دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دانشکده داروسازی
گروه فارماکوگنوزی

راهنمای آزمایشگاه فارماکوگنوزی

سال تحصیلی۱۴۰۳

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.

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

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

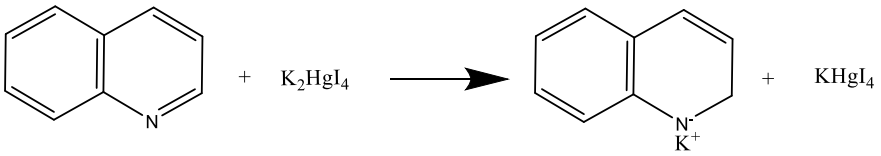
آلکالوئیدها در گیاهان معمولاً به صورت نمک و بازهای آزاد یافت می شوند، مواد طبیعی که همراه آنها مشاهده می شوند، اکثراً اسیدهای گیاهی (مثل اسید اگزالیک و مالیک) و تانن ها هستند که جهت شناسایی اختصاصی آلکالوئیدها این مواد قبلاً بایستی جدا گردند.
آلکالوئیدها دارای خواص فیزیکی و شیمیایی مشترک زیادی می باشند، 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).

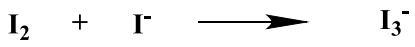
به طور کلی به کمک معرف ها می توان با توجه به رسوب و تغییر رنگی که با آلکالوئیدها حاصل می کنند آنها را شناسایی کرد.

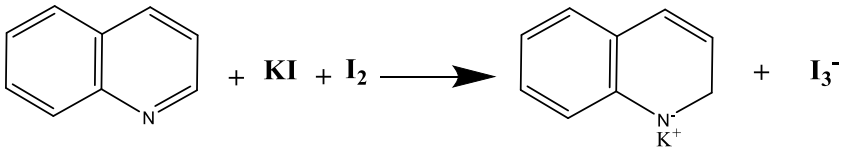
Mayer's Reaction



Cream precipitate

Wagner's Reaction





Reddish-Brown precipitate

روش کار

هدف از این آزمایش هـای جسـتجوی وجـود آلکالوئیـدها و در صـورت موجـود بـودن تشـخیص 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 روی هات پلیت قرار می دهـیم تـا کـاملا خشک شود.

۲- پس از خشک کردن به آن ۲ml اسید کلریدریک ۲N افـزوده، محلـول حاصـل را سـرد کـرده و مقدار ۰/۵ گرم کلرید سدیم به آن افزوده و پس از بهـم زدن آنـرا صـاف نمائیـد. رسـوب روی صافی را با مقدار کافی محلول اسیدکلریدریک شسته تا حجـم آن بـه ۱۰ml برسـد. از محلـول صاف شده ۲ml در دو لوله آزمایش بریزید و بقیه را برای مراحل بعد نگهداری کنید.

به یکی از لوله ها چند قطره معرف میر بیافزائید و نتیجه را ملاحظه کنـی در صـورتیکه رسـوب یـا کدروتی در هیچ یک از لوله ها تشکیل نگردد می توان نتیجه گرفت کـه در عصـاره مـورد آزمـایش آلکالوئید وجود ندارد در صورت مشاهده رسوب در.حالت اول: در صـورتیکه محلـول کمـی کـدر شود (+). حالت دوم: کدورت زیاد ولی رسوبی تولید نمی شود (++). حالت سوم: رسوب فـراوان و سنگین تولید می گردد (+++).نشانه اینست کـه در عصـاره مـورد آزمـایش ممکـن اسـت آلکالوئیـد 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 باشـد، بـه محلـول اسـیدی مقـدار کافی محلول آمونیاک غلیظ افزوده تا در مجاورت کاغذ تورنسل قلیایی(آبی رنگ) گردد. توجـه کنید که آمونیاک غلیظ بسیار خطرناک است و چند قطره از آن برای قلیایی کردن محلول کـافی است.

۲- محلول قلیایی حاصل را به یک قیف دکانتاسیون کوچک منتقل کرده و آنرا سه بار و هر بار بـا ۱۰ml کلروفرم استخراج نمائید. دقت کنید که از تکان دادن شـدید مخلـوط بـرای جلـوگیری 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 گـرم نمـوده تـا حل شود سپس آنرا خنک کرده و بداخل یک لوله آزمایش صاف نمـوده و صـاف شـده را بـدو قسمت تقسیم نمائید:

به هر کدام از لوله های آزمایش محتوی آلکالوئید معرف میر و واگنر مطابق آزمایش قبلـی افـزوده 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.

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

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.

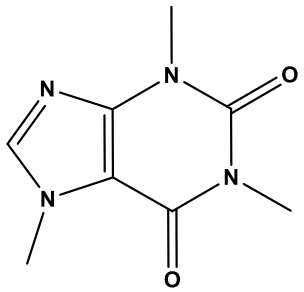
این آزمایش شامل مراحل زیر می باشد:

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.

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



caffeine

روش کار

۵ گرم قهوه بو داده و نرم شده را در یک ظرف شیشه ای ریخته و ۵ 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 (قیف 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.

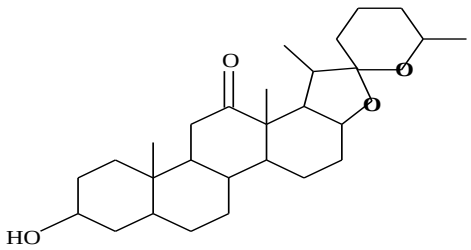
جهت اطمینان از کافئین استخراج شده، طیف .I.R آنرا تهیه کرده و با طیف کافئین استاندارد مقایسه کنید.

تجسس ترکیبات پلی سیکلیک (ساپونین ها و استرول ها)

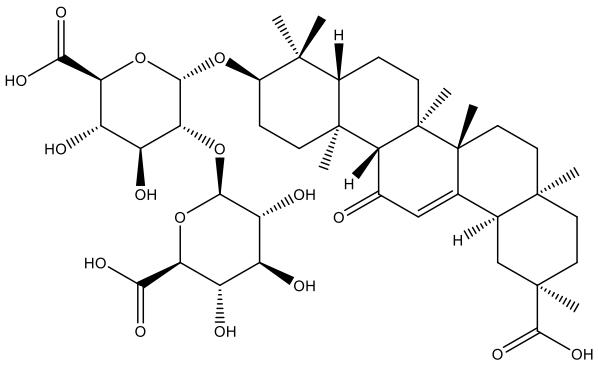
تری ترپنوئیدها موادی هستند که ساختمان کربنی آنها از شش واحد ایزوپرن تشکیل شده و از نظر بیوسنتزی از یک هیدروکربن خطی دارای ۳۰ اتم کربن به نام اسکوالن حاصل می شوند. این اجسام دارای ساختمان حلقوی و پیچیده بوده و اکثراً دارای عوامل الکلی، آلدئیدی یا کربوکسیل (اسیدی) میباشند. آزمایشی که معمولاً جهت تشخیص 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



Glycyrrhizin

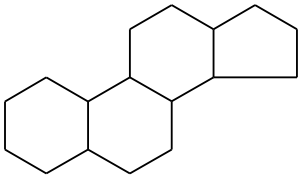
ساپونین ها دارای چند خاصیت اختصاصی بوده که می توان آنها را به سهولت تشخیص داد:

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.

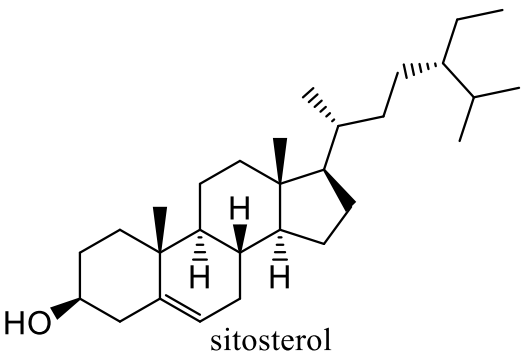
۳- ساپونین ها برای حیوانات خونسرد مانند ماهی و حلزون سمی بوده و سبب مرگ آنها می شوند. از این رو از زمان های بسیار قدیم تعداد زیادی از آنها به عنوان مرگ ماهی به کار می روند.

٤- 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).

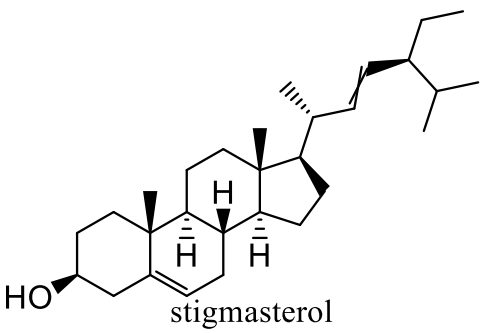


Steroid main strucuture

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.



sitosterol



stigmasterol

روش کار

۱) آزمایش تولید کف برای تجسس ساپونین ها

۱- مقدار نوک اسپاتول 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 ۵ گرم پودر (ریشه) گیاه چوبک را در ۴۰ml 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 ۵mlاتردوپترول ریخته و دکانته (سرریزکردن 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 ته‌نشین شده است سرریز شده و بیرون ریخته می‌شود و لایه زیرین که مایعی چگال‌تر یا رسوب است بر جای می‌ماند)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
٤- مقدار ۱۰ml کلروفرم به رسوب باقیمانده افزوده و بخوبی هم بزنید. سپس کلروفرم را بداخل یک لوله آزمایش ریخته و به آن تا آبگیری 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 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 ۳-۲ 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 سیکلوپنتانوپرهیدروفنانترن

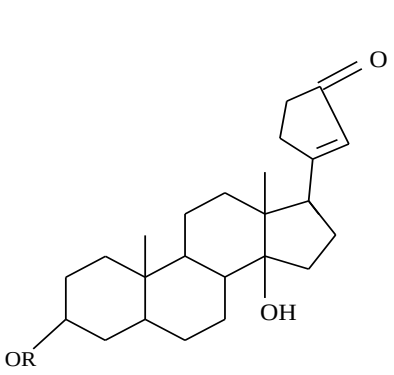
۲- حلقه لاکتونی α و β اشباع نشده (پنج یا شش عضوی) در C_{17}

۳- عامل هیدروکسیل β در C_{14}

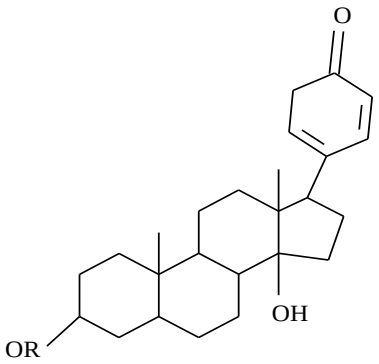
٤- اتصال حلقه های C و D به فرم سیس

٥- 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.

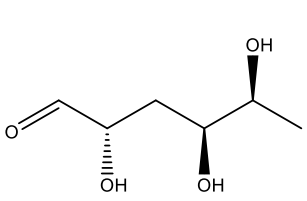
دسته کاردنولیدها در طبیعت فراوانتر بوده و جزء استروئیدهای ۲۳ کربنی هستند و دارای حلقه لاکتونی پنج عضوی اشباع نشده (گاما- لاکتون) می باشند. کلمه بوفادینولیدها از واژه بوفو (قورباغه) اقتباس شده، آگلیکون آنها دارای ۲۴ کربن بوده و یک حلقه لاکتونی شش ضلعی اشباع نشده (دلتا-لاکتون) به حلقه استروئیدی آنها در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

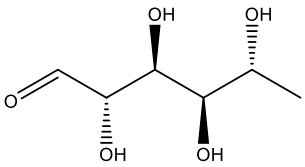
از جمله ویژگی های خاص شیمیایی این دسته ترکیبات این است که اتصال دو حلقه D و C به فرم سیس می باشند که در استروئیدهای موجود در طبیعت کمتر مشاهده گردیده است. اتصال سایر حلقه ها به این قرار می باشد که دو حلقه A و B به فرم سیس و دو حلقه C و B به فرم ترانس اتصال دارند.

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.

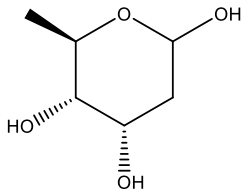
از مهمترین قندهای عادی می توان قند گلوکز را ذکر کرد که اغلب در انتهای زنجیر واقع شده است. دسته دیگر قندهای غیرعادی هستند که اختصاصاً همراه چنین ترکیباتی مشاهده می شوند و به نام قندهای دزوکسی شناخته می شوند مثل:



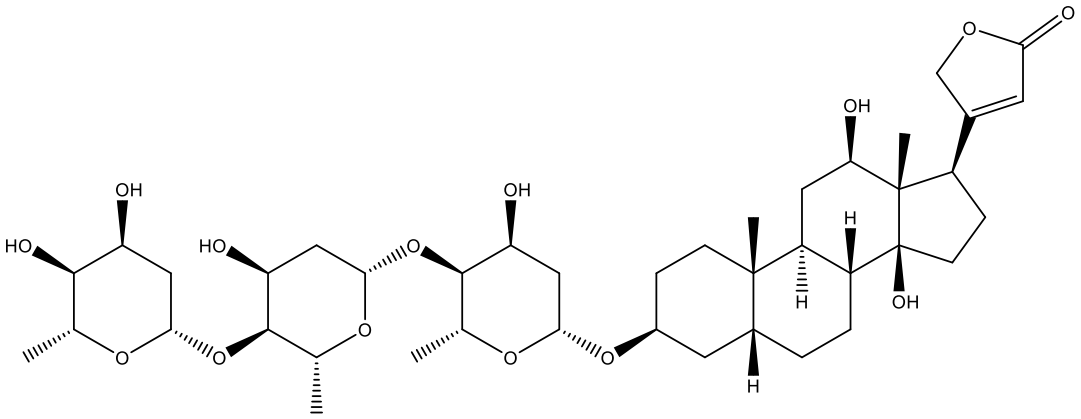
3,6-Dideoxy-L-xylo-hexose



rhamnose



digitoxose



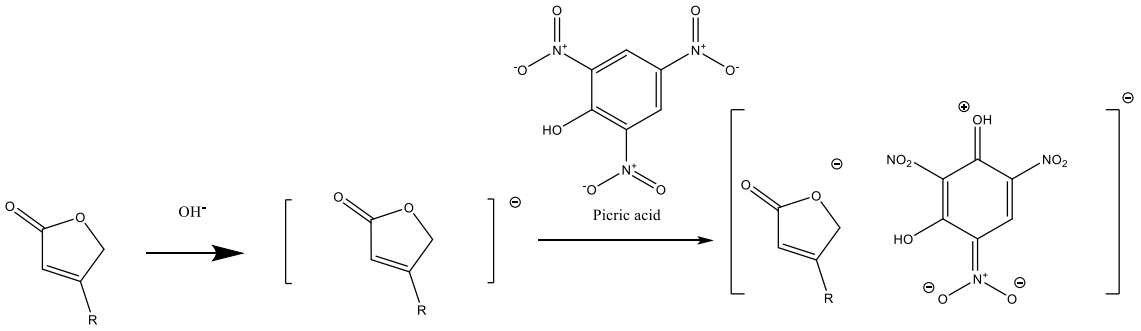
digoxin

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 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 تقریبا با ml ۴۰ 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 کاملا خشک شود.

۲- روی عصاره الکلی خشک شده ۵mlاتردوپترول ریخته و دکانته (سرریزکردن 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 ته‌نشین شده است سرریز شده و بیرون ریخته می‌شود و لایه زیرین که مایعی چگال‌تر یا رسوب است بر جای می‌ماند)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.

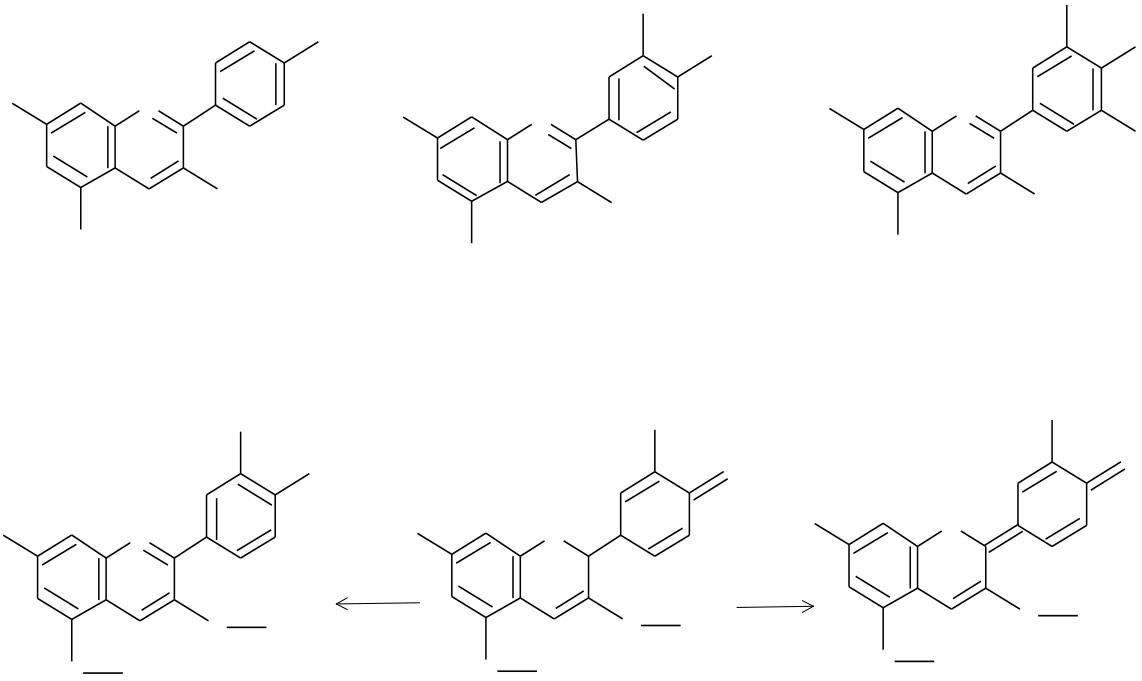
٤- به رسوب ml ۳ معرف کلرید فریک (۰/۳ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد کلرید فریک در ۵۰ml اسید استیک خالص) افزوده و پس از مخلوط کردن بداخل یک لوله آزمایش کوچک بریزید.

۱- در حالیکه لوله را به حالت زاویه ۴۵ درجه گرفته اید مقدار ۲-۱ 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. 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 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.



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.

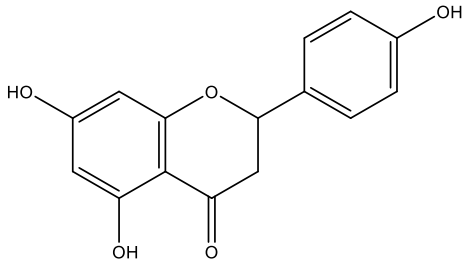
روش کار

برای انجام آزمایش مقدار ۱۰ گرم از کلم بنفش شسته شده را به قطعات کوچک تقسیم کرده و در ۵۰ml آب بریزید. پیگمان های کلم بنفش را بوسیله جوشانیدن بمدت ۱۵ دقیقه استخراج و حاصل را در یک ظرف مدرج ریخته و حجم آنرا به ۳۰ml برسانید، 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	
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

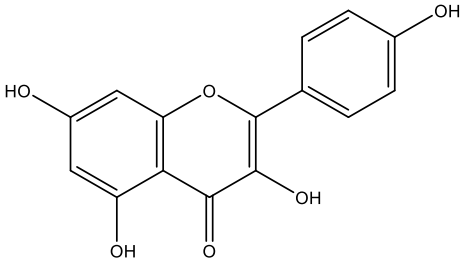
تجسس فلاونوئیدها

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 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:



naringenin

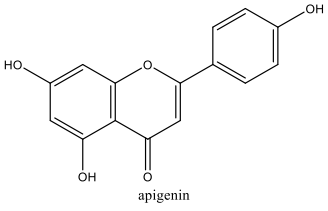
Flavanone



kaempferol

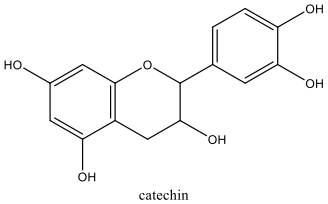
Flavonols

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:

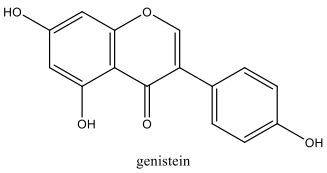


apigenin

Flavones

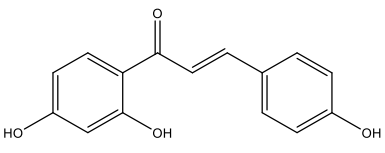


catechin

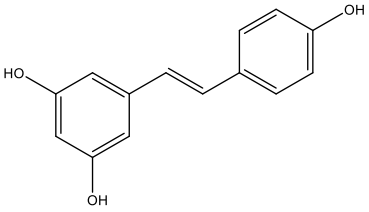


genistein

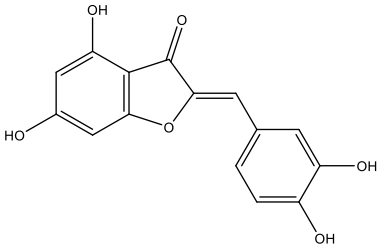
Isoflavones



Isoliquiritigenin



resveratrol



Aureusidin

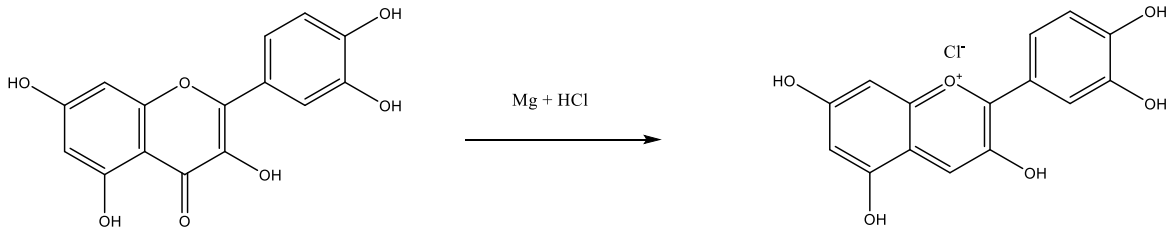
مهمترین ماده فلاونوئیدی که از نظر داروئی دارای اهمیت است روتین می باشد، روتین و هسپریدین را در درمان بیماری های مربوط به شکنندگی و خونریزی از عروق موئین به کار می برند. در سال های اخیر نشان داده شده که فلاونوئیدها دارای خاصیت ضد ویروس، ضدالتهاب و ضدسرطان می باشند، از اینرو تحقیقات دامنه داری روی این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

فلاونوئیدها 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.



Shinoda Test (Cyanidin Reaction)

روش کار

تجسس فلاونوئیدها

۵- ۳ گرم علف چای را تقریبا 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 کاملا خشک شود.

٦- روی عصاره الکلی خشک شده ۵mlاتردوپترول ریخته و دکانته (سرریزکردن 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 ته‌نشین شده است سرریز شده و بیرون ریخته می‌شود و لایه زیرین که مایعی چگال‌تر یا رسوب است بر جای می‌ماند)نمایید.

۷- 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.

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

۹- به یکی از لوله ها مقدار ۰/۵ ml اسید کلریدریک غلیظ و ۲۰mg-۱۰ (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.

۱۰-در یک لوله دیگر 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 تانن ها و پلی فنل ها

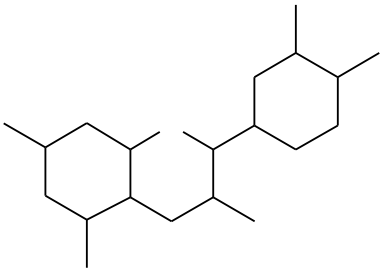
تانن ها دسته بزرگی از مواد آلی طبیعی پیچیده می باشند که به مقدار زیاد، در عالم گیاهی پراکنده بوده و در اکثر تیره های گیاهی یافت می گردند. تانن ها از دسته ترکیبات پلی فنلی طبیعی بدون ازت می باشند که غیر قابل تبلور هستند، اینها با آب و الکل تولید محلولات کلوئیدی می نمایند و دارای طعم قابضی هستند. تانن 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.

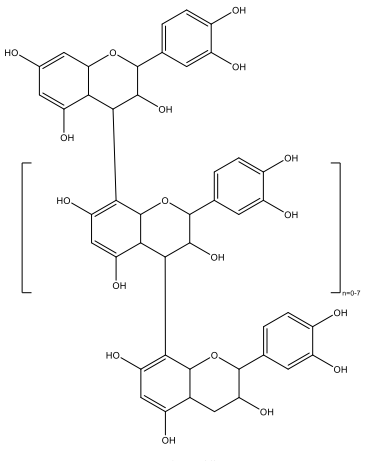
تانن ها باعث رسوب محلول ژلاتین، آلکالوئیدها، نمک فلزات سنگین، آمین ها و آمیدها می شوند و با املاح آهن رنگ آبی تند یا سبز مایل به سیاه تولید می کنند که این خصوصیات جهت شناسایی کیفی و کمی تانن ها استفاده می شود. قابل توجه است که امروزه از روش های پیشرفته کروماتوگرافی جهت شناسائی کیفی و کمی تانن ها استفاده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





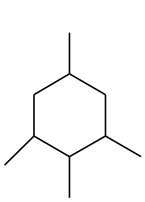
Proanthocyanidins

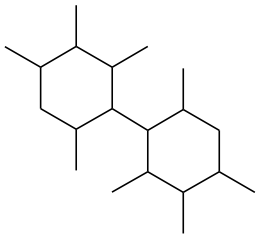
تانن های کاتشول جزء دسته ترکیبات پلی مریزه محسوب می شوند و حداقل از تشکیل دو مولکول از ترکیبات فوق بوجود می آیند. اتصال حلقه ها غالباً توسط کربن های ۶ و ۸ و ′۲ و ′۶ می باشد ولی در مورد پروآنتوسیانیدین ها اتصال بین کربن های ۴ و ۸ انجام می گیرد. این دسته از تانن ها در اثر حرارت از خود ناپایداری نشان داده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

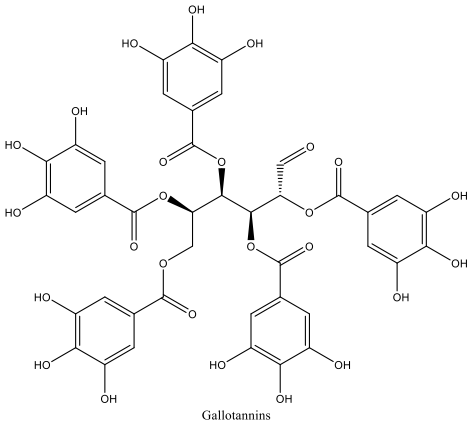
- در اثر جوشاندن با اسید کلریدریک (محلول های اسیدی) تولید فلوبافن قرمز غیر محلول (قرمز تانن- پلی مرهای قرمز - قهوه ای) می نمایند.
- با کلرید فریک تولید رنگ سبز (بعلت وجود دو عامل هیدروکسیل مجاور یکدیگر) می نمایند.
- با آب برم تولید رسوب می نمایند.
- با فرمآلدئید، اسید کلریدریک ایجاد رسوب قرمز می کنند.

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:







Gallotannins

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 های فراوانی دارد. در سال های اخیر نشان داده شده که این مواد دارای اثر ضدسرطان نیز می باشند.

روش کار

۱- مقدار ۱۰ گرم نمونه گیاهی را در ۴۰ml 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 کاملا خشک شود .

۲- بعد در ۱۰ml آب مقطر جوش حل کنید و بگذارید به حرارت آزمایشگاه برسد.

۳- ۲-۴ قطره محلول ۱۰٪ کلرید سدیم به محلول سرد شده بیافزائید تا بدینوسیله ترکیبات غیر تانن رسوب داده شود.

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

٥- 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.

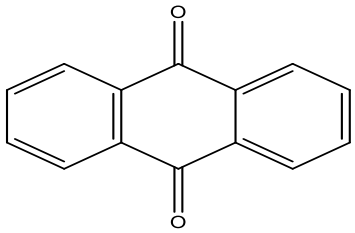
ب) ۴تا ۵ قطره ژلاتین نمک دار (ژلاتین ۱٪ به علاوه نمک کلرید سدیم ۱۰٪) به لوله آزمایش ۲ افزوده و تولید رسوب را ملاحظه نمائید.

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.

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.



anthraquinones

اثر دارویی و موارد استعمال

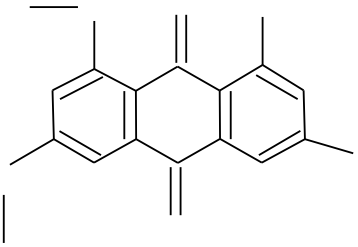
آنتراکینون های آزاد بدون قسمت قندی دارای خاصیت دارویی کمی می باشند و وجود قسمت قندی برای خاصیت بیولوژیک دارو ضروری بنظر می رسد، چون انتقال آگلیکون را به محل اثر در روده بزرگ تسهیل می کند. بدون قسمت قندی، قسمت اعظم آگلیکون طی متابولیسم از بین می رود.

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

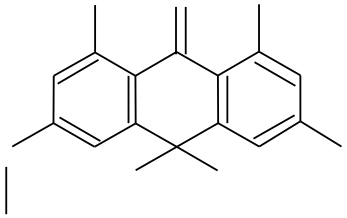
به طور کلی آنتراکینون گلی کوزیدها را به دو گروه دسته بندی می نمایند:

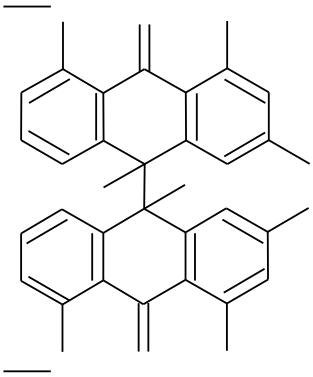
۱- آنتراکینون گلی کوزیدهائی که از ۱، ۸ دی هیدروکسی آنتراکینون (1,8-Dihydroxyanthra qinone) مشتق شده اند مثل:

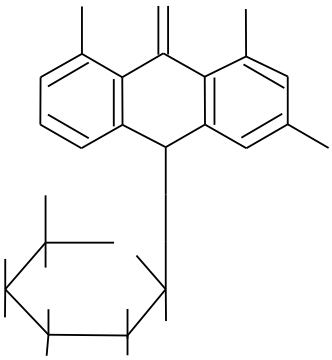


Glucofrangulin A,B

۲- آنتراکینون گلی کوزیدهائی کـه از مشـتقات ۱، ۸ دی هیدروکسـی آنتـرون (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 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 ۳۰ گرم پودر برگ سنا را در ۴۰ml 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 کاملا خشک شود.

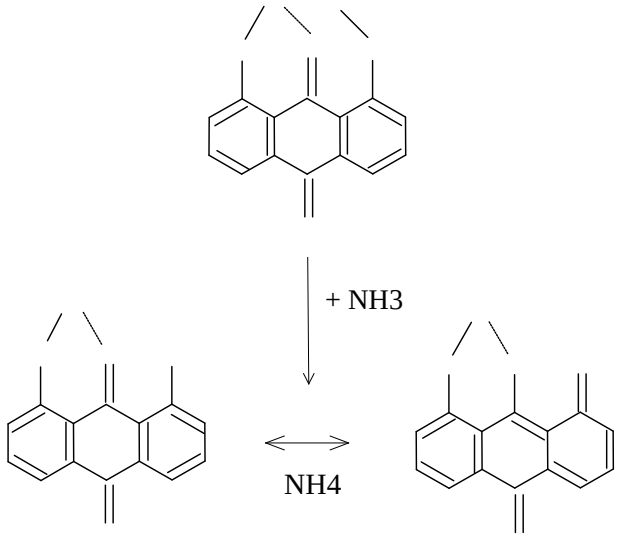
۲- عصاره الکلی بدست آمده را در ۱۰ml آب مقطر حل کرده و سپس صاف نمائید.

۳- محلول صاف شده را با ۵ml گزیلن در یک قیف دکانتاسیون ریخته و تکان داده و بگذارید دو لایه از یکدیگر جدا شوند.

٤- فاز گزیلنی را به یک لوله آزمایش منتقل کرده و ۵ml محلول آمونیاک به آن افزوده و تکان دهید.

٥- 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 قیف دکانتاسیون تکان داده و لایه بنزنی را به دو قسمت تقسیم نمائید.

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

٥- 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 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

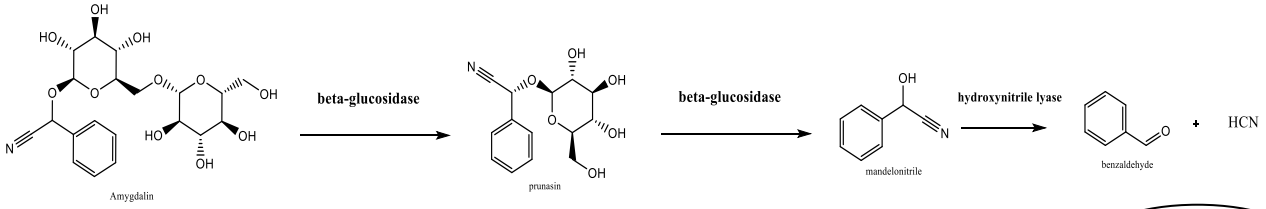
یک گرم اسفرزه (*Plantago ovata*) و یک گرم قدومه (*Allysum compstr*) را دقیقاً وزن کرده و جداگانه در دو استوانه مدرج با شرایط زیر منتقل کنید:
قطر داخلی آن حدود ۱۶mm، از ۰ تا ۲۵ml روی آن مدرج و تا ۰/۲ml را هم بتواند اندازه بگیرد.
۲۵ml آب مقطر اضافه کنید و مخلوط را هر ۱۰ دقیقه یکبار تا یک ساعت تکان دهید.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

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 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 سیانوژنتیک 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 سیانوژنتیک 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 ، گیلاس و هلو "حاصل می شود که به عنوان یک گلیکوزید سیانوژنی طبقه‌بندی می‌شود. خوردن آمیگدالین باعث آزادشدن سیانید در بدن انسان شده و می‌تواند به مسمومیت سیانیدی منجر شود.



روش کار

آزمایش گرینیارد

۱- چند دانه از نمونه گیاهی(بادام تلخ) را در یک ارلن مایر ۱۲۵ ml قرار داده و به آن کمی 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 نمائید (۵ گرم بیکربنات سدیم، ۰/۵ گرم اسید پیکریک و ۱۰۰ ml آب)، کاغذها را بوسیله فشردن بین دو کاغذ صافی خشک نمائید.

۳- 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.

٤- 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. تغییر رنگ کاغذ را ملاحظه نمائید.

در صورتیکه اسید سیانیدریک تولید شود، پس از ۱۵ دقیقه رنگ زرد کاغذ بـه قرمـز تغییـر می یابد و در صورتی که گلیکوزید سیانوژنتیک موجود نباشد رنگ زرد کاغذ بـدون تغییـر باقی می ماند.