می رسد، چون انتقال آگلیکون را به محل اثر در روده بزرگ تسهیل می کند. بدون قسمت قندی، قسمت اعظم آگلیکون طی متابولیسم از بین می رود.

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

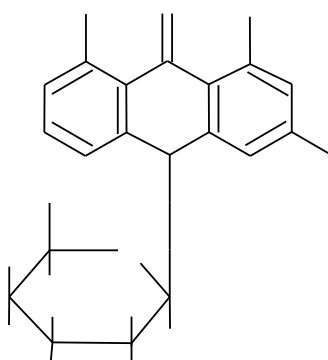
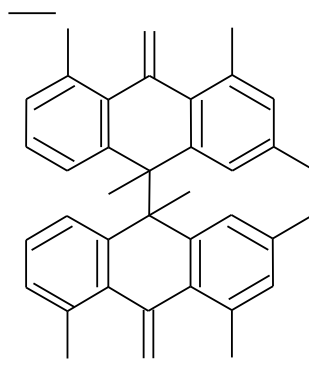
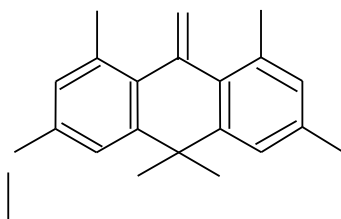
به طور کلی آنتراکینون گلی کوزیدها را به دو گروه دسته بندی می نمایند:

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



Glucofrangulin A,B

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



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

شناسایی آنتراکینون ها

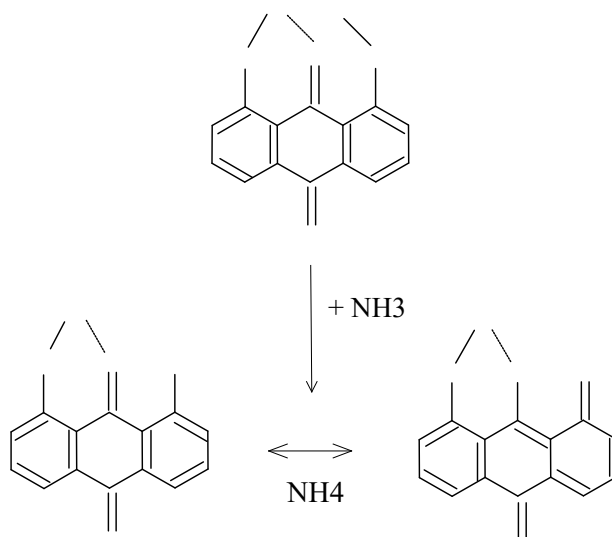
از مهمترین روش های شناسایی آنتراکینون گلی کوزیده‌ها، واکنش بورن تراگر (Born traeger) می باشد. این ترکیبات (۱، ۸- دی هیدروکسی آنتراکینون) در مجاور قلیائی ها تشکیل فنولات می دهند که دارای رنگ قرمز بوده و در ناحیه ۵۲۰ نانومتر قابل جذب می باشند. برای شناسایی این ترکیبات در ریشه روبرب و پوست فرانگولا و در فراآورده های دارویی آنها از همین روش بورن تراگر استفاده شده ولی برای شناسایی آنتراکینون های برگ سنا و میوه های آن از روش تغییر یافته بورن تراگر استفاده می شود. برای بررسی Aloinosid و Aloin صبر زرد از واکنش شانن استفاده می گردد.

روش کار

آزمایش بورن تراگر

- ۱- مقدار ۱۰ گرم پودر برگ سنا را در ۵۰ ml متانول روی هات پلیت حرارت داده تا حجم نصف گردد و سپس صاف کنید، صاف شده را مجدداً تا تبخیر کامل حلال روی هات پلیت حرارت دهید تا کاملاً خشک شود.
- ۲- عصاره الکلی بدست آمده را در ۱۰ ml آب مقطر حل کرده و سپس صاف نمائید.
- ۳- محلول صاف شده را با ۵ ml گزین در یک قیف دکانتاسیون ریخته و تکان داده و بگذارید دو لایه از یکدیگر جدا شوند.
- ۴- فاز گزینی را به یک لوله آزمایش منتقل کرده و ۵ ml 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 (در این آزمایشگاه انجام نمی شود)

- ۱- مقدار ۰/۳ گرم از نمونه گیاه مورد آزمایش را با ۱۰ ml محلول ۰/۵ نرمال پتاس و ۱ ml 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 قیف دکانتاسیون تکان داده و لایه بنزنی را به دو قسمت تقسیم نمائید.
- ۴- به قسمت اول ۴ ml 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).

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 ماده 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

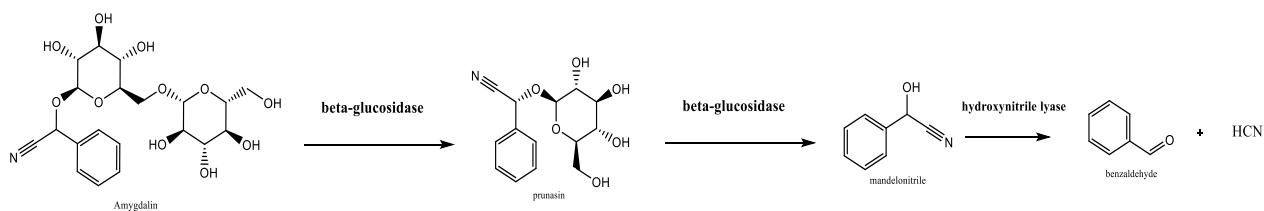
یک گرم اسفرزه (*Plantago ovata*) و یک گرم قدومه (*Allysum compstr*) را دقیقاً وزن کرده و جداگانه در دو استوانه مدرج با شرایط زیر منتقل کنید:
قطر داخلی آن حدود ۱۶mm، از ۰ تا ۲۵ml روی آن مدرج و تا ۰/۲ml را هم بتواند اندازه بگیرد. ۲۵ml آب مقطر اضافه کنید و مخلوط را هر ۱۰ دقیقه یکبار تا یک ساعت تکان دهید. 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.

جستجوی گلوکوزیدهای سیانوزنتیک

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 در اغلب گیاهان خانواده روزاسه وجود دارد و تاکنون در بیش از ۵۰ تیره گیاهی وجود آنها نشان داده شده است. در هر گیاهی که گلوکوزیدهای سیانوزنتیک موجود باشد، معمولاً آنزیم هیدرولیز کننده آنها نیز وجود دارد. بهترین آزمایشی که جهت تجسس این گلوکوزیدها در بافت های گیاهی به کار می رود عبارت از واکنش گرین یارد است. گلوکوزیدهای سیانوزنتیک علاوه بر آنزیم های مربوط توسط اسیدهای رقیق نیز هیدرولیز شده و تولید اسید سیانیدریک می نمایند.

آمیگدالین یک ماده گیاهی است که از هسته میوه های مختلف شامل آلو ، بادام ، زردآلو ، گیلان و هلو حاصل می شود که به عنوان یک گلیکوزید سیانوزنی طبقه بندی می شود. خوردن آمیگدالین باعث آزاد شدن سیانید در بدن انسان شده و می تواند به مسمومیت سیانیدی منجر شود.



روش کار

آزمایش گرین یارد

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

چند دانه از نمونه گیاهی (بادام تلخ) را با هاونگ خرد نمائید و در یک ارلن مایر ۱۰۰ ml قرار داده و به آن کمی آب مقطر افزوده تا کاملاً مرطوب گردد.

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.

بر روی ارلن مایر فویل آلومینیمی قرار می دهیم. در صورتیکه اسید سیانیدریک تولید شود، پس از ۱۵ دقیقه رنگ زرد کاغذ به قرمز تغییر می یابد و در صورتی که گلیکوزید سیانوزنتیک موجود نباشد رنگ زرد کاغذ بدون تغییر باقی می ماند.