اندازه‌گیری روغن در بذر

برای اندازه‌گیری روغن در بذر از روش وزنی استفاده شد. در این روش یک گرم بذر وزن می‌گردد و با ۱۸ میلی لیتر محلول ان- هگزان و ایزوپروپانول که به‌نسبت حجمی ۳: ۲ با هم مخلوط شده‌اند در یک هاون خرد شده و مخلوط به دست آمده توسط کاغذ صافی درون بشری که از قبل وزن شده بود، صاف گردید. سپس هاون و دسته هاون با ٦ میلی‌لیتر محلول ان- هگزان و ایزوپروپانول شستشو داده شده و مجددا صاف می‌گردد. محلول صاف شده پس از تبخیر ان-هگزان و ایزوپروپانول توزین می‌گردد. اختلاف وزن اولیه بشر (بشر خالی) و وزن ثانویه آن مقدار روغن موجود در یگ گرم بذر را نشان می‌دهد. در نهایت مقدار روغن بر حسب میلی‌گرم به‌ازای گرم وزن تر بافت محاسبه گردید.

نکته مهم: نظر به‌اینکه در این روش مقدار روغن برآورد شده برای این گیاهان کم بود بنابراین یک مرحله دیگر به روش بالا اضافه شد. بدین‌صورت که بعد از این که بذر در هاون با محلول ان هگزان- ایزوپروپانول خرد شدند مستقیما به لوله‌های پلی‌اتیلنی منتقل شدند و دیگر عمل صاف‌کردن صورت نگرفت. بعد این لوله‌ها با دور ۱۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد از سانتریفیوژ فاز بالایی به داخل بشر از قبل وزن شده ریخته شد و عمل تبخیر صورت گرفت و دوباره بشر وزن شد که اختلاف وزن درصد روغن می‌باشد.

نکته: در مواردی که در عصاره الکلی رنگیزه وجود دارد برای حذف رنگیزه از سولفات‌سدیم استفاده می‌شود. بدین‌صورت که ۲ گرم از این ماده در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌گردد. بعد از آن به‌ازای هر ۲٤ میلی‌لیتر عصاره الکلی ۱۲ میلی‌لیتر از این ماده اضافه می‌شود و در قیف جداکننده ریخته می‌شود. بعد در قیف محکم می‌شود و برای یک دقیقه تکان داده می‌شود. در حین کار سر قیف به‌طرف بالا نگهداشته می‌شود و آرام انتهای آن باز می‌شود تا گاز تشکیل شده خارج می‌شود این عمل چندین بار انجام می‌شود. بعد از یک دقیقه، سر قیف برداشته می‌شود. رنگیزه‌ها در انتهای قیف با سولفات‌سدیم ته‌نشین می‌گردد که با بازکردن دهانه قیف به‌آرامی از فاز الکلی جدا می‌گردد. ادامه کار مثل بالا است.

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول

استخراج قندهای محلول

استخراج قندهای محلول با استفاده از روش اوموکولو (۱۹۹٦) انجام شد. در این روش ٤۰ میلی‌گرم از بافت تر گیاهی با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن‌ماری) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌های الکلی به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول شفاف به‌دست آمده حاوی قندهای محلول به یک بشر منتقل شد و عمل فوق ٤ مرتبه دیگر بر روی بقایای بافتی به‌جا مانده تکرار گردید. در نهایت عصاره الکلی با حرارت تغلیظ شده و حجم آن به یک‌پنجم اولیه رسید. برای حذف کروفیل، عصاره به‌دست آمده به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط گردید و بعد از ورتکس کردن به‌مدت ۵ دقیقه به‌حال سکون رها شد. این عمل سبب جدا شدن کلروفیل از فاز آبی گردید. فاز آبی رویین به‌دست آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰۰ ساتریفیوژ شد. فاز شفاف بالایی جدا شده و از آن برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول استفاده شد.

نکته: برخی اوقات در هنگام تبخیر مقدار عصاره الکلی کمتر از ۵ میلی‌لیتر می‌شود (برای مثال ٤ میلی‌لیتر) در این هنگام می‌توان مقدار کم شده را با آب تکمیل کرد (یعنی یک میلی‌لیتر آب اضافه می‌شود) و اندازه‌گیری‌های بعدی بر روی این عصاره الکلی انجام می‌شود.

www.gologiah.ir

نکته: برخی اوقات در عصاره الکلی قندی رنگیزه وارد می‌شود که برای رنگ‌زدایی از پودر زغال استفاده می‌شود. بدین‌صورت که به‌ازای هر ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره قندی، ۲۰۰ میلی‌گرم پودر زغال اضافه می‌شود و در ٤٠٠٠g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود.

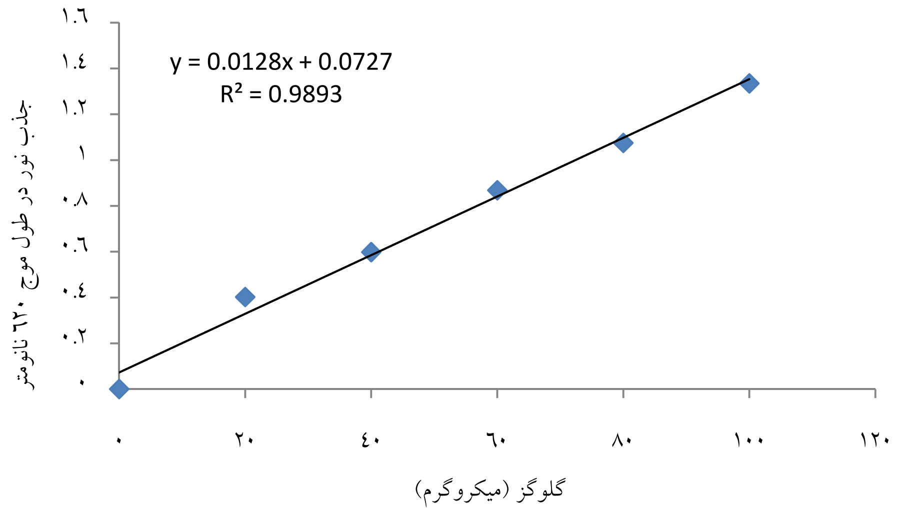
اندازه‌گیری قند کل

اندازه‌گیری قند کل به روش مک‌کریدی و همکاران (۱۹۵۰) انجام گردید. برای اندازه‌گیری قند کل ۰/۲ میلی‌لیتر (۲۰۰ میکرولیتر) از عصاره تغلیظ شده با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب نور هر یک از نمونه‌ها پس از سردشدن در طول موج ٦۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.
قبل از اندازه‌گیری قند کل نمونه، ابتدا باید منحنی استاندارد قند کل رسم گردد که برای رسم آن از محلول گلوگز ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب استفاده شد. لازم به ذکر است که برای آنکه دقت اندازه‌گیری بیشتر گردد، می‌توان ۵ میلی‌گرم گلوگز را با ۵ میلی‌لیتر آب مخلوط کرد و استفاده کرد. پس از تهیه محلول گلوگز، در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای مقادیر ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق که به‌ترتیب حاوی ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم گلوگز بود، اضافه گردید. در نهایت حجم محلول‌ها با آب مقطر به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد گلوگز بود به‌عنوان شاهد استفاده شد (بلانک). پس از آن ۳ میلی‌لیتر آنترون به هر کدام از لوله‌های آزمایش اضافه شد و پس از اضافه کردن، لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن در طول موج ٦۲۰ نانومتر قرائت گردید (جدول و شکل زیر).
نکته: برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف آنترون، ابتدا ۷٦ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد با ۳۰ میلی‌لیتر آب رقیق شد. بعد از سرد شدن ۱۵۰ میلی‌گرم آنترون در آن حل گردید و در ظرف کهربایی نگهداری شد.
نکته: لازم به ذکر است که اسید باید کم کم در آب ریخته شود و آب در اسید ریخته نشود زیرا احتمال خطر وجود دارد.

جدول۳-۱- طرز تهیه نمودار استاندارد قند کل به روش مک‌کریدی و همکاران (۱۹۵۰)

شماره لوله آزمایش	مقدار محلول گلوگز (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرو لیتر)	معرف آنترون (میلی لیتر)	جذب نور در طول موج ٦۲۰ نانومتر
۱	۰	۲۰۰	۳	۰
۲	۲۰	۱۸۰	۳	۰/٤۰۲
۳	٤۰	۱٦۰	۳	۰/۵۹۸
٤	٦۰	۱٤۰	۳	۰/۸٦۸
۵	۸۰	۱۲۰	۳	۱.۰۷۵
٦	۱۰۰	۱۰۰	۳	۱.۳۳۵

www.gologiah.ir



شکل ۳-۱- نمودار استاندارد گلوکز به روش مک‌کریدی و همکاران (۱۹۵۰)

نکته: لازم به ذکر است که وقتی نمونه اصلی پس از اعمال تیمار با اسپکتوفتومتر خوانده می‌شود عدد خوانده شده باید در رنج اعداد منحنی استاندارد باشد و اگر بالاتر از اعداد منحنی استاندارد بود باید به‌جای ۰/۲ میلی‌لیتر، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی برداشته شود و به آن ۰/۱ سی‌سی آب اضافه گردد و بعد مراحل بعدی ادامه پیدا کند.

اندازه‌گیری قندای احیایی

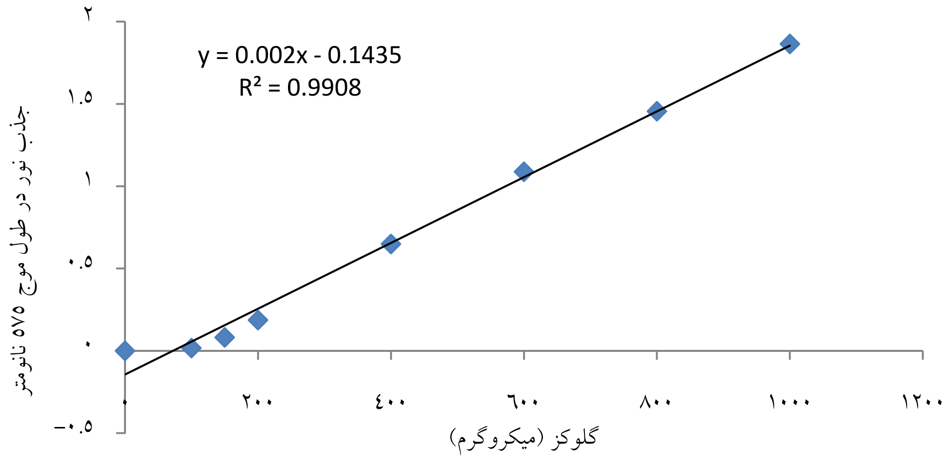
قندهای احیایی به روش میلر (۱۹۵۹) اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری قندهای احیایی ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تغلیظ شده حاوی قندهای محلول با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید مخلوط شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ٪۴۰ به آن افزوده و پس از سرد شدن لوله‌ها جذب نور آنها در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد.

برای تهیه منحنی استاندارد از محلول گلوگز با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. به هر یک از لوله‌های آزمایش، مقادیر ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول گوکز که به ترتیب حاوی ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم گلوکز بودند، اضافه گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش توسط آب مقطر به ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. لوله‌های آزمایشی که فاقد گلوکز بود، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از انجام مراحل ذکر شده در بالا میزان جذب نور در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از آن منحنی استاندارد رسم گردید (شکل ۲-۲).

نکته: برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید، ۱ گرم هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل کرده و سپس ۰/۰۵ گرم سولفیت سدیم (Na_2SO_3) به آن اضافه می‌گردد. در ظرف دیگری ۱ گرم دی‌نیترو سالیسیلیک اسید را با ۰/۲ گرم فنل در آب مقطر حل کرده و به محول اول اضافه می‌شود و با آب مقطر به جم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد.

جدول ۳-۲- طرز تهیه نمودار استاندارد قندهای احیایی به روش میلر (۱۹۵۹)

شماره لوله	گلوکز ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (میلی‌لیتر)	محلول ۴۰٪ پتاسیم سدیم تارتارات (میلی‌لیتر)	جذب نور در طول موج ۵۷۵ نانومتر
۱	۰	۱۵۰۰	۱/۵	۰/۵	۰
۲	۱۰۰	۱۴۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۰۱۷
۲	۱۵۰	۱۳۵۰	۱/۵	۰/۵	۰/۰۸۲
٤	۲۰۰	۱۳۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۱۸۷
۵	٤۰۰	۱۱۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/٦٤۹
٦	٦۰۰	۹۰۰	۱/۵	۰/۵	۱/۰۸۸
۷	۸۰۰	۷۰۰	۱/۵	۰/۵	۱/٤۵۵
۸	۱۰۰۰	۵۰۰	۱/۵	۰/۵	۱/۸٦٤



شکل ۳-۲- نمودار استاندارد قندهای احیایی به روش میلر (۱۹۵۹)

اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی

قندهای غیراحیایی به روش هاندل (۱۹٦۸) اندازه‌گیری شدند. بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده با ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سردشدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ٦۲۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت با توجه به فرمول به‌دست آمده از نمودار استاندارد و جذب نور در نمونه‌ها میزان قند غیراحیایی به‌دست می‌آید.

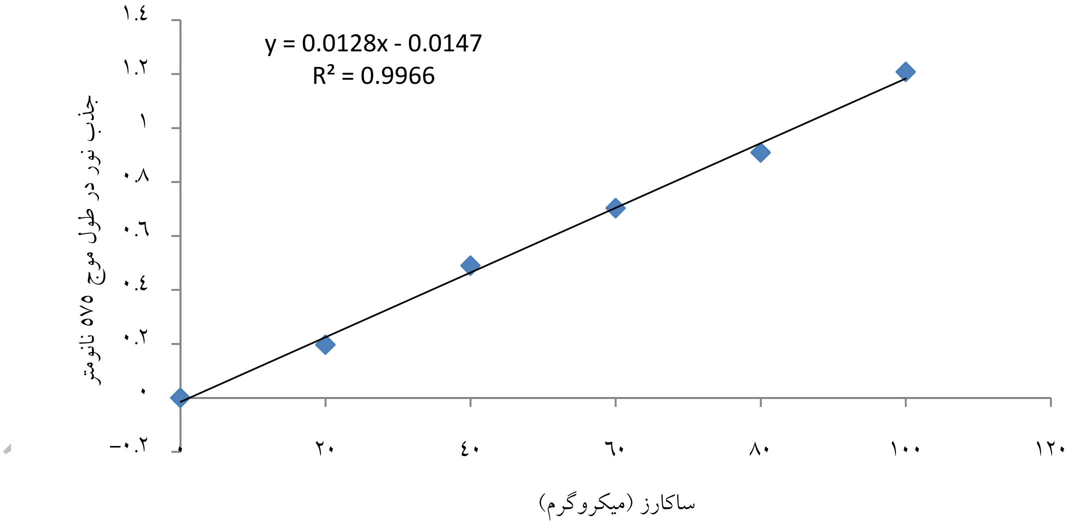
تهیه نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی

برای تهیه نمودار استاندارد از محلول ساکارز با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. به هر لوله آزمایش، مقادیر ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پایه ساکارز که به‌ترتیب حاوی ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم

ساکارز بودند، اضافه گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد ساکارز بود، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به مخلوط حاصل ۰/۱ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سردشدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نور در طول موج ٦۲۰ نانومتر قرائت و نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی رسم گردید

جدول۳-۳- طرز تهیه نمودار استاندارد قندهای غیر احیایی به روش هاندل (۱۹٦۸)

شماره لوله	مقدار محلول ساکارز (میکرولیتر)	آب مقطر (میکرولیتر)	محلول هیدروکسید پتاسیم ۳۰درصد (میلی‌لیتر)	معرف آنترون (میلی‌لیتر)	جذب نور در طول موج ٦۲۰ نانومتر
۱	۰	۱۰۰	۰/۱	۳	۰
۲	۲۰	۸۰	۰/۱	۳	۰/۱۹۷
۳	٤۰	٦۰	۰/۱	۳	۰/٤۹۰
٤	٦۰	٤۰	۰/۱	۳	۰/۷۰۳
٥	۸۰	۲۰	۰/۱	۳	۰/۹۰۹
٦	۱۰۰	۰	۰/۱	۳	۱/۲۰۸



شکل۳-۳- نمودار استاندارد قندهای غیر احیایی به روش هاندل (۱۹٦۸)

نکات

محلول پس از اضافه شدن معرف آنترون زرد و پس از حمام سبز رنگ شد.

نمونه ی شاهد زرد رنگ باقی ماند.

دقت شود در این کار وسایل مورد استفاده شده کاملا تمیز و خشک باشند.

اندازه‌گیری فروکتوز

اندازه‌گیری فروکتوز با استفاده از روش اشول (۱۹۵۷) انجام گردید. بدین منظور به ۲ میلی‌لیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده، به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر معرف ری‌سورسینول و ۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک رقیق اضافه گردید. لوله‌ها را در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ قرار داده و پس از آن، لوله‌های آزمایش را به‌مدت ۵ دقیقه در آب غوطه‌ور ساخته تا خنک شوند. سپس جذب محلول رنگی هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر در فاصله ۳۰ دقیقه قرائت شد.

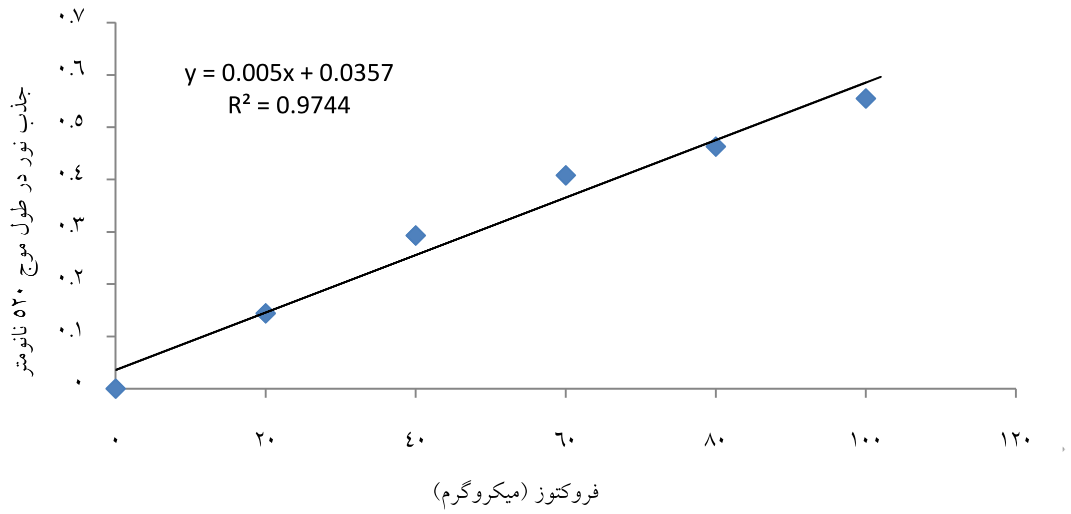
تهیه نمودار استاندارد فروکتوز: برای رسم تهیه منحنی استاندارد ۵ میلی‌گرم فروکتوز را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم. پس از تهیه محلول فروکتوز، در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای مقادیر ۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی‌لیتر از محلول استاندارد، اضافه گردید. در نهایت حجم محلول‌ها با آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد فروکتوز بود به‌عنوان شاهد استفاده شد (بلانک). پس از آن ۱ میلی‌لیتر معرف ری‌سورسینول و ۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک رقیق به هر کدام از لوله‌های آزمایش به‌ترتیب اضافه شد و پس از اضافه کردن، لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس لوله‌های آزمایش را به‌مدت ۵ دقیقه در آب غوطه‌ور کرده تا خنک شوند. بعد از آن جذب محلول رنگی هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر در فاصله ۳۰ دقیقه قرائت گردید (جدول۲ و شکل زیر).

معرف ری‌سورسینول: برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر از معرف ری‌سورسینول ، ۱ گرم ری‌سورسینول و ۰/۲۵ گرم تیوه‌اوره را در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک یخی حل گردید. این معرف در تاریکی پایدار است.

اسید کلریدریک رقیق: ۵ قسمت اسید کلریک غلیظ با یک قسمت آب مقطر مخلوط گردید.

جدول۳-٤- طرز تهیه نمودار استاندارد قند فروکتوز به روش اشول (۱۹۵۷)

شماره لوله	مقدار محلول فروکتوز (میلی‌لیتر)	آب مقطر (میلی‌لیتر)	معرف ری‌سورسینول (میلی‌لیتر)	اسید کلریدریک رقیق (میلی‌لیتر)	جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر
۱	۰	۲	۱	۷	۰
۲	۰/۲	۰/۱۸۰	۱	۷	۰/۱٤٤
۳	۰/٤	۰/۱٦۰	۱	۷	۰/۲۹۳
٤	۰/٦	۰/۱٤۰	۱	۷	۰/٤۰۸
۵	۰/۸	۰/۱۲۰	۱	۷	۰/٤٦۳
٦	۱	۰/۱	۱	۷	۰/۵۵۵



شکل ٣-٤- نمودار استاندارد قند فروکتوز به روش اشول (١٩٥٧)

www.gologiah

استخراج و اندازه‌گیری نشاسته

استخراج نشاسته

استخراج نشاسته با روش مک‌کریدی و همکاران (١٩٥٠) صورت گرفت. در این روش ٤٠ میلی‌گرم از بقایای بافتی به‌جا مانده بافت گیاهی را در میکروتیوب ریخته و ٠/٢ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و در یخ نگهداری شد و بلافاصله به آن ٠/٢٦ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ٥٢ درصد افزوده و به‌مدت ١٥ دقیقه در یخ نگهداری شد. پس از گذشت این مدت، ٠/٤ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و به‌مدت ١٠ دقیقه با سرعت g ٥٨٠٠ سانتریفوژ گردید. پس ازسانتریفیوژ، فاز بالایی به درون لوله آزمایش منتقل شد و در یخ نگهداری گردید. رسوبات باقی مانده نیز با ٠/١ میلی‌لیتر آب مقطر و ٠/١٣ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ٥٢ درصد مجددا استخراج و پس ازسانتریفیوژ، فاز بالایی آن به لوله اول منتقل شد و در نهایت حجم فاز محلول درون لوله آزمایش با آب مقطر به ٢ میلی‌لیتر رسانده شد و از آن برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد.

اندازه‌گیری نشاسته

برای اندازه‌گیری نشاسته از روش مک‌کریدی و همکاران (١٩٥٠) استفاده شد. در این روش، ٠/٢ میلی‌لیتر از عصاره حاوی نشاسته با ٣ میلی‌لیتر از معرف آنترون مخلوط و به‌مدت ٢٠ دقیقه در دمای ١٠٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها جذب نور نمونه‌ها در طول موج ٦٢٠ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری مقدار نشاسته از نمودار استاندارد قند کل (شکل ٣-١) استفاده گردید.

تعیین غلظت کلروفیل a ، b و کل و کاروتنوئیدها

ابتدا ١٠٠ میلی‌گرم از بافت تر گیاه در داخل هاون چینی با ١٠ میلی‌لیتر استن ٨٠ درصد ساییده شد. سپس محلول حاصل به لوله‌های سانتریفوژ انتقال و بقایای موجود در هاون، با مقداری استن ٨٠ درصد شسته و به محلول درون لوله اضافه گردید. سپس لوله‌ها به‌مدت ١٠ دقیقه در rpm ٦٠٠٠ سانتریفوژ شدند. محلول فوقانی به بالن ژوژه ٢٥ میلی‌لیتری انتقال یافته و حجم آن توسط استن ٨٠ درصد به ٢٥ میلی‌لیتر رسید. اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید با روش اسپکتروفتومتری با دستگاه

اسپکتروفتومتر انجام گرفت. به این ترتیب که مقدار جذب محلول‌ها را در طول موج ٤٨٠، ٥١٠، ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر خوانده و مقدار کلروفیل a ، b ، کل و کاروتنوئید بر اساس روابط زیر محاسبه گردید:

Chl.a mg/g FW=[١٢/٧(A٦٦٣) – ٢/٦٩ (A ٦٤٥)] × V/W

Chl.b mg/g FW=[٢٢/٩(A٦٤٥) – ٤/٦٨ (A ٦٦٣)] × V/W

Chl. total mg/g FW=[٢٠/٢(A٦٤٥) + ٨/٠٢ (A ٦٦٣)] × V/W

C mg/g FW = [٧/٦ (A ٤٨٠) – ١/٤٩ (A ٥١٠)] × V/W

A ٤٨٠، A ٥١٠ ، A ٦٤٥ و A٦٦٣به ترتیب عبارتند از مقدار جذب خوانده شده در طول موج ٤٨٠، ٥١٠، ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر، V حجم نهایی استن مصرفی بر حسب میلی‌لیتر و W وزن بافت تر است.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

تعیین مقدار آنتوسیانین بر طبق روش وانگر (١٩٧٩) صورت گرفت. بدین‌صورت که ١ گرم از سیر تازه را با ١٠ میلی‌لیتر متانول اسیدی ساییده و عصاره‌ها برای ٢٤ ساعت در تاریکی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این به مدت ١٠ دقیقه در دور ٤٠٠٠g عصاره را سانتریفوژ نموده و جذب محلول رویی با استفاده از اسپکتوفتومتر، S 2000 uv/visدر طول موج ٥٢٠ نانومتر قرائت شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول A=εbc به‌دست آمد که در آن مقدار ε یا ضریب خاموشی معادل $3300\ mMcm^{-1}$ (٣٣٠٠ mMcm-1)، A مقدار جذب، b عرض کووت اندازه‌گیری برابر ١ سانتی‌متر و c مقدار آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم وزن تر گیاه می‌باشد. در نهایت میزان آنتوسیانین بر حسب میکرو مول در گرم وزن تر سیر تازه بیان گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت آنزیم لیپاز به روش صادقی‌پور و باهالتا (٢٠٠٢) انجام گردید. در این روش ابتدا ٢ گرم بافت تر گیاه با ٦ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل تریس بازی ٠/١ مولار با اسیدیته ٧/٥، ساکاروز ٠/٤ مولار، کلرید پتاسیم ١٠ میلی‌مولار، سولفات‌منیزیم ١ میلی‌مولار، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (ETDA) ١ میلی‌مولار، فنیل متیل سولفونیل‌فلوراید (PMSF) ١ میلی‌مولار، پلی ونیل پلی پیرولیدون (PVPP) ٠/٦ درصد و ٢- مرکاپتواتانل ٥٠ میلی‌مولار در هاون سرد خرد و هموژنیزه گردید. سپس عصاره حاصل پس از صاف شدن توسط دو لایه پارچه ململ، به‌مدت ١٥ دقیقه در g × ٥٨٠٠ سانتریفوژ شد و فاز رویین روغنی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپاز به‌کار رفت. فاز رویین روغنی برداشت شده پس از سانتریفوژ در ٢ میلی‌لیتر بافر تریس ٢٠ میلی مولار با اسیدیته ٧/٥ حاوی ساکاروز ٠/٢ مولار به‌طور کامل هموژن گردید. سپس ٠/١ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل با ٠/٩ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ٠/١ مولار با اسدیته ٤/٥، بافر تریس ٠/١ مولار با اسدیته ٧/٥ و ٩ مخلوط گردید و در حمام آب گرم با دمای ٣٥ °C نگهداری شد و در فواصل ده دقیقه‌ای به‌مدت یک ساعت، هر بار ٠/١ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش برداشت شد و در دمای ٩٠ °C فعالیت آنزیمی متوقف گردید. میزان اسیدچرب آزاد شده در مخلوط واکنش به روش اسپکتروفتومتری (جک‌رابرتی و همکاران ١٩٦٩) Chakrabarty *et al.* (1969) اندازه‌گیری شد. مقادیر برداشت شده از زمان‌های مختلف با ١ میلی‌لیتر بنزن با استفاده از ورتکس مخلوط گردید تا اسیدهای‌چرب آزاد شده در فاز بنزنی استخراج شوند. پس از سانتریفوژ به‌مدت ٥ دقیقه در g × ١٠٠٠، مقدار ٠/٤ میلی‌لیتر از فاز بنزنی برداشت شد و با ١/٦ میلی‌لیتر بنزن مخلوط گردید و در نهایت ١ میلی‌لیتر معرف رودآمین 6G به آن افزوده شد. پس از گذشت ٣٠ دقیقه جذب نور در طول موج ٥٣٥ نانومتر اندازه‌گیری شد.

www.gologiah.ir

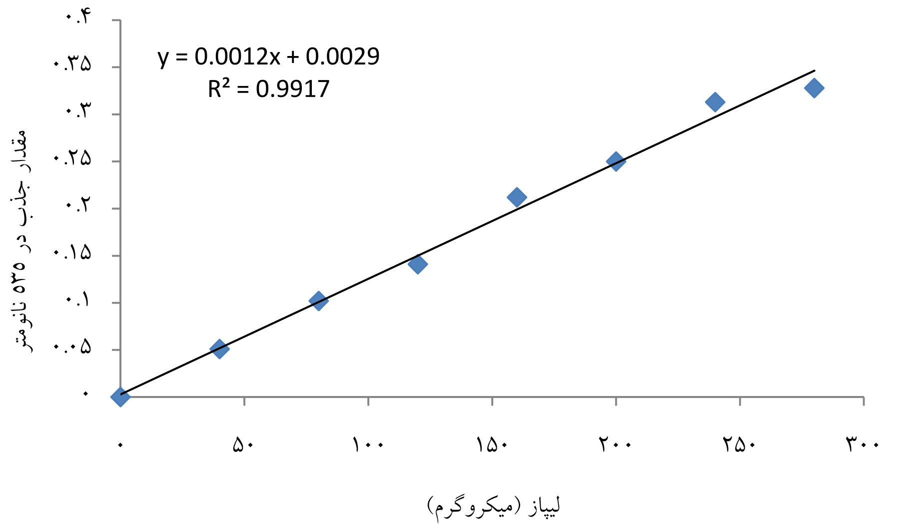
برای تهیه نمودار استاندارد اسیدچرب به لوله‌های آزمایش ۱۰۰ × ۱۲ میلی‌متری مقادیر ۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰، ۲۰۰، ۲۴۰ و ۲۸۰ میکرومتر از محلول اسید استئاریک در بنزن که به‌ترتیب حاوی ۰، ۸۰، ۱۶۰، ۲۴۰، ۳۲۰، ۴۰۰، ۴۸۰ و ۵۶۰ نانومول اسیدچرب بودند، منتقل گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش با محلول بنزن به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد اسید استئاریک بود به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف رودآمین 6G به آن افزوده شد و جذب نور آن‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر به دست آمد (جدول۳-۵). در نهایت با استفاده از مقادیر جذب نور بدست آمده نمودار استاندارد اسیدچرب رسم گردید.

برای تهیه معرف رودآمین ابتدا ۲۵ میلی‌گرم رودآمین 6G در ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (KH_2PO_4) ۰/۲ مولار با اسیدیته ۹/۷ و سود (NaOH) ۰/۲ مولار حل شد. سپس محلول حاصل با ۵۰۰ میلی‌لیتر بنزن در یک قیف جدا کننده (دکانتور) استخراج گردید. در نهایت فاز آبی دور ریخته شد و فاز بنزنی نارنجی رنگ به ظرف کهربایی منتقل شده و پس از افزودن اندکی سود در تاریکی نگهداری گردید.

جدول ۳-۵- طرز تهیه نمودار استاندارد اسیدچرب به روش جک‌رابرتی و همکاران (1969)

شماره لوله	محلول اسید استئاریک (میکرولیتر)	مقدار اسید استئاریک (نانو مول)	محلول بنزن (میکرولیتر)	معرف رودآمین 6G (میلی‌لیتر)	جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر
۱	۰	۰	۱۰۰۰	۰/۵	۰
۲	۴۰	۸۰	۹۶۰	۰/۵	۰/۰۵۱
۳	۸۰	۱۶۰	۹۲۰	۰/۵	۰/۱۰۲
۴	۱۲۰	۲۴۰	۸۸۰	۰/۵	۰/۱۴۱
۵	۱۶۰	۳۲۰	۸۴۰	۰/۵	۰/۲۱۲
۶	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۰/۵	۰/۲۵۰
۷	۲۴۰	۴۸۰	۷۶۰	۰/۵	۰/۳۱۳
۸	۲۸۰	۵۶۰	۷۲۰	۰/۵	۰/۳۲۸

www.gologah.ir



شکل ۳-۵- نمودار استاندارد اسیدچرب به روش جک‌رابرتی و همکاران (1969)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز

فعالیت آنزیم پروتئاز به روش آنسون (۱۹۳۸) انجام گردید. ابتدا ۱ گرم از بافت تر گیاه با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۱۰ میلی‌مولار استات‌سدیم و ۵ میلی‌مولار استات‌کلسیم با pH=۷/۵ در هاون سرد خرد و هموژنیزه شد. ۱ میلی‌لیتر از عصاره فوق را به لوله آزمایش که داخل آن ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/٦٥ درصد کازئین بود، انتقال داده شد. سپس مخلوط حاصل با استفاده از ورتکس مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از آن ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۱۰ میلی‌مولار به آن اضافه گردید. مخلوط فوق به‌وسیله ورتکس مخلوط شد و سپس در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس محلول حاصل با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۰/۵ صاف گردید. بعد از آن ۱ میلی‌لیتر از محلول صاف شده به لوله آزمایش منتقل گردید. پس از آن به‌ترتیب ۵ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو به لوله آزمایش اضافه گردید. سپس محلول حاصل با ورتکس هموژنیزه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نور در طول موج ٦٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

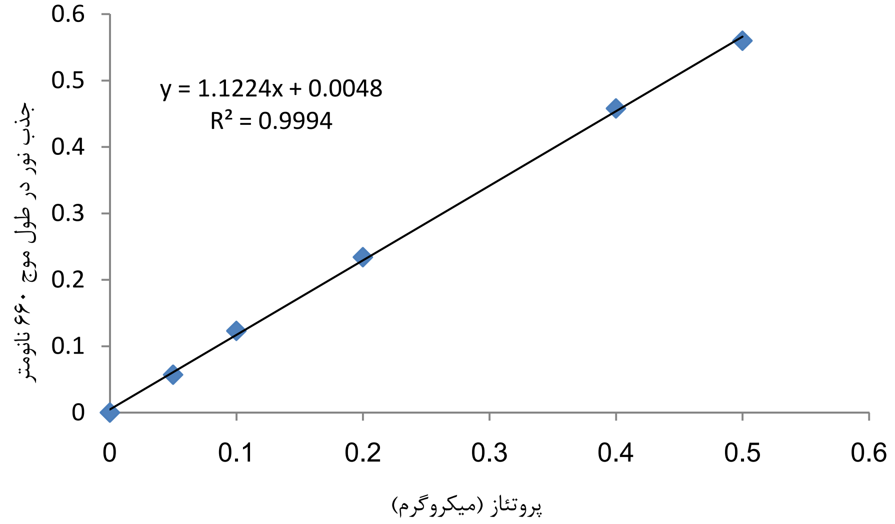
برای تهیه نمودار استاندارد از محلول ال‌تایروزین با غلظت ۱/۱ میلی‌مولار استفاده شد. در لوله‌های آزمایش ۱۰۰ × ۱۲ میلی‌متری مقادیر ۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۲۰، ۰/٤۰، ۰/۵۰ میلی‌لیتر محلول ال‌تایروزین اضافه گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش توسط آب به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به‌ترتیب ۵ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید. لوله‌آزمایشی که فاقد ال‌تایروزین بود به‌عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌های آزمایش با استفاده از ورتکس مخلوط گردید. پس از آن لوله‌های آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس جذب نور هر یک از محلول‌ها در طول موج ٦٦۰ نانومتر قرائت گردید.

- برای تهیه معرف فولین سیوکالتو ، ۱۰ میلی‌لیتر فولین سیوکالتو را با ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.
- برای تهیه محلول کازئین، ۰/٦٥ گرم کازئین را در ۱۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم با pH=۷/۵ در دمای ۹۰ – ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت می‌دهیم (نجوشد).

- برای تهیه محلول ال‌تایروزین ۱/۱ میلی‌مولار، ۰/۰۲ گرم آز آنرا در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه شده در دمای ۹۰-۸۰ حرارت می‌دهیم (نجوشد) تا کاملا حل گردد و بعد در دمای اتاق سرد می‌کنیم.

جدول ۳-٦- طرز تهیه نمودار استاندارد پروتئاز به روش آنسون (۱۹۳۸)

شماره لوله	ال‌تایروزین (میلی‌لیتر)	آب مقطر (میلی‌لیتر)	محلول کربنات‌سدیم (میلی‌لیتر)	فولین‌سیوکالتو (میلی‌لیتر)	جذب نور در ٦٦۰ نانومتر
۱	۰	۲	٥	۱	۰
۲	۰/۰٥	۱/۹٥	٥	۱	۰/۰٥۷
۳	۰/۱۰	۱/۹۰	٥	۱	۰/۱۲۳
٤	۰/۲۰	۱/۸۰	٥	۱	۰/۲۳٤
٥	۰/٤۰	۱/٦۰	٥	۱	۰/٤۸٥
٦	۰/٥۰	۱/٥۰	٥	۱	۰/٥٦۰



شکل ۳-٦- نمودار استاندارد پروتئاز به روش آنسون (۱۹۳۸)

www.iah.ir

اندازه‌گیری فعالیت آلفاآمیلاز

فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز به روش برنفلد (۱۹٥٥) انجام گردید. ابتدا یک گرم از بافت تر گیاه با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ که حاوی ٥۰ میلی‌مولار NaCl می‌باشد، در دمای اتاق در داخل هاون چینی ساییده شد. سپس عصاره حاصل به لوله سانتریفوژ انتقال داده شد. به‌مدت ۲٤ ساعت لوله حاوی نمونه روی شیکر قرار گرفت. سپس لوله حاوی عصاره به‌مدت ۳٥ دقیقه در rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس ازسانتریفیوژ، فاز بالایی به درون لوله آزمایش منتقل شد و رسوبات باقی‌مانده نیز با افزودن ۱۰ سی‌سی از بافرفسفات به‌مدت ۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی آن به لوله اول منتقل شد. در صورت انجام نشدن آزمایش در همان روز نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. بعد از آن نیم میلی‌لیتر عصاره آنزیمی فوق و نیم میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱ درصد به ترتیب به لوله‌ها

اضافه گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن لوله حاوی نمونه به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مخلوط حاصل ۳ میلی‌لیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک‌اسید اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. پس از سردشدن لوله‌ها، ۱ میلی‌لیتر تارتارات سدیم پتاسیم به آن افزوده و مقدار فعالیت آنزیم در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. برای اندازه‌گیری مقدار آلفاآمیلاز از نمودار استاندارد گلوکز استفاده گردید. **استخراج عصاره از برگ گیاه**

ابتدا برگها در محیط آزمایشگاه و در دمای طبیعی خشک شده سپس در آسیاب به صورت پودر در آمدند. نمونه‌های پودر شده وزن شده و مقدار ۵ گرم از پودر نمونه در ارلن ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس به آن ۵۰ سی سی متانول ۸۰ درصد اضافه شد (نسبت نمونه به محلول متانولی ۱به ۱۰باید باشد). پس از ۲٤ ساعت با استفاده از کاغذ صافی محلول متانولی حاوی نمونه صاف شد. پس از آن محلول متانولی را به دستگاه روتاری برای خارج کردن متانول از عصاره انتقال دادیم. پس از تبخیر متانول در دستگاه، عصاره خالص در ظرف کوچکی ریخته شد و برای اندازه گیری فنل ، فلاوونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده شد.

اندازه گیری آنتی اکسیدانت به روش DPPH

میزان مهار رادیکال‌های دی پی اچ (DPPH)، با روش ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۰۸) مورد ارزیابی قرار گرفت.ابتدا از عصاره بالا ٤۰ میلی گرم وزن نموده در ۲۵ سی سی متانول حل کردیم. وزن مورد نظر را برداشته در مقدار کمی متانول حل کرده سپس به حجم ۲۵ سی سی با متانول رساندیم. چون عصاره چسبناک است و وزن کردن آن سخت است پس اول بالن ۲۵ سی سی روی ترازو صفر کردیم و نمونه را در ان می ریزیم. دقت ترازو برای این کار باید تا ٤ رقم اعشار باشد.

در این مرحله رادیکال رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل یا DPPH را به غلظت ٤ میلی گرم در ۱۰۰ سی سی متانول حل می کنیم (۰.۱ میلی مولار). سپس برای هر عصاره ۵ غلظت باید ساخته شود. . برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های ۵۰۰–۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تمامی عصاره‌ها در حلال متانول آماده شدند. پس ۵ لوله انتخاب می‌کنیم. ابتدا در همه لوله ها ۲ سی سی DPPH می ریزیم. سپس ۲ سی سی عصاره به DPPH اضافه می کنیم. پس ۵ لوله با غلظت های متفاوت عصاره و DPPH یکسان داریم. بعد از این کار لوله ها بمدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار می گیرد و در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده می‌شوند. علاوه بر لوله های مذکور یک لوله برای شاهد در نظر می گیریم این لوله ماکزیمم جذب را دارد و فقط ۲سی سی DPPH و ۲ سی سی متانول دارد. اسپکت باید با متانول صفر شود.

معمولا رنگ لوله ها در جهت افزایش غلظت از ارغوانی به زرد است. یعنی غلیظ ترین لوله که بیشترین عصاره را دارد زرد است و کمترین غلظت ارغوانی است و مربوط به DPPH است. اعداد زیر توسط فرمول زیر به درصد مهار تبدیل می‌شود: عدد جذب نمونه را از عدد شاهد کم کرده و بر عدد شاهد تقسیم می کنیم بنابراین برای هر جذب یک درصد مهار داریم(از هر نمونه ۵ غلظت خوانده شد پس ۵ درصد مهار داریم). در انتها ۵ عدد بدست آمده در اکسل تشکیل یک شیب خط را می-دهد. از فرمول بدست آمده یا همان شیب خط بدست آمده y درصد جذب مهار است و X غلظت بوده و مجهول ما می‌باشد.

درصد مهار رادیکال های آزاد (DPPH) = $\frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$

غلظت	۱/٦	۰/۸	۰/٤	۰/۲	۰/۱
درصد مهار	۹۲/۸	٦۲/٤	۳۸/۷	١٦/٤	۵/۷

www.gologiah.ir

با بدست آمدن این خط براحتی می توان محاسبه کرد که اگر درصد مهار ما ۵۰ باشد غلظت چقدر است به این عدد IC_{50} گویند.در واقع IC_{50} غلظتی را نشان می دهد که در آن درصد مهار ۵۰٪ است و واحد آن میلی گرم بر میلی لیتر است. IC_{50} را توسط ماشین حساب می‌توان حساب کرد X ها و Yها را به دستگاه داده و در نهایت با دادن عدد ۵۰ بجای y ، می توان x را حساب کرد. در مقاله میانگین غلظت مهار ۵۰٪ IC50 در عصاره متانولی بر اساس میلی گرم بر میلی لیتر گزارش می شود.

باید دقت کرد که ۵ عدد بدست آمده برای درصد مهار به گونه ای باشد که عدد ۵۰ (نه لزوما عدد ۵۰) را هم شامل شود، به عنوان مثال در جدول بالا بین اعداد ۳۸.۷ و ٦۲.٤ عدد ۵۰ هم وجود دارد، در حالیکه اعداد ۷۹،۸۳،۹٤،۹۵،۹۹ دارای محدوده نادرستی می باشند. علت این امر بالا بودن غلظت عصاره است، بدین منظور باید یک نمونه جهت تست نمودن که دارای محدوده وسیعی از غلظت بالا تا پایین باشد (۱۲.۵ تا۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تا غلظتهای مناسب جهت بدست آوردن درصد مهار بدست آید. در صورتی که از اعداد با محدوده بالا تر از ۵۰ استفاده شود، IC_{50} بدست آمده از این معادله خط منفی می شود، که نادرست است.

www.gologiah.ir

اندازه گیری فنل کل

اندازه گیری فنل کل از روش ابراهیم زاده و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. تهیه عصاره به روش قبلی است. بعد از گرفتن عصاره ۰.۵ سی سی عصاره متانولی (٤۰ میلی گرم در ۲۵ سی سی) را با ۵ سی سی فولین سیوکالتیو (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط میکنیم سپس ٤ سی سی کربنات سدیم یک مولار (۱۰.٦ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر) اضافه می کنیم. برای شاهد نیز بجای عصاره خشک، متانول که حلال است ریخته می شود و بعد فولین سیوکالتیو و کربنات سدیم اضافه می گردد. از این محلول برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده می شود. محلول فوق باید ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گیرد و بعد در طول موج ۷٦۵ نانومتر خوانده شود. عصاره متانولی را می توان کمتر درست کرد مثلا ٤۰ میلی گرم در ۲۵ سی سی متانول.با استفاده از استاندارد گالیک اسید منحنی کالیبراسیون رسم می شود.معادله ای که بدست می آید مشابه معادله $y=0.0063X$ است.

در اینجا y همان عددی است که در مقابل بلانک خوانده می شود از این طریق x بدست می آید. چون غلظت عصاره ٤۰ میلی گرم عصاره خشک در ۸۰ سی سی و یا به عبارت دیگر ۱٦۰۰میلی گرم در لیتر یا ۱.٦ گرم در لیتر بوده است. باید این x را برای ۱ گرم در لیتر حساب کرد. که در اینجا x دوم بدست امده به عنوان محتوای فنلی و بر حسب اکی والان گالیک اسید در یک گرم عصاره خشک بدست می اید.

اندازه گیری محتوای فلاونوئید

تهیه عصاره خشک به روش قبلی است. ۰.۵ سی سی از عصاره متانولی+ ۱.۵ سی سی متانول+ ۰.۱ سی سی آلومنیوم کلرید۱۰٪ در اتانول(۱۰ گرم الومنیوم کلرید در ۱۰۰ سی سی اتانول و آب مقطر)+ ۰.۱ سی سی استات پتاسیم یک مولار (۲.٤۱ گرم در ۱۰ سی سی آب مقطر)+ ۲.۸ سی سی اب مقطر. برای تهیه شاهد نیز بجای عصاره متانولی، متانول خالص می ریزیم. سپس مخلوط در نیم ساعت تاریکی قرار گرفته و در طول موج ٤۱۵ نانو متر خوانده می شود. اعداد بدست امده برای فنل و فلاونوئید باید با رجوع به منحنی استاندارد تبدیل به میزان واقعی شوند. برای این کار بدین صورت عمل می شود. به عنوان مثال اگر معادله منحنی استاندارد ما $y= 0.0067x+0.0132$ باشد،

Y همان جذب خوانده شده توسط بلانک است. در اینجا x را بدست آورده و سپس در یک تناسب برای ۱ گرم در لیتر عصاره محاسبه می شود و بر اساس اکی والان کوئرستین در یک گرم عصاره خشک گزارش می شود.

اندازه گیری کلروژنیک اسید و کافئیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC

به منظور اندازه گیری کلروژنیک و کافئیک اسید از کروماتوگرافی با کارایی بالا استفاده شد. HPLC یعنی کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد یا کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی است. HPLC از دو فاز ثابت و متحرک تشکیل شده است. که فاز ثابت ممکن است جامد و یا مایع باشد و فاز متحرک مایع است.

مدل دستگاه استفاده شده مرک- هیتاچی است. که شامل تجهیزات زیر می باشد:

۱- پمپ : لاکروم
۲- مدل ل- ۷۱۰۰
۳- دتکتور : UV
٤- ستون : C-18 با ابعاد ٤/٦ × ۲۵۰ میلی متر
۵- اندازه ذرات : ۵ میکرومتر

نمونه ها با سرعت جریان یک میلی متر در دقیقه در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شدند. فاز متحرک شامل استونیتریل به میزان ۱۰ میلی لیتر به اضافه ۱میلی لیتر اسید استیک و ۸۹ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه می باشد.

آماده سازی نمونه

برای آماده سازی نمونه جهت تزریق به دستگاه HPLC ، ابتدا نمونه به مدت ٤۸ ساعت در آون با دمای ۳۸ درجه سانتیگراد خشک شده و سپس آسیاب شد. ۵۰ میلی گرم از نمونه پودر شده به ارلن مایر ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۲/۵ میلی لیتر ترکیب متانول و آب به نسبت ۸۰ به ۲۰ (V/V) اضافه شد سپس ۳۰ دقیقه در التراسوند قرار داده شده و پس از آن آب دو بار تقطیر به نسبت 1:1 به عصاره اضافه گردید(12.5 میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد). محلول حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ تا ٦۰۰۰ سانترفیوژ شد. بخش فوقانی محلول سانترفیوژ شده به ظروف مخصوص HPLC انتقال داده شد و در دمای ۱۸- درجه تا زمان آنالیز نگه داری شدند (شوتز و همکاران ۲۰۰٦).

تهیه نمودار کالیبراسیون برای کلروژنیک اسید و کافئیک اسید

به منظور تهیه منحنی کالیبراسیون و معادله خط مربوطه از غلظت های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر کلروژنیک اسید و کافئیک اسید استفاده گردید. به این صورت ابتدا یک محلول پایه از کلروژنیک و کافئیک اسید با غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر تهیه و سپس حجم معینی از آن را درون بالن ژوژه ۱۰ سی سی، توسط متانول خالص رقیق نموده تا هر یک از غلظت های فوق حاصل گردد. هر یک از استانداردهای فوق را سه بار به دستگاه تزریق تا از کالیبره بودن دستگاه اطمینان حاصل گردد. سپس با استفاده از مساحت سطح زیر منحنی هر یک از استانداردها نمودار کالبراسیون مربوطه رسم و معادله خط حاصل بدست آمد.

www.gologiah.ir

تزریق نمونه گیاهی

به منظور شناسایی پیک مربوط به کلروژنیک و کافئیک اسید در نمونه های تهیه شده، زمان بازداری آن در نمونه با زمان بازداری ترکیب استاندارد در هر تزریق مقایسه شد. برای اطمینان بیشتر نمونه ای همراه با استاندارد تزریق و و پیک مربوطه دقیقا در زمان پیک استاندارد ظاهر شد.

میزان کلروژنیک اسید و کافئیک اسید بر حسب درصد بیان می شود. X مجهول در فرمول منحنی را با جایگزین کردن سطح زیر نمودار نمونه های تزریق شده به دست می آوریم . واحد مجهول (X) بر حسب پی پی ام می باشد. پی پی ام مقدار میلی گرم در ۱۰۰۰ سی سی است که با توجه به اینکه عصاره خشک قبل از تزریق در محلول ۱ میلی لیتر متانول حل شده بود، مقدار میلی گرم کلروژنیک و کافئیک اسید در حجم ۱ میلی لیتر به دست می آوریم و سپس به گرم تبدیل کرده و درصد بیان می کنیم.

www.gologiah.ir