

Tannins-Tests for identification

اختبارات التаниنات لتشخيصها

1. Goldbeater's skin test (Skin tanning test): اختبار غولد بيتر (اختبار دباغة الجلد)
Goldbeater's skin = membrane prepared from ox intestine & similar to untanned hide.

- Soak a small piece of goldbeater's skin in 25 % HCl; rinse with distilled water & place in the solution to be tested for 5 min. Wash with distilled water & transfer to a 15 % solution of ferrous sulphate.
يحضر جلد أمعاء ثور ينقع في حمض الهيدروكلوريك ومن ثم يغسل بالماء المقطر ويوضع في محلول الفحص 15 دقيقة . يغسل بالماء المقطر ومحلو 15% سلفات الحديد
- A brown or black color on the skin indicates the presence of true tannins.
عند ظهور لون بني او اسود على الجلد دليل وجود تаниنات حقيقية

Prof. Dr. Isam Agha

9

Tannins-Tests for identification

اختبارات التаниنات لتشخيصها

2. Gelatin test:

- True tannins (about 0.5-1%) + 1% solution of gelatin → precipitate
- Gallic acid & other pseudotannins may react in concentrated solutions:
اختبار الجيلاتين: تعطي التаниنات الحقيقية مع محلول الجيلاتين 1% يعطي رسابة كما ويعطي حمض الغاليك وغيرها من التаниنات الكاذبة يمكن أن تتفاعل مع محلول جيلاتين مركز

Prof. Dr. Isam Agha

10

Tannins-Tests for identification

اختبارات التانينات لتشخيصها

3. Ferric chloride test: اختبار كلوريد الحديد

- 2-3 ml of the extract + 5 % ferric chloride solution drop by drop → bluish-black (Hydrolysable tannins: gallitannins & ellagitannins) or brownish-green color (Condensed tannins)
- If the extract contains both types of tannins → blue color + more ferric chloride → olive-green

4. Test with bromine water: Aqueous tannin extract + bromine water اختبار ماء البرومين

- Condensed tannins → buff-colored precipitate
- Hydrolysable tannins → no precipitate.

5. Test for catechin: اختبار الكاتيكن Dip a matchstick in the plant extract containing catechin, dry, then dip in conc. HCl & warm near a flame → pink or red color.

Prof. Dr. Isam Agha

11

Tannins -Quantitative determination

تحديد التانينات كمياً

1. Hide powder method: طريقة مسحوق الجلد

- » Most widely used on commercial scale.
- » A known amount of a reference sample of hide powder is added to the drug extract.
- » The difference in the dry weight of the extract before & after treatment with hide powder is a measure for the tannin content.

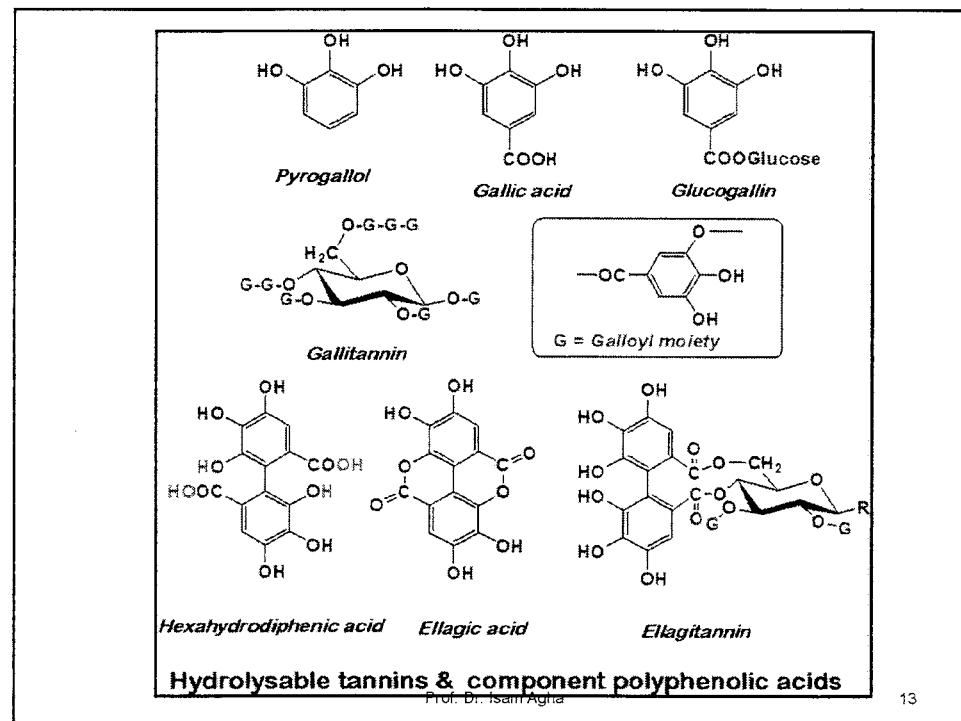
2. Copper acetate method طريقة اسيتات النحاس

3. Agglutination method طريقة التحصب

4. Iodometric determination طريقة مقياس اليود

Prof. Dr. Isam Agha

12



Hydrolysable Tannins- Example

امثلة على التانينات القابلة للحلمة

Tannic acid (Gallotannic acid or Tannin, E.P.)

1. **Source:** obtained from galls arising on various species of *Quercus*. These contain 50-70 % of tannin (gallotannic acid + gallic acid 2-4 % + ellagic acid).
2. **Hydrolysis:** → gallic acid + glucose (pentadigalloyl glucose).
3. **Uses:** Major source of pharmaceutical tannin. It is used as astringent & styptic.

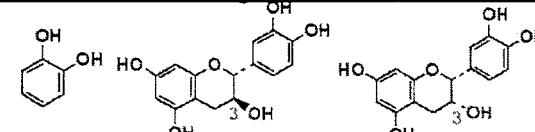
Condensed Tannins - Building Units

مكونات التانينات المتكاثفة

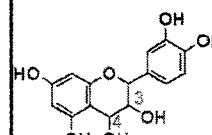
►► Related to flavonoids

►► Polymeric flavan-3-ols
e.g. dimeric
procyanidin

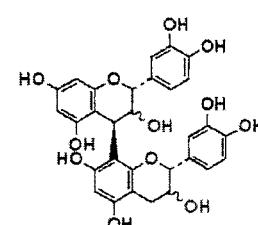
►► Polyphenolic units
present in condensed
tannins: catechin,
epicatechin & flavan-
3, 4-diol
(leucocyanidin).



Catechol (+)-Catechin (-)-Epicatechin



Flavan 3,4-diol structure



A dimeric procyanidin

Polyphenolics in condensed tannins

Prof. Dr. Isam Agha

15

Saponin glycosides الغليكوزيدات السابونينية

Prof. Dr. Isam Agha

16

General characters

الخواص العامة

1. Widely distributed in higher plants. واسعة الانتشار في النباتات
العليا
2. Bitter, acrid taste & sternutatory (irritant to mucous membranes). مرارة الطعم مخرشة للمخاطيات
3. Form colloidal solutions in H₂O → foam on shaking due to: hydrophobic / hydrophilic asymmetry of the molecule (large aglycone & small sugar moiety) → lowering of surface tension in aqueous solution. تشكل محليل غرويدي بالماء لتشكل رغوة
محاليل غرويدية بالماء لتشكل رغوة

Prof. Dr. Isam Agha

17

General characters

الخواص العامة

1. Form insoluble complex with sterols. تشكل معقدات غير ذوبان مع الستيرولات
ذوبان مع الستيرولات
 - ❖ Destroy RBCs → haemolysis. تحطم كريات الدم الحمراء
 - ❖ Toxic to cold-blood animals (fishes & frogs). سامة للضفادع والحيوانات ذات الدم البارد
 - ❖ Toxic by i.v. injection & harmless by oral route. سامة للبشر بالحقن الوريدي وغير سامة فمويا.

Prof. Dr. Isam Agha

18

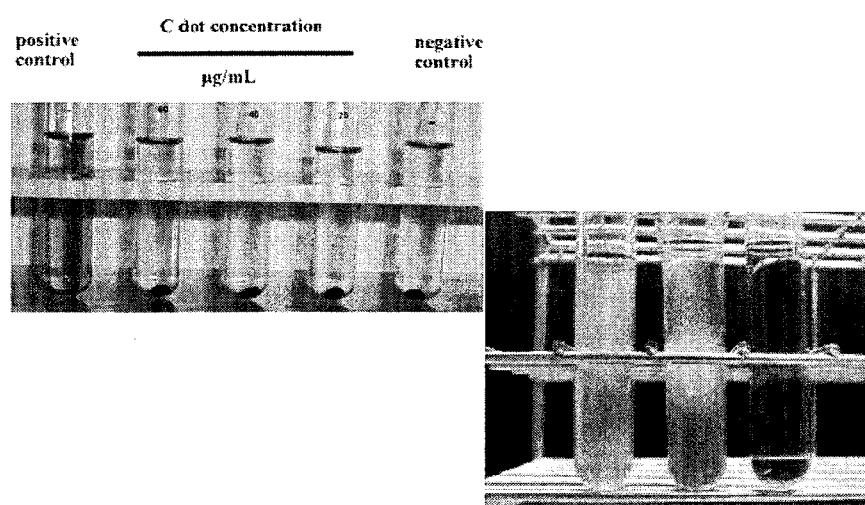
Property of Saponins

- They have a high molecular weight لها وزن عالي نسبيا
- They have a high polarity لها قطبية عالية
- They are hydrolyzed by acids to give aglycone (sapogenin), sugars and related uronic acids. يتم حلتها بالحمض لتعطي جسم أغликون وسكاكر وحموض اورونية

Prof. Dr. Isam Agha

19

Property of Saponins



Prof. Dr. Isam Agha

20

Property of Saponins خواص الصابونينات

- Not soluble in diethyl ether غير ذوابة بالايتر الايتيلي
- Soluble in water, ethanol, methanol, alcohol ذوابة بالماء والكحولات
- Specific solution is n-Butanol or Isopropanol ذوابة بشكل خاص في البوتانول النظامي والايزوبروبانول
- Absorption max. 210-220 nm (glycyrrhizin 254 nm) الامتصاص الأعظمي (nm)

Prof. Dr. Isam Agha

21

Chemical characters الخواص الكيميائية

1. **O-glycosides → hydrolysis → aglycone (sapogenin) + sugar moiety.** تعطي الغликوزيدات الأكسجينية بالحلمية أغليكون يسمى السابوجينين وجزء سكري
2. **Aglycone:** الأغليكون
 - **triterpenoidal (C-30) [mainly in Dicotyledons]** ثلاثي تيربينوئيد (30 ذرة كربون)
 - **steroidal (C-27) [mainly in Monocotyledons]** ستيرونيدي (27 ذرة كربون)

Prof. Dr. Isam Agha

22

Chemical characters

الخواص الكيميائية

- Sugar moiety: الجزء السكري
- Often contain uronic acids or acyl residues. يحتوي غالبا على حموض اورونية أو بقايا اسيل.
- Usually glycosylation is at C-3. ترتبط السكريات بترابط السكريات في الموضع 3 من جسم الأغليكون
- Sometimes -CH₃ (side chain) ⊕ -COOH, which may be esterified by a sugar. يمكن أحياناً إسترة الميثيل أو الكربوكسيل بمجموعات الميثيل أو الكربوكسيل بسكريات

Prof. Dr. Isam Agha

23

Tests for identification

اختبارات التشخيص

1. Froth test: اختبار الرغوة

1 ml of aqueous solution of saponin or plant extract + shake → persistent & voluminous froth.

2. Haemolysis test: اختبار انحلال الدم

Suspension of RBCs in normal saline + equal volume of plant extract in normal saline + shake gently → clear red solution indicating haemolysis of RBCs (compared with blank).

Prof. Dr. Isam Agha

24

Quantitative Determination التحديد الكمي

1. Gravimetric method طرق وزنية

- Saponin glycosides + Ba(OH)₂ → precipitate [Saponin-Ba(OH)₂ complex]
- Filter, dry & weigh the precipitate → original weight {W1}
- Ignite & weigh the residue → {W2} (calculated as BaO)
- W1 - W2 = Saponin content

2. Determination of Foam Index تحديد مناسب وقيمة الرغوة

- The foam index is defined as:
“The dilution of the drug, that gives a layer of foam of 1 cm height, when an aqueous solution is shaken in a graduated cylinder for 15 seconds after standing for 15 min.”

Prof. Dr. Isam Agha

25

Quantitative Determination التحديد الكمي

3. Determination of Fish Index تحديد قيمة السمية للأسمك

- Saponins are toxic to cold blooded animals.
- The fish index is defined as:
“The reciprocal of the saponin dilution that kills 60 % of the experimental animals within 1 hour.”

4. Determination of Haemolytic Index تحديد قيمة انحلال الدم

- The haemolytic index is defined as:
“The greatest dilution of saponin that produces complete haemolysis.”

Prof. Dr. Isam Agha

26

Isolation فصل الصابونينات وعزلها

1. **Plant material + water, alcohol or aqueous alcohol + reflux.**
تستخلص بالغليان مع مزيج كحول وماء تحت مبرد صاعد
2. **Concentrate & precipitate crude saponin mixture with:**
تكثف الخلصة ويرسب مزيج الصابونين الخام احدى الطرق الآتية:
 - Ether or acetone.
 - Lead acetate (acidic saponins), or basic lead acetate (neutral saponins) followed by decomposition with acid.
اضافة اسيتون او الایتر، او اسیتات الرصاص (الصابونينات الحمضية)، او اسیتات الرصاص الأساسية (صابونينات حمضية)، او اسیتات الرصاص الأساسية (صابونينات معتدلة) متبوعة باضافة حمض
3. **Individual glycosides are separated by chromatography.**
تفصل الفردية الغليکوزیدات
باستخدام الكروماتوغرافيا

Prof. Dr. Isam Agha

27

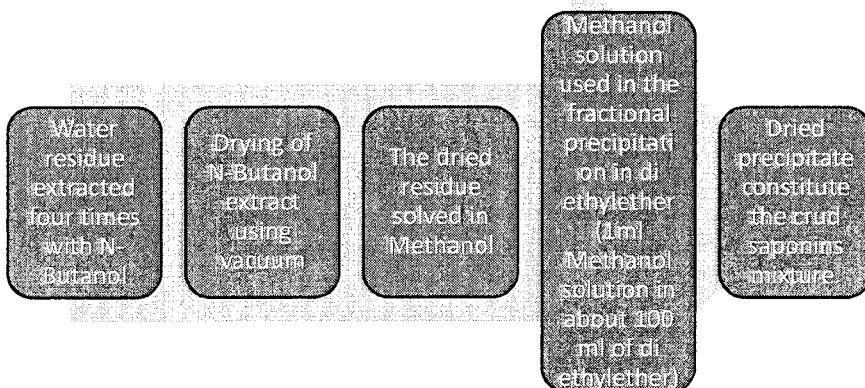
Extraction of saponins استخلاص الصابونينات



Prof. Dr. Isam Agha

28

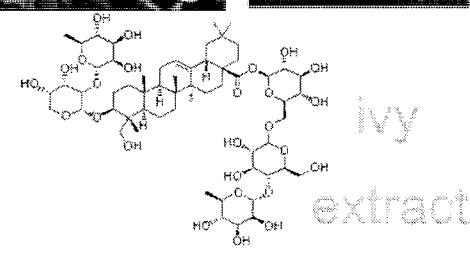
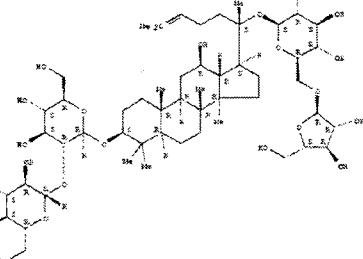
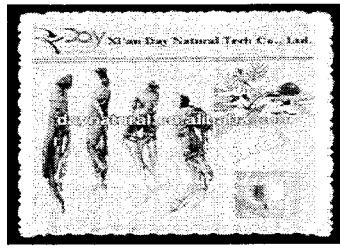
Extraction of saponins استخلاص الصابونينات



Prof. Dr. Isam Agha

29

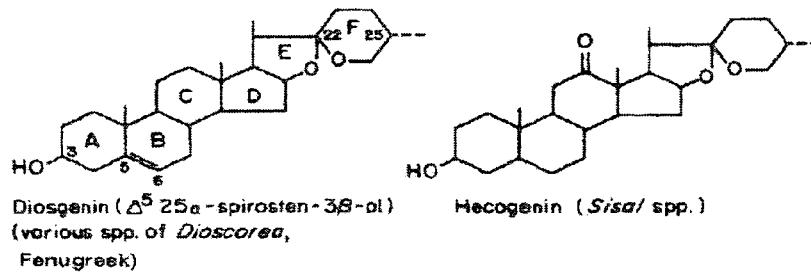
Triterpen Saponins and steroidal saponins الصابونينات ثلاثية التيربين والستيروئيدية



Prof. Dr. Isam Agha

30

Chemical structure of Diosgenin and Hecogenins البنية الكيميائية للديوسجينين والهيكوجينين



Prof. Dr. Isam Agha

31

Separation of steroidal Sapogenins فصل اغليكونات الصابونينات الستيروئيدية

Sapogenins are separated by acid hydrolysis of the saponins. But Previous fermentation of the material for some 4-10 days give a better yield.

After acid hydroxylation the sapogenin extracted with organic solvents

Prof. Dr. Isam Agha

32

Detection of saponins using TLC كشف الصابونيات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

- Mobile phase: chloroform +Methanol + water (40+60+5)
- Stable phase: silica gel or RP8, RP18

Prof. Dr. Isam Agha

33

Detection of saponins using TLC

Spraying with Anis
aldehyde / Sulfuric
acid reagent

Spraying with
water (surface
activity weight
spots)

Detection:

Using blood gel
suspension reagent
(haemolyse effect)

UV exposure (plats
with fluorescence
reagent)

Prof. Dr. Isam Agha

34

Spraying reagent of saponins on TLC كاشف الرذ للصابونيات على الطبقة الرقيقة

-Anise aldehyde / Sulfuric acid reagent:

(80% Methanol + 15% Acetic acid + 5% sulfuric acid + 15 drops of anise aldehyde) after spraying heating about 10 Min. in temp. 110 (coloring reagent)

Prof. Dr. Isam Agha

35

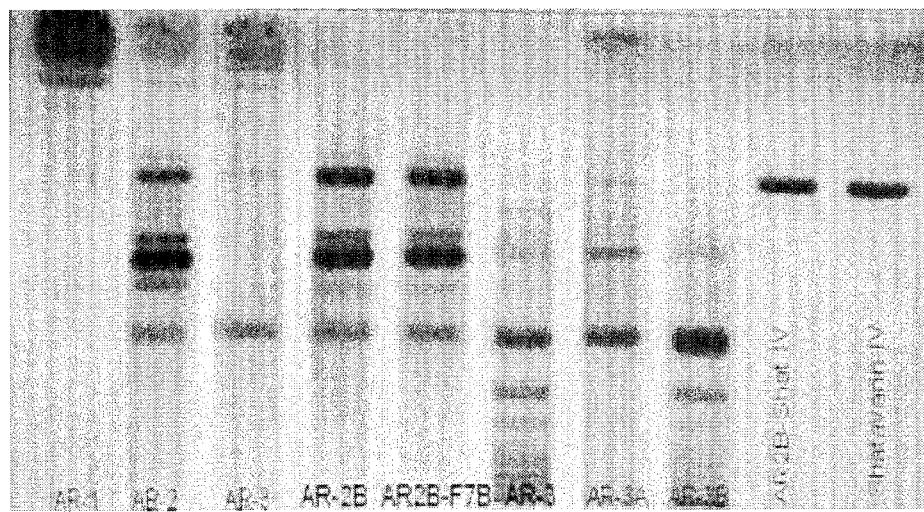
Detection of saponins كواشف الصابونينات

1. Color reaction with aromatic aldehyde (hydroxyl triterpen with anis aldehyde, vanillin .. In strong mineral acids (sulfuric acid, phosphoric acid, perchloric acid) gives colored mixture (dehydration reaction)
تفاعل لوني مع (الألدهيدات العطرية بوجود حمض معدني
 2. Reaction with sulfuric acid and anhydrous acetic acid (unsaturated and hydroxyl triterpenoids and steroids)
التفاعل مع حمض السلفوريك ومبلا ماء حمض الاستيك
 3. Reaction with mineral acids and oxidant (Zlatkis-Zak reaction)
التفاعل مع الحمض المعدنية بوجود الموكسدة (Zlatkis-Zak reaction)
 4. Reaction with Antimony (III)-chloride (III)-chloride
التفاعل مع ثالث كلوريد (III)-chloride (III)-chloride

Prof. Dr. Isam Agha

36

TLC of Saponins



Prof. Dr. Isam Agha

37

HI determination تحديد منسوب انحلال الدم

- HI is the haemolyse index which indicate the milliliter number of blood which haemolysed by only one g of the drug على عدد مل الدم المنحل بمقادير ١ غ من العقار
- $HI_{sa} = HI_{st} \times C_{sa} / C_{st}$
- C_{sa} is the concentration of the sample solution in the last reagent glass in which the blood haemolysed
- C_{st} is the concentration of the standard solution in the last reagent glass in which the blood haemolysed

Prof. Dr. Isam Agha

38

HI determination تحديد منسوب احلال الدم

- To determine the HI we need the followings:
1. Phosphate puffer (PH=7.4)
 2. Blood suspension 4% in the Phosphate puffer (PH=7.4)
 3. Standard saponin dissolved in Phosphate puffer (PH=7.4)
 4. Sample of saponin dissolved in Phosphate puffer (PH=7.4)

Prof. Dr. Isam Agha

39

- ## HI determination تحديد منسوب احلال الدم
- We need two series of reagent glasses (sample , standard)
 - Add one ml. of Phosphate puffer (PH=7.4) to all glasses
2. Add One ml. of the standard solution in the second glass of the standard series, mix and take this one ml again to the third glass, mix and take one ml ... (still one ml in every glass)

Prof. Dr. Isam Agha

40

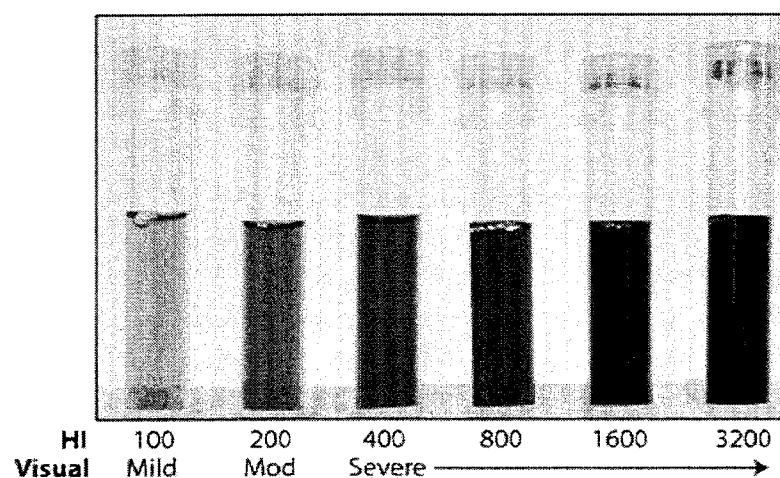
HI determination تحديد منسوب انحلال الدم

- Add One ml. of the sample solution in the second glass of the sample series, mix and take this one ml again to the third glass, mix and take one ml ... (still one ml in every glass)
- Add one ml of the blood suspension in every glass of two series.
- After more the 4 hour you must determine the last glass of two series in which the blood still totally haemolysed. And determine the concentration of this glass.

Prof. Dr. Isam Agha

41

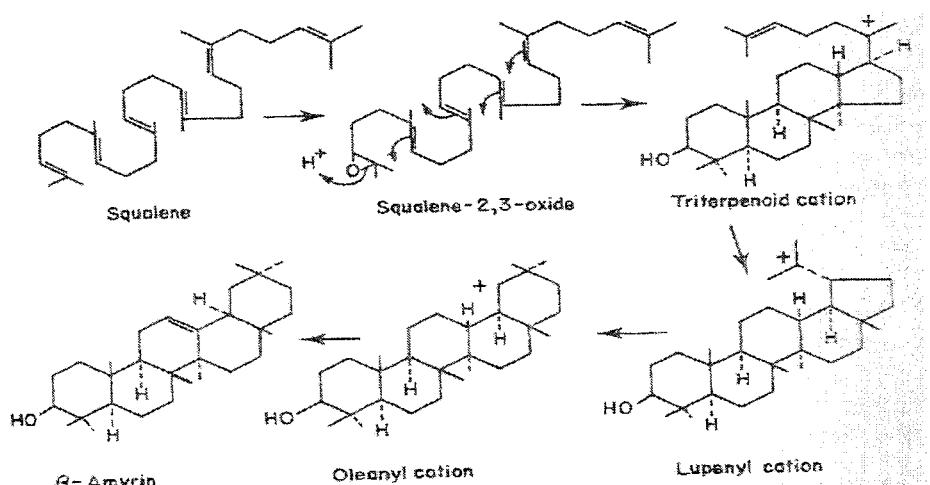
HI determination تحديد منسوب انحلال الدم



Prof. Dr. Isam Agha

42

Synthesis of saponins اصطناع الصابونينات



Prof. Dr. Isam Agha

43

Steroidal saponins الصابونينات الستيروئيدية

Distribution:

- ❖ Mainly in Monocotyledons [Dioscoreaceae (*Dioscorea* sp), Amaryllidaceae (*Agave* sp) & Liliaceae (*Trillium*)]
- ❖ Few in Dicotyledons [Scrophulariaceae (*Digitalis purpurea*)]

Important aglycones:

- ❖ Diosgenin & botogenin (*Dioscorea*).
- ❖ Hecogenin, manogenin & gitogenin (*Agave*).
- ❖ Sarsasapogenin & smilagenin (*Smilax*).

Glycosides:

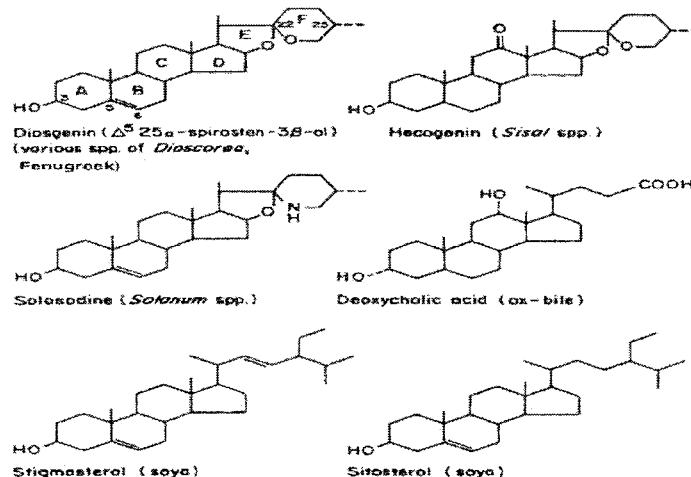
- ❖ Sarsaponin
- ❖ Digitonin & gitonin
- ❖ Balanitins 1-4
- ❖ Dioscin

Prof. Dr. Isam Agha

44

Natural steroids

الستيروئيدات الطبيعية

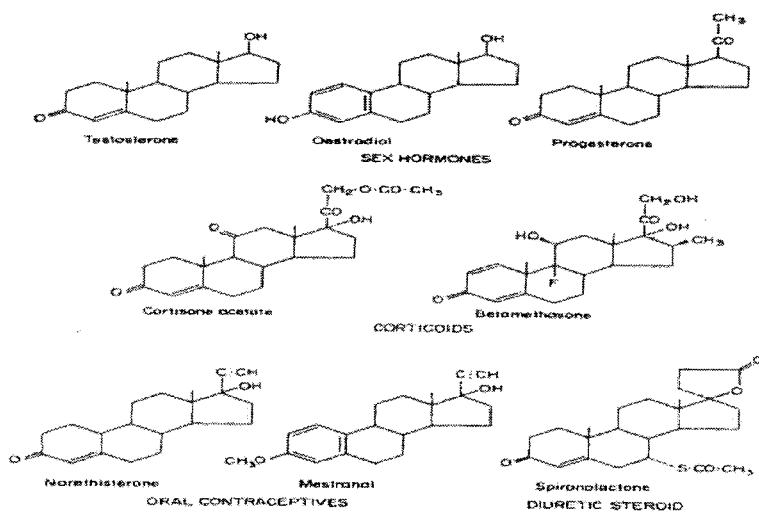


Prof. Dr. Isam Agha

45

Synthesized active steroids

الستيروئيدات الفعالة المصنعة



Prof. Dr. Isam Agha

46

Triterpenoidal Saponins - Licorice saponins

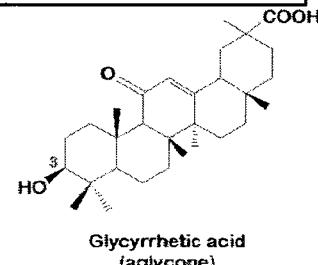
Source

Rhizomes & roots of licorice: 2-6 % of Glycyrrhizin

Glycyrrhizin = mixture of K+ & Ca++ salts of Glycyrrhizic acid

Glycyrrhizic acid ≡ Glycyrrhizinic acid

Structure
Glycyrrhizic acid = Glycyrrhetic
acid -3 O- diglucuronide (2 molecules
of glucuronic acid)

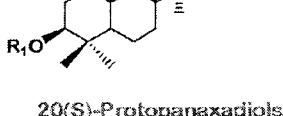


Glycyrrhetic acid ≡ Glycyrrhetic acid

Prof. Dr. Isam Agha

47

Ginsenosides

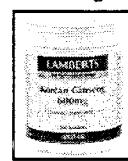
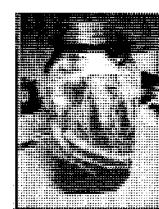


Ginsenoside	R ₁	R ₂
Rb ₁	-glc (2-1)glc	-glc (6-1)glc
Rb ₂	-glc (2-1)glc	-glc (6-1)arab
Rc	-glc (2-1)glc	-glc (2-1)arab
Rd	-glc (2-1)glc	-glc



20(S)-Protopanaxatriols

Ginsenoside	R ₁	R ₂
Re	-glc (2-1)rha	
Rf	-glc (2-1)glc	-H
Rg ₁	-glc	-glc
Rg ₂	-glc (2-1)rha	-H



Prof.



Cardio active glycosides

الغликوزيدات الفعالة في القلب

Prof. Dr. Isam Agha

49

Introduction

مقدمة

- ❖ **Also called cardiac glycosides.** تسمى **غликوزيدات قلبية**
- ❖ **Have specific & potent activity on cardiac muscles.** لها خواص وفعاليات نوعية على عضلة القلب
- ❖ **Small doses → therapeutic action.** بجرعات صغيرة **علاجية**
- ❖ **High doses → toxic & sometimes lethal.** بجرعات **كبيرة سامة**

Prof. Dr. Isam Agha

50

Distribution

- ❖ Mainly present in : Scrophulariaceae (*Digitalis*), Apocynaceae (*Strophanthus*) Liliaceae (*Urginea*), & Ranunculaceae (*Adonis*).
- ❖ Localized in different plant organs.:
 - seeds (*Strophanthus*)
 - leaves (*Digitalis*)
 - fruits (*Acokanthera*)
 - bulbs (*Urginea= Squill*)
 - roots (*Apocynum*)
 - herbs (*Adonis*)
- ❖ Best source is *Digitalis purpurea* (purple foxglove).

Prof. Dr. Isam Agha

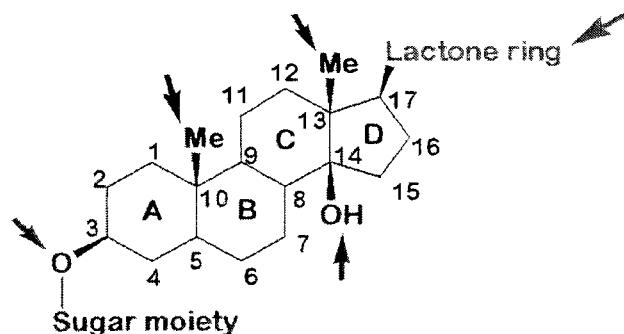
51

Chemical Structure

البنية الكيميائية

Steroidal nucleus with: نواة ستيروليندية مع

- ❖ An unsaturated lactone ring attached to C-17 with β -configuration 17 حلقة لاكتونية بالموقع 17
- ❖ A tertiary β -hydroxyl group at C-14. مجموعة هيدروكسيل 14 مجموعه هيدروکسیل بالموقع 14



Basic structure of cardioactive glycosides

Prof. Dr. Isam Agha

52

Chemical Structure

In addition to:

1. An axially oriented -OH at C-3 to which is attached the sugar moiety.
2. Methyl groups at C-10 & C-13.
3. Cis-fusion of rings C / D & in most cases that of rings A / B.
4. Other substituents on steroidal nucleus e.g.:
 - ⊕ Replacement of -CH₃ at C-10 by -CHO or -CH₂OH (e.g. *Strophanthus* glycosides).
 - ⊕ Additional-OHs present at C-1, C-2, C-5, C-11, C-12 & C-16.

Prof. Dr. Isam Agha

53

Chemical Structure-Sugar moiety

السكاكر المرتبطة

- ⊕ Characterized by being:
 - Attached to C-3 of the steroidal nucleus.
 - Variable number of sugar units (1 – 4).
- ⊕ Sugars are of different types: hexoses, methyl pentoses & 2-6 deoxy hexoses etc.....

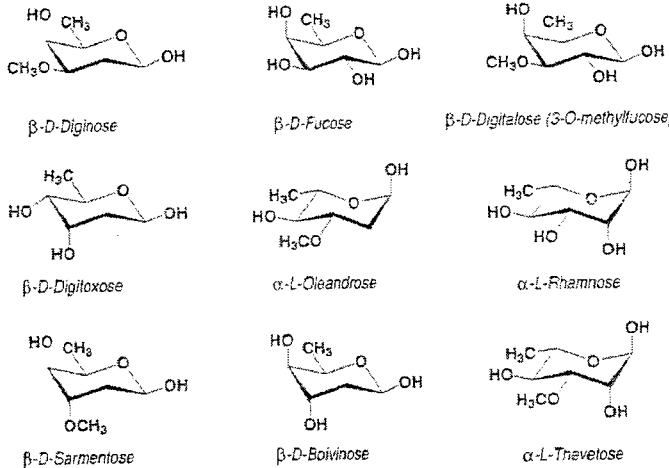
Type of sugar	Examples
1.Hexose	Glucose
2.Methyl pentose (6-deoxy hexose)	Rhamnose, Fucose & Allomethylose
3.2-6 deoxy hexose	Digitoxose & Boivinose
4.Methyl pentose-3-methyl ether	Digitalose
5.2-6 deoxy hexose-3-methyl ether	Cymarose, Sarmentose & Oleandrose

Prof. Dr. Isam Agha

54

Specific Sugars in Cardiac Glycosides

السكاكر النوعية



Prof. Dr. Isam Agha

55

Classification

تصنيف الغليكوزيدات القلبية

According to the type of lactone ring present in the aglycones as: تصنف وفق الحلقة اللاكتونية إلى كاردينوليد وبوفادينوليد

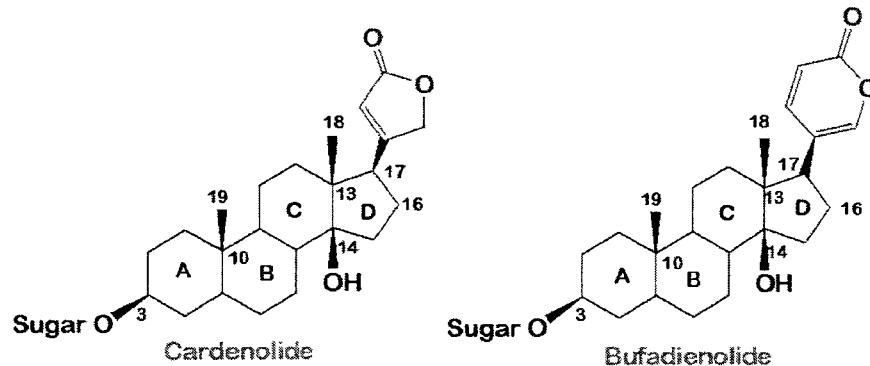
Points of differentiation الاختلافات	Cardenolides (Butenolides) الكاردينوليدات	Bufadienolides (Pentadienolide or Scilladienolides) البوفادينوليدات
1. Structure of lactone ring	5-membered (4 C + 1 O)	6-membered (5 C + 1 O)
2. UV absorbance	220 nm	300 nm
3. Tests for identification	+ ve (Kedde's, Legal's & Raymond's tests)	- ve (Kedde's, Legal's & Raymond's tests)
4. Examples : Glycosides of	<i>Digitalis & Strophanthus</i>	<i>Squill (Urginea)</i>

Prof. Dr. Isam Agha

56

Classification

تصنيف الغليكوزيدات القلبية



Prof. Dr. Isam Agha

57

Properties, Stability & Hydrolysis

الخواص، الانحلالية والحلمية

- * **Condition:** **crystalline, odorless & bitter taste.**
الحالة: بلورات بلا رائحة وبمذاق مر

- * **Solubility:** **most are hydrophobic, soluble in organic solvent, slightly soluble in water & freely soluble in alcohol.**
الانحلالية: معظمها كارهة للماء، ذوبابة في محلات العضوية ، قليلة الذوبان في الماء وذوبابة في الایتانول:

Except: ouabain highly hydroxylated, hydrophilic & water soluble.
باستثناء الوبائين القطيبي والذوباب بالماء

Prof. Dr. Isam Agha

58

Stability- Effect of acids

الذوبانية وتأثير الحموض

1. Mild acidic conditions → complete hydrolysis (cleavage of all glycosidic linkages) → aglycone + individual sugar units.
2-deoxy sugars directly attached to the aglycones are the most easily hydrolyzed
2. Drastic acidic conditions → elimination of OH group at C-14 → 14, 15 anhydro derivatives.

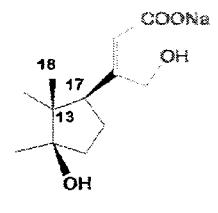
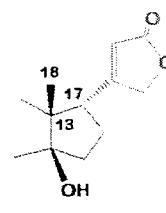
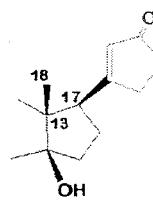
Prof. Dr. Isam Agha

59

Stability- Effect of alkalis

الثباتية تأثير القلويدات

- + NaOAc → Isomerisation of lactone ring from unstable β-oriented → stable α-oriented → inactive allo-cardenolides.
 - + Na₂CO₃ → deacylation of acylated sugars (e.g. of acetyl digitoxose in Lanatosides → corresponding *Purpurea* glycosides).
2. Drastic alkaline conditions: e.g. + strong NaOH solution → cleavage of lactone ring → carboxylic acid salt → complete loss of activity.



Prof. Dr. Isam Agha

60

Stability- Effect of hydrolyzing enzymes

الثباتية وتأثير انزيمات الحلمة

Glycosides + Enzymes → Gradual hydrolysis

» Example:

**Primary glycosides + α -glucosidase →
removal of terminal α -glucose →
Secondary glycosides**

Prof. Dr. Isam Agha

61

Chemical tests-

A- Color reactions due to the aglycone moiety

الاختبارات الكيميائية
تفاعلات كيميائية لكشف جسم الأغليكون

♦ Reactions due to the (-CH₂-) group of the lactone ring [characteristic for 5-membered lactone ring of cardenolides]:

1. Legal's test: + Na nitroprusside + NaOH → deep red color.
2. Raymond's test: + m-dinitrobenzene + NaOH → violet color → blue color.
3. Kedde's test: + Kedde's reagents A (3, 5 dinitrobenzoic acid) & B (NaOH) → violet color.
4. Baljet's test: + Baljet's reagent (picric acid + NaOH) → orange or red.

Prof. Dr. Isam Agha

62

Chemical tests-

A- Color reactions due to the aglycone moiety

الاختبارات الكيميائية

تفاعلات كيميائية لكشف جسم الأغليكون

♣ Tests for steroid nucleus: +ve with any steroid compound including cardenolides & bufadienolides:

1. Antimony trichloride test: + $\text{SbCl}_3 / \text{CCl}_4$ → blue or violet.
2. Liebermann's test: + glacial acetic acid + 1 drop conc. H_2SO_4 → red, violet, blue to green.

Prof. Dr. Isam Agha

63

Chemical tests-

A- Color reactions due to the aglycone moiety

الاختبارات الكيميائية

تفاعلات كيميائية لكشف الجسم السكري

Keller-Killiani's test (for 2-deoxy sugar):

Glycoside containing 2-deoxysugar + glacial acetic acid (+ traces of FeCl_3) + conc. H_2SO_4 (carefully added on wall of test tube → lower layer) → brown ring between the 2 layers.

Prof. Dr. Isam Agha

64

Quantitative determination

التحديد الكمي

- **Cardiac glycosides must be carefully determined in crude drugs & pharmaceutical formulations as:** يجب أن يتم التحديد الكمي للصابونينات بشكل دقيق وذلك للأسباب الآتية:
 1. **They are highly toxic.** سميتها العالية
 2. **Their amount in plant material is liable to variation (stage of development, seasonal variations, drying & storage conditions)** للتغير الكبير في نسبها في النباتات

Prof. Dr. Isam Agha

65

Methods of determination

طرق التحديد

1. **Colorimetric:** based on color tests e.g. Balget's or Kedde's. لونية
2. **Gravimetric.** وزنية
3. **Fluorimetric (combined with chromatography)** بقياس التألق
4. **Biological:** most widely used, based on determination of the minimum lethal dose that stops the heart under specified conditions. بيولوجية
5. **Immunoassay.** مناعية
6. **Chromatographic methods e.g. RP-HPLC (Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography).** طرق الكروماتوغرافيا

Prof. Dr. Isam Agha

66