دانشگاه علوم پزشکی همدان

دانشکده داروسازی

گروه فارماکوگنوزی

راهنمای آزمایشگاه فارماکوگنوزی ۲

جلسه	سرفصل مطالب فارماکوگنوزی ۲ عملی
۱	استخراج و شناسایی ترکیبات تری ترپنوئیدی (ساپونین ها)
۲	استخراج و شناسایی ترکیبات تری ترپنوئیدی (استرول ها)
۳	استخراج و جداسازی تتراترپنوئید (کاروتنوئیدها)
۴	استخراج و جداسازی تتراترپنوئید (کاروتنوئیدها)
۵	استخراج اسانس
۶	شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس
۷	استخراج و شناسایی آلکالوئیدها
۸	استخراج و شناسایی آلکالوئیدها
۹	استخراج و تعیین مقدار کافئین
۱۰	استخراج و تعیین مقدار کافئین
۱۱	استخراج و شناسایی قند دزاکسی (کاردنولید گلیکوزید)
۱۲	تعیین مقدار آب و رطوبت در بافت های گیاهی

استخراج و شناسایی گلیکوزید قلبی (کاردنولید گلیکوزید)

مقدمه

به طور کلی استروئیدهای متعددی در گیاهان یافت می شوند که دارای اثر بارز بر روی عضله قلب می باشند و به همین دلیل 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

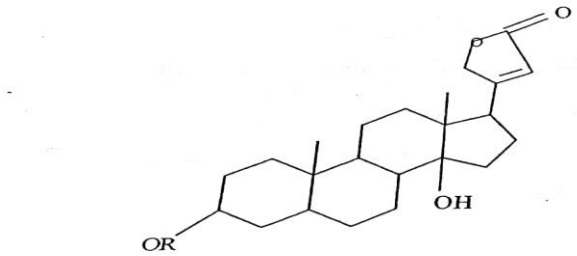
۲- حلقه لاکتونی آلفا و بتا اشباع نشده (پنج یا شش عنصری) در C17

۳- عامل هیدروکسیل بتا در C14

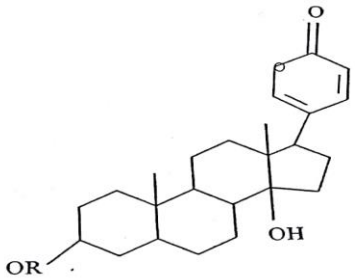
۴- اتصال حلقه های Cو D به فرم سیس

۵- یک یا چند قند در C3 در ساختمانشان می باشند.

آگلیکون استروئیدی این دسته از مواد به دو دسته تقسیم می شوند: کاردنولیدها و بوفادینولیدها.



Cardenolide



Bufadienolide

دسته کاردنولیدها در طبیعت فراوانتر بوده و جز استروئیدهای ۲۳ کربنه هستند و دارای حلقه لاکتونی پنج عنصری اشباع نشده (گاما- لاکتون) می باشند.

روش کار

ابتدا ۳ گرم برگ خشک شده گیاه خرزهره را خرد نموده و به داخل ارلن منتقل نمایید.

حدود ۳۰ سی سی ان- هگزان به آن اضافه و روی هیتر با حرارت کم گرما دهید.

محلول رویی را به داخل لوله آزمایش انتقال داده و به آن ۴ میلی لیتر معرف کلرورفریک بیافزایید و هم بزنید.

سپس لوله آزمایش را با زاویه ۴۵ درجه گرفته و با استفاده از یک پیپت پاستور ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ را ته لوله آزمایش حاوی محلول بریزید تا ۲ لایه کاملاً متمایز تشکیل گردد.

از تکان دادن لوله خودداری نمایید.

در حد فاصل ۲ لایه، حلقه رنگی تولید شده (قرمز ارغوانی) نشانه ی وجود قند دزاکسی می باشد.

پس از پایان آزمایش محتوی لوله آزمایش را در ظرف ضایعات خالی نمایید.

سؤالات

آلکالوئیدها

مقدمه

آلکالوئیدها ترکیبات آلی ازت داری هستند که در گیاهان معمولاً به صورت نمک یافت می شوند. آلکالوئیدها به علت دارا بودن عامل آمین اغلب دارای خاصیت بازی هستند و ازت آن ها بیشتر در حلقه قرار گرفته به غیر از برخی ترکیبات مانند افدرین و کلشی سین که مستثنی می باشند. آلکالوئیدها اغلب در آب غیرمحلول یا کم محلول بوده و با اسیدها تولید املاح محلول در آب می نمایند. آلکالوئیدهای آزاد به صورت باز در اتر و کلروفرم محلولند ولی املاح آن ها در این حلال ها غیر محلولند و اینگونه آلکالوئیدها را می توان جدا، خالص و تعیین مقدار نمود. همچنین مواد طبیعی که همراه آن ها مشاهده می شوند، اکثراً اسیدهای گیاهی (مانند اسید اگزالیک و مالیک) و تانن ها می باشد که اختصاصاً جهت شناسایی آلکالوئیدها این مواد بایستی از قبل جدا گردند. جهت استخراج آلکالوئیدها معمولاً از اسید رقیق و الکل استفاده شده و بعد از صاف نمودن آنها را به صورت نمک از عصاره ها به دست می آورند. این ترکیبات در اثر قلیایی کردن عصاره ها به کمک قلیایی کننده هایی مثل آمونیاک به صورت باز آزاد در آمده و توسط حلال های آلی قابل استخراج و از سایر مواد محلول در آب جداسازی می شوند. برای شناسایی آلکالوئیدها از معرف هایی استفاده می شود که با آن ها 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 می باشند. در این آزمایش از دانه های گیاه اسپند (*Peganum harmala*) استفاده می شود.

روش کار

۲ گرم اسپند آسیاب شده را وزن نموده و سپس در داخل ارلن ریخته و ۵۰ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک (HCL) ۱۰ درصد به آن افزوده و روی هیتر قرار دهید تا به جوش برسد و قبل از جوشیدن و سرریز شدن از روی حرارت بر می داریم. طی این مرحله آلکالوئیدها در محلول اسیدی به شکل ملح هیدروکلراید در می آیند و خصلت قطبی می گیرند و وارد محلول پلار اسیدی می شوند. اگر در طی حرارت حجم حلال از پنجاه کمتر شد با آب مقطر دوباره به حجم می رسانیم.

آن را در یک بشر با کاغذ صافی صاف نموده و در زیر هود با افزودن چندین سی سی آمونیاک به آن و چک کردن PH آن با کاغذ تورنسل، محلول را قلیایی کنید. این کار موجب می شود که آلکالوئیدها بشکل آزاد و غیریونیزه درآیند.

سپس محلول را در قیف دکانتور ریخته و به مقدار مساوی با حجم آن کلروفرم (دو بار هر بار ۱۵ میلی لیتر) به آن بیافزایید و به آرامی تکان دهید. کلروفرم یک حلال غیر قطبی است و در نتیجه باز آزاد (آلکالوئید) به داخل این حلال وارد می شود.

بعد از مدتی که دکانتور ثابت ماند و دو فاز از هم جدا شدند، فاز زیرین را جدا کرده و در یک ارلن جمع آوری نمایید و با روتاری آن را تغلیظ کنید.

از نمونه استخراج و جداسازی شده، TLC تهیه کنید و لکه های حاصل را با کمک کابینت UV و یا با اسپری معرف دراژنـدرف (K Bi I4) ظاهر نمایید. حلال تانک را کلروفرم و متانول با نسبت ۵۰ به ۵۰ انتخاب نمایید.

نحوه ساخت معرف شناسایی آلکالوئیدها (دراژندرف):

۱/۷گرم بیسموت ساب نیترات + ۲۰ سی سی اسید استیک + ۸۰ سی سی آب + ۱۰۰ سی سی محلول یدید پتاسیم ۵۰٪ = stock solution

۱۰ سی سی stock solution + ۲۰ سی سی اسید استیک ← در بالن ژوژه با آب به حجم ۱۰۰ برسانید.

فرمول های لازم جهت ساخت HCL۱۰٪ مورد نیاز از HCL۳۶.۵٪ موجود:

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

نرمالیته $N = \frac{10ad}{E}$

$E = \frac{M}{n}$, $c_m = \frac{N}{n}$

www.4800.blogfa.com

N1V1=N2V2

سؤالات

- ظهور لکه ها را گزارش نمایید.
- معرف دراژندرف با چه واکنشی لکه ها را ظاهر می سازد؟

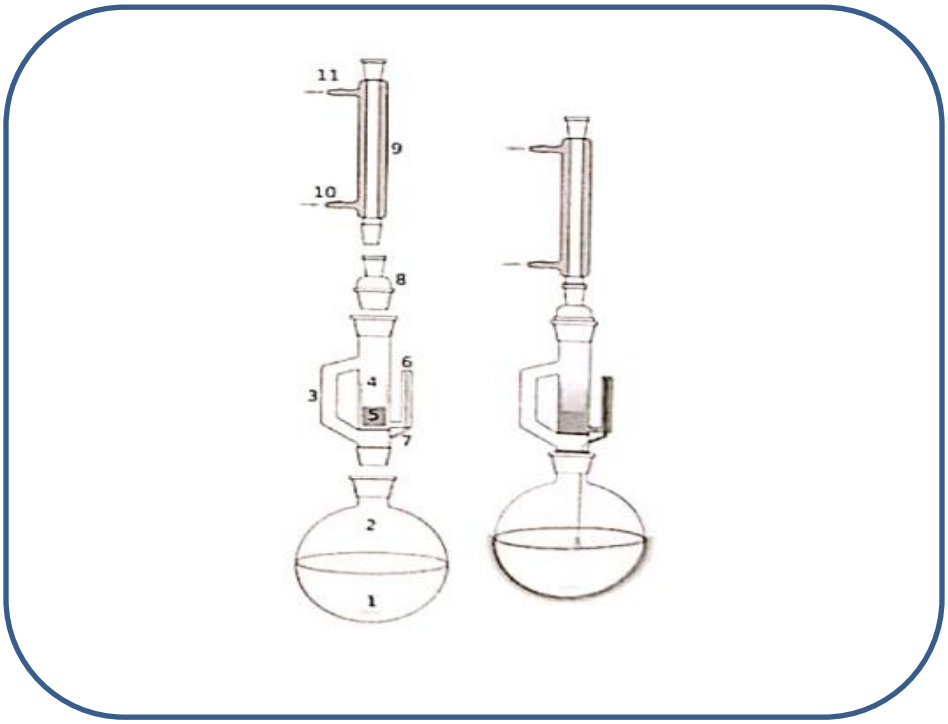
استخراج و تعیین مقدار کافئین

مقدمه

کافئین (۱و۳و۷ تری متیل گزانتین)، آلکالوئیدی با ساختار پورینی (متیل گزانتینی) است. کافئین خواب آور (در دوز بالا)، آرام بخش، ضد درد و تشدید کننده اثرات آدرنالین در ورزشکاران و افزایش قدرت جسمانی است. در دانه های گیاه قهوه (*Cafea Arabica*) یک تا دو درصد کافئین وجود دارد.

در این آزمایش از دستگاه سوکسله به منظور عصاره گیری از قهوه و استخراج آلکالوئید آن استفاده می شود . جهت استفاده از آن نمونه در مخزن سوکسله ریخته می شود و یک حلال (۱) مورد نظر در بالن (۲) ریخته می شود که در اثر حرارت حلال بخار شده و روی نمونه (۵) ریخته می شود. این چرخه وقتی که مخزن سوکسله (۴) پر شد از طریق سیفون نازک شیشه ای (۶و۷) دوباره به بالن بر می گردد و به این ترتیب این چرخه انجام می شود.

مزیت این سیستم این است که به جای استفاده از مقدار زیادی حلال، همان حلالی که از داخل نمونه عبور کرده دوباره بازیافت می شود. پس از استخراج حلال با استفاده دستگاه روتاری حذف می شود و حاصل کار، ترکیب موردنظر است. بخش غیر محلول از ماده موردنظر(مثلاً قهوه در این آزمایش) ، داخل مخزن باقی می ماند که معمولاً دور ریخته می شود.



روش کار

مقدار ۵ گرم قهوه را در یک بشر ۵۰ سی سی ریخته و ۵ سی سی اتر و ۱ سی سی آمونیاک به آن بیافزایید و بوسیله همزن شیشه ای آن را به خوبی مخلوط کنید .

سپس مخلوط حاصله را درون یک کاغذ صافی که به شکل یک لوله ته بسته دآورده شده است، بریزید. دقت نمایید قطر این لوله کاغذی باید طوری باشد که به راحتی وارد مخزن لوله ای شکل سوکسله شود و هم چنین ذرات قهوه از داخل کاغذ خارج نشود.

بالن ها را ابتدا به طور دقیق وزن کنید و سپس داخل بالن ۱۰۰ سی سی کلروفرم ریخته و آن را به گیره ببندید و روی شوف بالن قرار دهید.

سوکسله را روی بالن سوار کرده و بعد از گذاشتن کاغذ صافی حاوی قهوه در داخل مخزن سوکسله مقداری کلروفرم نیز روی آن بریزید.

سپس مبرد را همراه با شیلنگ های ورودی و خروجی آب بر روی سوکسله سوار کنید.

اتصالات سمباده ای را قبل از بستن سیستم به مقدار خیلی کم چرب کنید تا در پایان کار برای جدا کردن اتصالات به مشکل برخورد نکنید.

شیر آب را باز کنید تا آب درون مبرد جریان یابد، باید در تمام طول انجام آزمایش آب درون مبرد جریان داشته باشد درغیر این صورت بخارات محلول از سیستم خارج می شود.

توجه داشته باشید که دستگاهی که نصب کرده اید کاملاً عمودی باشد تا قطره های حلال روی مواد درون کاغذ بریزد.

در پایان عصاره گیری اجازه می دهیم سیستم کمی خنک شود و همه بخارات در مبرد سرد شده و به فاز مایع وارد شوند.

ابتدا مبرد را بردارید و سپس سوکسله را جدا نمایید و در مرحله آخر بالن را از گیره جدا کنید.

اگر مقداری محلول درون سوکسله مانده آن را به آرامی داخل بالن بریزید.

محلول داخل بالن را به وسیله روتاری تغلیظ و خشک نمایید و به ماده خشک شده ته بالن حدود ۱۰ سی سی اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال اضافه کنید و چند لحظه آن را به حال خود گذاشته و سپس مقدار ۱۰ سی سی آب مقطر بدان بیافزایید.

آن را درحالی که گرم است صاف نمایید و محلول صاف شده را پس از سرد شدن با کمی سود نرمال (هر گروه تقریباً ۳ سی سی) قلیایی نمایید (با کاغذ تورنسل چک نمایید).

بعد محلول قلیایی شده را داخل قیف دکانتور بریزید و هم حجم آن کلروفرم بیافزایید و پس از تکان دادن فاز زیرین را جدا نموده و تغلیظ و خشک کنید.

پس از این که کاملاً خشک شد وزن نموده و مقدار کافئین استخراج شده را محاسبه کنید.

سؤالات

۱- درصد مقدار کافئین موجود در قهوه را محاسبه نمایید.

۲- دلیل افزودن اسید سولفوریک و سود را بنویسید.

۳- روش های شناسایی کافئین (تکنیک های طیف سنجی و رنگ سنجی) را بنویسید.

استخراج اسانس رازیانه و

شناسایی اجزاء تشکیل دهنده آن

مقدمه

اسانس ها ترکیبات معطری هستند که در بخش های مختلف گیاهان وجود دارند و چون در دمای محیط و مجاورت با هوای آزاد تبخیر می شوند، لذا آنها را Volatile oils و یا Essential oils نیز می نامند. اکثر ترکیبات موجود در اسانس از نظر بیوسنتزی جزء ترپنوئیدها می باشند و گروه کوچکی از آن ها جزء ترکیبات آروماتیک (فنیل پروپن ها) قرار دارند و بطور کلی می توان گفت این گروه از ترکیبات طبیعی مخلوطی از هیدروکربن ها و مشتقات اکسیژنه آن ها (الکل ها، کتون ها، آلدئیدها، اترها، اکسیدها و ...) می باشند. اسانس ها از نظر اجزاء تشکیل دهنده بسیار متفاوتند ولی دارای خواص فیزیکی مشترک می باشند، مانند بوی مشخص، ضریب شکست، فعالیت نوری، عدم امتزاج با آب اما محلول در اکثر حلال های آلی.

استخراج اسانس به روش های مختلفی صورت می گیرد اما معمولی ترین روش تهیه اسانس روش تقطیر (distillation) می باشد .

تقطیر اسانس به دو روش با آب (hydrodistillation) و با بخار (steam distillation) سال ها مورد استفاده می باشد. در سطح آزمایشگاهی برای استخراج اسانس های سبک تر از آب از دستگاهی به نام کلونجر و در مورد اسانس هایی که از آب سنگین ترند از دین استارک برای اسانس گیری استفاده می شود. اسانس ها در مجاورت با نور و اکسیژن اکسیده و تیره می شوند، لذا باید آنها را پس از استخراج در شیشه های تیره درب دار و در محلی تاریک و خنک نگهداری نمود.

روش کار

ابتدا ۵۰ گرم میوه رازیانه (Foeniculum vulgare) را پودر کنید و داخل یک بالون ریخته و به مقدار ۲/۳ حجم بالن ، آب مقطر به آن بافزایید.

بالن را داخل شوف بالن قرار داده و به دستگاه کلونجر متصل نمایید.

شیر آب را به مقدار کم باز نموده و شوف بالن را ابتدا روی درجه ماکزیمم قرار دهید.

زمانی که آب به جوش آمد و همراه با اسانس شروع به تبخیر کرد، درجه حرارت شوف بالن را کم کنید.

حدود ۴-۳ ساعت زمان می برد تا اسانس گیری کامل گردد.

حاصل تقطیر بدست آمده مخلوطی از آب و اسانس است که معمولا به صورت دو لایه مجزا جمع آوری می شود. از آنجایی که آب سنگین تراست ، در پایین قرار می گیرد و اسانس روی آن جمع می شود. درپایان شیر کلونجر را باز کرده تا آب خارج شود و بعد

اسانس را در ویالی جمع آوری نمایید. دقت کنید تاجاییکه ممکن است آب کمتری وارد اسانس شود که دراین صورت باید از سولفات سدیم برای حذف آب استفاده کنید.

شناسایی کیفی مقدماتی:

اگرچه امروز GC بطور گسترده ای در آنالیز ترکیبات اسانسی به کار می رود اما استفاده از روش TLC به منظور شناسایی اولیه ترکیبات موجود در اسانس و یا بررسی مقدماتی مواد اسانسی (مثلا در فارماکوپه ها برای ارزیابی کیفیت و خلوص اسانس ها)، کارایی خوب و قابل توجهی را نشان می دهد. همچنین روش TLC تکنیک ارزان و سریعی است که نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد.

آنتول ترکیبی با ساختار شبه دوپامینی است که در رازیانه به میزان زیادی وجود دارد. بنابراین از محلول رقیق شده اسانس بدست آمده از رازیانه (۱ml اسانس را با ۹ml ان-هگزان رقیق نمایید) و از استاندارد آنتول موجود در آزمایشگاه بوسیله لوله موئینه نازک شده، بر روی کاغذ TLC نقطه گزاری کنید.

سپس کاغذ را در داخل تانک با فاز متحرک (۹۳٪ تولوئن و ۷٪ اتیل استات) قرار دهید و ردیابی لکه ها را به سه روش زیر می توانید مورد بررسی قرار دهید:

- استفاده از نور UV با طول موج ۲۵۴nm
- اسپری معرف انیس آلدهید و سپس حرارت دادن آن
- اسپری معرف وانیلین در اسیدسولفوریک و سپس حرارت دادن آن

شناسایی کیفی و کمی:

به منظور جداسازی بهتر و در ادامه شناسایی کیفی و کمی دقیق تر ترکیبات موجود در اسانس از روش GC استفاده می‌شود که متعاقبا با کمک کروماتوگرام حاصل از GC و نمونه های استاندارد، بعضی از مواد موجود دراسانس (مانند آنتول) تعیین مقدار می-گردند.

سؤالات

۱- حجم اسانس و هیدرولا حاصل از استخراج چقدر می باشد؟

۲- مشاهدات خود را پس از جداسازی اجزاء و ظهور لکه ها بنویسید.

۳- طیف گاز کروماتوگرافی مربوط به اسانس استخراج شده را بررسی و تفسیر مربوطه را ضمیمه گزارش کار کنید.

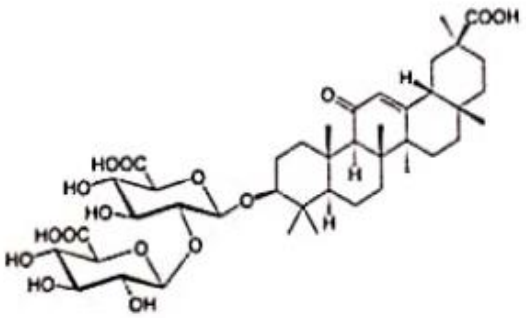
شناسایی ترکیبات تری ترپنوئیدی

(ساپونین ها و استرول ها)

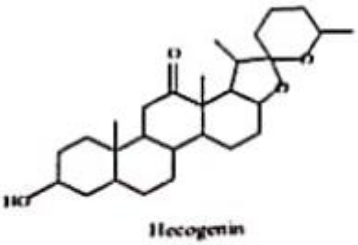
مقدمه

تری ترپنوئیدها ترکیباتی طبیعی هستند که از نظر بیوسنتزی از یک هیدروکربنی خطی ۳۰ کربنه (C30) به نام اسکوالن (Squalene) تشکیل می گردند. ساختمان کربنی این مواد دارای شش واحد ایزوپرن بوده و ساختاری حلقوی و پیچیده دارند که اکثراً دارای عوامل الکلی، آلدهیدی و یا کربوکسیل می باشند. **ساپونین ها و استرول ها** دو گروه از دسته تری ترپنوئیدی می باشند.

ساپونین ها (saponin): معمولاً به عنوان گلیکوزیدهای متصل به aglycone شبه استروئیدی هیدروفوب شناخته شده اند و دارای خواص تولیدکنندگی کف صابونی هستند که به دو گروه ساپونین های استروئیدی و ساپونین های پنج حلقه ای تری ترپنی دسته بندی می شوند. گروه اول بیشتر در گیاهان تک لپه پیدا شده اند و اهمیت زیادی در صنعت داروسازی دارند زیرا با ترکیباتی از قبیل هورمون های جنسی، کورتیزون، استروئیدهای دارویی، ویتامین دی و گلیکوزیدهای قلبی ارتباط دارند. ساپونین های پنتا سیکلیک نیز بیشتر در دولپه ای ها یافت می شوند. از منابع ساپونین ها می توان به ریشه گیاه جینسینگ (جنس Panax)، سویا و نیز ریشه گیاه شیرین بیان اشاره کرد.



یک ترکیب ساپونین پنتاسیکلیک
در گیاه شیرین بیان



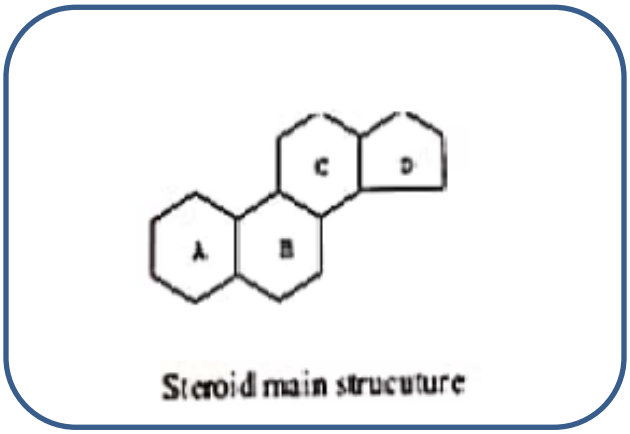
یک ترکیب ساپونین استروئیدی
در گیاه آگاو

ساپونین ها در سیستم دفاعی گیاهان، در برابر حملات مهاجمین نقش دارند. بسیاری از آنها داری چندین اثر مضر روی حیوانات مهاجم و رشد قارچ ها و باکتری ها دارند. همچنین ساپونین ها چند ویژگی اختصاصی را دارا می باشند که بدین وسیله می توان وجود این ترکیبات را در بخش های مختلف گیاهی بررسی نمود.

از جمله این ویژگی ها عبارتند از:

- ساپونین ها دارای واکنش رنگی اختصاصی به نام واکنش لیبرمن- بورشارد می باشند (با افزودن انیدرید استیک – اسید سولفوریک غلیظ که سبب ایجاد رنگ آبی – سبز با اکثر تری ترپن ها و استرول ها می گردد)
- ساپونین ها در محلول آبکی در اثر تکان دادن تولید کف ثابتی می نمایند که حداقل به مدت ۳۰ دقیقه پایدار است.
- ساپونین ها قادر به همولیز نمودن گلبول های قرمز خون می باشند.
- ساپونین ها برای حیوانات خونسرد مانند ماهی و حلزون سمی بوده و باعث از بین رفتن آنها می شوند.

استروئیدها یا استرول ها :دسته ترکیبات دیگری از تری ترپن ها بوده که دارای ساختار سیکلوپنتانوپر هیدروفنانترن (چهارحلقه ای) می باشند.



Steroid main structure

تعدادی از استرول ها را می توان از بافت های گیاهی جدا نمود. به عنوان مثال سه فیتوسترول شناخته شده و موجود در اکثر گیاهان عالی عبارتند از: سیتوسترول، استیگماسترول و کمپسترول. این استرول ها هم به صورت آزاد و هم به شکل گلیکوزید وجود داشته و بیشتر در تیره های گیاهان تک لپه یافت شده اند.

این ترکیبات گیاهی از نظر اقتصادی حائز اهمیت زیادی هستند چرا که از آن ها به عنوان ماده پیش ساز در تهیه کورتیزون و بسیاری از هورمون های استروئیدی استفاده می گردد. به طوری که در گذشته منشأ استرول ها را فقط منابع حیوانی می دانستند و از هورمون های غدد فوق کلیوی و یا از اسیدهای صفراوی استفاده می کردند که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبوده است.

روش کار

الف) شناسایی ساپونین ها:

از ریشه گیاه چوبک (جنس *Acanthophyllum*) به علت وجود مقدار زیادی ماده ساپونین و در نتیجه خاصیت کف کنندگی آن در قدیم به عنوان ماده شوینده استفاده می شده است.

ابتدا حدود ۱ گرم از پودر این گیاه را در استوانه ی مدرج ۵۰ سی سی ریخته و حدود ۱۰ سی سی آب مقطر جوش آمده به آن اضافه کنید. سپس آن را به شدت به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید و طی ۳۰ دقیقه بعد کف حاصل از آن را ملاحظه نمایید.

ب) شناسایی تری ترپن ها و استرول های اشباع نشده :

حدود ۱۰ گرم سویا خرد شده را داخل ارلن ریخته و ۴۰ سی سی متانول به آن افزوده و پس از پوشاندن سر ارلن با فویل سوراخ دار، آن را بر روی هیتر قرار دهید تا بجوشد و حجم آن تقریباً نصف گردد. سپس عصاره حاصل را صاف کنید و محلول صاف شده را در دو لوله آزمایش تقسیم کنید.

لوله آزمایش شماره ۱: جهت انجام آزمایش لیبرمن – بورشارد

در این تست ۵-۳ قطره انیدرید استیک به لوله ۱ بیافزایید و آهسته تکان دهید تا مخلوط گردد. سپس ۲ تا ۳ سی سی اسید سولفوریک غلیظ به محلول اضافه شود و به آهستگی مخلوط نمایید. پس از مخلوط نمودن تغییرات تدریجی رنگ را در طی ۵ دقیقه مشاهده نمائید و لذا رنگی زرشکی ایجاد می شود.

لوله آزمایش شماره ۲: جهت انجام آزمایش سالکوفسکی (شناسایی استرول های اشباع نشده)

به منظور انجام این تست لوله آزمایش را با زاویه ۴۵ درجه در دست گرفته و بوسیله پیپت پاستور مقدار ۳-۲ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ را از جدار لوله آزمایش به آن اضافه کنید. تغییر رنگ محلول را از زمان افزودن اسید تا چند دقیقه بعد ملاحظه نماییدو یک محلول دو فازی ایجاد می شود.

سؤالات

۱- برای حذف کف پایدار ساپونین چه روشی پیشنهاد می دهید؟

۲- در مرحله استخراج ترکیبات تری ترپنی از سویا، حلال جایگزین پیشنهاد دهید.

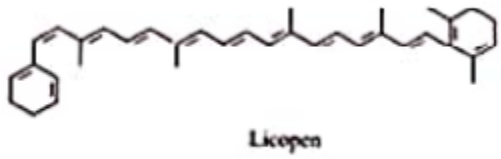
استخراج و جداسازی تتراترپنوئید

(کاروتنوئیدها)

مقدمه

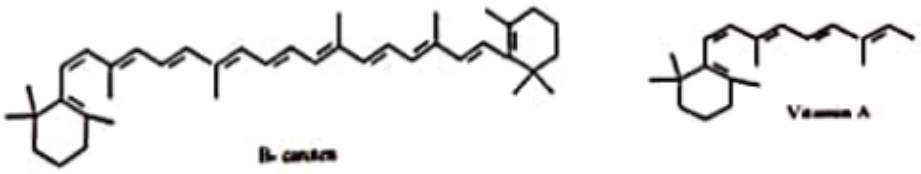
کاروتنوئیدها از فراوانترین رنگدانه های محلول در چربی در انواع گیاهان بوده و ساختار تتراترپنوئیدی (C40) دارند و به علت وفور پیوندهای مزدوج در این ترکیبات، نسبت به اکسیداسیون فتوشیمیایی هوا بسیار حساس می باشند. بتا کاروتن و لیکوپن از شناخته شده ترین کاروتنوئیدها می باشند.

ساختار لیکوپن از هشت واحد ایزوپرن ساخته شده است به طوری که یک سیستم کاملاً مزدوج با باندهای دوگانه دارد و به علت کروموفور بودن دارای رنگ شدیدی می باشد. لیکوپن به عنوان رنگ غذایی استفاده می شود و مسئول ایجاد رنگ قرمز در گوجه فرنگی و میوه جات دیگر است.



Licopen

ساختار بتا کاروتن دارای چهار ایزومر است که تفاوتشان در طرز تشکیل حلقه و موقعیت باندهای دوگانه می باشد. بتاکاروتن مسئول ایجاد رنگ زرد در هویج و سایر میوه جات می باشد و در برگ سبز گیاهان و گلها همراه با کلروفیل و گزانتوفیل و نیز در چربی شیر و کره موجود می باشد. بتاکاروتن در ساخت ویتامین A به کار می رود.



β-carotene

Vitamin A

روش کار

الف) استخراج لیکوپن و بتاکاروتن

۵ گرم رب گوجه فرنگی را داخل بالن ریخته و حدود ۲۰ میلی لیتر استون به آن اضافه نموده و سپس آن را به سیستم رفلاکس متصل نمایید.

بعد از حدود ۱۰ دقیقه رفلاکس، مخلوط حاصل را صاف کنید و عصاره را در یک ظرف (بشر یا ارلن) جمع آوری کنید و مواد جامد روی کاغذ صافی را مجدداً به بالن منتقل نمایید و عمل استخراج را دوباره با استون تکرار کنید.

مواد جامد باقیمانده را دوبار دیگر و هر بار با ۲۰ میلی لیتر ان- هگزان رفلاکس کنید تا استخراج کامل صورت گیرد.

مجموع حاصل استخراج را به یک قیف دکانتور ۲۵۰ منتقل کنید و حجمی تقریباً مساوی با حجم عصاره استخراج شده، محلول اشباع کلرید سدیم به آن اضافه نموده و تکان دهید.

فاز آبی را جدا نموده و دور بریزید و فاز آلی را مجدداً با آب مقطر شستشو دهید. در آخر فاز آلی را جداسازی نموده و با کمک سولفات سدیم انیدر خشک کرده و سپس داخل کریستالیزور بریزید و بگذارید تا خشک گردد.

حال می بایست لیکوپن و بتاکاروتن استخراج شده را به کمک کروماتوگرافی ستونی خالص سازی نمایید.

ب) روش تهیه ستون و نحوه جداسازی لیکوپن و بتاکاروتن از یکدیگر

یک ستون به طول تقریبی ۳۰ سانتی متر و قطر ۲ سانتی متر را برداشته و تقریباً دوسوم حجم آن را از حلال ان – هگزان پر کنید. در حالی که با یک وسیله (مثلاً مداد) به ستون می زنید به کمک یک قیف، حدود ۸۰ گرم از ماده جاذب اکسید آلومینیوم یا آلومین را داخل ستون بریزید و پیوسته ستون را تکان دهید تا ستون به طور یکنواخت پر گردد.

چنانچه مقداری از پودر آلومین به جدار داخلی ستون چسبید نیز می توانید با کمی حلال اضافه، آن را بشویید.

شیر ستون را باز نگه دارید و همزمان از بالای ستون آرام آرام حلال اضافه کنید.

سعی کنید سطح بالای ستون صاف شود و زمانیکه ارتفاع حلال قرار گرفته در روی سطح آلومین در حدود ۵ سانتی متر ثابت گردید، شیر ستون را ببندید. در این زمان ستون برای قرار دادن نمونه آماده است.

حاصل استخراج را که به صورت خشک فراهم کرده بودید، در حداقل مقدار هگزان حل نمایید و محلول حاصل را به کمک پیپت پاستور به طور صاف و یکنواخت روی ستون لود کنید. سپس برای جداسازی از حلال مناسب (۱۰درصد استون و ۹۰ درصد هگزان) به عنوان فاز متحرک استفاده نمایید. ابتدا لایه نارنجی رنگ (لیکوپن) جدا می گردد که پس از آن برای خارج نمودن لایه زرد رنگ(کاروتن) بهتر است از فاز متحرک مناسب تر (۵۰ درصد استون و ۵۰درصد هگزان) استفاده شود. با تغییر قطبیت حلال همه اجزا در داخل ستون با هم حرکت نمی کنند و فرصت عبور لایه ها به ترتیب و با سرعت مناسب فراهم می گردد. بنابراین

بدین روش جداسازی فازهای رنگی صورت گرفته و هر فاز را در داخل یک کریستالیزور ریخته و اجازه دهید حلال آن تبخیر گردد. توجه کنید که محلول حاصل را دور از نور نگه دارید، زیرا کاروتنوئیدها رنگدانه های ناپایداری می باشند و خیلی سریع درگیر اکسیداسیون فتوشیمیایی خود به خود می شوند. البته در ضمن انجام کروماتوگرافی، بوسیله بخار حلال محافظت می شوند.

ج) بررسی لیکوپن و بتاکاروتن توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

ابتدا برای جداسازی باید تانک کروماتوگرافی تهیه کنید. حدود ۲-۳ میلی لیتر از حلال تانک را در داخل تانک ریخته و درب آن را بوسیله ی درپوش یا یک پلیت 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 درنتیجه زمان لازم برای پیشروی کاهش می یابد.

برای تانک حلالی مناسب است که لکه ها را بخوبی از هم جدا کند. بنابراین با توجه به قطبی بودن کاغذ TLC موجود در آزمایشگاه بهتر می باشد قطبیت حلال تانک را افزایش دهید بطوریکه نسبت ۵۰ به ۵۰ از استون و هگزان را انتخاب نمایید. حدود ۵ میلی متر بالاتر از لبه تحتانی کاغذ TLC بامداد کم رنگ خط کاملا افقی رسم کنید و از هر فرکشن جداسازی شده، مقدار بسیار کمی به اندازه ی یک نقطه به کمک لوله موئینه بسیار نازکی روی خط رسم شده 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 برروی کاغذ واقع گردد. بتدریج حلال به همراه اجزاء موجود در فرکشن ها به سمت بالای صفحه TLC حرکت می کند و وقتی قسمت اعظم صفحه را طی کرد، کاغذ TLC را از تانک خارج نموده تا حلال آن در هوا تبخیر گردد و سپس به روش زیر مورد بررسی قرار گیرد.

حال کاغذ را در کابینتUV با طول موج ۲۵۴ نانومتر نگاه کنید و لکه ها را بررسی نمایید. از آنجا که برخی مواد ممکن است جذب UV نداشته باشند پس از روش اسپری رنگ هم استفاده می کنیم تا همه لکه های جدا شده روی کاغذ را ببینیم. پس از اسپری معرف کاغذ را بوسیله سشوار یا حرارت هیتر خشک کرده و لکه های ظاهر شده را بررسی نمایید.

سؤالات

۱- علت استفاده از ۲ حلال مختلف در مرحله استخراج را توضیح دهید.

۲- فاز متحرک و فاز ساکن جایگزین در کروماتوگرافی ستونی را پشنهاد دهید.

تعیین مقدار آب و رطوبت موجود در بافت های گیاهی

مقدمه

۱) **تعیین مقدار آب به روش آزئوتروپی با گزیلن**

مقدار نمونه ای که جهت تعیین رطوبت به کار می رود باید به نحوی باشد که برای گیاهان خشک در حدود ۲۰ گرم و برای گیاهان تازه در حدود ۴-۵ گرم باشد که با این روش مقدار تقریبی ۳-۴ میلی متر آب اندازه گیری می شود.

روش کار

اگر گیاه دارویی به صورت ریزوم باشد باید به قطعات کوچک تقسیم و در آسیاب مخصوص زائد آنرا خرد نمود. سپس مقدار معینی از آن را بدقت وزن کنید(در مورد گیاه خشک برابر ۲۰ گرم و برای گیاه تازه حدود ۵ گرم) در اینجا از برگ تازه شمشاد استفاده می شود که در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۲۰۰ میلی لیتر گزیلن بدون آب می باشد، می ریزیم و دستگاه دین استارک (Dean Stark) را به آن وصل می نماییم. ابتدا محتوی بالن را به آهستگی تا حد جوش حرارت داده و سپس درجه حرارت را طوری تنظیم می کنیم که در هر ثانیه ۲ قطره آب تقطیر شود.پس از خارج شدن کامل آب موجود در بافت ها (عدم افزایش حجم آب) حرارت را قطع نموده و آخرین قطرات آب را به کمک لوله میله شیشه ای در قسمت جمع شونده لوله وارد نموده و مقدار آب حاصل را از روی درجات دستگاه دین استارک می خوانیم. اگر نتوانستید از روی درجات دستگاه مقدار آب را محاسبه نمائید می توان از یک مزور ۱۰ میلی لیتری برای تعیین میزان آب خارج شده از گیاه استفاده نمود.

۲) تعیین مقدار آب گیاه از طریق وزنی (کم شدن وزن ماده مورد آزمایش)

روش کار

در یک پلیت شیشه ای ۵ گرم برگ تازه را که بوسیله ترازوی حساس ، وزن نموده ریخته و سپس آن را در آون ۱۰۰ درجه بمدت چند ساعت قرار داده تا کاملاً خشک شود مقدار کامل رطوبت هنگامی بدست می آید که پس از چندین بار توزین کپسول چینی محتوی ماده مورد نظر، نقصان وزنی ملاحظه نگردد و سپس درصد مقدار رطوبت را محاسبه می نمائیم.

سؤال

۱- مقدار آب موجود در نمونه گیاه خود را به درصد با هر دو روش گزارش کنید.

با آرزوی سلامتی