دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دانشکده داروسازی
گروه فارماکوگنوزی

راهنمای آزمایشگاه فارماکوگنوزی

روش کار فارماکوگنوزی ۲

بنام خدا

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

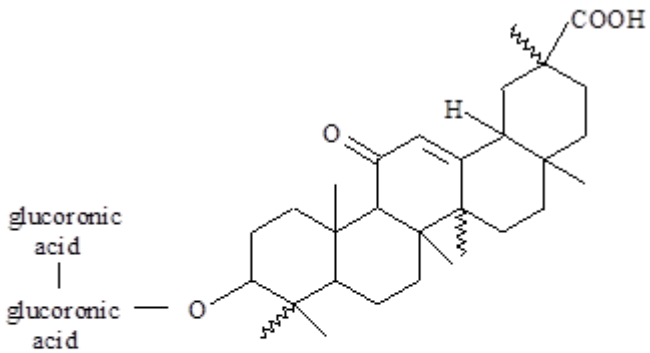
۱- به طور مرتب و در ساعات تعیین شده در آزمایشگاه حاضر شوید.
۲- برای ورود به آزمایشگاه پوشیدن روپوش الزامیست.
۳- قبل از شروع به کار، دستور العمل مربوط به آن را بدقت مطالعه کنید و بعد از پایان کار عملی در هر جلسه نتایج آزمایش هر جلسه را بصورت کتبی تهیه کنید و در همان جلسه به مسئول آزمایشگاه تحویل دهید.
٤- قبل از استفاده از هرگونه مواد شیمیایی برچسب روی شیشه را بدقت بخوانید.
٥- درب شیشه حاوی مواد شیمیایی را بلافاصله پس از استفاده ببندید و آنرا در جای خود قرار دهید.
٦- 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 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 ۱۶ml اسید سولفوریک رقیق ۲۵٪ (به صورت قطره قطره)رسوبی حاصل می شود. رسوب را به کمک قیف بوخنر جدا کرده و با آب مقطر بشوئید تا آب حاصل از شستشو خنثی گردد(تست با کاغذ یونیورسال). آنگاه رسوب را جمع آوری و در ۱۰ml آمونیاک غلیظ حل نموده و در اتو ۴۰ درجه ی سانتیگراد خشک کنید، و سپس درصد گلیسیریزین به دست آمده را گزارش نمایید.



Glycyrrhizinic acid

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

استخراج اسید سیتریک از آبلیمو

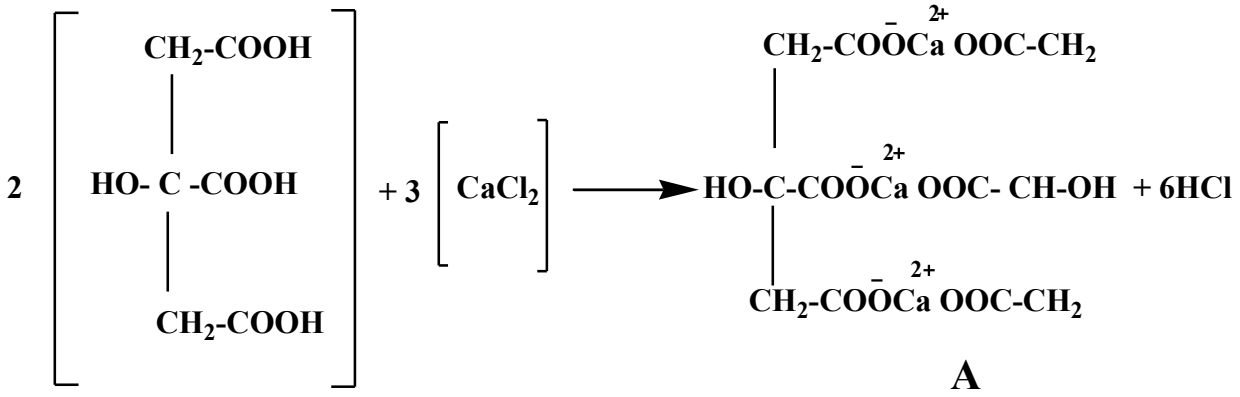
اسیدهای گیاهی به مقدار فراوان در گیاهان به صورت آزاد و یا ترکیب با مواد معدنی یا ترکیبات آلی (املاح آلکالوئیدی) یا به صورت استر یافت می شوند
نسبت به تعداد گروه های کربوکسیل آنها را به اسیدهای یک ظرفیتی، دو ظرفیتی و یا چندظرفیتی تقسیم می کنند. این اسیدها در واکنش های تنفسی سلول های گیاهی نقش داشته، بعضی 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، اسید آلی است که با فرمول مولکولی $C_6H_8O_7$ شناخته می‌شود. شکل ظاهری این ترکیب به صورت پودر جامد، کریستالی و سفیدرنگی است قدرت اسیدی این ترکیب زیاد است و 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. درصد اسید سیتریک در آبلیمو به طور متوسط پنج تا شش درصد است.

روش کار

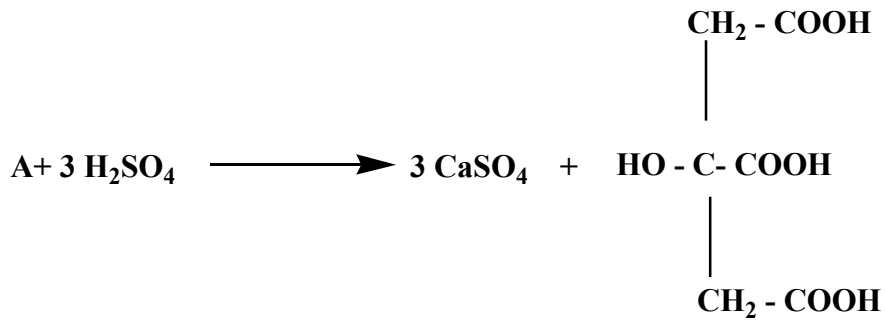
مقدار ۵۰ml آبلیمو را در یک بشر ۵۰۰ ریخته و به آن محلول ۱۰٪ سود افزوده (حدودا ۱۵ میلی لیتر)و تکان داده تا محلول قلیائی شود(تست با کاغذ تورنسل). تغییر رنگ مشخصی در این مرحله حاصل شده و رنگ محلول از زرد روشن به قهوه ای مبدل می شود.
حجم محلول را با مزور اندازه گرفته و سپس آن را داخل یک بشر ریخته و به ازای هر ۱۰ml از محلول صاف شده، ۵ml محلول ۱۰٪ کلرید کلسیم به آن بیافزائید و مرتب آن را با میله شیشه ای هم زنید، سپس محلول را روی هات پلیت قرار داده تا بجوش آید و رسوب متراکم سیترات کلسیم را هنگامیکه محلول هنوز داغ است به کمک خلأ صاف کنید. رسوب حاصله را با مقدار ۲۰ml آب جوش شسته و سپس آنرا در مقدار کمی آب سرد حل کرده و سپس حرارت دهید تا بجوش آید ویک کاغذ صافی را وزن کرده و مجدداً رسوب را بوسیله خلأ صاف و جمع کنید. رسوب حاصل را پس از قرار دادن در آون خشک نمایید و وزن رسوب را محاسبه کنید.
اسید سیتریک را می توان از سیترات حاصله به روش زیر تهیه نمود:

رسوب وزن شده را ، در یک بشر ریخته و طبق معادلـه واکـنش، مقـدار اسـید سـولفوریک نرمـال مورد نیاز را محاسبه نمایید و به آن بیافزائید. وسپس رسوب را توسط کاغذ صافی جدا نماییـد. و محلول حاصل را در یک پلیت وزن شده ریخته و روی بن ماری قرار دهید تا کاملا خشـک شـود و کریستال های اسید سیتریک تشکیل گردد. مقداردرصد اسید سیتریک را در محلول اولیه محاسـبه نمائید.

۱) معادله واکنش اسید سیتریک با کلرید کلسیم



۲)معادله واکنش سیترات کلسیم با اسید سولفوریک



Calcium citrate M_w =498

.

Sulfuric acid Mw =98

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.(این نمونه از قبل آماده شده است).

۲- محلول تست: ۰/۴g از عصاره را در ۵ml آب مقطر حل کنید.

۳- محلول های شاهد: ۰/۴g از هر یک از قندهای استاندارد گلوکز و ساکارز را در ۵ml آب مقطر حل کنید. (این نمونه از قبل آماده شده است).

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. (این نمونه از قبل آماده شده است).

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 ۱cm 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

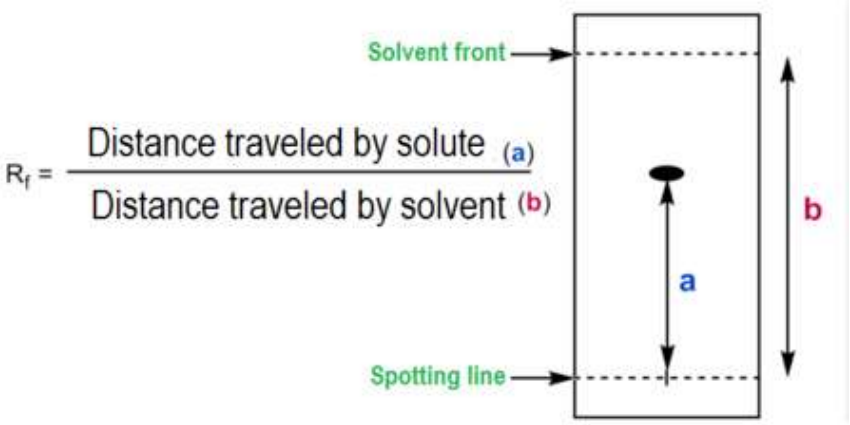
۰/۴g از عصاره ترنجبین را به یک بالون ژوژه ۵۰ml منتقل نموده و با آب مقطر به حجم برسانید.
سپس ۲ml از محلول تهیه شده را به یک بالون ژوژه ۵۰ml منتقل نموده و با آب مقطر به حجم برسانید.غلظت محلول را بر حسب mg/ml محاسبه نمایید.

به روش فوق محلولی با غلظت ۰/۳۲mg/ml از گلوکز استاندارد تهیه نمائید. (این نمونه از قبل آماده شده است).

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 قطره قطره اضافه نمائید. محلول ها را ۱۰ دقیقه بدون حرکت نگه دارید و سپس آرام با کمک میله شیشه ای مخلوط نمایید. و مجدداً برای ۳۰ دقیقه بدون حرکت نگه دارید. ۱ حجم از محلول نمونه و استاندارد و بلانک را با ۱ 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 اسانس رازیانه و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده آن

اسانس ها ترکیبات معطری هستند که در بخش های مختلف گیاهان وجود دارند و از آنجائی که در دمای معمولی و در مجاورت با هوای آزاد تبخیر می شوند لذا به آنها Etheral oils، Volatile oils یا Essential oils گفته می شود.

اسانس ها مخلوط های کمپلکسی از مواد مختلف می باشند اما اکثر ترکیبات موجود در اسانس از نظر بیوسنتزی جزء ترپنوئیدها (منو- و سزکویی ترپنوئیدها) هستند و گروه کوچکی از آنها جزء ترکیبات آروماتیک (فنیل پروپن ها) قرار دارند و لذا بطور کلی می توان گفت این گروه از ترکیبات طبیعی مخلوطی از هیدروکربن ها و مشتقات اکسیژنه آنها (الکل ها، کتون ها، آلدئیدها، اترها، اکسیدها ...) می باشند.

اسانس ها از نظر اجزاء تشکیل دهنده بسیار متفاوتند ولی دارای تعدادی خواص فیزیکی مشترک هستند چون: بوی مشخص، ضریب شکست، فعالیت نوری، عدم امتزاج با آب اما محلول در اکثر حلال های آلی.

روش های استخراج

روش های مختلفی جهت استخراج اسانس ها وجود دارد اما معمولی ترین روش تهیه اسانس بویژه در مورد اسانس های رسمی (official volatile oil) روش تقطیر (distillation) می باشد. تقطیر اسانس به دو روش با آب (water or hydrodistillation) و با بخار (Steam distillation) سال هاست که جهت تهیه اسانس های مختلف بکار می رود. در سطح آزمایشگاهی برای استخراج اسانس های سبکتر از آب از دستگاهی بنام کلونجر (Clevenger apparatus) استفاده می شود.

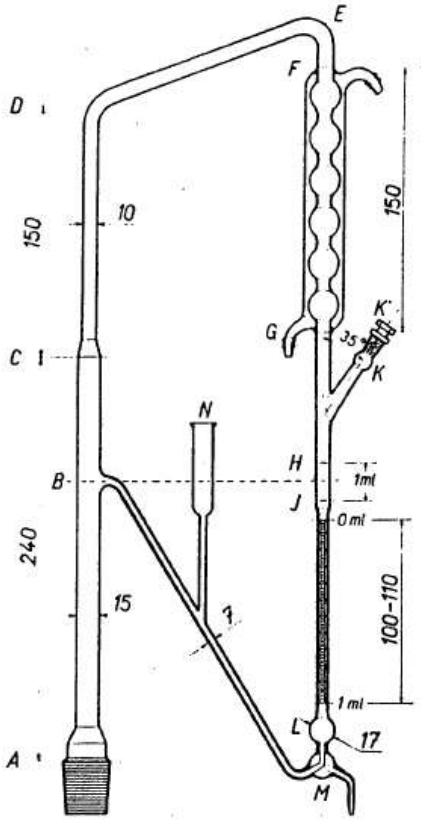
حاصل تقطیر (distillate) بدست آمده، مخلوطی از آب و اسانس است که معمولاً به صورت دو لایه مجزا جمع آوری می شود. اسانس ها در مجاورت با نور و اکسیژن اکسیده و تیره می شوند لذا به منظور جلوگیری از این امر باید آنها را در شیشه های تیره دردار و در محلی تاریک و خنک نگه داری نمود.

روش های جداسازی و شناسایی

امروزه کروماتوگرافی گازی (GC) متداول ترین شیوه جهت آنالیز اسانس هاست و بدین منظور از ستون های مختلف کاپیلاری با پلاریته های مختلف استفاده می شود. ساده ترین راه برای آنالیز و شناسایی اجزاء اسانس توسط GC استفاده از شاخص های خروج مواد از ستون می باشد که عبارتند از: زمان بازداری (Retention time= Rt) و شاخص بازداری کواتس (Kovat's Retention Index= KRI).

استفاده از GC متصل به اسپکتروسکوپ جرمی (MS) ابزاری بسیار دقیق و قدرتمند به منظور شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس ها می باشد و امروزه بطور گسترده ای از دستگاه 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.



شکل دستگاه اسانس‌گیری (طول اندازه‌ها بر حسب واحد میلیمتر است)

روش کار

استخراج اسانس

میزان 50 g 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 ۲ ساعت عمل اسانس گیری را انجام دهید. اسانس حاصل را از دستگاه خارج کنید و در ویال بریزید 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)

٤- 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.

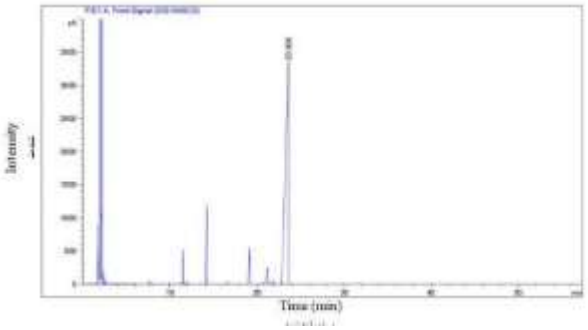
٥- ردیابی لکه ها: به سه روش صورت می گیرد:

- استفاده از نور UV با طول موج 254nm
- اسپری معرف وانیلین در اسید سولفوریک و متعاقب آن حرارت در $110^{\circ}c$ برای ۵ دقیقه
- اسپری معرف ۲، ۴- دی نیتروفنیل هیدرازین.

٦- 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.



کروماتوگرام گازی اسانس رازیانه

جداسازی اسانس گل بابونه و تعیین میزان کامازولن با روش اسپکتروفتومتری

بابونه آلمانی (نام علمی: Matricaria chamomilla)، گیاهی است یک‌ساله، معطر و به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ سانتیمتر که به صورت خودرو در مزارع و کنار جاده‌ها می‌روید. ساقه آن دارای انشعاباتی است و برگ‌های آن بریدگی‌های باریک و دراز با ظاهر برگچه‌مانند دارد. بخش مورد استفاده این گیاه، کاپیتول های (مرکز گل گیاه) آن است که در فاصله ماه‌های اردیبهشت تا مهر ماه، آن را از ساقه جدا می‌کنند.

کاپیتول های این گیاه دارای اسانس هستند. این اسانس در حالت تازه دارای رنگ آبی تیره‌است

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 مقدار مشخص گل بابونه به آن اضافه کنید.

بالون را به دستگاه اسانس گیری وصل کرده و عمل تقطیر را برای مدت ۲ 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 ۵ 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 ε =۴۲۰

وزن مولکولی کامازولن M_w=۱۸۴/۳ می باشد.

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

دانشکده داروسازی شهید بهشتی

برنامه آزمایشگاه فارماکوگنوزی عملی- نیمسال دوم ۱۴۰۵-۱۴۰۴ ساعت ۱۶-۱۳

جلسه	تاریخ	آزمایش	استاد درس
اول	یکشنبه۱۴۰۵/۱/۱۶ دوشنبه ۱۴۰۵/۱/۱۷	استخراج و تعیین مقدار گلیسیریزین از شیرین بیان	**دکتر نیک آور**
اول	شنبه ۱۴۰۵/۱/۲۲ یکشنبه۱۴۰۵/۱/۲۳ دوشنبه ۱۴۰۵/۱/۲۴	استخراج و تعیین مقدار گلیسیریزین از شیرین بیان	**دکتر نیک آور**
دوم	یکشنبه۱۴۰۵/۱/۳۰ دوشنبه ۱۴۰۵/۱/۳۱	شناسایی و تعیین مقدار قند در مان ترنجبین	**دکتر مجاب**
دوم	شنبه ۱۴۰۵/۲/۵ یکشنبه۱۴۰۵/۲/۶ دوشنبه ۱۴۰۵/۲/۷	شناسایی و تعیین مقدار قند در مان ترنجبین	**دکتر مجاب**
سوم	یکشنبه۱۴۰۵/۲/۱۳ دوشنبه ۱۴۰۵/۲/۱۴	استخراج اسیدسیتریک از آبلیمو	**دکتر اسماعیلی**
سوم	شنبه ۱۴۰۵/۲/۱۹ یکشنبه۱۴۰۵/۲/۲۰ دوشنبه ۱۴۰۵/۲/۲۱	استخراج اسیدسیتریک از آبلیمو	**دکتر اسماعیلی**
چهارم	یکشنبه۱۴۰۵/۲/۲۷ دوشنبه ۱۴۰۵/۲/۲۸	استخراج و تعیین مقدار و شناسایی اجزاء اسانس رازیانه	**دکتر مصدق**
چهارم	شنبه ۱۴۰۵/۳/۲ یکشنبه۱۴۰۵/۳/۳ دوشنبه ۱۴۰۵/۳/۴	استخراج و تعیین مقدار و شناسایی اجزاء اسانس رازیانه	**دکتر مصدق**
پنجم	یکشنبه۱۴۰۵/۳/۱۰ دوشنبه ۱۴۰۵/۳/۱۱	استخراج اسانس بابونه و تعیین مقدار کامازولن	**دکتر حسین آبادی**
پنجم	شنبه ۱۴۰۵/۳/۱۶ یکشنبه۱۴۰۵/۳/۱۷ دوشنبه۱۴۰۵/۳/۱۸	استخراج اسانس بابونه و تعیین مقدار کامازولن	**دکترحسین آبادی**