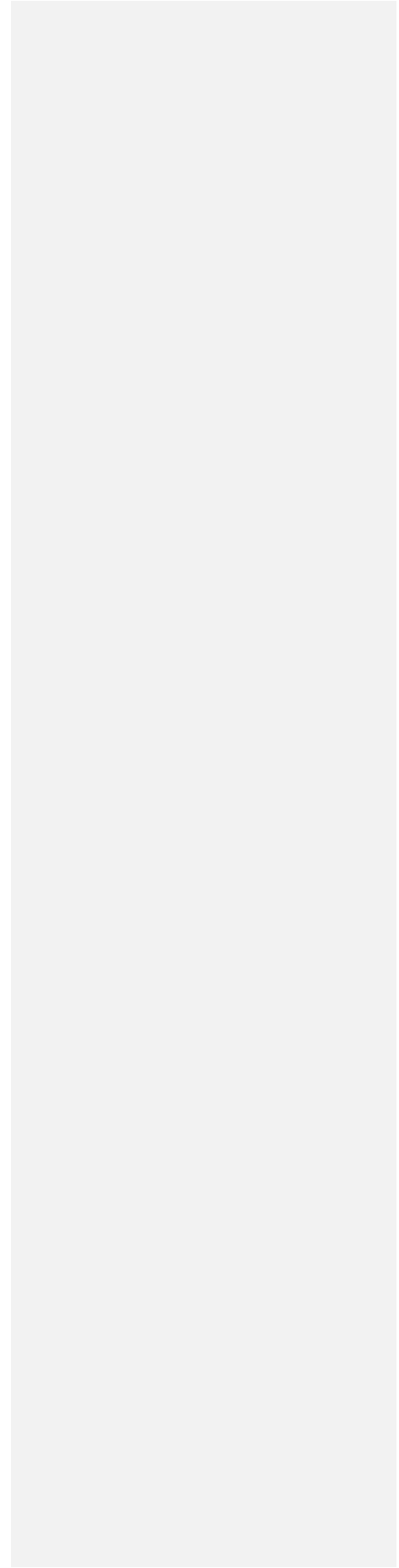


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه ی دکترای حرفه ای داروسازی

عنوان:

بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده اندام

هوایی گیاه *Echinophora cinerea*

استاد راهنما:

دکتر یلدا شکوهی نیا

نگارش:

مریم رشیدی

دی ماه ۱۳۹۲

Comment [Dp1]: . . سلیز آرم .

Comment [Dp2]: Bzar 16

Comment [Dp3]: Bzar 18 bold

Comment [Dp4]: bzar 18 bold

Comment [Dp5]: Bzar 16

تقدیر و تشکر

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی.....	۱
فصل اول : کلیات	
۱-۱- پیشگفتار.....	۴
۲-۱- هدف و انگیزه.....	۵
۳-۱- معرفی گیاه مورد بررسی.....	۵
۳-۱-۱- جایگاه گیاه مورد بررسی در رده بندی گیاهی.....	۵
۳-۱-۲- مشخصات گیاه شناسی عمومی شاخه نهاندانگان.....	۶
۳-۱-۳- مشخصات گیاه شناسی خانواده چتریان یا جعفری (Umbelliferae).....	۶
۳-۱-۴- مشخصات جنس <i>Echinophora</i>	۷
۳-۱-۵- خصوصیات گیاه شناسی <i>E. cinerea</i>	۷
۴-۱- موارد استعمال و خواص درمانی گونه های مختلف جنس <i>Echinophora</i>	۹
۵-۱- تحقیقات فیتوشیمی انجام شده بر روی گونه های مختلف جنس <i>Echinophora</i>	۹
۶-۱- معرفی مواد مؤثره‌ی مورد تحقیق.....	۱۰
۶-۱-۱- فلاونوئید ها.....	۱۰
۶-۱-۱-۱- معرفی.....	۱۰
۶-۱-۲- شیمی فلاونوئید ها.....	۱۰
۶-۱-۳- دسته بندی فلاونوئید ها.....	۱۱
۶-۱-۴- ویژگی های فارماکولوژیکی فلاونوئید ها.....	۱۱
۶-۲- کوئرستین.....	۱۲
۶-۲-۱- معرفی و ساختار شیمیایی.....	۱۲

Comment [Dp6]: B lotus 12

فاصله سطور . سانتیمتر : [Dp7]

- ۱-۲-۶-۲- خصوصیات فیزیکی..... ۱۲
- ۱-۲-۶-۳- گیاهانی که مشتقات کوئرستین از آنها استخراج شده است..... ۱۳
- ۱-۲-۶-۴- ویژگی های فارماکولوژیکی مشتقات کوئرستین..... ۱۳
- ۱-۶-۳- کامفروول..... ۱۴
- ۱-۳-۶-۱- معرفی و ساختار شیمیایی..... ۱۴
- ۱-۲-۳-۶-۱- خصوصیات فیزیکی..... ۱۴
- ۱-۳-۳-۶-۱- گیاهانی که مشتقات کامفروول از آنها استخراج شده است..... ۱۵
- ۱-۳-۶-۴- ویژگی های فارماکولوژیکی مشتقات کامفروول..... ۱۵
- ۱-۷- اهداف و فرضیات..... ۱۶
- ۱-۷-۱- اهداف اصلی..... ۱۶
- ۱-۷-۲- اهداف ویژه (اختصاصی)..... ۱۶
- ۱-۷-۳- فرضیات..... ۱۶
- ۱-۷-۴- سوالات پژوهشی..... ۱۶
- ۱-۷-۵- اهداف کاربردی..... ۱۷

فصل دوم : مواد و روش ها

- ۱-۲- دستگاه ها..... ۱۹
- ۲-۲- وسایل آزمایشگاهی..... ۲۰
- ۳-۲- مواد شیمیایی..... ۲۰
- ۴-۲- معرف مورد استفاده و طرز تهیه آن..... ۲۱
- ۵-۲- جمع آوری، شناسایی و آماده سازی گیاه..... ۲۱
- ۶-۲- تهیه ماده خام گیاهی..... ۲۱
- ۷-۲- تهیه عصاره تام..... ۲۱

۲۲.....	۸-۲- کروماتوگرافی ستونی.....
۲۲.....	۹-۲- کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC).....
۲۳.....	۱۰-۲- خالص سازی عصاره IB و فراکسیونه کردن آن.....
۲۴.....	۱۱-۲- فراکسیونه کردن 36D.....
۲۶.....	۱۲-۲- بررسی خلوص ترکیب مورد نظر.....
۲۶.....	۱۲-۲-۱- تهیه طیف NMR.....
۲۶.....	۱۲-۲-۱-۱- طیف COSY.....
۲۶.....	۱۲-۲-۲-۱- طیف HMBC.....
۲۷.....	۱۲-۲-۳-۱- طیف DEPT ₁₃₅
۲۷.....	۱۲-۲-۴-۱- طیف DEPT ₉₀
۲۷.....	۱۲-۲-۲- تهیه طیف جرمی (Mass).....

فصل سوم : نتایج

۲۹.....	۱-۳- مشخصات ظاهری گیاه.....
۲۹.....	۲-۳- استخراج کوئرستین گلیکوزید از گیاه <i>E. cinerea</i>
۲۹.....	۱-۲-۳- نتایج توزین عصاره ی تهیه شده.....
۲۹.....	۲-۲-۳- فراکسیونه کردن عصاره IB.....
۳۰.....	۳-۲-۳- فراکسیونه کردن 36D.....
۳۱.....	۱-۳-۲-۳- آنالیز طیف های ¹ HNMR، ¹³ CNMR و NMR دو بعدی فراکسیون 42E.....
۴۲.....	۲-۳-۲-۳- آنالیز طیف Mass فراکسیون 42E.....
۴۴.....	۳-۳-۲-۳- آنالیز طیف Mass فراکسیون 42F.....

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴۷.....	۱-۴- بحث و نتیجه گیری.....
---------	----------------------------

۴-۲- پیشنهادات..... ۵۰

منابع و مأخذ..... ۵۱

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- گیاه خوشاریزه کوهستانی (کوه پازنان از توابع شهرستان بویر احمد).....	۸
شکل ۲-۱- منشا فلاوانون ها، ایزو فلاوانون ها و فلاون ها.....	۱۰
شکل ۳-۱- ساختمان انواع فلاونوئید ها.....	۱۱
شکل ۴-۱- ساختار شیمیایی کوئرستین آگلیکون.....	۱۲
شکل ۵-۱- ساختار شیمیایی کامفرول آگلیکون.....	۱۴
شکل ۱-۲- فلوجارت خالص سازی ترکیبات جدا شده از گیاه <i>E. cinerea</i>	۲۵
شکل ۱-۳- کروماتوگرام HPLC فراکسیون 36D.....	۳۱
شکل ۲-۳- ساختار شیمیایی کوئرستین-۳-O-گلیکوزید.....	۳۱
شکل ۳-۳- طیف ¹ HNMR مربوط به فراکسیون 42E.....	۳۵
شکل ۴-۳- طیف ¹³ CNMR مربوط به فراکسیون 42E.....	۳۶
شکل ۵-۳- طیف DEPT ₁₃₅ مربوط به فراکسیون 42E.....	۳۷
شکل ۶-۳- طیف DEPT ₉₀ مربوط به فراکسیون 42E.....	۳۸
شکل ۷-۳- طیف HSQC مربوط به فراکسیون 42E.....	۳۹
شکل ۸-۳- طیف COSY مربوط به فراکسیون 42E.....	۴۰
شکل ۹-۳- ارتباطات COSY (³ J H-H) مولکول کوئرستین-۳-O-گلیکوزید.....	۳۲
شکل ۱۰-۳- طیف HMBC مربوط به فراکسیون 42E.....	۴۱
شکل ۱۱-۳- ارتباطات HMBC (^{2,3} J C-H) مولکول کوئرستین-۳-O-گلیکوزید.....	۳۳
شکل ۱۲-۳- طیف جرمی مربوط به فراکسیون 42E.....	۴۲
شکل ۱۳-۳- روشهای شکست فلاونوئیدها در دستگاه Mass.....	۴۳
شکل ۱۴-۳- مدل شکست کوئرستین به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی.....	۴۳

شکل ۳-۱۵- ساختار شیمیایی کامفرول گلیکوزید..... ۴۴

شکل ۳-۱۶- طیف جرمی مربوط به فراکسیون 42F..... ۴۴

شکل ۳-۱۷- مدل شکست کامفرول به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی..... ۴۵

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- رده بندی گیاه مورد بررسی از لحاظ جایگاه رده بندی.....	۶
جدول ۱-۲- دستگاههای مورد استفاده.....	۱۹
جدول ۲-۲- مواد و حلال های مورد استفاده.....	۲۰
جدول ۳-۲- خصوصیات ستون به کار رفته جهت کروماتوگرافی عصاره IB.....	۲۳
جدول ۴-۲- برنامه گرادینت HPLC فراکسیون 36D.....	۲۴
جدول ۵-۲- خصوصیات HPLC فراکسیون 36D.....	۲۴
جدول ۱-۳- خصوصیات فراکسیون های حاصل از ستون IB.....	۳۰
جدول ۲-۳- خصوصیات فراکسیون های حاصل از HPLC فراکسیون 36D.....	۳۰
جدول ۳-۳- خلاصه نتایج آنالیز طیف های $^1\text{H NMR}$ ، $^{13}\text{C NMR}$ و NMR دو بعدی فراکسیون 42E.....	۳۴

علائم و اختصارات

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

UV : Ultra Violet

TLC : Thin Layer Chromatography

VLC : Vacuum Liquid Chromatography

H-NMR : Hydrogen-Nuclear Magnetic Resonance

C-NMR : Carbon-Nuclear Magnetic Resonance

MS : Mass Spectroscopy

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

COSY : Correlation Spectroscopy

DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

μm : Micrometer

nm : Nanometer

μl : Microlitre

ml : Millilitre

PDA : photodiode array

MHz : Megahertz

Psi : Pounds per Square Inch

چکیده فارسی

این صفحه شماره یک ریاضی Comment [Dp8]: پایان نامه می باشد.

ساختار یافته باشد. Comment [Dp9]: کلمات بین - کلمه باشد.

مقدمه و هدف: گیاه خوشاریزه کوهستانی (*Echinophora cinerea*) گیاهی است از خانواده چتریان (Apiaceae) که اندام هوایی آن به عنوان سبزی و چاشنی ماست و پنیر و جهت درمان ناراحتی های گوارشی در استان چهار محال و بختیاری مورد استفاده قرار می گیرد. علی رغم مصارف سنتی خوراکی و درمانی گیاه و مطالعات فارماکولوژیکی (حدود ۱۳ پژوهش درون تنی، برون تنی، بالینی) بر روی انواع خوشاریزه، هیچ تلاشی برای جداسازی متابولیت های ثانویه عصاره ی آن صورت نگرفته است، از این رو جهت کاربرد صحیح گیاه بررسی فیتوشیمیایی آن امری ضروری به نظر می رسد.

مواد و روش ها: اندام هوایی پودر شده گیاه با حلال استون برای جدا کردن ترکیبات غیر پلار عصاره گیری شد، پودر باقیمانده پس از خشک شدن، با حلال اتانول-آب (۸:۲) به روش خیساندن عصاره گیری شد. عصاره هیدروآتانولی در حلال تغلیظ گردید. جهت فرآکسیونه کردن اولیه عصاره هیدروآتانولی از کروماتوگرافی تحت خلا با جاذب RP-18 و مخلوط حلالهای متانول و آب با کاهش پلاریته استفاده شد. فرآکسیونهای حاصل به وسیله NMR آنالیز گردیده و در صورتی که حاوی مواد ارزشمند بودند مجدداً با کروماتوگرافی ستونی فاز معکوس RP-18 خالص سازی شدند، در نهایت فرآکسیونها با HPLC فاز معکوس خالص سازی نهایی شدند. مواد خالص به دست آمده با روشهای اسپکتروسکوپی شامل NMR یک بعدی، دوبعدی (شامل طیفهای COSY, HSQC, HMBC و NOESY) و Mass شناسایی شدند.

یافته ها: پس از چند مرحله عصاره گیری، کروماتوگرافی ستونی و HPLC تهیه ای از عصاره هیدروآتانولی، دو ترکیب فلاونوئیدی گلیکوزیده (کوئرستین-۳-O-β-دی گلوکو پیرانوزید و کامفرول گلیکوزید) جداسازی و شناسایی گردیدند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به اینکه مشتقات فلاونوئیدی از مهمترین گروههای فنی موجود در طبیعت هستند و با توجه به ساختار ویژه آن ها که به عنوان شلات کننده های فلزی و برداشت کننده های رادیکال آزاد قوی عمل می کنند، این گیاه می تواند از لحاظ بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Echinophora cinerea*، عصاره هیدروآتانولی، کوئرستین-3-O- β -دی گلوکو پیرانوزید، کامفرول

گلیکوزید.

Comment [Dp10]: بیشتر از پنج کلمه نباشد.

فصل اول

کلیات

۱-۱- پیشگفتار

Comment [Dp11]: فاصله از لبه کاغذ سمت . سانتیمتر باشد.

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگانی انسان هم زمان بوده است. انسان در تمام دوران تاریخی چاره‌ای جز توسل به گیاهان نداشت و طی سالیان متمادی داروهای طبیعی خصوصاً داروهای گیاهی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می‌شدند و مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفتند [۱]. استفاده از این روش درمانی در تمامی تمدن‌ها سابقه دارد و یک جزء مهم در پیشرفت علم پزشکی رایج به شمار می‌رود.

Comment [Dp12]: فاصله از لبه کاغذ سمت چپ: سانتیمتر باشد. و پایین . سانتیمتر باشد.

اگر چه در نیم قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به شدت رواج یافت ولی اثرات جانبی آنها سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردیده است و این نکته که توسل به گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ یکی از روش‌های مؤثر در درمان بوده است، به خوبی روشن است [۲].

به تدریج با پیشرفت علوم، موارد مصرف گیاهان دارویی نیز تکامل یافت و تحقیقات فراوانی برای به کارگیری هر چه بهتر از آنها انجام شد.

با این حال، کاربرد ترکیبات کل گیاه برای دلایل درمانی یا آزمایشی چندین عیب دارد که عبارتند از:

الف) تغییر در مقدار مواد متشکله فعال با تغییر محل جغرافیایی، از یک فصل به فصل دیگر با بخشهای مختلف گیاه و مورفولوژی و شرایط اقلیمی و اکولوژی.

ب) پیدایش همزمان ترکیبات سینرژیستی ایجاد کننده اثرات نامطلوب، آنتاگونیست یا دیگر تغییرات غیر قابل پیش بینی فعالیت زیستی.

ج) تغییرات یا از دست دادن فعالیت زیستی وابسته به تغییر پذیری در جمع‌آوری، ذخیره و آماده سازی مواد خام [۳].

بنابراین جداسازی ترکیبات و استفاده از مواد خالص به جای گیاه مزیت‌هایی از جمله بررسی راحت تر اثر درمانی، تعیین دوز و سمیت می باشد.

اگر چه گیاهان همواره به عنوان منابع ارزشمند دارویی برای انسان مطرح بوده و می‌باشند ولی بررسی های علمی کافی بر روی آنها انجام نپذیرفته است و لذا هنوز گیاهان ناشناخته‌ی زیادی در جهان وجود دارد و بالطبع هزاران

Comment [Dp13]: فاصله از شماره صفحه تا لبه کاغذ . سانتیمتر باشد

ترکیب جدید ناشناس نیز در طبیعت موجود است که این مواد می‌توانند نه تنها به عنوان دارو بلکه به عنوان نقطه‌ی شروعی برای ساخت داروهای صناعی دیگر باشد [۲].

در این راستا علم فارماکوگنوزی در شاخه فیتوشیمیایی با بهره‌گیری از جدیدترین فن‌آوری و دستاوردهای علمی گام‌های بزرگی در جهت بررسی مواد موجود در گیاهان برداشته است [۴].

۱-۲- هدف و انگیزه

بی‌لوتوس Comment [Dp14]:

با توجه به شرایط آب و هوایی متنوع، کشور ما زیستگاه مناسبی برای رویش و گسترش (پرورش) اکثر گیاهان از جمله نهانانگان می‌باشد که در کشور ما بطور وسیع کشت می‌شوند.

بی‌لوتوس Comment [Dp15]:

گیاه *Echinophora cinerea* (Boiss.) Hedge and Lamond از خانواده چتریان یا جعفری (Umbelliferae) می‌باشد که بومی ارتفاعات جنوب غرب ایران می‌باشد. این گیاه در بین مردم منطقه تحت عنوان خوشاریزه کوهستانی [۵] شناخته می‌شود.

اثرات درمانی همچون کاهش شدت درد های دوران قاعدگی [۶]، برطرف کننده کرامپ شکمی و اسپاسم های روده ای [۷]، ضد قارچ [۸-۱۰]، ضد سرطان و ضد آپوپتوز [۱۱ و ۱۲]، ضد باکتری [۱۳]، آنتی اکسیدان [۱۴] و جاروبگری رادیکال های آزاد [۱۵] از انواع خوشاریزه گزارش شده است.

با توجه به مصرف خوراکی و درمانی این گیاه، اهمیت گیاهان خانواده چتریان و عدم انجام مطالعه بر روی متابولیت های ثانویه ی آن، تصمیم به بررسی فیتوشیمیایی گیاه مورد نظر از لحاظ وجود ترکیبات مؤثره گرفته شد.

۱-۳- معرفی گیاه مورد بررسی

گیاه مورد بررسی با نام علمی *Echinophora cinerea* (Boiss.) Hedge and Lamond از خانواده چتریان یا جعفری (Umbelliferae=Apiaceae) می‌باشد.

۱-۳-۱- جایگاه گیاه مورد بررسی در رده بندی گیاهی

در رده بندی این گیاه بر اساس سیستم طبقه بندی آرتور کرنگوئیست طبق جدول ۱-۱ می‌باشد.

جدول ۱-۱ رده بندی گیاه مورد بررسی از لحاظ جایگاه رده بندی

خل جدول فارسی بی: Comment [Dp16]
و لاتین تایمز

Division (شاخه)	Magnoliophyta
Class (رده)	Dicotyledons
Subclass (زیر رده)	Dialypetales
Order (راسته)	Umbelliferae
Family (خانواده)	Umbelliferae
Genus (جنس)	<i>Echinophora</i>
Species (گونه)	<i>cinerea</i>

۲-۳-۱- مشخصات گیاه شناسی عمومی شاخه نهاندانگان

در نهاندانگان تخمک درون برچه‌ای مسدود به نام تخمدان جای دارد و به عبارت دیگر دانه همواره در حفره تخمدان پوشیده باقی می‌ماند. علاوه بر وضع تخمک اندام‌های تولید مثل در نهاندانگان بطور کامل تکامل پیدا نموده و عضوی به نام گل به وجود آمده است. نهاندانگان دارای لقاح مضاعف هستند و ذخایر دانه بر اثر تقسیم تریپلوئید (آلبومن) به وجود می‌آید. نهاندانگان به دو گروه تک لپه و دولپه‌ای تقسیم می‌شوند [۱۶].

۳-۳-۱- مشخصات گیاه شناسی خانواده چتریان یا جعفری (Umbelliferae)

گیاهان تیره جعفری دارای اختصاصات ریخت شناسی بسیار یکنواخت و صفاتی بسیار ممتاز و ثابت و خاص خود هستند [۱۷]. در شناسایی جنس‌ها و گونه‌های این خانواده، ساختمان میوه و برگ‌های قاعده‌ای گیاه و نوع گل آذین و چتر ساده یا مرکب حائز اهمیت است. تمام اندام‌های گیاهان این خانواده دارای دستگاه ترشحاتی است. این خانواده دارای ۲۷۵ جنس و ۲۸۵۰ گونه می‌باشد که عموماً در مناطق معتدل هر دو نیمکره شمالی و جنوبی می‌رویند [۱۸]. گیاهان خانواده چتریان عموماً علفی، یک ساله و یا چند ساله و دارای ساقه تقریباً راست یا خزنده و معمولاً شیاردار هستند [۱۹]. بخش مرکزی ساقه بر اثر از بین رفتن سلول‌های مغزی خالی است و به لوله‌ها یا مجرای وسیع سرتاسری تبدیل می‌شود [۲۰]. نام خانواده چتریان از آرایش گل‌ها گرفته شده است که در دسته‌های چتر مانند (Umbelle) جمع شده‌اند. گل‌ها منفرد و معمولاً کوچک هستند. کاسبرگ ریز بوده یا وجود ندارند و پنج گلبرگ

معمولاً به رنگ سفید و ندرتاً صورتی رنگ می‌باشند [۲۱]. میوه های اعضای این خانواده عموماً خشک و متشکل از یک یا دو برچه به پشت و پهلو فشرده یا استوانه ای ناشکوفاست که بوسیله صفحه‌ای پهن یا باریک از یکدیگر جدا شده‌اند، بدون کرک یا کرک دار و پوشیده از فلس یا خار هستند [۲۲].

در بین گیاهان تیره جعفری گونه های زیادی وجود دارد که اغلب آنها مورد شناسایی مردم بوده و در طب مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۹].

۱-۳-۴- مشخصات جنس *Echinophora*

جنس *Echinophora* در ایران چهار گونه گیاه علفی چند ساله معطر دارد که *E. cinerea* و *E. platyloba* انحصاری ایران و دو گونه دیگر آن یعنی *E. orientalis* و *E. sibthorpiana* علاوه بر ایران در آناتولی، ارمنستان روسیه، ترکمنستان، افغانستان، شبه جزیره بالکان، کرت، قبرس و سوریه نیز می‌رویند [۵].

۱-۳-۵- خصوصیات گیاه شناسی *E. cinerea*

گیاه *E. cinerea* (شکل ۱-۱) که در زبان فارسی به آن خوشاریزه کوهستانی [۵] می‌گویند، گیاهی است پایا، کمی کرکین، بلند به ارتفاع ۱۲۰-۴۰ سانتی‌متر، دارای ساقه های ایستاده ضخیم، شیاردار و در بالا منتهی به پانیکولی از انشعابات کوتاه، برگ ها سبز، قاعده ایها به ابعاد ۱۵-۱۰/۵×۴-۹ سانتی متر، مثلثی تا پهن دراز، دارای ۳-۴ بار انشعابات شانه ای عمیق، پوشیده از کرک، با تقسیمات پهن دراز و تقسیمات کوچک محکم، خطی باریک، کوتاه، ناودانی به طول پنج میلی متر، ساقه ایها کوچک و تحلیل رفته هستند. گل ها زرد، گل آذین شامل تعداد زیادی چتر با ۷-۵ پرتو ناهمقد به طول ۱۰-۵ میلی متر، برگک های گریبان تخم مرغی، برگشته، ناهمقد به ابعاد ۲-۱×۳-۳ میلی متر، برگک های چترک ها پنج عدد، تخم مرغی ناهمقد به ابعاد ۳-۱/۵×۱/۵-۴ میلی متر، دمگل های چترک ۱۳-۱۰ عدد به طول ۴-۰ میلی متر، گل های بیرونی چترک دارای پا خامه برجسته، تقسیمات کاسه آن تخم مرغی، گسترده، گلبرگ های آن کوچک و کرکپوش یا کرکین است. میوه ها کرکدار، خامه آن به طول ۵/۳-۳ میلی متر است. موسم گل دهی در این گیاه تیر تا مرداد ماه می‌باشد. این گیاه در جنوب غرب ایران می‌روید [۲۳].

شکل ۱-۱ گیاه خوشاریزه کوهستانی (کوه پازنان از توابع شهرستان بویر احمد)

تمامی واحدها به فارسی: Comment [Dp17]:
نوشته شود یا سیستم بین‌المللی متریک

۱-۴- موارد استعمال و خواص درمانی گونه‌های مختلف جنس *Echinophora*

عصاره متانولی *E. cinerea* اثر ضد سرطان و ضد آپوپتوز داشته است [۱۲ و ۱۱].

مصرف خوراکی عصاره *E. platyloba* به عنوان کاهنده شدت درد های دوران قاعدگی در دختران موثر است. نتایج نشان می دهد که عصاره و پلاسبو هر دو در کاهش شدت درد موثر بوده، با این وجود تاثیر عصاره *E. platyloba* به مراتب بیشتر از پلاسبو بوده است [۶].

روغن فرار و عصاره هیدروالکلی *E. platyloba* اثر ضد اسپاسم روی عضله صاف ایلتوم جدا شده از رت های ویستار مذکر داشته و در کنترل کرامپ های شکمی موثر بوده است [۷].

E. platyloba اثرات ضد قارچ و ضد باکتری نشان داده است [۸، ۱۰، ۱۳]. روغن فرار و عصاره متانولی *E. platyloba* در *in vitro* اثر آنتی اکسیدانی داشته است [۱۴].

در مطالعه ای تازه بر روی روغن فرار *E. sibthorpiana* مشخص گردید که روغن فرار گیاه اثرات جاروبگری رادیکال های آزاد و ضد میکروبی داشته است [۱۵].

۱-۵- تحقیقات فیتوشیمی انجام شده بر روی گونه‌های مختلف جنس *Echinophora*

بررسی‌های انجام شده بر روی روغن فرار گیاه *E. platyloba* نشان داده است که مونوترپن ها و سزکوئی ترین ها ترکیب های اصلی اسانس بنخش هوایی این گیاه را تشکیل می‌دهند. *ocimene* و *phellandrene* (۲/۲۴٪) از ترکیبات اصلی مونوترپن هیدروکربنی اسانس بودند [۲۴].

نتایج حاصل از آنالیز روغن فرار به دست آمده از جوانه گل های *E. cinerea* نشان می‌دهد که آلفا-فلاندرن، بتا-

فلاندرن، آلفا-پینن، پارا-سیمن، لینالول و سیترونلول اجزای اصلی اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند [۲۵ و ۲۶].

به جز مطالعات صورت گرفته بر روی اسانس گیاه، مطالعه فیتوشیمی دیگری بر روی عصاره گیاهان این جنس انجام نشده است.

Comment [Dp18]: بین رفرانسهای متوالی (و) گذاشته شود. بین رفرانسهای غیر متوالی (،) گذاشته شود.

۶-۱- معرفی مواد مؤثره ی مورد تحقیق

۶-۱-۱- فلاونوئید ها

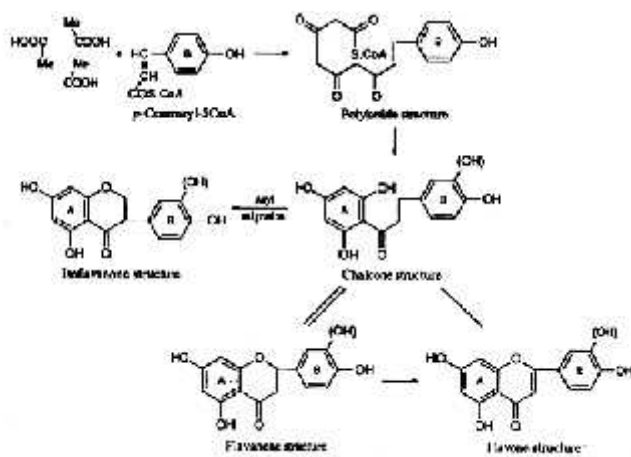
۶-۱-۱-۱- معرفی

فلاونوئید ها یکی از مهمترین گروههای فنلی موجود در طبیعت را تشکیل می دهند. بیش از ۴۰۰۰ فلاونوئید در منابع گیاهی شناسایی شده اند که به طور عمده به عنوان رنگدانه های ایجاد کننده تنوع رنگی برگ ها در پاییز و بسیاری از رنگ های زرد، نارنجی و قرمز موجود در گل ها و غذا ها می باشند [۲۷ و ۲۸].

فلاونوئید ها و ترکیبات نزدیک به آنها اغلب زرد رنگ می باشند (در لاتین واژه flavus به معنی رنگ زرد است). همچنین از فلاونوئید ها به عنوان شاخص های ارزشمند کموتاکسونومی در گیاهان استفاده وسیعی می گردد. این ترکیبات در خانواده های Polygonaceae (هفت بند)، Rutaceae (مرکبات)، Leguminosae (نخود)، Umbelliferae (چتریان) و Compositae (کاسنی) به وفور یافت می شوند [۲۸].

۶-۱-۲- شیمی فلاونوئید ها

از لحاظ بیوسنتتیک فلاونوئید ها از سه واحد استات و یک واحد فنیل پروپان تشکیل می گردند که در نتیجه آن یک پلی کتید بوجود آمده و این پلی کتید سپس توسط آنزیم سنتز کننده چالکون حلقوی می شود [۲۸ و ۲۹]. در شکل ۲-۱ منشا فلاونون ها، ایزو فلاونون ها و فلاون ها آمده است.

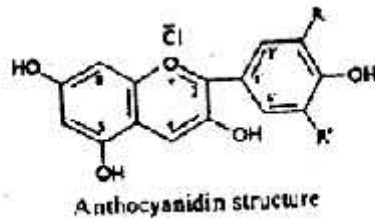
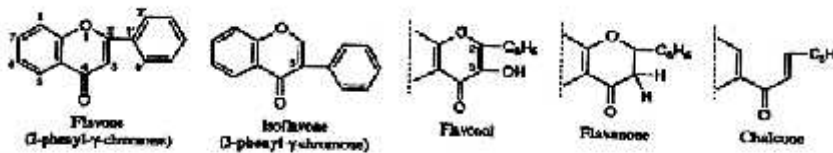


شکل ۲-۱ منشا فلاونون ها، ایزو فلاونون ها و فلاون ها

۳-۱-۶-۱- دسته بندی فلاونوئید ها

فلاونوئید ها، ترکیباتی با وزن مولکولی کم اند که در تمام گیاهان آوندی یافت می شوند و براساس ساختار و همچنین نحوه استخلاف های موجود بر روی آنها به فلاونول ها، فلاون ها، فلاونون ها، چالکون ها، ایزوفلاون ها و آنتوسیانیدین ها تقسیم می شوند [۲۷].

ساختمان انواع فلاونوئید ها در شکل ۳-۱ آمده است.



شکل ۳-۱ ساختمان انواع فلاونوئید ها [۲۸]

۳-۱-۶-۱-۴- ویژگی های فارماکولوژیکی فلاونوئید ها

فلاونوئید ها به دلیل دارا بودن فعالیت های ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد حساسیت، به عنوان محافظت کننده کبد، ضد لخته، ضد ویروس و ضد سرطان شناخته شده اند.

فلاونوئید ها به علت ساختار فنولی ویژه به عنوان شلات کننده های فلزی و برداشت کننده های رادیکال آزاد قوی عمل می کنند [۲۷]. برخی از گیاهان حاوی فلاونوئید دارای اثر مدر، ضد اسپاسم، ضد تومور، ضد باکتری یا ضد قارچ بوده و تعدادی هم به عنوان رنگ کننده در رنگرزی استفاده می شوند [۲۸،۳۰].

اثرات فیزیولوژیکی فلاونوئید ها به مقدار زیادی ناشی از خواص آنتی اکسیدانی آنها در پلاسما می باشد که به عنوان مهارکننده های آنزیم های اورنیتین کربوکسیلاز، پروتئین کیناز و کالمودولین عمل می کنند [۳۱]. مرگ سلول عصبی

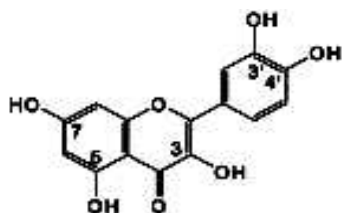
ناشی از استرس اکسیداتیو در بسیاری از آسیب شناسی ها شامل سکنه، ضربه و بیماریهای نظیر آلزایمر و پارکینسون دیده شده است.

طبیعت پلی فنولی فلاونوئید ها باعث جمع آوری رادیکالهای آزاد مثل سوپراکسید و رادیکالهای هیدروکسیل می شود. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می دهد که مصرف فلاونوئید ها با کاهش خطر بیماریهای عروق کرونری قلب، سکنه، دیابت و سرطان شامل سرطان های پستان، پروستات، ریه، کولون و معده همراه خواهد بود [۳۲ و ۳۱، ۲۷].

۱-۶-۲- کوئرستین

۱-۶-۲-۱- معرفی و ساختار شیمیایی

کوئرستین (Quercetin) 3,3',4',5,7- (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one; pentahydroxy flavone) یک محصول پلی فنلی در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدی در گیاهان است که به هر دو صورت آگلیکون و -گلیکوزید وجود دارد و دارای اثرات درمانی متعددی می باشد [۳۳]. ساختار شیمیایی کوئرستین آگلیکون در شکل ۴-۱ آمده است.



شکل ۴-۱ ساختار شیمیایی کوئرستین آگلیکون [۳۴]

۱-۶-۲-۱- خصوصیات فیزیکی

کوئرستین آگلیکون با فرمول مولکولی $C_{15}H_{10}O_7$ و جرم مولی $302/236$ گرم بر مول و دانسیته $1/799$ گرم بر سانتی متر مکعب و نقطه ذوب 316 درجه سانتی گراد به صورت پودر کریستالی زرد رنگی است که به رطوبت حساس است. در آب نامحلول ولی در محلول های قلیایی آبی، حل می شود [۳۵].

۱-۶-۲-۳- گیاهانی که مشتقات کوئرستین از آنها استخراج شده است

کوئرستین از گیاهانی از جمله *Solanum nigrum* [۳۶]، *Capparis spinosa* [۳۷]، *Camellia sinensis* [۳۹ و ۳۸، ۳۴]، *Allium cepa* [۳۹ و ۳۸، ۳۴، ۳۱]، *Malus spp* [۴۰، ۳۴] و تعدادی دیگر از گیاهان جداسازی شده است که در *Camellia sinensis* به صورت کوئرستین-۳-روتینوزید و در *Allium cepa* به صورت کوئرستین ۳-گلیکوزید می باشد. از عصاره متانولی اندام هوایی *Capparis spinosa* علاوه بر روتین، کوئرستین-۳-O-گلیکوزید و کوئرستین-۳-O-۷-رامنوزید، یک فلاونوئید جدید به نام *quercetin 3-O-[6 -L-rhamnosyl]-D-glucoside* جداسازی و شناسایی گردید [۳۷]. از برگ‌های *Solanum nigrum* علاوه بر *quercetin 3-galactosyl(1 6)galactoside*، *quercetin 3-galactoside*، *3-gentiobioside* و *3-galactoside*، دو کوئرستین گلیکوزید جدید به نام های *quercetin 3-O-(2^{Gal} -galactoside* و *quercetin 3-O-(1 6)-galactoside* (rhamnosyl)-glucosyl (1 6)-galactoside) و *quercetin 3-O-(1 2)-galactoside* (rhamnosyl)-glucosyl (1 2)-galactoside) جداسازی و شناسایی گردیدند [۳۶].

در *Malus spp* کوئرستین-O-گلیکوزیدهایی مثل *quercetin-3-O-(1 6)-D-glucoside* (rutin)، *quercetin-3-O-(1 6)-D-galactoside* (hyperin)، *quercetin-3-O-D-xyloside*، *quercetin-3-O-D-glucoside* (isoquercitrin)، *quercetin-3-O-L-arabinofuranoside* (avicularin) و *quercetin-3-O-L-rhamnoside* (quercitrin) (reynoutrin)، جداسازی و شناسایی شدند [۴۰، ۳۴].

۱-۶-۲-۴- ویژگی‌های فارماکولوژیکی مشتقات کوئرستین

کوئرستین و مشتقات گلیکوزیده آن مانند کوئرستین ۳-مونو گلیکوزید و کوئرستین-۴-O-مونو گلیکوزید دارای اثرات آنتی پروستانوئید و ضد التهابی [۳۳، ۳۱]، ضد آریتمی [۳۳، ۳۱]، ضد هایپرتانسیون [۳۳، ۳۱]، ضد سرطان [۴۱، ۳۸، ۳۳] و ضد ویروس می باشند [۳۳، ۳۱].

کوئرستین، کوئرستین-روتینوزید، ۳-O-متیل کوئرستین و بعضی مشتقات کونژوگه آن دارای اثرات آنتی اکسیدانی [۳۹ و ۳۸، ۳۴، ۳۱] و آنتی ترومبوز [۳۸، ۳۳، ۳۱] می باشند.

کوئرستین-۳'و۴'-دی-۴-O- - گلیکوزید و کوئرستین-۴'-O- - گلیکوزید دارای اثر آنتی اکسیدانی در شرایط برون تن می باشند [۴۲].

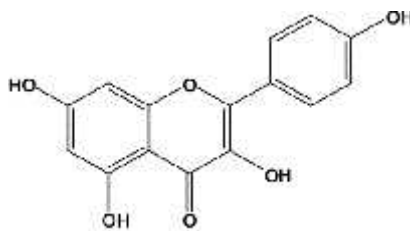
علاوه بر این ها کوئرستین روتینوزید، کوئرستین ۳-O- - دی گلوکورونید و کوئرستین ۴'-O- - دی گلوکورونید با جلوگیری از اکسیداسیون لیپو پروتئین های با دانسیته پایین (LDL) منجر به کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری های قلبی عروقی می شود [۳۳و۳۴،۳۸و۳۹،۴۲و۴۳]. همچنین با تنظیم چرخه سلولی، تداخل با محل های اتصال استروژن نوع II و مهار تیروزین کیناز باعث مهار پیشرفت سرطان های آزمایشگاهی در مدل های حیوانی می شوند [۳۳،۳۸،۴۱].

۱-۳-۶-۳- کامفرول

۱-۳-۶-۱- معرفی و ساختار شیمیایی

کامفرول (Kaempferol) (3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one) یک فلاونول طبیعی از دسته فلاونوئید ها است که دارای اثرات درمانی متعددی می باشد [۳۵]. کامفرول سه گروه هیدروکسی روی حلقه کرومون و یک گروه هیدروکسی در موقعیت ۴ حلقه فنیل متصل به کرومون دارد. ساختار شیمیایی کامفرول آگلیکون در شکل ۵-۱ آمده است.

کامفرول یک گروه هیدروکسی نسبت به کوئرستین کمتر دارد.



شکل ۵-۱ ساختار شیمیایی کامفرول آگلیکون [۳۵]

۱-۳-۶-۲- خصوصیات فیزیکی

کامفرول آگلیکون با فرمول مولکولی $C_{15}H_{10}O_6$ و جرم مولی ۲۸۶/۲۴ گرم بر مول و نقطه ذوب ۲۷۸-۲۷۶ درجه سانتی گراد به صورت جامد کریستالی زرد رنگی است که به میزان کمی در آب حل می شود ولی در اتانول داغ و دی اتیل اتر به طور کامل، قابل حل است [۳۵].

۱-۶-۳-۳ گیاهانی که مشتقات کامفرول از آنها استخراج شده است

کامفرول از گیاهانی از جمله *Peucedanum spp* [۴۴]، *Chresta scapigera* [۴۵]، *Loropetalum chinense* [۴۶]، *Morus alba L.* [۴۷]، *Tilia spp* [۴۸]، *Bauhinia forficata* [۴۹]، *Camellia sinensis* [۵۰]، *Olea europaea* [۵۱]، *Hypericum perforatum* [۵۱]، *Crataegus laevigata* [۵۱]، *Origanum vulgare* [۵۱]، *Lauris nobilis* [۵۱] و تعدادی دیگر از گیاهان جداسازی شده است که در *Loropetalum chinense* به صورت کامفرول-۳-۰-دی گلوکو پیرانوزید و *tiliroside* (مشتقی از کامفرول با بخش آسیل گلیکوزید) [۴۶]، در *Morus alba L.* به صورت کامفرول-۳-۰- گلوکو پیرانوزید [۴۷] و در *Bauhinia forficata* به صورت کامفرول-۳-۰-۷-۰- (دی رامنوزید *kaempferitrin*) [۴۹] می باشد.

دو کامفرول گلیکوزید جدید به نام‌های *-L-kaempferol-3-O-[2-O-D-galactopyranosyl-6-O-D-glucopyranoside]* و *-L-kaempferol-3-O-[2-O-D-xylopyranosyl-6-O-L-rhamnopyranosyl]-D-glucopyranoside* از *Camellia sinensis* جداسازی و شناسایی گردیدند [۵۰].

۱-۶-۳-۴ ویژگی‌های فارماکولوژیکی مشتقات کامفرول

کامفرول اثرات آنتی اکسیدانی [۳۵، ۴۷-۵۲]، ضد سرطانی [۳۵، ۴۸]، ضد میکروبی [۳۵، ۴۵ و ۴۶]، ضد ویروسی [۳۵، ۵۳]، ضد التهابی [۳۵] و ضد آلرژی [۳۵] دارد.

اثر آنتی اکسیدانی مشتقات گلیکوزیدی کامفرول [۳۵، ۴۷-۵۲] به واسطه تشکیل کمپلکس های شلاته کننده رادیکال های آزاد [۴۷]، مهار تشکیل آنزیم های پرو اکسیداتیو مثل سیکلواکسیژناز به خصوص در سیستم های بیولوژیک [۴۷]، جاروبگری رادیکال های DPPH [۴۷ و ۴۸، ۵۰]، مهار کننده گزانتین اکسیداز [۵۰] و مهار واکنش های اتو اکسیداسیون [۳۵] می باشد.

خصوصیات آنتی اکسیدانی فلاونول ها از جمله کامفرول به حضور و همچنین آرایش فضایی گروه های هیدروکسی، متوکسی و باند های گلیکوزیدی مرتبط است [۴۷].

اکسیداسیون سلولی توسط رادیکال های آزاد منجر به بسیاری از بیماری ها از جمله استئوپروزیس، روماتیسم و ... می شود. در نتیجه کامفرول با اثر آنتی اکسیدانی خود می تواند در درمان این بیماری ها موثر باشد [۴۸].

اثر آنتی اکسیدانی کامفرول با اثر ضد سرطانی آن مرتبط است. کامفرول با خاصیت مهار واکنش های اتو اکسیداسیون و جاروبگری رادیکال های آزاد، نقشی کلیدی در پیشگیری از سرطان دارد [۳۵،۴۸].

کامفرول-۳-O-دی گلوکوپیرانوزید و *tiliroside* فعالیت ضد باکتری، ضد قارچی و ضد مخمری دارند. همچنین به عنوان حشره کش و علف کش استفاده می شوند [۳۵،۴۵ و ۴۶].

کامفرول-۳-O- ()-دی رامنوزید روی سطح گلوکز سرم موثر است، به گونه ای که تجویز خوراکی آن منجر به اثر هیپو گلیسمیک در رت های سالم و دیابتی شده با آلوکسان می شود [۴۹].

۷-۱- اهداف و فرضیات

۷-۱-۱- اهداف اصلی

استخراج و تعیین ساختار متابولیت های ثانویه موجود در عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده اندام هوایی گیاه

Echinophora cinerea

۷-۱-۲- اهداف ویژه (اختصاصی)

۱. تهیه عصاره ی پلار (با حلال اتانول-آب) از گیاه *Echinophora cinerea*
۲. فراکسیونه کردن عصاره هیدروآتانولی به وسیله کروماتوگرافی ستونی فاز معکوس
۳. جداسازی و خالص سازی ترکیبات موجود در عصاره هیدروآتانولی به وسیله HPLC
۴. تعیین ساختار ترکیبات استخراج شده پلار با روش های اسپکتروسکوپی از قبیل UV، NMR و Mass
۵. آماده کردن کلیه ترکیبات استخراج شده برای بررسی اثر درمانی خاص با توجه به ساختار و مقدارشان.

۷-۱-۳- فرضیات

متابولیت های ثانویه ای در اندام هوایی خوشاریزه کوهستانی وجود دارند که شناسایی آنها می تواند در روشن تر ساختن اهمیت غذایی و دارویی گیاه مؤثر باشد.

۷-۱-۴- سوالات پژوهشی

چه متابولیت های ثانویه ای در عصاره پلار (هیدروآتانولی) خوشاریزه کوهستانی وجود دارد؟

۱-۷-۵- اهداف کاربردی

استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه گیاهانی که به مصارف خوراکی می‌رسند می‌تواند کمک شایانی به روشن ساختن ارزش غذایی و دارویی و عوارض جانبی آنها بنماید.

فصل دوم

مواد و روش ها

۱-۲- دستگاه‌ها

دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱-۲ آمده است.

جدول ۱-۲ دستگاه‌های مورد استفاده

کشور سازنده	شرکت سازنده	نام دستگاه و مدل آن
آمریکا	Hamilton	آسیاب برقی
آلمان	Heidolph	روتاری EV311
سوئیس	Camag	لامپ UV ویژه TLC دارای طول موجهای ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر
تایوان	Rosh RV RB	پمپ خلا مدل EP-200-H
آلمان	Sartorius	ترازوی دیجیتالی TE214S
آمریکا	Bruker	NMR(400MHz)
استرالیا	CSK	Powersonic410
آلمان	KH	شیکر
انگلستان	Electromantle	هیتر
آلمان	Memmert	بن‌ماری
کره جنوبی	899-6, Hoky-dong Young Lin Bldg	دستگاه HPLC
کره جنوبی	YL 9111S Binary Pump	پمپ HPLC
کره جنوبی	YL 9160 PDA Detector	دتکتور
آمریکا	Agilent	دستگاه Mass مدل 5973 network mass selective detector

۲-۲- وسایل آزمایشگاهی

ارلن، بشر، مزور، استوانه‌ی مدرج، میله شیشه‌ای، پنس، بالن ژوژه، بالن، لوله موئینه، تانک کروماتوگرافی، کاغذ صافی، ستون کروماتوگرافی، پلیت کروماتوگرافی، قیف بوخنر، ارنلن خلأ، ویال شیشه‌ای و قیف شیشه‌ای.

۲-۳- مواد شیمیایی

لیست مواد و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲-۲ آورده شده است.

جدول ۲-۲ مواد و حلال‌های مورد استفاده

نام ماده	شرکت سازنده
متانول	دکتر مجلی
متانول HPLC	Merck
استون	دکتر مجلی
بوتانول	Merck
استیک اسید	Merck
سدیم مولیبدات	Merck
کاغذ صافی	Whatman
اتانول	دکتر مجلی
سیلیکاژل فاز معکوس RP18	Merck
ورقه کروماتوگرافی لایه نازک	Merck
سریم سولفات	Merck
ستون HPLC معکوس (۲۵۰×۳۰ میلی متر)	Vertica

۲-۴- معرف مورد استفاده و طرز تهیه آن

۲۱ گرم سدیم مولیبدات را در ۴۶۹ میلی لیتر آب حل کرده، سپس یک گرم سریم سولفات به آن اضافه و حل نموده و سپس به آرامی ۳۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۶٪ را به آن اضافه کرده و نهایتاً در ۵۰ درجه سانتی گراد حرارت داده تا نمک ها حل شوند [۵۴].

Comment [Dp19]:

۲-۵- جمع آوری، شناسایی و آماده سازی گیاه

اندام هوایی گیاه خوشاریزه در خرداد ماه سال ۱۳۸۹ از کوه پازنان از توابع شهرستان بویر احمد واقع در ارتفاع ۱۸۰۰ متری از سطح دریا جمع آوری شد. نمونه گیاهی توسط دکتر عزیز الله جعفری (مرکز تحقیقات گیاهان یاسوج) شناسایی شد. نمونه هرباریومی گیاه *E. cinerea* به شماره هرباریومی ۱۱۲۲ در دانشکده داروسازی اصفهان نگهداری می شود.

۲-۶- تهیه ماده خام گیاهی

اندام هوایی خوشاریزه در شرایط سایه و هوای آزاد خشک شده و سپس توسط آسیاب برقی پودر گردید تا سطح تماس بیشتری با حلال مربوطه ایجاد شود.

۲-۷- تهیه عصاره تام

روش کار: ۱۰۰۰ گرم از اندام هوایی خشک و پودر شده گیاه برای جدا کردن ترکیبات غیر پلار به مدت دو شبانه روز در هشت لیتر استون خیسانده شد تا عمل استخراج صورت پذیرد. ظرف حاوی پودر گیاه و حلال، توسط دستگاه شیکر تکان داده و سپس عصاره بدست آمده توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید. این پروسه سه بار تکرار شد تا عمل استخراج به حداکثر شکل ممکن صورت پذیرد. در نهایت عصاره خشک به هم اضافه و توزین شد (Ext 1A). پودر باقیمانده پس از خشک شدن در هشت لیتر حلال اتانول-آب (۸:۲) خیسانده شد تا عمل استخراج صورت پذیرد. ظرف حاوی پودر گیاه و حلال، توسط دستگاه شیکر تکان داده و سپس عصاره بدست آمده توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید. این پروسه سه بار تکرار شد تا عمل استخراج به حداکثر شکل ممکن صورت پذیرد. در نهایت عصاره خشک به هم اضافه و توزین شد (Ext 1B).

Comment [Dp20]: تمام اعداد زیر ده باید به صورت املایی نوشته شود.

Comment [Dp21]:

۲-۸- کروماتوگرافی ستونی

برای خالص سازی ابتدایی ترکیبات از کروماتوگرافی ستونی استفاده شد، چون در این روش عمل تفکیک مواد بر روی مقدار زیادی از فاز ثابت انجام می گیرد.

کروماتوگرافی ستونی شامل یک فاز متحرک (مخلوط حلال های متانول و آب) و یک فاز ساکن (RP-18) بود که تفکیک مواد متناسب با حل شدن در دو فاز انجام شد [۵۵ و ۵۶].

نوع کروماتوگرافی انجام گرفته از نوع جذبی بود، چون فاز ساکن جامد و فاز متحرک مایع بود [۵۷]. نمونه در بالای ستون قرار داده شد تا نواری از ماده تشکیل شود، سپس حلال با عبور از میان ستون اجزای مخلوط را با خود حمل کرده، چون سرعت حرکت هر جزء به میزان جذب سطحی آن بر روی ماده داخل ستون بستگی دارد، بنابراین ماده ای که کمتر جذب شده سریع تر از ماده ای که با شدت بیشتری جذب شده است، حرکت می کند. اختلاف بین جذب های سطحی به حد کافی بود و جداسازی کامل انجام گرفت [۵۷].

ستون های مورد استفاده از لحاظ اندازه دارای طول و قطر متفاوتی می باشند. در این تحقیق از سیلیکاژل فاز معکوس RP-18 با اندازه ذره ای ۰/۳۰-۰/۱۵ میکرو متر به عنوان فاز ثابت استفاده شده است.

همچنین از سیستم حلال متانول:آب با نسبت های مختلف به عنوان سیستم فاز متحرک استفاده شد.

شماره های بکار رفته در این تحقیق نشانگر شماره قراردادی منسوب به هر ستون است و حرف بعد از آن نشانگر فراکسیون های هر ستون می باشد.

۲-۹- کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC)

کروماتوگرافی مایع یک نام عمومی برای انواع روش های کروماتوگرافی است که فاز متحرک آنها مایع است. کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی به نام های کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و همچنین با سرعت بالا نیز مشهور می باشد [۵۸].

دلیل استفاده از این روش آنالیز موادی بود که به علت عدم فرار بودن و یا ناپایداری در مقابل حرارت به وسیله گاز کروماتوگرافی قابل آنالیز نبودند [۵۶].

زیر نویس متن بی لوتوس
و نباید از سه سطر بیشتر باشد. در غیر این صورت
به قسمت واژه نامه منتقل می شود.

در دستگاه HPLC فاز متحرک از درون مخازن حلال توسط پمپ، با فشار و با سرعتی ثابت و یکنواخت وارد ستون شد. نمونه از طریق سیستم تزریق وارد جریان فاز متحرک در مدخل ورودی ستون شد. برای از بین بردن پیک حلال نمونه در قسمتی از فاز متحرک حل شد. برای تزریق نمونه از انژکتور رثوداین دربردارنده لوپ استفاده شد. لوپ مورد استفاده دارای حجم یک میلی لیتر بود.

ستون مهمترین قسمت دستگاه بوده و با کمک فاز متحرک باعث تفکیک مواد موجود در نمونه می گردد.

ستون مورد استفاده از جنس فولاد زنگ نزن حاوی جاذب RP-18 بود.

همچنین علاوه بر ستون اصلی از یک ستون محافظت کننده (گارد) برای محافظت از ستون اصلی استفاده گردید.

ستون گارد از نظر مواد داخل ستون شبیه ستون اصلی بود، با این تفاوت که از ستون اصلی کوچکتر و ارزان تر بود.

دکتور و ثبات قسمت های دیگر HPLC هستند. نوع دکتور مورد استفاده در آنالیز بستگی به ماهیت نمونه دارد

[۵۵]. دکتور مورد استفاده در این تحقیق، دکتور PDA بود [۵۹-۵۶].

۲-۱۰- خالص سازی عصاره IB و فراکسیونه کردن آن

بخشی از عصاره IB (۳۰ گرم) با استفاده از ستون کروماتوگرافی و ۱۵۰ گرم سیلیکاژل RP-18 و با استفاده از فاز

متحرک متانول و آب فراکسیونه و نهایتاً شش فراکسیون به نام های 36A-36F بدست آمد. بر روی فراکسیون های

حاصل در مراحل بعد خالص سازی بیشتری صورت گرفت.

خصوصیات ستون به کار رفته جهت کروماتوگرافی عصاره IB در جدول شماره ۲-۳ مشاهده می شود.

جدول ۲-۳ خصوصیات ستون به کار رفته جهت کروماتوگرافی عصاره IB

میزان بارگذاری ستون	۳۰ گرم
حجم ستون	۱۵۰ میلی لیتر
فاز متحرک	متانول : آب (۹۵:۵ تا ۱۰۰:۰)
حجم فراکسیون ها	۵۰ میلی لیتر

۱۱-۲- فراکسیون 36 D

بخشی از فراکسیون 36 D (۱۰۰ میلی گرم) توسط دستگاه HPLC و با استفاده از ستون حاوی سیلیکاژل RP-18 و فاز متحرک متانول و آب (طبق جدول ۲-۴) فراکسیونه و شش فراکسیون 42 A - 42 F بدست آمد. خصوصیات HPLC فراکسیون 36D در جدول شماره ۲-۵ مشاهده می شود.

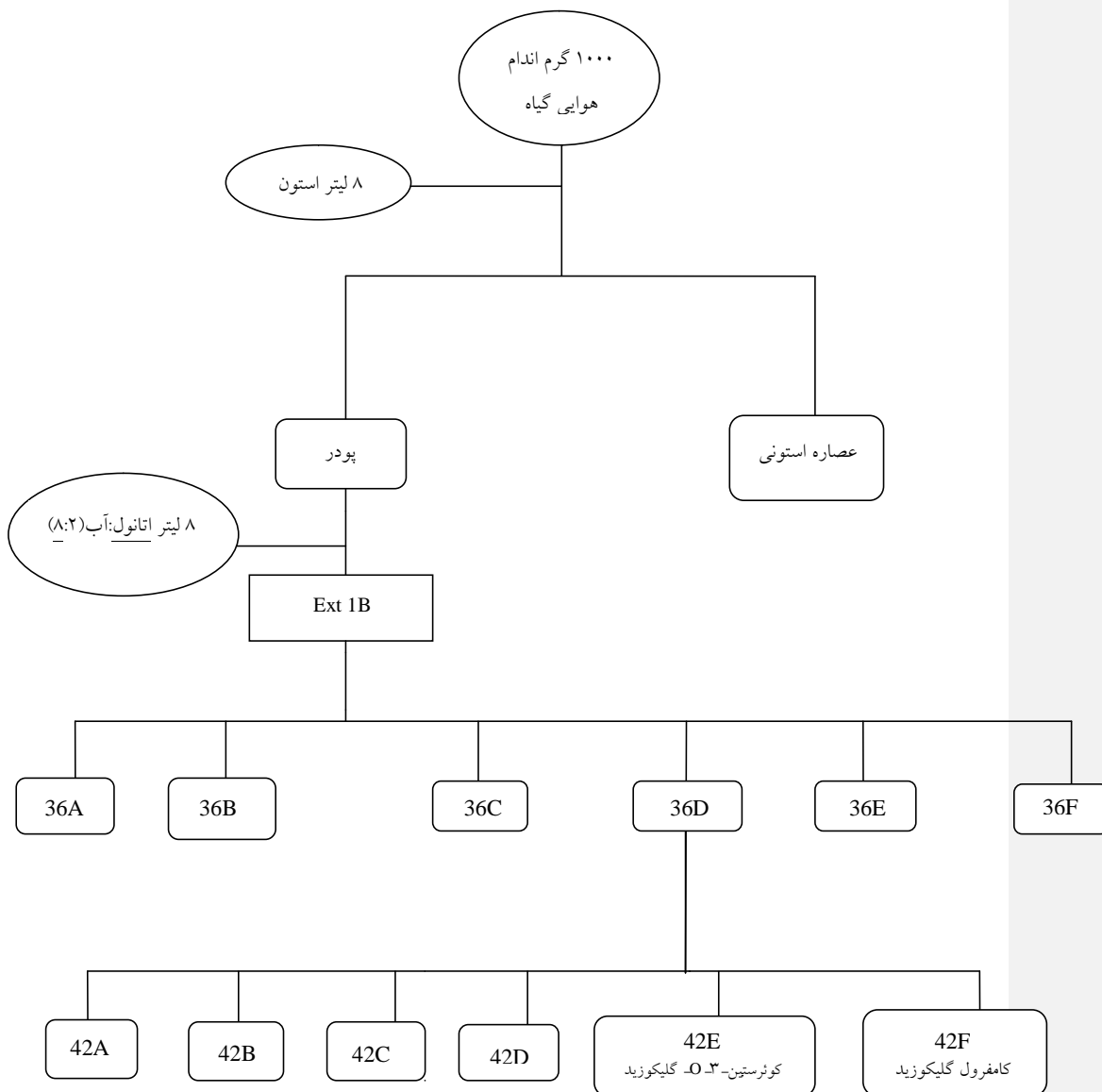
جدول ۲-۴ برنامه گرادیانت HPLC فراکسیون 36 D

زمان (بر حسب دقیقه)	درصد متانول در آب
۰	%۴۰
۲۰	%۷۰
۲۵	%۱۰۰
۳۰	%۱۰۰

جدول ۲-۵ خصوصیات HPLC فراکسیون 36 D

۱۰۰ میلی گرم	میزان بارگذاری ستون
۱۷۵ میلی لیتر	حجم ستون
متانول:آب (۶:۴ تا ۱۰۰:۰)	فاز متحرک
۱۰ میلی لیتر در دقیقه	میزان جریان فاز متحرک
۷۰۰ - ۱۳۵۰ psi	فشار
PDA (۲۵۴ nm, ۳۶۶ nm, ۲۱۰ nm)	دکتور

شکل ۱-۲ فلوجارت خالص سازی ترکیبات استخراج شده از گیاه *E. cinerea* را نشان می دهد.



شکل ۱-۲ فلوجارت خالص سازی ترکیبات جدا شده از گیاه *E. cinerea*

۱۲-۲- بررسی خلوص ترکیب مورد نظر

در این مرحله شناسایی و تطابق ساختار ترکیبات خالص سازی شده با استفاده از روش های آنالیز دستگامی NMR و Mass صورت گرفت.

۱-۱۲-۲- تهیه طیف NMR

جهت بدست آوردن اطلاعات در مورد ساختمان شیمیایی و خلوص ترکیبات مختلف، طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ای ارزنده تر از بقیه طیف‌ها از جمله طیف‌های ماوراء بنفش و مادون قرمز است. طیف رزونانس مغناطیسی هسته به تعیین تعداد و نوع هیدروژن‌ها و کربن‌های موجود در ساختمان ماده مورد نظر و ماهیت اطراف این اتم‌ها می‌پردازد [۶۰]. از ترکیب جدا شده از گیاه مورد بررسی طیف های $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و NMR دو بعدی در حلال متانول دوتریه تهیه شد.

از مواردی که $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ با هم متفاوت هستند، می توان به موارد زیر اشاره نمود:

- پیک های ^{13}C در محدوده وسیع تری از جابجایی شیمیایی در مقایسه با پروتون توزیع شده اند.
- شدت پیک ^{13}C در طیف معمولی متناسب با تعداد اتم های کربن آن پیک نمی باشد.
- هسته ^{13}C فراوانی کمتری دارد و حساسیت آن کمتر از پروتون می باشد. بنابراین به نمونه بیشتر و زمان طیف گیری طولانی تری نیاز داریم [۶۱].

۱-۱۲-۲-۱- طیف COSY

COSY یک طیف نگاری ارتباطی ($^1\text{H-}^1\text{H}$) نامیده می شود و ارتباط دو هیدروژن و سینال را با هم نشان می دهد [۶۱].

۱-۱۲-۲-۲- طیف HMBC

در این آزمایش بر روی کوپلاژ های در طول دو و سه پیوند ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ ، $^3\text{J}_{\text{CH}}$) سرمایه گذاری می شود. این طیف به طور غیر مستقیم ارتباط کربن-کربن (البته نه $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$) را نشان می دهد و به علاوه قادر خواهد بود که کربن های نوع چهارم را به پروتون های نزدیک به آن ارتباط دهد [۶۱].

1 . Hydrogen-Nuclear magnetic resonance
2 . Carbon-Nuclear magnetic resonance

۲-۱۲-۱-۳- طیف DEPT₁₃₅

طیفی است که انواع چند شاخگی کربن ها را نشان می دهد. در این طیف CH و CH₃ بالا و CH₂ پایین قرار می گیرند.

۲-۱۲-۱-۴- طیف DEPT₉₀

طیفی است که انواع چند شاخگی کربن ها را نشان می دهد. در این طیف CH ها بالا قرار می گیرند.

۲-۱۲-۲- تهیه طیف جرمی (Mass)

در این تکنیک که جهت آنالیز ترکیبات آلی و تعیین ساختمان مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد، مولکولها (در حالت گازی و فشار بسیار پایین) توسط جریانی از الکترون های پراثرژی بمباران می شود. در اثر برخورد الکترون های پراثرژی با مولکولهای ماده، یک الکترون ظرفیتی از مولکول خنثی جدا شده و یون مولکولی (کاتیون رادیکال) تولید می گردد. سپس یونهای تولید شده بر مبنای نسبت جرم به بار دسته بندی و فراوانی نسبی یونهای مختلف ایجاد شده ثبت می شود [۶۰]. طیف جرمی اطلاعات بسیار مهمی از جمله جرم مولکولی ترکیب مورد بررسی را در اختیار محقق قرار می دهد.

فصل سوم

نتایج

۳-۱- مشخصات ظاهری گیاه

گیاه *E. cinerea* با نام فارسی خوشاریزه، گیاهی است پایا، بلند، به ارتفاع ۱۲۰-۴۰ سانتی متر.

ساقه : ایستاده، شیار دار و ضخیم.

برگ ها : سبز، پوشیده از کرک، با تقسیمات پهن دراز و کوچک محکم، خطی باریک، کوتاه.

گل ها : زرد، گل آذین شامل تعداد زیادی چتر با ۵-۷ پرتو ناهمقد.

میوه : کرکدار

۳-۲- استخراج کوئرستین گلیکوزید از گیاه *E. cinerea*

۳-۲-۱- نتایج توزین عصاره ی تهیه شده

وزن عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده حاصل از ۱۰۰۰ گرم پودر اندام هوایی گیاه خوشاریزه ۲۰۰/۹ گرم بود که

معادل ۲۰/۰۹ w/w % است.

۳-۲-۲- فراکسیونه کردن عصاره 1B

بخشی از عصاره 1B (۳۰ گرم) با استفاده از VLC^۱ و سیلیکاژل فاز معکوس RP-18 (۰/۰۳۰-۰/۰۱۵ میکرومتر) با

استفاده از فاز متحرک متانول و آب خالص سازی شده که نهایتاً شش فراکسیون به نام های 36A-36F مطابق جدول

۳-۱ بدست آمد. تقسیم بندی فراکسیون ها بر مبنای الگوی TLC آنها صورت گرفت.

1 . Vacuum Liquid Chromatography
2 . Thin layer chromatography

جدول ۳-۱ خصوصیات فراکسیون های حاصل از ستون 1B

MARK	TUBES	ELUENT	WEIGHT	UV _{254/366 nm}
36A	1-6	MeOH:H ₂ O (5:95)	14.6515 (g)	آبی، بنفش/+
36B	7-12	MeOH:H ₂ O (1:9)	2.681 (g)	آبی، بنفش/+
36C	13-20	MeOH:H ₂ O (2:8)(3:7)	0.7203 (g)	آبی، سبز/+
36D	21-34	MeOH:H ₂ O (5:5)(7:3)(9:1)	2.581 (g)	آبی، سبز/+
36E	35-41	MeOH:H ₂ O (9:1)	0.486 (g)	آبی، سبز/+
36F	42-45	MeOH:H ₂ O (9:1)(10:0)	0.6322 (g)	آبی، سبز/+

۳-۲-۳- فراکسیونه کردن 36D

بخشی از فراکسیون 36D (۱۰۰ میلی گرم) توسط دستگاه HPLC و با استفاده از ستون حاوی سیلیکاژل RP-18 و فاز متحرک متانول و آب خالص سازی شد و در نتیجه شش فراکسیون به نام های 42A-42F به شرح جدول ۳-۲ بدست آمد.

شکل ۳-۱ کروماتوگرام HPLC فراکسیون 36D را نشان می دهد.

جدول ۳-۲ خصوصیات فراکسیون های حاصل از HPLC فراکسیون 36D

MARK	TUBES	ELUENT	WEIGHT	UV _{254/366 nm}
42A	2	MeOH:H ₂ O (4:6)	0.0047 (g)	آبی/-
42B	3	MeOH:H ₂ O (4:6)	0.0016 (g)	آبی/-
42C	6-7	MeOH:H ₂ O (4:6)	0.0031 (g)	آبی/-
42D	9-12	MeOH:H ₂ O (4:6)	0.0181 (g)	آبی، سبز/+
42E	20-21	MeOH:H ₂ O (7:3)	0.0204 (g)	آبی، سبز/+
42F	25	MeOH:H ₂ O (10:0)	0.0019 (g)	آبی، سبز/+

— 36D (254 nm)

— 36D (366 nm)

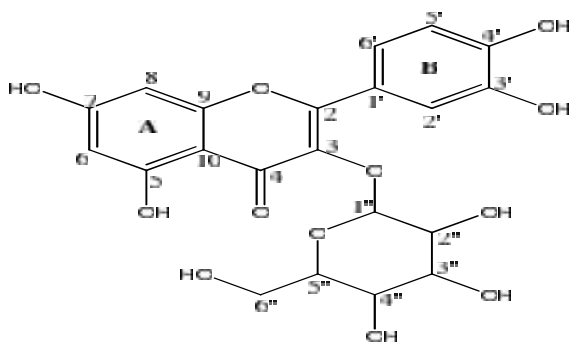
— 36D (210 nm)

شکل ۱-۳ کروماتوگرام HPLC فراکسیون 36D

(سیستم حلال متانول:آب (۶:۱ تا ۱۰:۱)، طول موج ۲۱۰، ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر)

فراکسیون 42E در آنالیز TLC یک لکه نشان می داد که مورد آنالیز $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ ، NMR دو بعدی و Mass قرار گرفت. نتایج حاصل از طیف ها نشان می دهند که این ماده یک کوئرستین-۳-گلیکوزید (شکل ۲-۳) می باشد.

۱-۳-۲-۳ آنالیز طیف های $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و NMR دو بعدی فراکسیون 42E



شکل ۲-۳ ساختار شیمیایی کوئرستین-۳-گلیکوزید

طیف $^1\text{H-NMR}$: از نمای کلی طیف $^1\text{H-NMR}$ (شکل ۳-۳) مشخص است که ترکیب مورد بررسی دارای هیدروژنهای حلقه آروماتیک A و B (6.26-7.47 ppm) و هیدروژنهای متصل به اکسیژن (3.14-3.64 ppm)، مربوط به قند می باشد.

طیف های $^{13}\text{C-NMR}$ و DEPT: با توجه به طیف $^{13}\text{C-NMR}$ (شکل ۴-۳) ۲۱ کربن در این مولکول وجود دارد. پیک های کوتاه تر نشان دهنده کربن های نوع چهارم هستند که زمان آسایش کمتری دارند. در این مولکول ۱۰ کربن نوع چهارم وجود دارد.

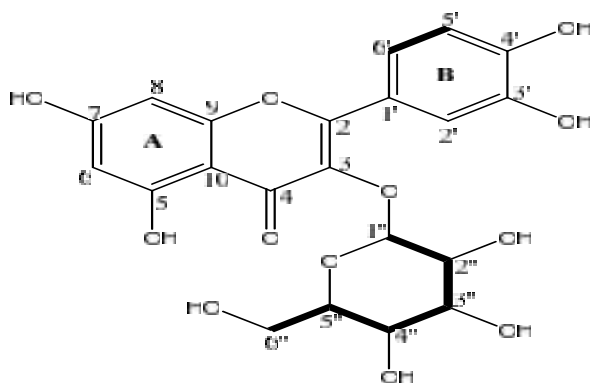
چند شاخگی کربن های دیگر با توجه به طیف های DEPT₁₃₅ (شکل ۵-۳) و DEPT₉₀ (شکل ۶-۳) مشخص می شوند. با توجه به طیف DEPT₁₃₅، مجموعاً ۱۰ مورد CH و CH₃ می تواند وجود داشته باشد که با توجه به طیف DEPT₉₀ هر ۱۰ مورد CH هستند. به علاوه طیف DEPT₁₃₅ نشان می دهد که یک مورد CH₂ در مولکول وجود دارد.

به طور کلی ۱۲ مورد کربن آروماتیک موجود است که به حلقه های A، B و C مربوط هستند. کربن های مولکول قند شامل کربن های CH اکسیژنه (70-80 ppm)، یک CH₂ اکسیژنه (62.5 ppm) و یک کربن آنومریک (104.4 ppm) می باشد.

کربن کربونیل در 179.4 ppm مشخص است.

طیف HSQC در طیف HSQC (شکل ۳-۷) ارتباط کربنها و هیدروژنهای J یک مشخص می شود، پس تعیین می گردد که کدام هیدروژن به کدام کربن متصل است.

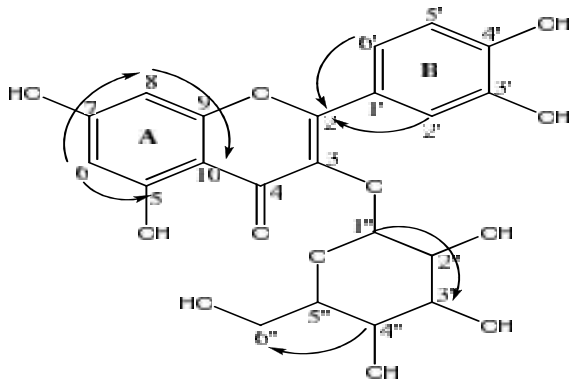
طیف COSY در طیف COSY (شکل ۳-۸) ارتباط هیدروژنهای J معادل ۳ (ویسینال) دیده می شود که موارد شاخص در شکل ۳-۹ آمده است.



شکل ۳-۹ ارتباطات COSY (H-H) مولکول کوئرستین-۳-O-گلیکوزید

(حلال متانول دوتریه، قدرت دستگاه ۴۰۰ مگا هرتز)

طیف HMBC در طیف HMBC (شکل ۳-۱۰) ارتباط هیدروژنهای و کربنها با J معادل ۲ و ۳ را نشان می دهد. از موارد شاخص در این طیف می توان به ارتباط هیدروژن های H-6 (6.08 ppm) و H-8 (6.26 ppm) با کربن C-10 (105.6 ppm) اشاره کرد. به علاوه برای تعیین محل دقیق اتصال قند ارتباط هیدروژن آنومریک (5.13 ppm) با C-1' (104.4 ppm) مفید است. ارتباطات مهم در تعیین ساختار این مولکول در شکل ۳-۱۱ آمده است.



شکل ۳-۱۱ ارتباطات HMBC (H-C/13C) مولکول کوئرستین-۳-O-گلیکوزید

(حلال متانول دوتریه، قدرت دستگاه ۴۰۰ مگا هرتز)

نوع قند با توجه به اطلاعات موجود در متون [۶۲] در مورد CNMR ترکیب و اطلاعات طیف Mass تعیین شده است.

در مجموع با توجه به اطلاعات حاصل از طیف های NMR یک بعدی، دو بعدی، Mass و مقایسه با متون [۶۲]

ساختار ترکیب 42E یک کوئرستین-۳-O-دی گلوکو پیرانوزید معرفی می گردد.

جدول ۳-۳ خلاصه نتایج آنالیز طیف های $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و NMR دو بعدی فراکسیون 42E را نشان می دهد.

جدول ۳-۳ خلاصه نتایج آنالیز طیف های $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و NMR دو بعدی فراکسیون 42E

Mark	CNMR	Multiplit	HNMR	Multiplit	J	Integral	COSY	HMBC	
								قوی	ضعیف
4	179.4	C	-				-	-/6,8	
7	165.9	C	-				-	6,8/-	
5	162.9	C	-				-	6,8/-	

9	159.0	C	-				-	8/-
2	158.4	C	-				-	2,6/5,8
4	149.8	C	-				-	-
3	145.8	C	-				-	-
3	135.6	C	-				-	17/-
6	123.2	CH	7.47	dd	$J_1=2$ $J_2=8.4$	1	5	-
1	123.0	C					-	-
2	117.6	CH	7.62	d	2	1	-	-
5	116.0	CH	6.76	d	8.4	1	6	-
10	105.6	C	-				-	6,8/-
1	104.4	CH	5.13	d	7.6	1	2	6,8/
6	99.9	CH	6.08	d	1.6	1	-	8/-
8	94.78	CH	6.26	d	1.6	1	-	6/-
5	78.3	CH	3.14	m	-	1	6a	-/1
3	78.1	CH	3.20	m	-			-/1
2	75.7	CH	3.37	m	-	2	1	17/-
4	71.1	CH	3.26	m	-	1		-
6	62.5	CH a	3.64	dd	$J_1=2.4$ $J_2=11.8$	1	6b	4/-
		CH b	3.46	d	$J=11.8$	1	6a,5	-

شکل ۳-۳ طیف $^1\text{HNMR}$ مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۴۰۰ مگا هرتز)

شکل ۴-۳ طیف $^{13}\text{CNMR}$ مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۱۰۰ مگا هرتز)

شکل ۳-۵ طیف DEPT₁₃₅ مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۱۰۰ مگا هرتز)

شکل ۳-۶ طیف DEPT₉₀ مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۱۰۰ مگا هرتز)

شکل ۳-۷ طیف HSQC مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۴۰۰ مگا هرتز)

شکل ۸-۳ طیف COSY مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۴۰۰ مگا هرتز)

شکل ۱۰-۳ طیف HMBC مربوط به فراکسیون 42E

(حلال : متانول دوتریه، قدرت دستگاه : ۴۰۰ مگا هرتز)

شکل ۱۲-۳ طیف جرمی مربوط به فراکسیون 42E

(از نوع electron impact)

۲-۳-۲- آنالیز طیف Mass فراکسیون 42E

با توجه به طیف جرمی فراکسیون 42E (شکل ۳-۱۲) جرم مولکولی ترکیب ۳۰۲ گرم بر مول است که با جرم آگلیکون مطابقت دارد.

در m/z ۲۸۷ ($[M-15]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۶ یا ۸ مولکول گروه OCH_3 وجود ندارد.

در m/z ۲۸۵ ($[M-17]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۲ مولکول گروه OH وجود ندارد.

در m/z ۲۷۱ ($[M-31]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۲ مولکول گروه OCH_3 وجود ندارد.

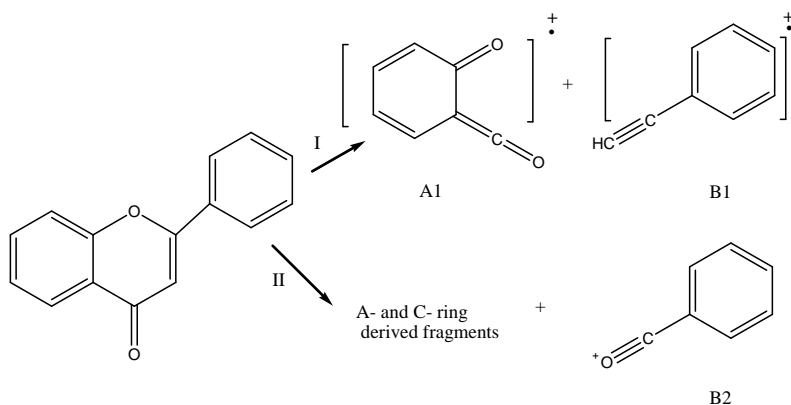
در m/z ۲۸۴ ($[M-18]^+$) پیکی دیده نمی شود و این نشان می دهد که ترکیب مورد نظر C-6 گلیکوزید نیست.

در m/z ۲۷۴ ($[M-28]^+$) نشان دهنده جدا شدن گروه $C=O$ است که شکست معمول در فلاونوئیدها است.

در m/z ۲۵۹ ($[M-43]^+$) نشان دهنده جدا شدن گروه $C=O$ و CH_3 است که در مولکول حاضر دیده نمی شود، چون CH_3 ندارد.

در m/z ۲۴۷ ($[M-55]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس گروه پرنیل در مولکول وجود ندارد.

یکی از شکست های مهم در فلاونوئیدها شکست ملکول به روشهای I و II می باشد (شکل ۳-۱۳) که فلاونها و ایزوفلاونها قطعه $A1^+$ یا $(A1+H)^+$ و $B1^+$ را تولید می کنند و فلاونولها قطعه $(A1+H)^+$ و $B2^+$ را تولید می کنند [۶۳].



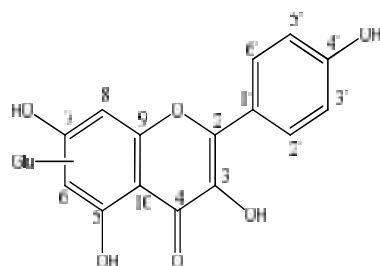
شکل ۳-۱۳ روشهای شکست فلاونوئیدها در دستگاه Mass [۶۳]

بنابراین کوئرستین که یک فلاونول است، قطعاتی به جرم ۱۳۷ و ۱۵۳ گرم بر مول تولید می کند. شکل ۳-۱۴ مدل شکست کوئرستین به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی را نشان می دهد.

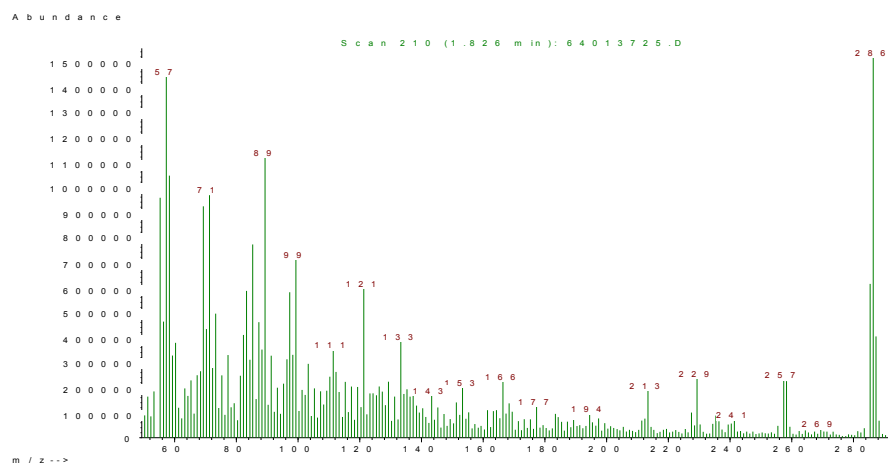
+

شکل ۱۴-۳ مدل شکست کوئرستین به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی

فراکسیون 42F در آنالیز TLC یک لکه نشان می داد که مورد آنالیز Mass قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می دهد که این ماده احتمالاً یک کامفرول گلیکوزید (شکل ۱۵-۳) می باشد که با توجه به اطلاعات موجود، محل اتصال قند و نوع قند مشخص نیست.



شکل ۱۵-۳ ساختار شیمیایی کامفرول گلیکوزید



شکل ۳-۱۶ طیف جرمی مربوط به فراکسیون 42F

(از نوع electron impact)

۳-۲-۳- آنالیز طیف Mass فراکسیون 42F

با توجه به طیف جرمی فراکسیون 42F (شکل ۳-۱۶) جرم مولکولی ترکیب ۲۸۶ گرم بر مول است که با جرم آگلیکون مطابقت دارد.

در m/z ۲۷۱ ($[M-15]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۶ یا ۸ مولکول گروه OCH_3 وجود ندارد.

در m/z ۲۶۹ ($[M-17]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۲ مولکول گروه OH وجود ندارد.

در m/z ۲۵۵ ($[M-31]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس در موقعیت ۲ مولکول گروه OCH_3 وجود ندارد.

در m/z ۲۶۸ ($[M-18]^+$) پیکی دیده نمی شود و این نشان می دهد که ترکیب مورد نظر C-6 گلیکوزید نیست.

m/z ۲۵۸ ($[M-28]^+$) نشان دهنده جدا شدن گروه $C=O$ است که شکست معمول در فلاونوئید ها است.

m/z ۲۴۳ ($[M-43]^+$) نشان دهنده جدا شدن گروه $C=O$ و CH_3 است که در مولکول حاضر دیده نمی شود، چون CH_3 ندارد.

در m/z ۲۳۱ ($[M-55]^+$) پیکی دیده نمی شود، پس گروه پرنیل در مولکول وجود ندارد.

یکی از شکست های مهم در فلاونوئید ها شکست ملکول به روشهای I و II می باشد (شکل ۳-۱۳) که فلاونها و ایزوفلاونها قطعه $A1^+$ یا $(A1+H)^+$ و $B1^+$ را تولید می کنند و فلاونولها قطعه $(A1+H)^+$ و $B2^+$ را تولید می کنند [۶۳]. بنابراین کامفرول که یک فلاونول است، قطعاتی به جرم ۱۲۱ و ۱۵۳ گرم بر مول تولید می کند. شکل ۳-۱۷ مدل شکست کامفرول به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی را نشان می دهد.



شکل ۳-۱۷ مدل شکست کامفرول به قطعات تشکیل دهنده در طیف سنج جرمی

همه فراکسیون های 36A-36F مورد آنالیز و جداسازی HPLC قرار گرفتند ولی با توجه با امکانات موجود و روش های تست شده به جداسازی ماده کاملاً خالص منتج نشد. با توجه به اینکه ترکیبات گلیکوزیدی بودند، شناسایی ترکیبات با خلوص غیر کامل و بدون طیف های دو بعدی امکان پذیر نبود.

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از گیاهان که در درمان بیماری‌ها سابقه طولانی به قدمت تاریخ حیات بشر دارد، در گذشته بیشتر به عنوان یک علم تجربی مطرح بوده است. طی قرن اخیر با پیشرفت علم، از مصرف داروهای گیاهی نسبت به گذشته کاسته شد و جای آن را داروهای صناعی و نیمه صناعی پر کرده است. تجربه چند دهه اخیر نشان داده است که داروهای صناعی با تمام کارایی مورد توجه خود، دارای آثار سویی نیز هستند. از این رو امروزه رویکرد مجدد به گیاهان دارویی به عنوان منبع طبیعی ترکیبات موثره و درمانگر، مورد توجه خاص قرار گرفته است، بطوریکه در اکثر کشور های پیشرفته جهان که در زمینه تهیه داروها و مواد صناعی شیمیایی پیشتاز هستند، مصرف داروهای گیاهی توسعه یافته و تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی و مواد متشکله آن‌ها رو به افزایش است. ایران به دلیل برخورداری از آب و هوای متنوع، محل رویش بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌باشد. با توجه به حرکت سریع جهان به سمت بهره‌برداری از منابع طبیعی لازم است که با نگرشی تازه و کاملاً علمی برای استفاده بهینه از گیاهان دارویی، در جهت کمک به تهیه مواد اولیه طبیعی مورد نیاز در صنایع دارویی کشور اقدام به تهیه و شناسایی مواد موثره و بررسی اثرات فارماکولوژیک و بالینی این گیاهان نمایم [۶۴].

در این تحقیق بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده اندام هوایی گیاه Hedge and Lamond *Echinophora cinerea* (Boiss.) مورد نظر بوده است. علی‌رغم مصارف سنتی گسترده خوراکی و درمانی گیاه و مطالعات فارماکولوژیکی (حدود ۱۳ پژوهش درون تنی، برون تنی، بالینی) بر روی انواع خوشاریزه، هیچ تلاشی برای جداسازی متابولیت‌های ثانویه عصاره‌ی آن‌ها صورت نگرفته است.

از گیاه *E. cinerea* (خوشاریزه کوهستانی) [۵] که به صورت محلی به عنوان سبزی و چاشنی ماست و پنیر و جهت درمان ناراحتی‌های گوارشی مورد مصرف قرار می‌گیرد، پس از جداسازی ترکیبات غیر پلار با استون، عصاره هیدروآتانولی تهیه شد. عصاره حاصل با روش کروماتوگرافی ستونی و HPLC فرآکسیونه و مواد خالص جداسازی شد.

پس از چند مرحله عصاره‌گیری، کروماتوگرافی ستونی و HPLC تهیه‌ای از عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده، دو ترکیب فلاونوئیدی گلیکوزیده (کوئرستین-۳-O-گلیکوزید و کامفرول گلیکوزید) جداسازی و شناسایی گردیدند.

ترکیب کوئرستین-۳-O- گلیکوزید از گیاهان مختلفی جداسازی شده است. گیاهانی که حاوی این ترکیب بودند، برگ های *Solanum nigrum* از خانواده Solanaceae (سیب زمینی) [۳۶]، عصاره متانولی اندام هوایی *Capparis spinosa* از خانواده Capparidaceae [۳۷]، *Camellia sinensis* از خانواده Theaceae [۳۹ و ۳۸، ۳۴]، *Allium cepa* از خانواده Liliaceae (لاله) [۳۹ و ۳۸، ۳۴، ۳۱]، عصاره پوست *Malus spp* [۳۴، ۴۰] از خانواده Rosaceae و تعداد دیگری از گیاهان می باشند.

این ترکیب از جنس *Echinophora* و این گونه، تاکنون جداسازی نشده است.

این ترکیب دارای اثرات آنتی اکسیدان [۳۹ و ۳۸، ۳۴، ۳۱]، آنتی پروستانوئید و ضد التهابی [۳۳، ۳۱]، ضد آریتمی [۳۳، ۳۱]، ضد هایپرتانسیون [۳۳، ۳۱]، ضد سرطان [۴۱، ۳۸، ۳۳] و ضد ویروس می باشد [۳۳، ۳۱]. در تحقیق حاضر با استفاده از سیستم کروماتوگرافی ریورس با جاذب RP-18 و حلالهای متانول و آب فلاونوئید گلیکوزیدها، مشابه جداسازی کوئرستین-۳-O- گلیکوزید و کوئرستین-۳-O- گلیکوزید-۷-O- رامنوزید از گیاه *Capparis spinosa* [۳۷] جدا شدند، اما در جداسازی کوئرستین-۳-O- دی گلاکتوزید، کوئرستین گلاکتوزید و روتینوزید از گیاه *Morus alba L.* از سیستم حلال استونیتریل:آب (۱:۱) و جاذب Zorbax SB C18 (3.9 × 150 mm) استفاده شد [۴۷].

ترکیب خالص شده بعدی یک مشتق گلیکوزیدی کامفرول است که با توجه به اطلاعات موجود، محل اتصال قند و نوع قند مشخص نمی باشد.

کامفرول از گیاهانی از جمله *Peucedanum spp* [۴۴]، *Chresta scapigera* [۴۵]، *Loropetalum chinense* [۴۶]، *Morus alba L.* [۴۷]، *Tilia spp* [۴۸]، *Bauhinia forficata* [۴۹]، *Camellia sinensis* [۵۰] و تعدادی دیگر از گیاهان جداسازی شده است که در *Loropetalum chinense* به صورت کامفرول-۳-O- دی گلوکو پیرانوزید و *tiliroside* (مشتقی از کامفرول با بخش آسیل گلیکوزید) [۴۶]، در *Morus alba L.* به صورت کامفرول-۳-O- گلوکو پیرانوزید [۴۷] و در *Bauhinia forficata* به صورت کامفرول-۳-O- (دی رامنوزید (kaempferitrin) [۴۹] می باشد.

دو کامفرول گلیکوزید جدید به نام‌های *kaempferol-3-O-[2-O-D-galactopyranosyl-6-O-L-* و *kaempferol-3-O-[2-O-D-xylopyranosyl-6-O-L-* و *rhamnopyranosyl]-D-glucopyranoside* شناسایی ساختار دقیق ماده دوم استخراج شده نیاز به جداسازی مجدد به مقدار بیشتر و تهیه طیف های NMR بعدی دارد.

شناسایی ساختار دقیق ماده دوم استخراج شده نیاز به جداسازی مجدد به مقدار بیشتر و تهیه طیف های NMR بعدی دارد.

از آنجاییکه فلاونوئیدها اثرات آنتی‌اکسیدانی دارند [۶۵] و به مقدار زیاد در گیاهان خوراکی یافت می‌شوند [۳۳]، اثر محافظتی کوئرستین-۳-O- گلیکوزید بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 روی سلول های PC₁₂ بررسی شد که چون خارج از انتظارات پروپوزال بود، به طور خلاصه در پیوست آمده است.

اهمیت موضوع از آن جنبه است که کوئرستین به طور عمده در گیاهان خوراکی همچون پیاز، سیب و چای دیده می‌شود [۶۶].

فرم گلیکوزیده فلاونوئیدها جذب بهتری دارد [۶۶] و به علاوه کوئرستین جذب بسیار خوب (حدود ۶۰٪) و ایمنی قابل قبولی هم داشته است [۶۶].

اثرات آنتی‌اکسیدانی کوئرستین-۳-O- گلیکوزید را می‌توان به وجود و محل گروه های OH آن مرتبط دانست [۶۶]. به طور عمده فلاونوئیدهای آنتی‌اکسیدان شرایط زیر را باید دارا باشند:

الف) OH ها در حلقه B به فرم کاتکول (اورتو) قرار داشته باشند. ب) باند دوگانه در موقعیت دو و سه وجود داشته باشد. ج) در موقعیت سه یا پنج، گروه OH قرار داشته باشد.

این ویژگی ها فلاونول ها را به آنتی‌اکسیدان های بالقوه ای تبدیل می‌کند. در گیاهان همین ترکیبات هستند که گیاه را از رادیکال های آزاد و UV محافظت می‌کنند [۳۳].

در نهایت با توجه به مواد استخراج شده خالص که به آن اشاره شد و مواد استخراج شده ای که به علت مقدار کم ناخالصی قادر به تشخیص آن نبودیم، می‌توان گفت که متابولیت های اصلی عصاره هیدروآتانولی چربی زدایی شده گیاه *E. cinerea* از دسته فلاونوئید گلیکوزیدها و ترکیبات فنلی گلیکوزیدی دیگر می‌باشند.

پیشنهادات

- بررسی اثرات درمانی ترکیبات خالص سازی شده
- جداسازی فلاونوئید کامفرول گلیکوزید به مقدار زیاد و تعیین دقیق ساختار آن

ترتیب فرانس نویسی مطابق: Comment [Dp23]:
با آیین نامه دانشگاه در پایان نامه حاضر این
آیین نامه به طور کامل رعایت گردیده است.

منابع و مآخذ

- [۱]. زمان، ساعد. (مترجم)، گیاهان دارویی: روشهای کشت برداشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ولاگ ژان و استودولا ژیری (نویسندگان)، چاپ پنجم، انتشارات ققنوس، تهران، ۱۳۸۲، ص ۱۸-۹.
- [۲]. عماد، مهدی. شناسایی گیاهان دارویی، صنعتی، مرتعی و جنگلی و موارد مصرف آنها. چاپ اول، انتشارات توسعه روستایی، تهران، ۱۳۷۸، جلد دوم، ص ۹.
- [3]. Colegate SM, Molyneux RJ. *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. CRC press, 2007.
- [۴]. امامی، احمد، شمس اردکانی، محمد رضا، مهرگان، ایرج. فرهنگ مصور گیاهان دارویی. مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ۱۳۸۳، ص ۸۰.
- [۵]. مظفریان، ولی الله. فرهنگ نام های گیاهی ایران. چاپ دوم، فرهنگ معاصر، تهران، ۱۳۷۷، ص ۱۹۵.
- [6]. Delaram M, Sadeghiyan Z. The effect of *Echinophora-platyloba* extract on primary of dysmenorrhea. *Arak Med Uni J*, 2010, 13(3), P: 61-67.
- [7]. Sadraei H, Asghari G, Yaghubei K. Study of the effect of hydro-alcoholic and essential oil of *Echinophora platyloba* on rat isolated ileum concentrations *in vitro*. *JRMS*, 2003, 7(2), p: 150-155.
- [8]. Avijgan M, Mahboubi M, Darabi M, Saadat M, Sarikhani S, Kassaiyan N. Overview on *Echinophora platyloba*, a synergistic anti-fungal agent candidate. *J Yeast Fung Res*, 2010, 1(5), p: 88-94.
- [9]. Avizhgan M, Saadat M, Nilfrooshzadeh M, Hafizi M. Anti fungal effect of *Echinophora Platyloba* extract on some Common Dermathophytes. *J Med Plants*, 2006, 5(18), p: 6-10.
- [10]. Avijgan M, Hafizi M, Saadat M, Nilforoushzadeh M. Antifungal effect of *Echinophora Platyloba*'s Extract against *Candida albicans*. *Iran J Pharm Res*, 2010, 5(4), p: 285-289.
- [11]. Dhanamani M, Devi SL, Kannan S. Ethnomedicinal plants for cancer therapy-a review. *J Drugs Med*, 2011, 3(1), p: 1-10.
- [12]. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines. *Neoplasma*, 2006, 53(5), p: 428-433.
- [13]. Entezari M, Hashemi M, Ashki M, Ebrahimian S, Bayat M, Azizi Saraji A, et al. Studying the effect *Echinophora platyloba* extract on bactira (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Candidia albicans*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*) *in vitro*. *World J Med Sci*, 2009, 4(2), p: 89-92.
- [14]. Gholivand M, Rahimi-Nasrabadi M, Mehraban E, Niasari M, Batooli H. Determination of the chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of essential oil and methanol extracts of *Echinophora platyloba* DC. *Nat Prod Res*, 2011, 25(17), p: 1585-1595.
- [15]. Mileski K, Dzamic A, Ciric A, Grujic S, Ristic M, Matevski V, et al. Radical scavenging and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Echinophora sibthorpiana* Guss. from macedonia. *Arch Biol Sci Belgrade*, 2014, 66 (1), p: 401-413.

- [۱۶]. قهرمان، احمد. گیاه شناسی عمومی. چاپ اول، انتشارات باورداران، تهران، ۱۳۶۹، صص ۵۴۹ و ۵۵۴.
- [۱۷]. قهرمان، احمد. کروموفیت‌های ایران. انتشارات مرکز دانشگاهی، تهران، ۱۳۷۲، جلد دوم، صص ۶۶۸.
- [۱۸]. آزادبخت، محمد. رده‌بندی گیاهان دارویی. چاپ اول، انتشارات تیمورزاده، تهران، ۱۳۷۸، صص ۲۱۶.
- [۱۹]. زرگری، علی. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۶۶، جلد دوم، صص ۴۷۶-۴۷۴.
- [۲۰]. مظفریان، ولی الله. گیاهان خانواده چتریان در ایران. سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ۱۳۶۲، نشریه شماره ۳۵، صص ۱۶.
- [۲۱]. ویلسون کارل، لومیس والتر. گیاه شناسی. ترجمه: مقدم، فاطمه و ملک زاده، فریدون. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۶۹، جلد دوم، صص ۳۳۲.
- [22]. Trease GE, Evans WC. Trease and Evan's *Pharmacognosy*. 15 th ed, Edinburgh, W.B. Saunders Company, 2002, No. 227, P: 256-257.
- [۲۳]. قهرمان، احمد. فلور رنگی ایران. انتشارات مؤسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۳۸۰، جلد بیست و سوم، صص ۲۸۱۴.
- [24]. Hassanpourghdam MB, Shalamzari MS, Sepehri, N. GC/MS analysis of *Echinophora platyloba* DC. essential oil from Northwest Iran: a potential source of (Z)- α -ocimene and -phellandrene. *Chemija*, 2009, 20(2), p: 120-123.
- [25]. Sajadi SE, Ghannadi A. Composition of the essential oil of *Echinophora cinerea* (Boiss.) Hedge et Lamond. *J Ess Oil Res*, 2002, 14(2), p: 114-115.
- [26]. Ahmadi L, Mirza M, Khorram MT. Essential Oil of *Echinophora cinerea* (Boiss.) Hedge and Lamond from Iran. *J Ess Oil Res*, 2001, 13(2), p: 82-83.
- [۲۷]. عبادی، منوچهر. اساس فارماکودینامی گیاهان دارویی. ترجمه: غلامی، عذرا، ابوالحسن زاده، زهره، محقق زاده، عبدالعلی. راه کمال چوگان، تهران، ۱۳۸۶، صص ۵۶۴، ۵۷۴، ۵۷۸.
- [۲۸]. اوانس ویلیام، تریز جورج. فارماکونوزی تریز و اوانس. ترجمه: افشاری پور، سلیمان. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ۱۳۸۶، جلد دوم، صص ۱۴۴-۱۴۶، ۲۲۸، ۲۶۴.
- [29]. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Churchill Livingstone, 2004, 75.
- [30]. Quarengnil MV, Tereschuka ML, Baigori MD, Abdalal LR. Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*. *Fitoterapia*, 2000, 71(6), p: 710-712.

- [31]. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33(12), p: 1061–1080.
- [32]. Dewick PM. *Medicinal Natural Products*. 2th ed, London, John Willey & Sons, 2001, 151.
- [33]. Desmiaty Y, Alatas F. Determination of quercetin in *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*, 2008, p: 385-388.
- [34]. Hollman PC, van-Trijp JM, Buysman MN, Mengelers MJ, de-Vries JH, Katan MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS lett*, 1997, 418(1), p: 152–156.
- [35]. Kini J, Srinivasa Narasimha K, Pai VK, Bodke Y. Automation of process of devising newer Chromone derivatives from existing Natural and Synthetic Chromones by their Study of Structure Activity Relationship—a novel approach. *Int J Sci Res*, 2013, 1(4), p: 435-440.
- [36]. Nawwar M, El-Mousallamy A, Barakat HH. Quercetin 3-glycosides from the leaves of *Solanum nigrum*. *Phytochemistry*, 1989, 28(6), p: 1755–1757.
- [37]. Sharaf M, El-Ansari M, Saleh N. Quercetin triglycoside from *Capparis spinosa*. *Fitoterapia*, 2000, 71(1), p: 46–49.
- [38]. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS lett*, 1998, 426(3), p: 331–336.
- [39]. Hollman PC, de-Vries JH, van-Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6), p: 1276-1282.
- [40]. Lommen A, Godejohann M, Venema D, Hollman PC, Spraul M. Application of directly coupled HPLC–NMR–MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel. *Anal Chem*, 2000, 72(8), p: 1793–1797.
- [41]. Lamson DW, Brignall M. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Journal of Clinical Therapeutic*, 2000, 5(3), p: 196.
- [42]. Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4-O- β -glucoside and isorhamnetin-4-O- β -glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res*, 1998, 29(3), p: 257-269.
- [43]. Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(11), p: 1274–1285.
- [44]. Kuzmanov B, Andreev N, Kozovska V. Chemotaxonomic study on bulgarian species of "*Peucedanum*" L. I. in *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 1980.
- [45]. Schinor EC, Salvador MJ, Ito IY, Dias DA. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. *Braz J Microbiol*, 2007, 38(1), p: 145-149.

- [46]. Zhang Q, Fan D, Xiong B, Kong L, Zhu X. Isolation of new flavan-3-ol and lignan glucoside from *Loropetalum chinense* and their antimicrobial activities. *Fitoterapia*, 2013, 90, p: 228-232.
- [47]. Flaczyk E, Kobus-Cisowska J, Przeor M, Korczak J, Remiszewski M, Korbas E, et al. Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba L.* leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes. *Agricultural Sciences*, 2013, 4, p: 141-147.
- [48]. Brizi MR, Marrassini C, Zettler G, Ferraro G, Anesini C. Comparative Antiproliferative Action of Two Extracts from *Tilia x viridis* on Normal and Tumoral Lymphocytes: Relationship with Antioxidant Activity. *Chinese Medicine*, 2012, 3, p: 20-29.
- [49]. de Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-()-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *J Nat Prod*, 2004, 67(5), p: 829-832.
- [50]. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agricult Food Chem*, 2006, 54(8), p: 2951-2956.
- [51]. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 2005, 89(2), p: 191-198.
- [52]. Leung HW-C, Lin C-J, Hour M-J, Yang W-H, Wang M-Y, Lee H-Z. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(10), p: 2005-2013.
- [53]. Wang HD, et al. Evaluation for inhibitory effects of natural flavonoids on neuraminidases. *Chinese Journal of New Drugs*, 2009, 15, p: 25.
- [۵۴]. بیگلری، علیرضا. "بررسی فیتوشیمیایی گیاه *Euphorbia heterodena* Janb et.Spack". پایان نامه‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۸۶، ص ۲۸.
- [۵۵]. هالر جیمز، اسکوک داگلاس، وست، دونالد. *مبانی شیمی تجزیه*. ترجمه: سلاجقه، عبدالرضا. نجفی، ابوالقاسم. مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۳۸۴، جلد ۲، ص ۷۶۰.
- [۵۶]. حسن زاده خیاط، محمد. *روشهای تجزیه دستگاهی*. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد، مشهد، ۱۳۸۰، جلد اول، صص ۱۹۶، ۲۱۳، ۲۱۹، ۲۸۵.
- [۵۷]. استوک رالف. *روشهای کروماتوگرافی*. ترجمه: حسین، سید واقف، منظوری لشکر، جمشید. مرکز نشر دانشگاهی، تهران، جلد اول، ۱۳۷۰.
- [58]. Braithwaite A, Smith FJ. *Chromatographic Methods*. 4th ed, Champan & Hall, London, 1985, p: 212-215.
- [59]. Harvey D. *Modern Analytical Chemistry*. Mc Graw-Hill, 2000, pp: 563, 569, 570, 578-585.

[۶۰]. افشاری پور، سلیمان. روش‌های نوین تجزیه دستگاهی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ۱۳۷۲.

صص ۱۶، ۴۲، ۱۹۷، ۳۱۳ و ۱۵.

[۶۱]. میر محمد صادقی، مجید، سعیدی، محمد رضا. (مترجم). شناسایی ترکیبات آلی به روش طیف سنجی. رابرت

سیلوراشترین، فرانسیس وبستر، دیوید کمیل (نویسندگان)، چاپ اول، انتشارات نوپردازان، تهران، ۱۳۸۸، صص ۲۹۰-۲۶۵.

[62]. Badria FA, Ameen M, Akl MR. Evaluation of Cytotoxic Compounds from *Calligonum comosum* L. growing in Egypt. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences*. 2007, 62(9-10), p: 656-60.

[63]. Markham KR. *Techniques of Flavonoid Identification*. London, Academic Press, 1982, p: 88-89.

[۶۴]. غلامزاده، سعید. " بررسی فیتوشیمیایی گیاه جاشیر *Prangos ferulacea* (L.) Lindl ". پایان نامه دکتری

عمومی داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۹۰، صص ۹۲.

[65]. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001, 74(4), p: 418-425.

[66]. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca J, Flamm G, Williams G, Lines T. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*. 2007, 45(11), p: 2179-2205.

Abstract

Introduction and Objectives: *Echinophora cinerea* belongs to Apiaceae family and aerial parts are used as vegetables and seasoned yogurt and cheese, and for the treatment of digestive disorders in Chahar Mahal and Bakhtiari. Despite the traditional use and dietary and pharmacological studies (approximately 13 research *in vivo*, *in vitro*, clinical) on *Echinophora* spp, no attempt has been made to isolate secondary metabolites.

Materials and methods: Powdered aerial parts of the plant were extracted with acetone to remove non-polar compounds; the remaining powder after drying was extracted with EtOH:H₂O (8:2) by maceration method. Hydroethanolic extract was concentrated in vacuum. Initial fractionation of the extract by column chromatography on reverse phase RP-18 sorbent and solvent mixtures of methanol and water with decreasing polarity was performed. The resulting fractions were analyzed by NMR and promising fractions were refractionated and purified using reversed phase HPLC analysis on RP-18 and structures of pure compounds were determined by one-dimensional NMR spectroscopy techniques, two-dimensional (including COSY, HSQC, HMBC and NOESY spectra) and Mass analysis.

Results: The step by step extraction, column chromatography and HPLC purification of hydroethanolic extract, resulted in two flavonoid glycosides, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside and kaempferol glycoside.

Conclusion: Given that flavonoids are the most important groups of phenolic compounds found in nature, and due to their special structural features as metal chelation and free radical scavengers, these plants could be considered as antioxidant and anti-cancer agents.

Keywords: *Echinophora cinerea*, Hydroethanolic extract, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, Kaempferol glycoside.



Kermansheh University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

Thesis Title:

**Phytochemical investigation of the defatted
hydroethanol extract of *Echinophora cinerea* aerial
parts**

By: Maryam Rashidi

Under Supervision of:

Dr. Yalda Shokoohinia

A Thesis Submitted to the Graduate Studies Office
in partial fulfillment of the requirements for
the degree of Pharm. D.

Jan 2014

Comment [Dp24]: خلاصه انگلیسی همانند
خلاصه فارسی بین - کلمه ساختار یافته و
تعداد کلمات کلیدی بیشتر از کلمه نباشد

Comment [Dp25]: