



دانشگاه علوم پزشکی همدان

دانشکده داروسازی

گروه فارماکوگنوزی

راهنمای آزمایشگاه فارماکوگنوزی ۱





دانشگاه علوم پزشکی همدان
دانشکده داروسازی

جدول زمان بندی فارماکوگنوزی ۱ عملی

مدرس : دکتر دارا دستان – دکتر شیرین مرادخانی

جلسه	سرفصل مطالب فارماکوگنوزی ۱ عملی	مدرس
۱	استخراج و شناسایی تانن ها	دکتر دستان
۲	استخراج و شناسایی آنتوسیانین ها	=
۳	استخراج گلیکوزید آنتراکینونی	=
۴	استخراج و شناسایی فلاوونوئیدها	=
۵	استخراج گلیسرین و تعیین درصد آن	=
۶	استخراج گلیکوزید سیانوژنی + TLC	=
۷	استخراج نشاسته	دکتر شیرین مرادخانی
۸	استخراج پکتین	=
۹	استخراج و تعیین مقدار اسید سیتریک	=
۱۰	استخراج مان و آنالیز کیفی آن (TLC)	=
۱۱	تعیین مقدار خاکستر ۱	=
۱۲	تعیین مقدار خاکستر ۲ و تعیین ضریب تورم	=

تانن ها گروهی از مواد آلی طبیعی موجود در اکثر گیاهان می باشند که از دسته ترکیبات پلی فنلی بدون ازت و غیر قابل تبلور بوده و با آب و الکل تولید محلول های کلوئیدی می نمایند. تانن های حقیقی (و موجود در طبیعت) وزن مولکولی بالایی داشته و با پروتئین ها ترکیب می شوند و شامل دو گروه عمده هستند: تانن های هیدرولیز شونده و تانن های کندانسه (غیر قابل هیدرولیز).

- تانن های قابل هیدرولیز یا تانن های پیروگالال یا گالتانن ها:

قهوه ای رنگ و محلول در آب گرم بوده و تولید محلول کلوئیدی می نماید. این دسته از تانن ها، ترکیبات استری بوده که در اثر هیدرولیز با اسیدهای رقیق غالباً تولید اسید گالیک یا ترکیبات فنلی مشتق شده از اسیدگالیک را می نمایند.

- تانن های کندانسه یا تانن های کاتشین یا فلوپوتانن ها:

این دسته از تانن ها، پلی مری از ترکیبات فنلی بوده که وابسته به فلاونوئیدها هستند، اما در آب محلول نبوده و در اثر حرارت دادن با محلول های اسیدی ناپایداری نشان داده و ایجاد پلیمرهای قرمز-قهوه ای غیرمحلولی به نام فلوپافن یا قرمزتانن می نمایند.

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 از این ویژگی ها جهت شناسایی تانن ها استفاده می شود. البته امروزه جهت شناسایی کیفی و کمی تانن ها از روش های کروماتوگرافی، رنگ سنجی و اسپکتروفتومتری نیز استفاده می گردد.

تانن ها روی بافت های زنده اثر قابض داشته و در پزشکی جهت مصرف داخلی در دستگاه گوارش (مثال برای کنترل اسهال) و جهت مصرف خارجی در معالجه زخم ها، سوختگی ها، التهابات پوستی و هموروئید (مثال برای کنترل خون ریزی) بکار می رود. در اساس این درمان، پروتئین بافت ها توسط تانن رسوب کرده و اینگونه پوشش محافظی با دارا بودن خاصیت آنتی سپتیکی ایجاد می گردد. در فرآیند چرم سازی نیز تانن ها از طریق ایجاد تغییرات شیمیایی و ایجاد ساختار غیر محلول با پروتئین های الیافی (کلاژن) موجود در پوست خام حیوانات، جهت تولید چرم در دباغی استفاده می شده است. از آنجایی که تانیک اسید با نمک های آهن (مثال فروس سولفات) به صورت شیمیایی واکنش داده و ایجاد رنگ های تندی می نماید، از آن برای تولید جوهرهای پایدار استفاده می شود. همچنین تانن ها در صنایع آرایشی و بهداشتی و در صنعت نوشابه سازی نیز استفاده زیادی دارد.

روش کار

بخش الف:

مقدار ۱۰ گرم پوست آسیاب شده انار را داخل ارلن ریخته و ۳۰ ml متانول به آن اضافه کرده و روی هیتز قرار دهید تا بجوشد.

زمانیکه حجم آن به نصف رسید، محتوی ارلن را صاف کرده و محلول صاف شده را خشک کنید.

سپس آن را در ۱۰ ml آب جوش حل نمایید و صبر کنید تا به دمای محیط برسد.

۲-۴ قطره محلول ۱۰٪ کلریدسدیم به محلول سرد شده فوق بیافزایید تا بدین طریق ترکیبات غیر تانن رسوب داده شود.

محلول را صاف نموده و صاف شده را در چهار لوله آزمایش بریزید و به هر لوله آزمایش از معرف های زیر اضافه کنید و تشکیل رسوب را در هر یک از لوله ها ملاحظه و یادداشت نمایید.

(A) ۰/۵ سی سی از محلول ژلاتین ۱٪ به لوله آزمایش اول اضافه کنید.

(B) ۰/۵ سی سی از محلول ژلاتین نمک دار (ژلاتین ۱٪ + کلریدسدیم ۱۰٪) به لوله آزمایش دوم اضافه کنید.

(C) ۳-۴ قطره محلول کلرید فریک ۱٪ به لوله آزمایش سوم اضافه کنید.

(D) لوله آزمایش چهارم را به عنوان شاهد در نظر بگیرید.

بخش ب:

مقدار ۵ گرم میوه بلوط آسیاب شده را داخل ارلن ریخته و ۵۰ ml آب به آن اضافه کرده و روی هیتز قرار دهید تا بجوشد، تا زمانیکه آب به خوبی تغییر رنگ دهد.

محتوی ارلن را صاف کرده و محلول صاف شده را پس از سرد شدن در چهار لوله آزمایش بریزید و همانند آزمایش بخش اول به هریک، معرف اضافه کرده و تشکیل رسوب را مشاهده کنید.

سؤالات

مشاهدات خود را در خصوص هر دو آزمایش الف و ب به طور جداگانه گزارش نمایید.

آنتوسیانین ها ازجمله پیگمان های موجود در گیاهان می باشند که در آب محلول بوده و باعث ایجاد رنگ های قرمز، ارغوانی، بنفش و آبی در قسمت های مختلف گیاه می شوند. 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 قلیایی آبی و یا سبز می گردند. این آزمایش نشان دهنده تغییر رنگ آنتوسیانین ها برحسب PH های متفاوت محیط می باشد. بطوریکه رنگ قرمز به علت تولید فرم کاتیونی آنتوسیانین ها بوده و رنگ آبی فرم آنیونی را نشان می دهد. به عبارت دیگر در اثر افزایش تعداد استخلاف های هیدروکسیل موجود در مولکول آنتوسیانین ، رنگ حاصله تیره تر می گردد. به عنوان مثال با توجه به شکل زیر پلارگونیدین نارنجی مایل به قرمز، سیانیدین قرمز تیره و دلفینیدین آبی می باشد. لکوانتوسیانین ها را می توان درضمن گرم کردن نمونه ای از بافت گیاهی با محلول ۲ نرمال اسیدکلریدریک در پروپانول به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه تشخیص داد، تولید رنگ قرمز یا بنفش که به تدریج قوی تر می گردد نشانه مثبت بودن واکنش است. آنتوسیانین در پرتقال خونی، تمشک، توت فرنگی، کلم بنفش، انگور های بنفش رنگ و بادمجان و سایر خوراکی های قرمز و بنفش رنگ مانند چای ترش یافت می شود که ازجمله خواص آن می تواند میزان خطر ابتلا به عوارض قلبی و چاقی مفرط را به میزان قابل توجهی کاهش دهد.

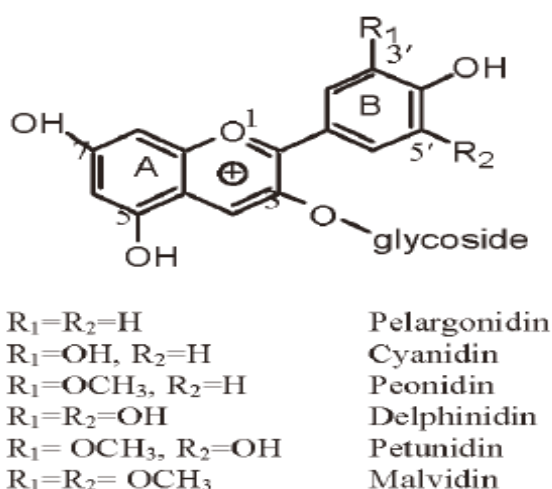


Figure 1. Basic structure of an anthocyanin pigment.

مقدار ۱۰ گرم از کلم بنفش را وزن کرده و بشویید و سپس به قطعات ریز خرد کنید و داخل ارلن بریزید. ۱۰۰ ml آب مقطر به آن افزوده و روی هیتر به مدت ۱۵ دقیقه بجوشد. پس از استخراج آنتوسیانین های موجود در کلم بنفش اجازه دهید تا محلول سرد شود. ۱۸ لوله آزمایش حاوی محلول های بافر تهیه شده طبق جدول زیر (به منظور ایجاد PH های مناسب) آماده کنید و در داخل هر یک از لوله ها، مقدار ۲ ml از محلول استخراج شده ی فوق بریزید و طیف رنگی حاصل را مشاهده نمایید.

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	محلولهای بافری شماره لوله آزمایش ها
2	-	-	0.5	9.5	-	1
3.6	-	-	9.5	0.5	-	2
4.7	-	-	10	-	-	3
5.6	-	0.5	9.5	-	-	4
5.9	-	1	9	-	-	5
6.2	-	2	8	-	-	6
6.5	-	3	7	-	-	7
6.6	-	4	6	-	-	8
6.8	-	5	5	-	-	9
7	-	6	4	-	-	10
7.2	-	7	3	-	-	11
7.4	-	8	2	-	-	12
7.7	-	9	1	-	-	13
8	5.5	-	4.5	-	-	14
9.8	5	-	5	-	-	15
10.7	7	-	3	-	-	16
11.2	7	3	-	-	-	17
14	-	-	-	-	10	18

روش محلول سازی:

$$0.1 \text{ mol/l} \times 40 \text{ g/mol} \times 100 \text{ ml}$$

(1) **NaOH 0/1 مولار:** (M=40)

$$= 0.4 \text{ g}$$

1000

بنابراین **0.4g** از پودر **NaOH** را در یک بالن ژوژه **100mL** توسط آب به حجم برسانید.

(2) **HCL 0.1 مولار:** (M=36.5g/mol) 37%

$$N = \frac{10ad}{E} \quad \text{نرمالیت}$$

N : نرمالیت
a : دانسیته محلول
d : درصد خلوص محلول
E : اکی والان
n : ظرفیت

$$E = \frac{M}{n}, \quad C_m = \frac{N}{n}$$

$$C_m = 10ad/M = (10 \times 0.37 \times 1.2)/36.5 = 0.12$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$X = 83.3 \quad \leftarrow \leftarrow 0.12 \times X = 0.1 \times 100$$

بنابراین **83.3ml** از محلول **HCL 37%** برداشته و با آب به حجم **100ml** می رسانیم.

(3) **KH₂PO₄ 0.15 مولار:** (M=136.1)

$$0.15 \text{ mol/l} \times 136.1 \text{ g/mol} \times 1000 \text{ ml}$$

$$= 20.415 \text{ g}$$

1000

بنابراین **20.415g** از پودر **KH₂PO₄** را در یک بالن ژوژه **1000ml** توسط آب به حجم برسانید.

(۴) $0.15 \text{ K}_2\text{HPO}_4$ مولار: ($M=174.18$)

$$0.15 \text{ mol/l} \times 174.18 \text{ g/mol} \times 500 \text{ ml}$$

$$\frac{\quad}{1000} = 13.0635 \text{ g}$$

1000

بنابراین 13.0635 g از پودر K_2HPO_4 را در یک بالن ژوژه 500 ml توسط آب به حجم برسانید.

(۵) $0.15 \text{ Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ مولار: ($M=163.94+(12 \times 18)=380$)

$$0.15 \text{ mol/l} \times 380 \text{ g/mol} \times 250 \text{ ml}$$

$$\frac{\quad}{1000} = 14.25 \text{ g}$$

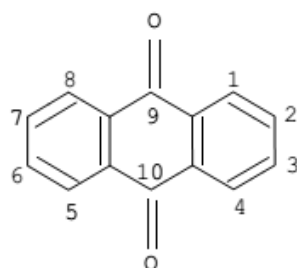
1000

بنابراین 14.25 g از پودر $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ را در یک بالن ژوژه 250 ml توسط آب به حجم برسانید.

سؤالات

- (۱) طیف رنگی حاصل از لوله آزمایش شماره ۱ به سمت لوله آزمایش شماره ۱۸ را گزارش نمایید.
- (۲) چگونگی انجام واکنش آنتوسیانین در محیط های بافری متفاوت (PH های مختلف) را نشان دهید.

آنتراکینونها مهمترین کینونهای طبیعی بوده که اکثرا در گیاهان تیره ی *Ramnaceae*, *Polygonaceae*, *Rubiaceae*, *Fabaceae*, *Liliaceae* یافت می گردند. این گروه از ترکیبات طبیعی در اثر هیدرولیز تولید آگلیکون هایی می نمایند که از مشتقات دی یا تتراهیدروکسی آنتراکینون یا سایر ترکیبات وابسته به آن می باشند.



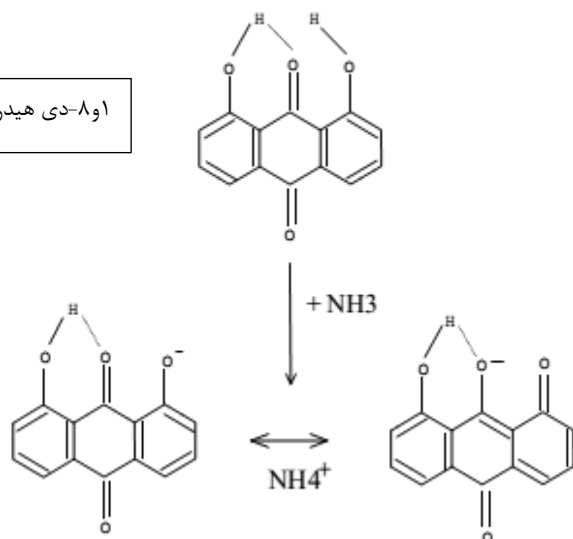
Anthraquinone

وجود قسمت قندی در آنتراکینونها برای حفظ خاصیت دارویی آن ها ضروری به نظر می رسد، چراکه انتقال آگلیکون را به محل اثر در روده بزرگ تسهیل می نماید. همچنین بخش اعظم آنتراکینون بدون قسمت قندی طی متابولیسم از بین می رود. گلیکوزیدهای آنتراکینونی از ترکیبات مسهلی بوده و مکانیسم اثر آن ها از طریق افزایش قدرت انقباض عضلات صاف جدار روده و افزایش ترشحات آب و املاح در داخل روده می باشد و نیز اثر دارویی آن بعد از ۶-۱۲ ساعت ظاهر می شود.

از مهمترین روش های شناسایی آنتراکینون گلیکوزیدها، واکنش **بورن تراگر Born traeger** می باشد. این دسته ترکیبات (۸۱ دی هیدروکسی آنتراکینون) در مجاور قلیایی ها ایجاد فنولات می نمایند که دارای رنگ قرمز بوده و در طول موج ۵۲۰ نانومتر قابل جذب می باشند.

مراحل واکنش بورن تراکر

۸-۱ دی هیدروکسی آنتراکینون



روش کار

مقدار ۱۰ گرم پودر برگ سنا را در داخل ارلن ریخته و ۳۰ ml متانول به آن اضافه کنید و روی هیتر قرار دهید تا بجوشد. بهتر است سر ارلن را با فویل سوراخ شده بپوشانید و زمانیکه حجم عصاره تقریباً نصف گردید، آن را صاف کرده و در داخل کریستالیزور روی حرارت ملایم خشک نموده و آن را وزن کنید. به عصاره ی خشک شده کم کم آب مقطر اضافه کنید تا حل گردد. چنانچه در ته ظرف ذرات جامد حل نشده باقی ماند، آن را صاف نمایید. سپس داخل قیف دکانتور ریخته و هم حجمش اتیل استات به آن اضافه کنید. خوب تکان دهید و بگذارید دو فاز از یکدیگر جدا شوند. فاز آلی را در دو لوله آزمایش تقسیم کنید. اولی را به عنوان شاهد نگهدارید و به لوله دوم مقداری آمونیاک (حدود ۵CC) افزوده و تکان دهید. رنگ لایه قلیایی را ملاحظه و گزارش نمایید

(بدیهی می باشد که تولید رنگ قرمز نشان مثبت بودن وجود ترکیبات آنتراکینونی می باشد).

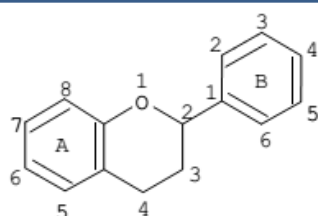
سوالات

- دو گروه آنتراکینون گلیکوزیدی را با ذکر تفاوت های ساختاری نام ببرید.

-

فلاونوئیدها از پیگمان ها یا ترکیبات طبیعی زردرنگ موجود در گیاهان می باشد که به صورت گلوکوزید(ترکیب با قندها) در تمام اندام های گیاهی پراکنده بوده بطوریکه گل ها ، میوه ها و برگ ها حاوی گلوکوزیدهای فلاونی بوده و قسمت های چوبی شده در گیاهان دارای آگلیکون فلاونوئیدی هستند.

فلاونوئیدها از نظر ساختمانی از مشتقات فلاوان (Flavan) هستند و همگی دارای خواص مشابهی می باشند. آگلیکون های این ترکیبات ساختارهای متفاوتی داشته ولی هسته اصلی همه ی آن ها به صورت $C_6-C_3-C_6$ نشان داده می شوند. این ترکیبات در آب محلول بوده وبا الکل به راحتی قابل استخراج می باشند.



Flavan = 2 phenyl chroman

آزمایش تشخیص فلاونوئیدها، به نام **واکنش سیانیدین** معروف است. اساس این واکنش روی هسته گامابنزوپیرون قرار دارد. برای انجام این واکنش هرگاه به عصاره ی الکلی حاوی فلاونوئید، اسید کلریدریک غلیظ و کمی براده منیزیم افزوده شود رنگ های مختلفی باتوجه به نوع فلاونوئید موجود حاصل می گردد. به عنوان مثال 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. تغییر رنگ معمولا پس از ۱-۲ دقیقه ظاهر می شود که شدت آن بستگی به غلظت فلاونوئید دارد.

مهمترین ماده فلاونوئیدی که از نظر دارویی اهمیت بیشتری دارد روتین می باشد. روتین و هسپریدین را در درمان بیماری های مربوط به شکنندگی و خونریزی از عروق موئین به کار می برند و اخیرا نیز خواصی همچون ضد ویروس، ضد التهاب و ضد سرطان برای این دسته ترکیبات فلاونوئیدی تشخیص داده شده است.

۳ گرم از گیاه علف چای را وزن نموده و در داخل ارلن ml ۳۰ متانول به آن اضافه کنید و روی هیتر قرار داده تا بجوشد تا حجم آن تقریباً نصف شود. بهتر است سر ارلن را با فویل آلومینیومی بپوشانید و سوراخ کوچکی روی فویل ایجاد نمایید. سپس عصاره را صاف کنید و محلول صاف شده را در داخل کریستالیزور ریخته و تا تبخیر کامل حلال روی هیتر حرارت دهید تا خشک شود.

بر روی عصاره خشک شده حدود ml ۱۵ هگزان که یک حلال غیرقطبی می باشد، اضافه نموده و همراه با هم زدن و کمی حرارت ملایم، مخلوط و سپس صاف کنید. هگزان را دور بریزید و رسوب باقیمانده در کف کریستالیزور را نگه دارید. این عمل را با هگزان مجدد تکرار کنید. محلول هگزانی فوق حاوی کلروفیل، رزین ها و چربی و... می باشد و رسوب حاوی فلاونوئیدها است.

رسوب را در ml ۱۰ اتانول ۸۰٪ حل کنید و محلول حاصل را در دو لوله آزمایش بریزید. لوله اول را به عنوان شاهد بگذارید که فقط حاوی ماده استخراج شده می باشد و به لوله دوم چند قطره اسید کلریدریک غلیظ و به اندازه نوک اسپاتول از براده ی منیزیم بیافزایید.

رنگ ایجاد شده را بعد از چند دقیقه ملاحظه نمایید. همچنین به رنگ های تولید شده در قسمت کف لوله توجه کنید.

سؤالات

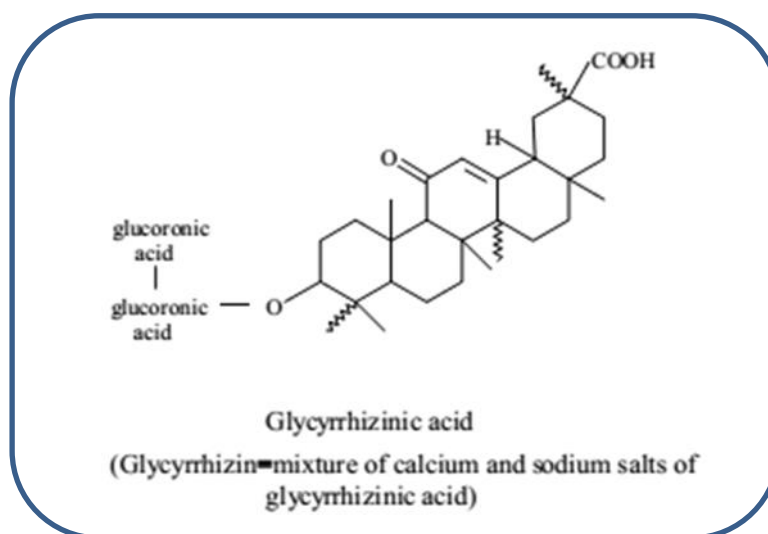
(۱) مکانیسم واکنش سیانیدین را بنویسید و دلیل استفاده از اسید کلریدریک را در این واکنش بیان کنید.

(۲) گروه های ساختاری مختلف آگلیکونهای فلاونوئیدی را نام ببرید.

تعیین مقدار گلیسرین (از طریق وزنی)

مقدمه

گلیسرین، گلوکوزید **اسید گلیسرینیک (یا گلیسیریتینیک)** می باشد که در ریشه خشک گیاه شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* وجود دارد و در اثر هیدرولیز ایجاد اسید گلیسرینیک و ۲ مولکول قند اسیدگلوکورونیک می نماید.



شیرین بیان دارای اثرات ضدالتهاب، ضد زخم گوارشی، خلط‌آور، ضد سرفه، ضد احتقان دستگاه تنفسی فوقانی، ضد قارچ و ضد باکتری است. این گیاه از گذشته تاکنون در درمان زخم‌های گوارشی مورد مصرف بوده است و در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی، سرماخوردگی، آنفلوانزا و برونشیت موثر است.

روش کار

ابتدا مقدار ۵۰ سی سی عصاره شیرین بیان را به همراه ۵۰۰ سی سی آب مقطر درون یک بشر ریخته و به کمک حرارت هیت رزبنت رقیقی از آن تهیه نمایید.

سپس مقدار ۵۰ سی سی از این شربت آماده شده را به یک بشر منتقل کنید و آرام آرام اسید سولفوریک رقیق (۳ برابر با آب رقیق شود) افزوده شود تا رسوبی حاصل گردد. افزودن اسید را تا وقتی ادامه دهید که دیگر رسوبی اضافه نشود. توجه کنید هنگام رقیق سازی به منظور جلوگیری از پاشیدن اسید، اسید را به ظرف محتوی آب بیافزایید. رسوب را به کمک قیف بوختر جدا کنید و با آب مقطر بشوید تا آب حاصل از شستشو خنثی گردد (باچک نمودن کاغذ PH). البته جهت تسریع در روند جداسازی رسوب می توانید از دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه استفاده کنید. بعد از سانتریفوژ محلول

رویی را دور ریخته و رسوب را چندین بار با آب مقطر شستشو دهید. برروی رسوب خنثی زیر هود قطره قطره آمونیاک غلیظ ریخته تا رسوب را حل کند. محلول حاصل را در کریستالیزور بریزید و زیر هود بگذارید تا کاملاً خشک شود. ماده ی باقیمانده در ظرف کریستالیزور همان گلیسیریزین می باشد.

دقت نمایید مقدار شربت تهیه شده و مقدار مخلوط رسوب واسید را قبل از جداسازی رسوب و همچنین کریستالیزور مورد استفاده را قبل از انتقال محلول به داخل آن وزن کرده باشید.

سوالات

گلوکوزیدها از مهمترین مواد موثره گیاهان می باشند که شامل دو بخش قندی و غیرقندی بوده که به یکدیگر باند شده اند. بخش قندی در اصل فاقد خاصیت دارویی بوده و فقط بیشتر در حلالیت و جذب مواد و انتقال بخش غیر قندی تاثیر دارد و بخش غیر قندی از مواد مختلف تشکیل شده است و دارای اثرات درمانی می باشند. بیشتر گیاهان منابع شیمیایی خود را به شکل گلوکوزید های غیر فعال ذخیره می کنند که در بدن گیاه خواران توسط آنزیم ها هیدرولیز می گردند.

مقدار بیشتر اسید سیانیدریک در گیاهان حاوی آن، به شکل گلوکوزید می باشد و این نوع گلوکوزید اغلب در گیاهان خانواده روزاسه وجود دارند. به علت اثر سمی اسیدسیانیدریک آزاد شده از هیدرولیز، این گیاهان از نظر سم شناسی و درمانی دارای اهمیت می باشند. در هر گیاهی که گلوکوزیدهای سیانوژنیک موجود باشد، آنزیم هیدرولیز کننده ی آن ها نیز وجود دارد. گلوکوزیدهای سیانوژنیک علاوه بر آنزیم های مربوط توسط اسیدهای رقیق نیز هیدرولیز شده و تولید اسید سیانیدریک می نمایند.

آزمایشی که به منظور شناسایی این نوع گلوکوزید در بافت های گیاهی به کار می رود **واکنش گرین یارد** نام دارد. در این جلسه از بادام تلخ به منظور شناسایی آمیگدالین (یک گلوکوزید سیانوژنیک بوده و طی هیدرولیز HCN آزاد می کند) استفاده می شود.

چهار عدد بادام تلخ را در داخل هاون خرد کنید و آن را در یک ارلن ریخته و به آن مقدار کافی آب مقطر افزوده تا کاملاً مرطوب گردد و **فعالیت آنزیمی آن افزایش یابد**. سپس کاغذ پیکرات سدیم را با فروبردن نوارهای کاغذ صافی در محلول تازه تهیه شده ی پیکرات سدیم (۵ گرم بیکربنات سدیم + ۰/۵ گرم اسید پیکریک + ۱۰۰ سی سی آب) آماده کنید و در آخر کاغذهای آغشته شده را به طریق فشردن بین دولایه کاغذ صافی خشک نمایید.

تکه کاغذ تهیه شده پیکرات سدیم را در بالا و داخل ارلن محتوی آب و پودر بادام قرار داده و سر ارلن را با فویل بپوشانید. سپس آن را روی هیتر با دمای حدود ۴۰ درجه ی سانتیگراد قرار دهید. توجه کنید کاغذ را به گونه ای از بالای ارلن آویزان نمایید که با ظرف و محتویات آن در تماس نباشد. پس از چند دقیقه تغییر رنگ کاغذ بر اثر بخارات حاصله قابل مشاهده است که نشان دهنده ی تولید اسید سیانیدریک می

باشد و در صورتیکه رنگ زرد کاغذ بدون تغییر باقی بماند دلیل بر عدم وجود گلوکوزید سیانوزنیک در نمونه مورد آزمایش خواهد بود.

سؤالات

استخراج نشاسته

مقدمه

نشاسته یک پلی ساکارید گیاهی ذخیره شده در اندام های ذخیره کننده ی گیاهان مانند ساقه ، ریشه ، ریزوم ، میوه و دانه ها می باشد. در خصوص استخراج و تهیه نشاسته در مقادیر زیاد، باید نکات زیر مورد توجه قرار گیرد:

- قسمت های گیاهی مورد استفاده حاوی مقادیر زیادی نشاسته باشند.
 - فشردگی گرانول های نشاسته در داخل سلول ها زیاد نباشد تا روند استخراج آسانتر صورت پذیرد.
 - مقدار زیاد و ماهیت ژلاتینی مواد پروتئینی همراه با نشاسته در داخل سلول ها روند تصفیه نشاسته را مشکل می سازد.
 - مقدار کم اسیدهای چرب موجود در گیاه نیز روند استخراج و تصفیه نشاسته را تسهیل می نماید.
- نشاسته به دلیل داشتن چگالی بیشتر (حدود ۱/۶) از سایر مواد همراه آن که غیر محلول در آب نیز می باشند، به راحتی قابل جداسازی می باشد.
- ۴ منبع عمده نشاسته عبارتند از: ذرت ، سیب زمینی ، گندم و برنج. لذا سیب زمینی به دلیل اینکه حاوی ۲٪ پروتئین و ۱٪ چربی و درصد نسبتا بالایی نشاسته بوده و فشردگی آن نیز در سلول ها زیاد نمی باشد، بنابراین عمل استخراج و تصفیه ی نشاسته آسانتر انجام می پذیرد.

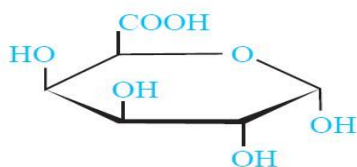
روش کار

مقدار ۱۰۰ گرم سیب زمینی پوست گرفته شده را دقیقا وزن نموده و سپس بوسیله رنده ریز بخوبی خرد نمایید. توده له شده حاصل را در داخل یک پارچه توری ریخته و خوب فشار دهید. محلول صاف شده از توری را در یک بشر جمع آوری کنید و سعی کنید تمام عصاره حاصله را بوسیله فشردن جدا نمایید. سپس مقداری آب به تفاله ی باقیمانده افزوده و پس از مخلوط کردن مانند قبل بوسیله فشردن آن را استخراج نمایید. عمل افزودن آب و فشردن را تا زمانیکه عصاره ی استخراج شده حاوی نشاسته می باشد، تکرار کنید. حاصل استخراج جمع آوری شده در داخل بشر را مدتی در حالت سکون نگه داشته تا اینکه نشاسته ته نشین شود و مایع فوقانی که حاوی سایر مواد سلولی می باشد را دور بریزید. مجددا داخل بشر مقداری آب افزوده و تکان دهید و اجازه دهید نشاسته دوباره ته نشین شود. یکبار دیگر مایع فوقانی را دور ریخته و باقیمانده ی آب را با کاغذ صافی و قیف ساده (و یا با کمک قیف بوختر و ارلن خلا و یا بوسیله سانتریفوژ) از رسوب نشاسته جدا کنید. رسوب حاصل را به یک پلیت شیشه ای منتقل نموده و در آون ۱۰۰ درجه قرار دهید تا خشک شود و سپس آن را توزین نمایید.

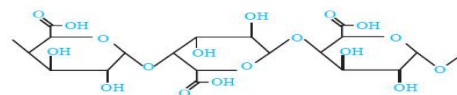
۱. وزن (گرم) و درصد نشاسته استخراج شده از سیب زمینی را گزارش نمایید.
۲. درصد پروتئین ، چربی و نشاسته موجود در سیب زمینی ، جو ، ذرت ، برنج و گندم را بررسی و در جدول زیر ذکر نمایید.

درصد ترکیبات	سیب زمینی	برنج	جو	گندم	ذرت
نشاسته					
پروتئین					
چربی					

پکتین پلی ساکاریدی با وزن مولکولی بین ۱۴۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دالتون می باشد که در میوه و ریشه ها ذخیره می گردد و در دیواره سلولی پوست میوه هایی از جمله مرکبات، سیب و قسمت های سخت باعث استحکام می شود. پکتین از نظر مولکولی، استری از متیل گالاکتورونان، گالاکتانان و آرابان است که گالاکتانان و آرابان قندهایی هستند که به متیل گالاکتورونان وصل شده اند و در اثر هیدرولیز ایجاد آرابینوز، گالاکتوز و اسید گالاکتورونیک (اسید پکتیک) را می نماید.



ساختار گالاکتورونیک اسید



ساختار پکتین
یا

پلی گالاکتورونیک اسید

پکتین خالص در مجاورت با آب حالت هیدروکلوئیدی و ژله مانند دارد و کاملاً سفید و بی بو می باشد. پکتین در میوه ها به شکل پروتوپکتین وجود دارد و ابتدا باید پروتوپکتین را در مجاورت اسید رقیق حرارت داده تا محلول شود که در این مرحله پکتین به زنجیره های کوچکتر شکسته می شود. بعد از سرد شدن به این محلول نمک طعام و یا الکل اضافه می گردد (تا مجدداً تکه های جدا شده با همدیگر پیوند بدهند) که این مرحله موجب رسوب پکتین محلول می گردد و پس از سانتریفوژ پکتین قابل جداسازی می باشد.

پکتین کاربردهای متعددی در صنعت داروسازی دارد از جمله اینکه محافظت کننده سیستم گوارشی است و به دلیل ساختمان موسیلاژی که دارد روی بستر گوارشی میسل هایی را تشکیل می دهد. پکتین حجم و ویسکوزیته مدفوع را افزایش می دهد و از این طریق به درمان یبوست کمک می کند. پکتین در تهیه ژله و شامپو نیز کاربرد دارد.

۲۵ گرم پوست پرتقال آسیاب شده را در داخل بالن ریخته و ۳۰۰ سی سی اسید کلریدریک ۱٪ به آن بیافزایید و سیستم رفلاکس را روی بالن سوار کنید. سپس حاصل را داخل یک پارچه توری منتقل کرده و با فشار مایع آن را داخل یک بشر بریزید و بگذارید سرد شود.

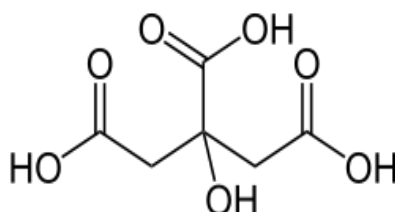
سپس با افزودن نمک به محلول حاصل اسیدپکتیک را رسوب دهید و رسوب ژله ای را جدا نموده (در صورت نیاز از سانتریفوژ استفاده گردد) و مجدداً با حل نمودن در آب و رسوب دادن با نمک جدا و در یک پلیت شیشه ای خشک و سپس توزین گردد.

درصد مقدار پکتین موجود در پوست پرتقال را محاسبه نمایید

استخراج اسید سیتریک از آبلیمو

مقدمه

اسیدهای موجود در گیاهان به مقدار فراوان در بافت های گیاهی به صورت آزاد و یا ترکیب شده با مواد معدنی یا آلی (املاح آلکالوئیدی) و یا به صورت استر یافت می شوند. این اسیدهای آلی را نسبت به تعداد گروه های کربوکسیل (COOH) موجود به اسیدهای یک ظرفیتی، دوظرفیتی و یا چند ظرفیتی تقسیم می کنند. این اسیدها در واکنش های تنفسی سلول های گیاهی نقش داشته و برخی مانند اسید سیتریک و مالئیک اسید و سوکسینیک اسید به مقدار زیاد و برخی دیگر مانند اسید آلفا کتو گلوئاریک به مقدار کمتری وجود دارند. اسید سیتریک یا جوهر لیمو ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) یک هیدروکسی اسید است. هیدروکسی اسیدها گروهی از اسیدهای کربوکسیلیک هستند که یک گروه عاملی هیدروکسیل به آنها افزوده شده است. اسید سیتریک را می توان از میوه مرکبات (مانند لیموترش، پرتقال) به شکل نمک کم محلول کلسیم جدا نمود. حلالیت اسید سیتریک در آب بسیار زیاد بوده و درعین حال دارای ویژگی حلالیتی غیرمعمولی نیز می باشد، به طوریکه حلالیت نمک آن در اثر افزایش درجه حرارت کاهش می یابد.



از جمله موارد کاربرد آن در صنایع نوشابه، آبمیوه، آرایشی و بهداشتی و داروئی استفاده می گردد و علاوه بر طعم دهندگی باعث تنظیم PH نیز می شود. محلول بافری اسید سیتریک به عنوان پاک کننده برای حذف دی اکسید گوگرد از سوخت های گازی کارخانجات برق و تصفیه خانه ها استفاده می شود. استرهای اسید سیتریک با الکل ها همچون استرهای تری اتیل، تری بوتیل و استیل تری بوتیل به عنوان یک نرم کننده غیرسمی در پلاستیک سازی به ویژه در پلاستیک های صنعت بسته بندی غذایی استفاده می شوند.

روش کار

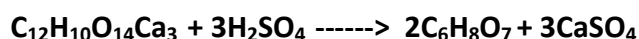
مقدار ۱۰ ml آبلیمو را در یک بشر ۱۰۰ سی سی ریخته و به آن قطره قطره سود ۱۰٪ اضافه کنید تا اینکه محلول کمی قلیایی گردد به طوریکه رنگ محلول نیز در این مرحله از زرد روشن به قهوه ای تغییر یابد. همچنین می توان زمان قلیایی شدن محلول را با کاغذ تورنسل نیز چک نمود. سپس محلول حاصل را به استوانه مدرج منتقل کرده و به اندازه نصف حجم آن کلرید کلسیم ۱۰٪ (CaCl_2) به آن بیافزایید و بهم بزنید. سپس محلول را حرارت داده تا بجوش آید. بنابراین رسوب متراکم سترات کلسیم به رنگ سفید مایل به زرد تشکیل می شود زیرا این نمک با افزایش حرارت حلالیتش کاهش می یابد و بیشتر رسوب می کند.

سپس رسوب حاصله را هنگامیکه هنوز داغ است بوسیله خلاء صاف کنید و کاغذ صافی حاوی رسوب را در آون ۱۲۰ درجه قرار دهید تا خشک شود. قبل از انجام عمل صاف کردن باید وزن کاغذ صافی ثبت گردد.

حال اسید سیتريک را به روش زیر از سیترات کلسیم جدا نمایید:

رسوب خشک شده را وزن نموده و در داخل یک بشر به مقدار محاسبه شده (---؟---) اسید سولفوریک نرمال به آن بیافزایید. چند دقیقه صبر کنید تا رسوب سولفات کلسیم نامحلول از آن جدا گردد. محلول حاصل حاوی اسید سیتريک می باشد که بعد از صاف کردن، آن را به یک کریستالیزور انتقال داده و در صورت لزوم حرارت دهید تا تغلیظ و سپس خشک گردد که در این حالت اسید سیتريک متبلور یا کریستالیزه می شود. وزن کریستال های خشک شده اسید سیتريک را بدست آورید.

روش انجام محاسبات جهت محلول سازی:



این واکنش بین ۱ مول رسوب سیترات کلسیم و ۳ مول اسید سولفوریک رخ داده که در حاصل ۲ مول اسید استیک و ۳ مول رسوب سولفات کلسیم به دست می آید.

برای تهیه ۱۰۰ ml اسید سولفوریک نرمال یا ۰/۵ مولار از اسید سولفوریک موجود در آزمایشگاه (نرمالیت: ۳۶/۸ ، مولاریته: ۱۸/۴) می بایست طبق فرمول زیر ۲/۷ ml از اسید موجود برداشته و در داخل بالن ژوژه به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

$$N_1V_1=N_2V_2 \quad \longrightarrow \quad 100 \times 1 = 36.8 \times V_2 \quad \longrightarrow \quad V_2 = 2.7$$

برای محاسبه ی مقدار حجم مورد نیاز از اسید سولفوریک (۰/۵ مولار) جهت افزودن به رسوب سیترات کلسیم می بایست مطابق فرمول زیر صورت گیرد:

$$\text{مقدار وزن رسوب سیترات کلسیم} \times 3 \text{ mol H}_2\text{SO}_4$$

$$Y = \text{(تعداد مول اسید سولفوریک مورد نیاز)}$$

(نیاز)

$$498 \text{ gr}$$

$$Y \times 1000\text{ml} / 0.5\text{mol} = \text{---?---ml (H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.5M)}$$

سوالات

۱) مقدار درصد اسید سیتريک را در محلول اولیه (آبلیمو) محاسبه نمایید.

۲) در ابتدا آزمایش، دلیل قلیایی کردن آبلیمو را بیان نمایید.

مان ها موادی با طعم کمی شیرین و ملایمند که به عنوان یکی از محصولات فرعی طبیعی کربوهیدراتی و در نتیجه ی برهم کنش عوامل زنده و غیر زنده در اکوسیستم ها حاصل شده اند که همچنین مصارف متنوع درمانی و خوراکی آن ها ریشه در طب سنتی و کهن دارد.

مان ترنجبین از گیاه خارشتر (*Alhagi pseudolhagi*) از تیره ی باقلا حاصل می شود که نتیجه فعالیت یک حشره ویژه بر روی برگ ها و سرشاخه های گیاه خارشتر می باشد. از نظر ظاهری به صورت ترشحات گلوله ای شکل ریز و سفید یا زرد رنگ و یا کمی متمایل به قهوه ای بوده و در صورت ناخالص بودن می توان خارهای نوک تیز و میوه های قرمز رنگ و تسبیحی شکل گیاه را در نمونه یافت. این مان به دلیل دارا بودن ترکیبات قندی مختلف طعم شیرینی دارد.

۳ گرم ترنجبین را در یک بشر ۵۰ سی سی بریزید و ۳۰ سی سی آب مقطر به آن اضافه کنید و خوب هم بزنید. عصاره حاصل را ابتدا با توری و سپس با کاغذ صافی صاف نمایید. محلول صاف شده را بر روی بن ماری تغلیظ نمایید تا خشک شود و سپس آن را وزن کنید.

به منظور بررسی کیفی مان ترنجبین از روش TLC با قندهای استاندارد موجود (شامل مالتوز، مانوز، گالاکتوز، ساکاروز، گلوکز و لاکتوز) استفاده می شود. بدین منظور جهت تهیه محلول تست می بایست ۰/۲ گرم از عصاره را در ۲ ml آب مقطر حل نمایید و برای تهیه محلول های شاهد نیز ۰/۲ گرم از هر یک از قندهای استاندارد را در ۲ ml آب مقطر حل کنید.

برای تهیه فاز متحرک به نسبت ۹:۶:۳:۱ به ترتیب از بوتانول - اسید استیک - دی اتیل اتر - آب حلال تانک کروماتوگرافی مورد نیاز را تهیه کنید و سپس درب تانک را بوسیله ی درپوش مسدود نمایید تا محفظه ی آن از بخار حلال اشباع گردد. بدین وسیله از تبخیر حلال موجود بر روی کاغذ TLC در طول پیشروی جلوگیری شده و در نتیجه زمان لازم برای پیشروی کاهش می یابد.

حدود ۵ میلی متر بالاتر از لبه تحتانی کاغذ TLC بامداد کم رنگ خط کاملاً افقی رسم کنید و از هر محلول شاهد و از محلول تست، مقدار بسیار کمی به اندازه ی یک نقطه به کمک لوله موئینه بسیار نازکی

روی خط رسم شده به فاصله حدود ۱ cm از یکدیگر قرار دهید. سپس کاغذ TLC را در داخل تانک قرار داده و درب آن را ببندید. حتما دقت کنید سطح حلال تانک به اندازه کافی پایینتر از خط افقی رسم شده بر روی کاغذ واقع گردد. بتدریج حلال به همراه اجزاء موجود در نمونه ها به سمت بالای صفحه TLC حرکت می کند و وقتی قسمت اعظم صفحه را طی کرد (زمانیکه حلال تا حدود ۵ میلی متری از بالای صفحه TLC پیشروی کرد)، کاغذ TLC را از تانک خارج نموده تا حلال آن در هوا و زیر هود تبخیر گردد و سپس به روش زیر مورد بررسی قرار گیرد.

حال از روش اسپری رنگ استفاده می کنیم تا همه لکه های جدا شده روی کاغذ را ببینیم. بنابراین برای ساختن معرف اسپری ۰/۵ ml آنیزالدئید، ۹ ml اتانول، ۰/۵ ml اسید سولفوریک غلیظ و ۱ ml اسید استیک را خوب با همدیگر مخلوط کنید و پس از ریختن معرف تازه تهیه شده در داخل ارلن ۱۰۰، بر روی لکه های کاغذ TLC اسپری کنید. بعد کاغذ را بوسیله ششوار یا حرارت هیتر خشک کرده و لکه های ظاهر شده را بررسی نمایید.

سوالات

- ۱) وزن عصاره خالص حاصل از ترنجبین چقدر می باشد؟
- ۲) لکه های ظاهر شده بر روی کاغذ TLC را تفسیر نمایید.
- ۳) قندهای موجود در ترنجبین و درصدهای آن ها را بنویسید.

تعیین مقدار خاکستر

مقدمه

این آزمایش برای شناسایی مواد معدنی غیرفراری انجام می گیرد که یا به عنوان ناخالصی و یا به صورت تقلبات موجود می باشد. هر داروی گیاهی حتی در خالص ترین حد ممکن می تواند به علت وجود طبیعی مقداری از مواد معدنی (پکتینات، اکسالات کلسیم، نمک های فلزات) بعد از سوزاندن دارای باقیمانده باشد، که تحت عنوان خاکستر فیزیولوژیک یا خاکستر عادی و یا بطور خلاصه خاکستر نامیده می شود. بنابراین میزان خاکستر تام نشان دهنده میزان املاح موجود در نمونه گیاهی می باشد.

همچنین در این آزمایش نیاز به استفاده از وسیله ای به نام دسیکاتور را دارید. دسیکاتور ظرف شیشه ای درپوش داری است که برای نگهداری اشیاء در فضای خشک استفاده می شود. بنابراین بوته های چینی یا کروزه ها را پس از انتقال از کوره و همچنین مواد خشک شده در اون را برای سرد کردن و جلوگیری از جذب رطوبت در دسیکاتور نگهداری می کنند.

روش کار

الف) تعیین درصد خاکستر تام:

یک کروزه چینی کاملاً تمیز را حدود ۱۵ دقیقه در کوره الکتریکی قرار دهید تا ایجاد خاکستر سفید کلسیفیه شود و پس از اینکه در دسیکاتور سرد شد، وزن نموده و سپس مقدار ۲ گرم پودر میوه گیاه گشنیز را دقیقاً وزن کرده و به طور یکنواخت در سطح کروزه توزین شده پهن کنید و مجدد در کوره با حرارت ۶۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰-۶۰ دقیقه قرار دهید. پس از سرد شدن کروزه در دسیکاتور باید به دقت توزین گردد. اختلاف وزن کروزه خالی و کروزه حاوی خاکستر، میزان خاکستر تام را نشان می دهد.

وزن خاکستر (گرم)

$$\text{درصد خاکستر تام} = \frac{\text{وزن خاکستر (گرم)}}{\text{وزن پودر اولیه (گرم)}} \times 100$$

وزن پودر اولیه (گرم)

ب) تعیین درصد خاکستر نامحلول در اسید کلریدریک:

بدین منظور خاکستر تام بدست آمده از مرحله قبلی را با ۰/۳ سی سی آب و ۰/۲ سی سی اسید کلریدریک ۳۷٪ داخل یک بشر مخلوط کرده و روی بشر را با یک پلیت یا شیشه ساعت بپوشانید. سپس مخلوط را روی هیتز قرار دهید تا بجوشد و بعد آن را در دمای محیط سرد کنید. در مرحله بعد باقیمانده را به کمک کاغذ صافی Ashless صاف نموده و دو بار با آب جوش شستشو دهید تا حاصل صافی خنثی گردد. در نهایت باقیمانده را خشک نمایید به طوریکه کاغذ صافی را در یک کروزه وزن شده گذاشته، در کوره قرار دهید تا کلسیفیه شود. بعد آن را در دسیکاتور قرار دهید تا سرد شود و سپس آن را توزین نمایید.

مقدار خاکستر نامحلول در اسید(گرم)

= درصد خاکستر نامحلول در

اسید

مقدار پودر اولیه نمونه گیاهی(گرم)

سؤالات

میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و خاکستر محلول در اسید نمونه خود را گزارش نمایید

تعیین مقدار ضریب تورم

مقدمه

ضریب تورم عبارت است از حجم اشغال شده (به میلی لیتر) توسط یک گرم از ماده ی گیاهی متورم شده در شرایط مخصوص . این تعیین مقدار براساس افزودن آب به یک ماده گیاهی (گیاه تام یا خرد شده) می باشد که درمورد مواد خرد یا پودر شده، برای اینکه کاملاً با آب مخلوط و در آن بخوبی پخش و پراکنده شوند نیاز به تکان دادن شدید است.

دانه گیاه اسفرزه یا بارهنگ کتان (*Plantago psyllium*) دارای اسید گالیک و اسید تانیک و گلیکوزیدی به نام اوکوبین (Aucobine) و مقدار فراوانی لعاب است و هم پوست و هم دانه آن به هنگام خیس کردن در آب درحد بالایی ژلاتینی می شوند و با جذب آب درون روده بزرگ حجم مدفوع را زیاد و سبب تسهیل باز شدن مجرای آن می شوند.

گیاه دیگری که دارای دانه های لعاب داری می باشد از جنس قدومه (*Alyssum*) بوده که در طب گذشته از آن به عنوان خلط آور و ضد التهاب استفاده می شده است. مصرف زیاد آن ممکن است به طور موقتی باعث نفخ و بزرگی شکم شود و حتی خطر انسداد روده هم وجود دارد.

روش کار

یک گرم اسفرزه و یک گرم قدومه را وزن کرده و هر کدام را در یک استوانه مدرج ۲۵ ml منتقل کنید و به هریک از استوانه ها ۲۵ml آب مقطر اضافه کنید ومخلوط را هر ۱۰ دقیقه یکبار تا یک ساعت تکان دهید. سپس مهلت دهید تا نهایتاً ثابت و بی حرکت بمانند. ابعاد استوانه مدرج بویژه قطر داخلی (حدود ۱۶mm) و قسمت درجه بندی شده (از ۰ تا ۲۵ ml روی آن مدرج و تا ۰/۲ml قابل اندازه گیری باشد) باید مشخص و درنظر گرفته شود. درآخر حجم اشغال شده توسط مواد گیاهی را به میلی لیتر اندازه بگیرید.

سوالات

- ضریب تورم دانه های اسفرزه و قدومه را گزارش دهید.
- میزان تکان دادن استوانه مدرج و نیز میزان درجه حرارت چه تاثیری بر جواب آزمایش خواهد داشت ؟ با دلیل ذکر نمایید.