

استخراج، جداسازی و شناسایی فلاونوئیدهای کوئرستین و روبینین از گیاه *Robinia pseudoacacia* L.

فاطمه سفیدکن^۱، اعظم آقا ولی جماعت^۲، مختار علی نیا رودسری^۳
و کامکار جایمند^۴

چکیده

عصاره گل و برگ گیاه از روش استخراج با سوکسله (به کمک حلالهای پترولیوم اتر، بنزن، کلروفرم، استون و متانول) و همچنین روش خوابانیدن در حلال (متانول - آب) به نسبت (۹ به ۱) و سپس حلال (متانول - آب) به نسبت (۱ به ۱) و پس از آن استخراج با کلروفرم و هگزان بدست آمد. پس از خالص سازی و جداسازی عصاره های حاصل توسط HPLC, P.C, HPLC, کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی تابش لحظه ای (Flash chromatography) دو فلاونوئید کوئرستین (Quercetin) و روبینین (Robinin) به صورت خالص بدست آمد. از تمامی عصاره ها و فراکسیونهای حاصل از ستون طیف HPLC و از نمونه های خالص بدست آمده طیف HPLC, ¹HNMR و UV تهیه گردید و ساختمان دو فلاونوئید ذکر شده تأیید گردید.

واژه های کلیدی: *Robinia pseudo acacia*، استخراج، فلاونوئید، کوئرستین، روبینین.

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، پست الکترونیکی: frsef@rifr-ac.ir.

۲- کارشناس ارشد دانشکده علوم دانشگاه زنجان.

۳- عضو هیأت علمی دانشکده علوم دانشگاه زنجان.

۴- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

مقدمه

Robinia pseudoacacia L. درختی است زینتی با گل‌های زیبا، خاردار و به ارتفاع ۶ تا ۲۰ متر که ساقه‌ای پوشیده از پوست خاکستری رنگ با شکافهای عمیق دارد. برگ‌های آن در بهار به رنگ سبز زیبایی در می‌آید. گل‌های آن از ۴ تا ۶ سالگی ظاهر می‌شوند و معمولاً هر ساله در اردیبهشت ماه (در مناطق معتدله) بیرون می‌آیند. گل‌های افاقیا سفیدرنگ، معطر، مجتمع به صورت خوشه‌های پرگل به طول ۲۰ تا ۳۰ سانتیمتر به حالت آویخته هستند. منطقه اصلی انتشار افاقیا، آمریکای شمالی است. ولی امروزه در نواحی مختلف اروپا، آسیای معتدله و ایران نفوذ یافته و در ایران بومی شده و عملاً در تمام مناطق می‌روید.

گل‌های درخت افاقیا، نوش فراوان و عسل معطر و مرغوب ایجاد می‌کنند. افاقیا دارای وارینه‌هایی با گل‌های قرمز و ارغوانی نیز می‌باشد. افاقیا از درختان بسیار مقاوم به خشکی می‌باشد (آزادبخت، ۱۳۷۸ و زرگری، ۱۳۶۷). گل درخت افاقیا، دارای اثرات خفیف آرام کننده، مقوی، قابض، نرم کننده و صفرا بر است و برگ درخت افاقیا اثر صفرا بر و ملین دارد. در طب سنتی از دم کرده گل و برگ درخت افاقیا در رفع سردردهای ناشی از مسمومیتها، سوءهاضمه، استفراق‌های سبک و احساس کسالت‌های عادی استفاده می‌شده است (زرگری، ۱۳۶۷).

در تحقیقاتی که قبلاً در مورد استخراج و شناسایی مواد مؤثر افاقیا انجام شده است مشخص گردیده که چوب این گیاه با خاصیت مقاومت در برابر پوسیدگی حاوی ۴٪ از یک ماده بیرنگ، فعال نوری با نقطه ذوب ۲۲۸ تا ۲۳۰ درجه سانتیگراد می‌باشد. همچنین در برگ‌های افاقیا گلیکوزید آکاستین یافت شد (Freudenberg (a) et al, ۱۹۵۳). همچنین از عصاره گل‌های افاقیا ترکیب دی هیدرو روبینین استخراج شده است (Freudenberg(b) et al, ۱۹۵۳).

در تحقیقی دیگر (Kubota et al, ۱۹۶۶) از عصاره متانولی برگ‌های افاقیا در

کروماتوگرافی کاغذی چهار لکه دیده شده است که دو تا از آنها آکاسیین (acaciin) و آکاستین شناسایی شده و دو لکه دیگر شناسایی نشده‌اند. در پژوهش دیگری جهت بررسی فلاونوئیدهای موجود در میوه نارس و خشک اقاچیا، عصاره‌گیری از یک کیلوگرم میوه طی دوبار استخراج با ۱۰ لیتر آب و طی مراحل مفصل جداسازی و خالص‌سازی و هیدرولیز اسیدی، کوئرستین، d-گالاکتوز و l-رامنوز شناسایی شد (Maksyutina, ۱۹۶۸). همچنین از ریشه اقاچیا ۴ و ۷- دی هیدروکسی فلاون، آپی جنین، نارنجین و ایزولیکورتنی جنین استخراج و جداسازی شده است (Wetzel et al, ۱۹۹۵). یک ترکیب فلاونوئیدی دیگر تحت نام رامنوروبین از گلهای اقاچیا جداسازی و شناسایی شده است (Mun et al, ۱۹۷۸). این ترکیب که به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک با سیستم حلالی بوتانول- اسیداستیک- آب تفکیک شده و به وسیله متانول استخراج گردیده است یک جامد سوزنی زرد روشن با نقطه ذوب ۴-۲۳۱ درجه بوده است. براساس تحقیق دیگری که در روسیه بر روی گل‌آذین ۱۲ گونه اقاچیا انجام شده بود، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و ۹ آمینو اسید متیونین، والین، بتا- فنیل - آلفا- آلانین، آمینو استیک اسید، آسپاراژین، سیستئین، آلانین و پرولین جداسازی و شناسایی شده است. گلهای اقاچیا حاوی کمفرول-۳- اورتو- بتا- دی گالاکتوپیرانوزید، ۷- اورتو- آلفا- ال- رامنوپیرانوزید بود (Osipovich et al, ۱۹۷۵). گلهای اقاچیا همچنین حاوی ترکیبهای معطر خوشبویی هستند که در تحقیقات دیگری به استخراج و شناسایی آنها پرداخته شده است. از جمله اسانس گلهای اقاچیا در روسیه مورد بررسی قرار گرفته و ۹ ترکیب در آن شناسایی شده که عمده‌ترین آنها لیمونن، لینالول، ژرانیول و سیترونلول بوده‌اند (Ismailov et al, ۱۹۸۰). در تحقیق دیگری ترکیبهای فرار گلهای اقاچیا ۲۲ ترکیب گزارش شده که عمده‌ترین آنها دلتا- ۳- کارن و لینالول بوده‌اند (Kamdem et al, ۱۹۹۴). در گزارش دیگری تعداد ترکیبهای معطر گلهای اقاچیا ۱۵ مورد ذکر شده که اجزای اصلی آمینوبنزالدئید، متیل آنترانیلات و لینالول بوده‌اند (Joulain et al, ۱۹۸۶).

ذکر همین نتایج نشان می‌دهد که نوع و درصد ترکیبهای معطر و همچنین فلاونوئیدهای موجود در گل و برگ اقاچیا در کشورها و شرایط آب و هوایی مختلف به شدت متفاوت هستند.

به همین دلیل تصمیم گرفتیم تا در این تحقیق به استخراج و اندازه‌گیری ترکیبهای فرار و نیز فلاونوئیدهای اقاچیا در ایران بپردازیم. ترکیبهای تشکیل دهنده اسانس و عصاره مطلق (استخراج با هگزان) گیاه اقاچیا را قبلاً گزارش نموده‌ایم (Sefidkon et al, 2002). در این پژوهش ترکیبهای فلاونوئیدی گل و برگ گیاه اقاچیا مورد نظر بوده‌اند. لازم به ذکر است که فلاونوئیدها یکی از بارزترین دسته‌های ترکیبهای طبیعی هستند که به دلیل خواص دارویی ویژه مورد توجه هستند. در طی ۵۰ سال گذشته تاثیرات فارما کولوژیکی فلاونوئیدها و مشتقاتشان با روند رو به افزایشی شناخته شده است. تاثیرات اسپاسمی، ضد گلو درد، ضد تومور، ضد زخم، ضد ورم سمی، ضد آلرژی، ضد میکروبی، ممانعت از شکنندگی و خونریزی عروق (Cody et al, 1986) ضد ویروس (Pusztai et al, 1966) و ضد سرطان (Kupchan et al, 1971) این ترکیبها قابل ملاحظه می‌باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

سرشاخه‌های گلدار گیاه *Robinia pseudoacacia* L. در اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۰ از باغ ملی گیاه‌شناسی ایران واقع در غرب تهران جمع‌آوری گردید. پس از تهیه نمونه هرباریومی نام علمی گونه گیاهی توسط گیاه‌شناسان مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع تأیید شد. گلها و برگهای گیاه از یکدیگر جدا و در دمای محیط و سایه خشک گردید و به طور مجزا توسط آسیا پودر گردید.

استخراج و تهیه عصاره

روش استخراج با سوکسله به کمک حلالهای پترولیوم اتر، بنزن، کلروفرم، استون و متانول برای پودر گل‌های افاقیا (500 g) و برگ‌های آن (270g) به طور مجزا بکار برده شد. به حاصل هر مرحله (به استثنای عصاره متانولی) پس از تبخیر حلال در خلا و توزین عصاره اولیه، جهت جدا نمودن هیدروکربنهای روغنی سنگین و مومها، به مقدار لازم متانول افزوده شده و پس از هم زدن شدید و نگهداری به مدت یکساعت در دمای ۱۵°C - و صاف نمودن و تبخیر متانول باقیمانده، در نهایت ۵ عصاره مطلق برای گل و ۵ عصاره مطلق برای برگ بدست آمد.

همچنین برای پودر گل‌های افاقیا (500g) و برگها (290) به طور مجزا روش خوابانیدن در حلال (متانول - آب) به نسبت (۹ به ۱) به مدت ۱۲ ساعت و بعد (متانول - آب) به نسبت (۱ به ۱) به مدت ۱۲ ساعت بکار برده شد. سپس حاصل دو مرحله بهم اضافه شده و به وسیله تقطیر در خلاء، حجم کل به ۱/۳ رسانده شد. آنگاه با استفاده از قیف جدا کننده و حجمهای ۵۰cc از کلروفرم طی پنج مرحله استخراج صورت گرفت. پس از تبخیر حلال در خلا عصاره مطلق نهایی به وزن (۵۷/ ۱۵۰ گرم) برای گل و ۵۷/ ۳۸ گرم برای برگ بدست آمد. مراحل فوق بار دیگر، برای ۵۰۰ گرم پودر گل انجام گردید و این بار جهت استخراج و حذف کلروفیل و چربیها از حلال هگزان استفاده شد. عصاره مطلق این مرحله ۱۲۱/ ۲۶ گرم بود.

جداسازی و خالص‌سازی

در مرحله استخراج به روش خوابانیدن در حلال و کلروفیل و چربی‌زدایی با هگزان قبل از رساندن حجم به ۱/۳ جامد زرد مایل به سبزی جداسازی شد که با استفاده از حلالهای پترولیوم اتر، بنزن، کلروفرم، استون و متانول شستشو و خالص‌سازی گردید. در نهایت جامد زرد رنگ خالصی بدست آمد که HD نامگذاری شد.

همچنین بر روی مقداری از عصاره حاصل از روش خوابانیدن در حلال و استخراج با هگزان با استفاده از سیلیکاژل و حلال متانول کروماتوگرافی تابش لحظه‌ای (FlashChromatography) انجام شد و لایه‌ای که در مقابل نور UV مشخص بود (لایه‌ای صورتی) جدا گردید. بعد از جدا کردن سیلیکاژل و تبخیر حلال متانول نمونه زرد مایل به نارنجی بدست آمد که نمونه A نامیده شد. به علاوه جهت جداسازی بهتر روی مقداری از عصاره حاصل از روش خوابانیدن در حلال و استخراج با هگزان کروماتوگرافی ستونی بر روی بستر سیلیکاژل ۶۰ در ستونی به طول ۵۰ Cm و قطر ۲ Cm انجام گردید و حلالهایی از قطبیت کم به زیاد به ترتیب شامل کلروفرم، اتر، اتیل استات، استون، متانول - آب (۱ به ۱) و آب بکار برده شد و هشت فراکسیون در حجمهای ۵۰ میلی لیتر جمع‌آوری گردید و به ترتیب برای حلالهای فوق فراکسیونها C1 تا C8 کدگذاری شد. از رسوبهای جدا شده و همچنین از فراکسیونهای C2 تا C8 حاصل از کروماتوگرافی، طیفهای HPLC تهیه گردید. به علاوه از عصاره‌های حاصل از استخراج با سوکسله و عصاره‌های حاصل از روش خوابانیدن در حلال و محلولهای زیر صافی حاصل از شستشوی جامدهای حاصل نیز طیف HPLC تهیه گردید.

شناسایی

برای تشخیص وجود فلاونوئید در عصاره‌های حاصل و جامدهای A، HD آزمون شینودا (۶)، انجام گردید. نتیجه آزمون برای عصاره‌های حاصل از سوکسله رضایتبخش نبود. اما برای بقیه عصاره‌ها و تمامی جامدهای حاصل نتیجه آزمون مثبت و وجود فلاونوئیدها را تأیید می‌نمود.

با استفاده از روش کروماتوگرافی کاغذی (p.c) (کاغذ واتمن شماره ۱) و حلالهای بنزن، دی اتیل اتر و مخلوط کلروفرم و دی اتیل اتر و همچنین واکنشگر افشانه‌ای آمونیاک و مقایسه با جداول استاندارد مربوط (۶)، وجود فلاونوئیدها و فلاونها برای

عصاره‌هایی که آزمون شینودای آن مثبت بود، تأیید شد. طیفهای HPLC با تهیه نمونه‌ها به غلظت ۱ میلی‌گرم نمونه در ۲ میلی‌لیتر متانول، برای استانداردها و عصاره‌های حاصل و نمونه‌های جامد، تهیه گردید. همچنین طیفهای ¹HNMR و UV از نمونه‌های A و HD تهیه گردید.

دستگاهها و مواد

سیستم HPLC مدل: Well Chrom 2000 از شرکت Knuer آلمان مجهز به پمپ مدل Stark – 1000 – Maxi، دتکتور از نوع UV مدل طیف نورسنج (که در ۲۹۰ نانومتر تنظیم گردیده بود). ستون مورد استفاده Eurosphere 100 C18 به قطر ۴ میلیمتر و طول ۲۵ سانتیمتر با ستون اولیه انتگرال ۵/۰ μm. به عنوان فاز متحرک از (متانول – آب – اسید استیک) به نسبت (۵۰ به ۴۵ به ۵) استفاده شده است. زمان هر تحلیل ۶۰ دقیقه بوده و حلالها با حمام فرا صوتی مدل Branson گاززدایی گردید و همچنین فاز متحرک قبلاً بوسیله فیلترهای غشایی PTFE با اندازه سوراخ ۰/۴۵ μm از شرکت Sartorius صاف گردید. دمای آن ۳۰ °C و شدت جریان حلال در ستون 1 ml/min بوده است. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود.

دستگاه ¹HNMR (500MHZ) و حلال مورد استفاده DMSO – d 6 بوده است. حلالهای مورد استفاده از شرکت Merck خریداری گردید.

نمونه‌های استاندارد

Qurecti (کوئرستین) (۳، ۳، ۵، ۷ – پنتا هیدروکسی فلاون) از شرکت Fluka خریداری گردید. Kaempferol (کمفرول) (۳، ۴، ۵، ۷ ترا هیدروکسی فلاون)، Apigenin (آپی جنین) (۴، ۵، ۷، تری هیدروکسی فلاون) و Acacetin (آکاستین)

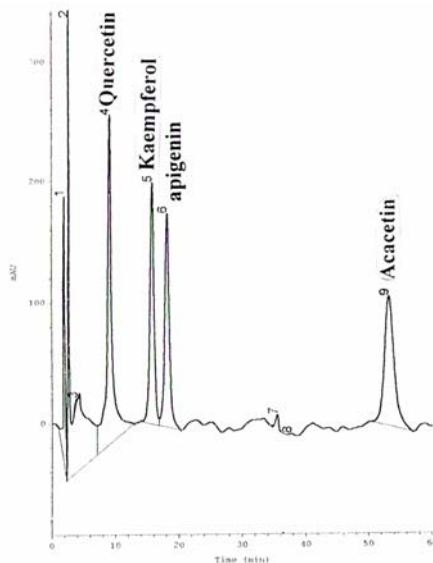
(۵، ۷، دی هیدروکسی - ۴ - متوکسی فلاون) هر سه از شرکت SIGMA خریداری گردید.

سیلیکاژل (۶۰) مورد استفاده در کروماتوگرافی ستونی و تابش لحظه‌ای مشخصات زیر را داشت:

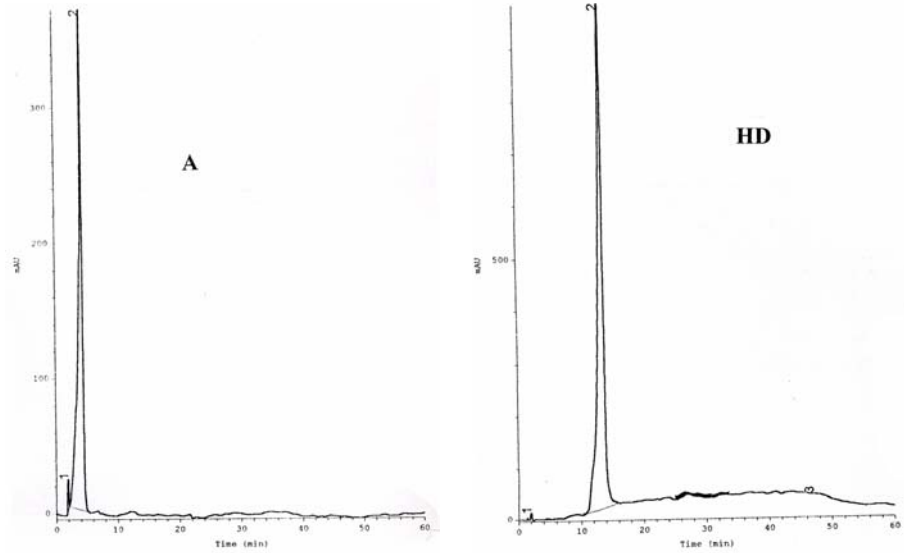
(0.2 - 0.5 mm / 35 - 70 mesh ASTM)
MACHERY NAGEL 6 160 DORREN GERMANY

نتایج

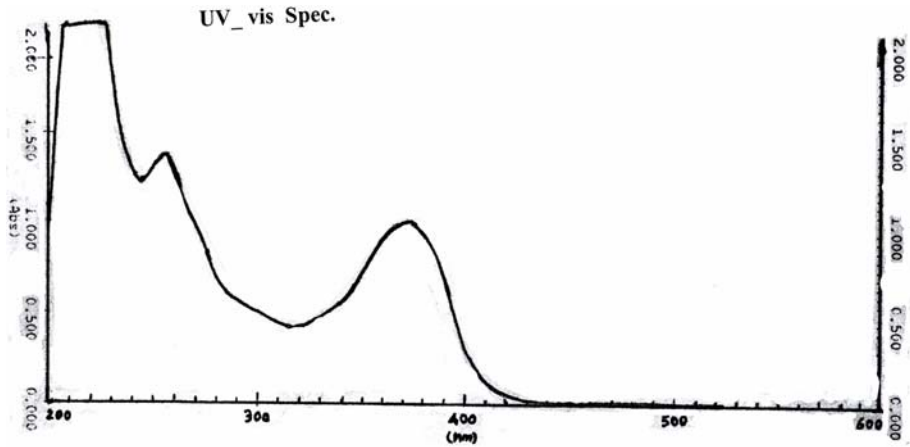
طیفهای HPLC، از مخلوط نمونه‌های استاندارد و ترکیبهای خالص شده A و HD در شکل‌های شماره ۱ و ۲ آورده شده‌اند. همچنین طیفهای UV-Visible در شکل‌های شماره ۳ و ۴ و نیز طیفهای رزونانس مغناطیس هسته (¹HNMR) در شکل‌های شماره ۵ و ۶ آورده شده‌اند.



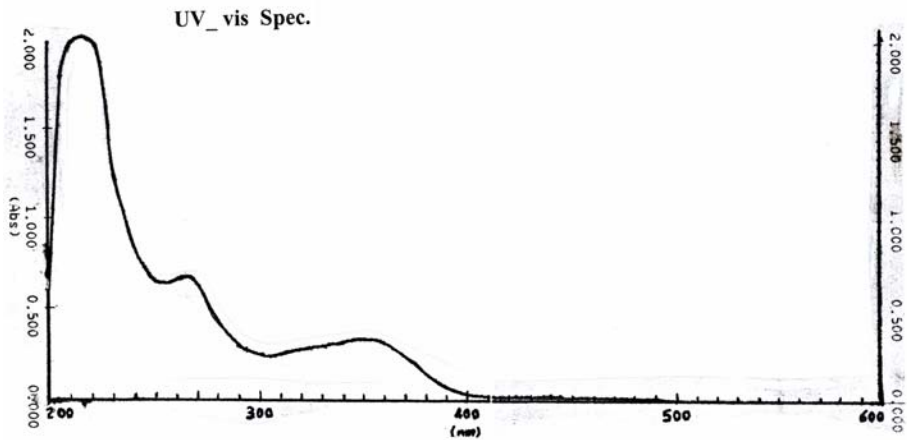
شکل شماره ۱- طیف HPLC از مخلوط استانداردها



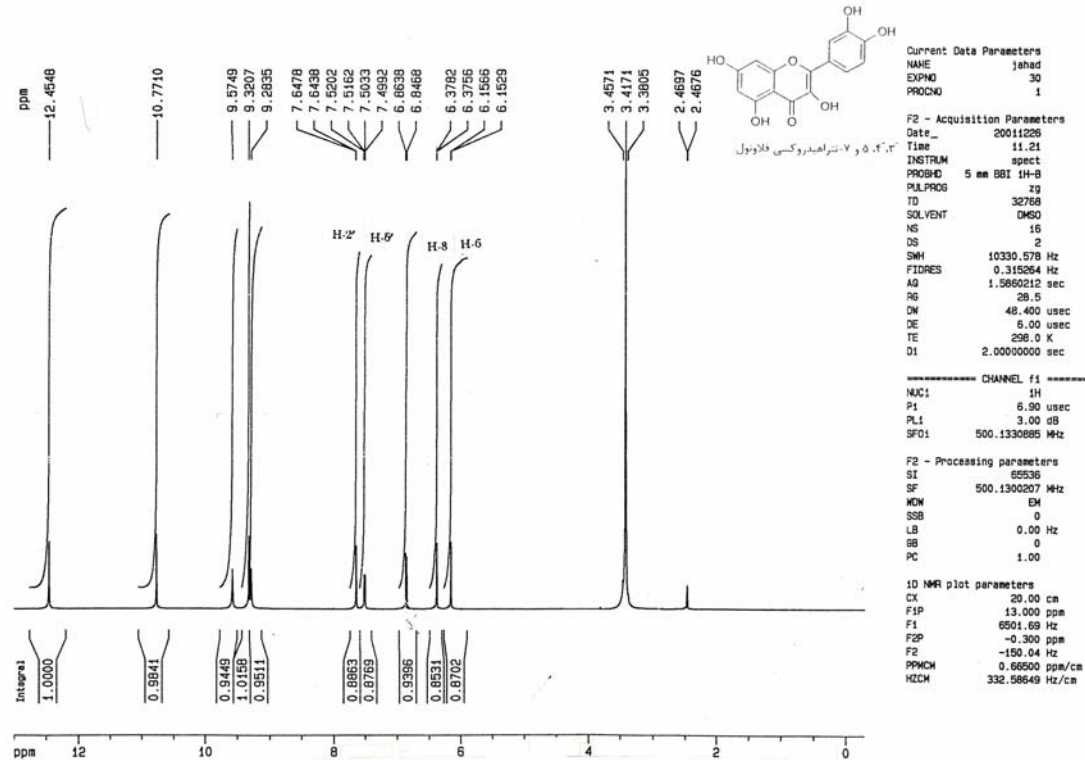
شکل شماره ۲- طیف HPLC از نمونه A و HD



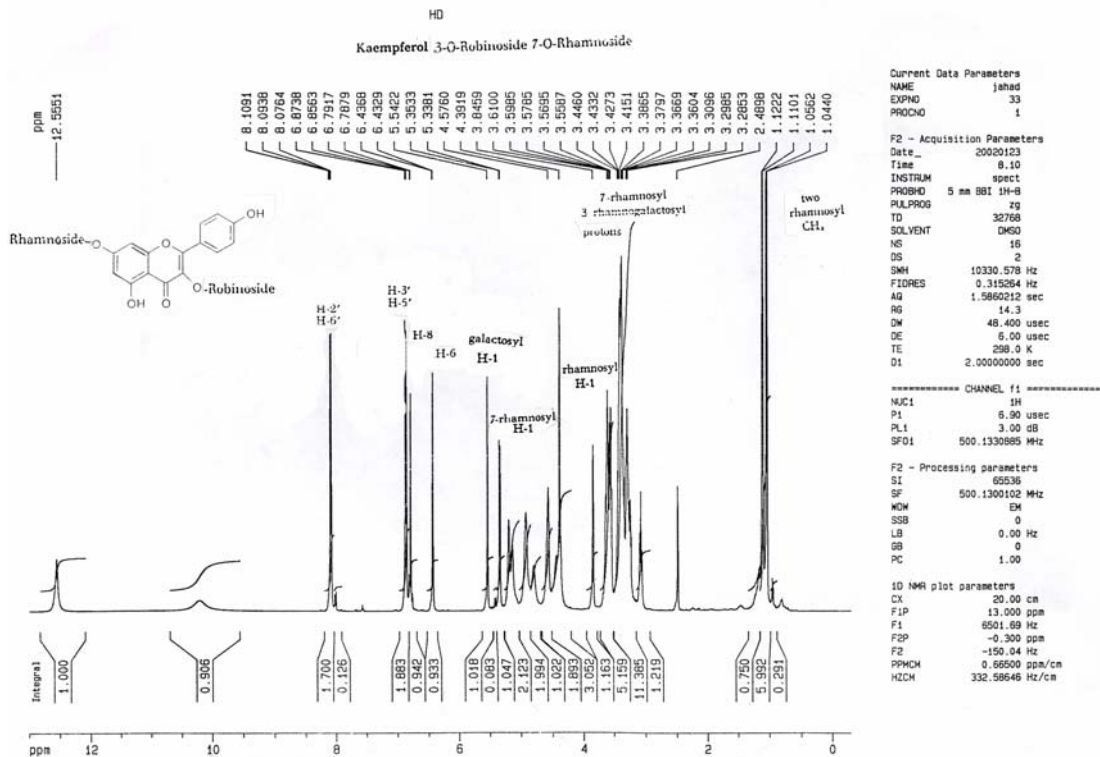
شکل شماره ۳- طیف U.v.-Visible ترکیب A در حلال متانول



شکل شماره ۴- طیف U.v.-Visible ترکیب HD در حلال متانول



شکل شماره ۵- طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب A در حلال DMSO-D_6



شکل شماره ۶- طیف ¹H NMR ترکیب HD در حلال DMSO-D₆

بحث

طیفهای HPLC نمونه‌های استاندارد، پیکهای قوی را در زمانهای بازداری زیر نشان داد. زمان بازداری استانداردهای کوئرستین در ۹/۱۳ دقیقه، کمفرول در ۱۵/۸۲ دقیقه، آپی جنین در ۱۸/۱۸ دقیقه و آکاستین در ۵۳/۲۳ دقیقه بود.

طیف HPLC عصاره‌های گل و برگ حاصل از استخراج با سوکسله هیچ‌کدام از ترکیبهای فلاونوئیدی مورد نظر را نشان نداد.

در مورد سایر عصاره‌ها طیفهای HPLC اطلاعات زیر را حاصل نمود:

عصاره گل حاصل از خوابانیدن در حلال و استخراج با کلروفرم، حاوی ۳۱/۹۶٪ از ترکیبی با زمان بازداری ۳/۶ دقیقه بود. عصاره برگ حاصل از خوابانیدن در حلال و استخراج با کلروفرم، حاوی ۵۳/۲۳٪ از ترکیب با زمان بازداری ۳۱/۰۸ دقیقه و ۲۳/۹۸٪ از ترکیبی با زمان بازداری ۱/۸۶ دقیقه بود. نمونه A حاوی ۸۹/۶۴٪ کوئرستین و نمونه HD حاوی ۹۸/۰۲٪ از ترکیبی با زمان بازداری ۴/۳ دقیقه بود.

نتایج طیفهای HPLC فراکسیونهای حاصل از کروماتوگرافی ستونی به صورت زیر

بود:

فراکسیون C2 (حاصل از شستشوی ستون با حلال کلروفرم) فقط حاوی کوئرستین بود. فراکسیون C3 (حاصل از شستشوی ستون با حلال اتر) حاوی ۲۷/۹۹٪ کوئرستین بود. فراکسیون C4 (حاصل از شستشوی ستون با حلال اتیل استات) فقط حاوی کوئرستین بود. فراکسیون C5 (حاصل از شستشوی ستون با حلال استون) حاوی ۹۹/۲۲٪ کوئرستین بود. فراکسیون C6 (حاصل از شستشوی ستون با حلال متانول) حاوی ترکیبی با زمان بازداری ۲/۷۸ دقیقه و فراکسیون C7 حاصل از شستشوی ستون با حلال (متانول - آب) (۱ به ۱) حاوی ۱۰/۲۱٪ کمفرول و ۸۰/۶۵٪ از ترکیبی با زمان بازداری ۲/۴۷ دقیقه بود.

بررسی ساختمان ترکیب A

نقطه ذوب ترکیب A، 310°C بوده و طیف ماوراء بنفش (UV) و $^1\text{H NMR}$ به صورت زیر بود:

UV: λ max (MeOH) ($254/2\text{nm}$) و ($370/2\text{nm}$), $^1\text{H NMR}$ (500MHZ, DMSO – d₆), $12/5$ ppm (1H, s, OH –_ه), $10/77$ ppm (1H, s, OH –_و), $9/57$ ppm (1H, s, OH –_ز), $9/8$ ppm (1H, s, OH –_ح), $7/6$ ppm (1H, d, 2HZ, H –_ط), $7/5$ ppm (1H, dd, 8/5 & 2HZ, H –_ث), $6/27$ ppm (1H, d, 2HZ, H –_ج)

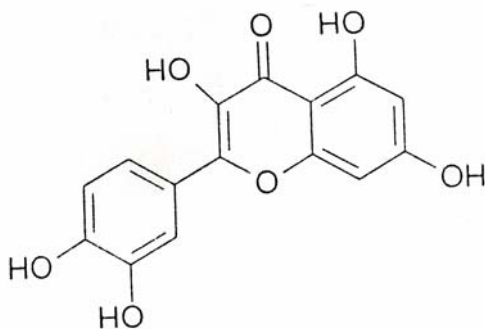
طیف HPLC این ترکیب دارای یک پیک بسیار نزدیک به زمان بازداری استاندارد کوئرستین است. λ max این ترکیب در طیف UV نیز $254/2$ و $370/2$ نانومتر بسیار نزدیک به λ max اعلام شده در منابع برای کوئرستین (255nm , 370nm) می باشد. همچنین نقطه ذوب این ترکیب 310°C بود که با نقطه ذوب گزارش شده در منابع (315°C) همخوانی دارد. طیف $^1\text{H NMR}$ این ترکیب نیز موید کوئرستین است که بررسی طیف پس از مطالعه مرجع مربوط به مشخصات طیفهای $^1\text{H NMR}$ بیانگر ترکیبات فلاونوئیدی می باشد (۷). ترکیب A یک آگلیکون است، زیرا خطوط طیفی مربوط به گلیلوئیدها در ناحیه ($8/5 - 0/5$) ppm مشاهده نمی شود و دو شاخه موجود مربوط به حلال می باشد.

ترکیب A دارای ۵ استخلاف هیدروکسیل است که شاخه مربوط به آنها به صورت یگانه (Singlet) هر کدام با انتگرال یک پروتون در ناحیه بالای ۹ ppm ظاهر شده اند و به طور مشخص شاخه ظاهر شده در $12/45$ ppm مربوط به OH –_ه می باشد و شاخه طیفی در $10/77$ ppm مربوط به OH –_و و شاخه $9/57$ ppm مربوط به OH –_ز و دو شاخه OH دیگر در $9/28$ ppm و $9/36$ ppm مربوط به حلقه B می باشد که با بررسی شاخه های طیفی هیدروژنهای حلقه B موقعیت این دو OH تعیین می شود.

علاوه بر تأیید استخلاف دو گروه $\text{OH} - ۵$ و $\text{OH} - ۷$ وضعیت دو پروتون $\text{H} - ۶$ و $\text{H} - ۸$ نیز به صورت دو شاخه دوگانه با $\text{J} = ۲ \text{ cps}$ و $\text{J} = ۶$ هر کدام با انتگرال حدود یک و مربوط به شکافتگی متا برای پروتونهای $\text{H} - ۶$ و $\text{H} - ۸$ در $۱۵/۶$ و $۳۷/۶$ مشاهده می‌شود.

همچنین یک دو شاخه در $۸/۶$ ppm با $\text{J} = ۸/۵ \text{ cps}$ با انتگرال حدود یک، وجود پروتون $\text{H} - ۵'$ و یک دو شاخه با $\text{J} = ۲ \text{ cps}$ و $\text{J} = ۶'$ در نتیجه جفت شدن متا پروتونهای $۲'$ و $۶'$ با انتگرال حدود یک، در $۶/۷$ ppm وجود پروتون $\text{H} - ۲'$ و یک دو شاخه که به چهار شاخه انشعاب یافته به ترتیب با $\text{J} = ۸/۵ \text{ cps}$ و $\text{J} = ۳$ و $\text{J} = ۲ \text{ cps}$ و $\text{H} - ۴'$ و $\text{H} - ۳'$ مربوط به شکافتگی ارتو پروتونهای $۵'$ و $۶'$ و همچنین شکافتگی متا برای پروتونهای $۲'$ و $۶'$ و انتگرال حدود یک در $۷/۵$ ppm وجود پروتون $\text{H} - ۶$ را تأیید می‌کنند. و در نهایت با توجه بوجود پروتونهای $۲'$ و $۵'$ و $۶'$ وجود دو گروه هیدروکسیل در موقعیتهای $۳'$ و $۴'$ و همچنین اتصال حلقه B از موقعیت ۲ به حلقه C تأیید می‌شود. با توجه به نتایج حاصل و توضیحات فوق ساختار ذیل برای این ترکیب ارائه می‌گردد که همان ساختار کوئرستین است:

بنابراین ترکیب A کوئرستین می‌باشد.



ساختار ترکیب A ۳، ۳'، ۴'، ۵، ۷ پنتا هیدروکسی فلاون (کوئرستین)

بررسی ساختمان ترکیب HD

نقطه ذوب این ترکیب ۲۴۸ درجه سانتیگراد بود. از طیف UV و NMR اطلاعات زیر بدست آمد:

UV: λ max (MeOH) (۲۶۷/۲nm) و (۳۵۱/۶nm), $^1\text{HNMR}$: ۱۲/۵۵ ppm (1H, S, OH_o), ۱۰ ppm (1H, S, OH_ε), ۸/۱ ppm (۲H, t, ۸/۵۱ & ۸ HZ, H_۲, H_۶), ۶/۹ ppm (۲H, m, ۲/۳ & ۷HZ, H_۳, H_۵), ۶/۷ ppm (1H, d, ۲HZ, H_۸), ۶/۴ ppm (1H, d, ۲HZ, H_۶) ۱/۲ppm (۶H, d, ۶HZ, ۲Me), ۵/۵ ppm (1H, S, H_۱), ۵/۳ppm (1H, d, H_{۱,۲}), ۴/۴-۵/۲ ppm (1H, m, H_۱), ۴/۶ppm (1H, S, H_۱), ۳-۳/۸ ppm (۱H, m)

طیف HPLC این ترکیب یک پیک قوی در زمان بازداری ۳ / ۴ دارد. طیف UV این ترکیب با λ max (۲۶۷ / ۲ nm) و (۳۵۱ / ۶ nm) با طیف UV استاندارد روبی نین. (۲۶۵nm و ۳۵۰nm) همخوانی دارد. همچنین نقطه ذوب این ترکیب ۲۴۸ °C با نقطه ذوب گزارش شده در منابع برای روبی نین (۲۵۴° - ۲۵۰°) همخوانی دارد. طیف $^1\text{HNMR}$ این ترکیب نیز جذبه‌های مختلف روبی نین یعنی کمفرول - ۳ - O - روبینوزید - ۷ - O - را نشان می‌دهد که در تفسیر طیف می‌توان موارد ذیل را ذکر نمود:

- ترکیب HD یک فلاونوئید گلیکوزید است، زیرا خطوط طیفی مربوط به گلیکوزیدها در ناحیه ppm (۵/۸ - ۰/۸) مشاهده می‌شود.

- ترکیب HD دارای دو استخلاف OH است که مشخصاً شاخه ظاهر شده در ppm ۱۲/۵۵ با انتگرال یک به گروه ه - OH نسبت داده می‌شود. و یک تک شاخه هم در ۱۰ ppm با انتگرال حدود یک، وجود استخلاف OH دیگر در ترکیب را نشان می‌دهد.

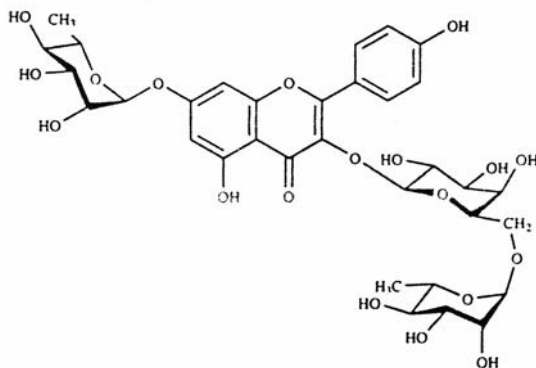
همچنین دو شاخه با cps = ۲ J_{۶,۸} = ۴ در ppm ۶/۴ و ppm ۶/۷ مربوط به جفت

شدن متا در پروتونهای C-۶ و C-۸ مشاهده می‌شود. که وجود استخلاف OH در موقعیت ه- C تأیید و همچنین وجود استخلاف در موقعیت C-۷ با اتصال به قند از آن موقعیت را نشان می‌دهد. یک چند شاخه در ۹ ppm با انتگرال دو پروتون مربوط به پروتونهای H-۳ و H-۵ شامل یک دو شاخه با $J_{۳,۵} = ۲/۳$ cps و $J_{۳,۵} = ۴$ مربوط به جفت شدن متا در این پروتونها و یک سه شاخه با $J_{۳,۲} = ۷$ cps و $J_{۳,۲} = ۷$ cps و $J_{۳,۲} = ۷$ cps مربوط به جفت شدن ارتو این دو پروتون مشاهده می‌شود.

همچنین یک سه شاخه در $\delta = ۸/۱$ ppm با انتگرال دو پروتون مربوط به جفت شدن ارتو پروتونهای H-۲ و H-۳ با $J_{۲,۳} = ۸/۵$ cps و $J_{۲,۳} = ۳$ و یک جفت شدن ارتو پروتونهای H-۶ و H-۵ و $J_{۶,۵} = ۸$ cps و $J_{۶,۵} = ۳$ می‌باشد. که موید پروتونهای H-۲ و H-۶ است. و همچنین وجود پروتونها در موقعیتهای C-۳ و C-۵ و C-۲ و C-۶ وجود استخلاف OH یا اتصال قند در موقعیت C-۴ را نشان می‌دهد. که با بررسی بخش مربوط به قند در طیف، اتصال قند و گروه OH مشخص می‌شود در ناحیه مربوط به جذب گلیکوزیدهای ترکیب HD دو دو شاخه در $۱/۲$ ppm که با $J = ۶$ cps و انتگرال شش پروتون مشاهده می‌شود که اتصال دو قند منوز را نشان می‌دهد. یک تک شاخه در $۵/۵$ ppm مربوط به $H = ۱$ در B-گالاکتوزیل می‌باشد که به یک رامنوز متصل است. یک دو شاخه با $J = ۷/۶$ cps در $\delta = ۵/۳$ ppm مربوط به جفت شدن پروتونهای H-۱ و H-۲ (پروتونهای قند) در $O - ۷$ - رامنوزید می‌باشد. که به علاوه چندتایی پیچیده در $(۵/۲ - ۴/۴)$ ppm نیز اتصال $O - ۷$ - رامنوزیل را تأیید می‌کند. لازم به ذکر است که قند رامنوز به طور طبیعی در فلاونوئید به صورت $\alpha - L$ می‌باشد. یک علامت طیفی تک شاخه نیز در $\delta = ۴/۶$ ppm مربوط به پروتون $C = ۱$ در $O - ۳$ - رامنوزیل می‌باشد. علائم طیفی پیچیده در $(۳ - ۳/۸)$ ppm مربوط به پروتونهای قندهای متصل شده با ۱۱ و ۵ با پروتونهای گالاکتورامنوزیل و پیرانوزیل همخوانی دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده ساختار زیر برای ترکیب HD یعنی روبی نین پیش‌بینی

می‌شود:



ساختار ترکیب HD (روبی نین) [کمبرول - ۳-O-β-D - گالکتوفورانوزیل - L - رامنوپیرانوزیل] - ۷-O-α-L - رامنوپیرانوزیل]
Kaempferol 3-rhamnosyl-(1 →6)-galactoside-7-rhamnoside

علاوه بر تعیین ساختار ترکیبات A و HD نتایج ذیل نیز جمع‌بندی می‌شود:

- روش سوکسله روش مناسبی برای استخراج فلاونوئید از گیاه اقاچیا نیست و روش خوابانیدن در حلال ضمن اینکه در مدت کوتاه‌تری فلاونوئیدهای گیاه را استخراج می‌کند به دلیل نداشتن حرارت باعث حفظ بهتر کیفیت این ترکیبها می‌شود.
- مناسبترین حلال برای استخراج فلاونوئیدهای اقاچیا، متانول و آب است.
- علاوه بر روبی نین به عنوان فلاونوئید اصلی تشکیل‌دهنده عصاره اقاچیا، کوئرستین به میزان بالایی در این گیاه وجود دارد.
- میزان عصاره مطلق و در نتیجه میزان کوئرستین در گل‌های اقاچیا بیشتر از برگ‌های آن است.

- کمبرول موجود در گل‌های اقاچیا به فرم گلیکوزیدی از نوع گمبرول - ۳ - O - روبینوزید - ۷ - O - رامنوزید است و کمبرول آزاد به صورت اگلیکون در گل‌های اقاچیا موجود نمی‌باشد.

مقایسه نتایج حاصل از استخراج و شناسایی فلاونوئیدهای موجود در گل و برگ افاقیا با تحقیقات انجام شده قبلی (Maksyutina, ۱۹۶۸) نشان داد که کوئرستین که در میوه خشک و نارس افاقیا وجود داشته از برگ و گل این گیاه نیز قابل استخراج است. نتایج این تحقیق در مورد وجود آکاستین در برگ و گل افاقیا نیز با تحقیقات قبلی (Kubota *et al*, ۱۹۶۶) در مورد برگ این گیاه نیز مطابقت دارد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع به خصوص بخش تحقیقات گیاهان دارویی به دلیل فراهم نمودن هزینه، امکانات و تجهیزات لازم تشکر می‌نمایم.

منابع

- آزادبخت، م.، ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. انتشارات تیمورزاده، تهران.
- زرگری، ع.، ۱۳۶۷. گیاهان دارویی. جلد دوم، ص ۶۳ انتشارات دانشگاه تهران.
- Cody, V, Middleton, E. and Harborn, J. B., 1986. Plant flavonoids in Biology and Medicine, Alan R. Liss, New York.
- Freudenberg(a), K., and Hartmann, L., 1953. Constituents from Robinia pseudoacacia L., Naturwissen schaften, 40, 413.
- Freudenberg(b), K., and Hartmann, L., 1953. Extractives of Robinia pseudoacacia L., 587, 207-212.
- Kupchan, S. M, and Beuerschmidt E, 1971. Rthochem. 10 pp 664.
- Pusztai, R, Beladi, I, Bakay, M., 1966. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 13, 113.
- Freudenberg(a), K., and Hartmann, L., 1953. Constituents from Robinia pseudoacacia L., Naturwissen schaften, 40, 413.
- Freudenberg(b), K., and Hartmann, L., 1953. Extractives of Robinia pseudoacacia L., 587, 207-212.
- Ismailov, N. M. and Achmedova, E. R., 1980. Main components of Robinia pseudoacacia oil, Maslo-Zhir. Prom., 12, 27-28.
- Joulain, D., 1986. Progress in essential oil research (Proc. Intern. Symp. Ess. Oils) Berlin, 57-67.
- Kamdem, D. P., 1994. Characterization of black locust floral fragrance, J. Essent. Oil Res., 6, 199-200.
- Kubota, T., and Hase t., 1966. Constituents of the leaves of Robinia pseudoacacia L., Nippon Kagaku Zasshi, 87 (11), 1206-8.

- Mabry, T. J., Markham, K. R., and Thomas, M.B., 1970. Systemic Identification of Flavonoids, Spring –Verlag, New York.
- Maksyutina, N. P., Litvinenko, V. I., 1968. Flavonoid carboxylic acid, Symp. 1st 1966 (Pub 1968), 60-63, (Russ).
- Markham, K. R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London.
- Mun, G. S., Song, H. Y., Jang, S. G., 1978. Paper and thin layer chromatographic study of some flavonoid compounds. Kim. In Gi. Punsok Hwahak, 16(3), 107-114 (Korean).
- Osipovich, L. I., 1975. Comparative characteristics of biologically active substances of inflorescences of Robinia species. Fitokhim. Izuch. BSSR Biofarm. Issled. 77-80 (Russ).
- Sefidkon, F., Alinia, M., Aghavali Jamaat, A., 2002. Volatile components of *Robinia pseudoacacia* L., J. Essent. Oil, Bearing Plants, 5(3), 169-172.
- Wetzel, A., Scheidemann, P. and Werner, D., 1955. Flavonoids in the root space of *Robinia pseudoacacia* L., isolation, identification and interactions, Wurzelraumes, 5th 1994 (Pub 1995), 119-122 (Ger).

Extraction, Separation and Identification of Flavonoides (Quercetine and Robinine) from *Robinia pseudoacacia* L.

F. Sefidkon¹, A. Agha-Vali Jamaat², M. Alinia Rodsari³ and K. Jimand⁴

Abstract

Robinia pseudoacacia (Black locust) is an ornamental tree with beautiful flowers. Its main distribution is North America which spreads to Europe, Asia and Iran. Today, it is naturalized in Iran and grows in every where.

Previously, we reported chemical composition of the essential oil and absolute of hexan extract of *R. pseudoacacia*.

In this research, the flavonoids from flowers and leaves of *Robinia pseudoacacia* were investigated. The extracts of flowers and leaves of *R. pseudoacacia* were obtained by Soxhlet apparatus (by petroleum ether, benzen, chlorform, acetone and methanol) and also by maceration in methanol-water (9:1) and then methanol-water (1:1) and extraction with chlorform and hexan. After purification and separation of the extracts by P.C, HPLC, column and flash chromatography, two flavonoids, Quercetine and Robinine were obtained as pure compounds. Structure of the compounds were characterized by HPLC (using standards), U.V. and ¹HNMR.

Key words: *Robinia pseudoacacia*, Flavonoids, Quercetin, Robinine.

1- Research Institute of Forests and rangelands, P. O. Box: 13185-116, Tehran.

E-mail: frsef@rifr-ac.ir

2- Zanjan University, Faculty of Science, Chemistry Department, Zanjan.

3- Zanjan University, Faculty of Science, Chemistry Department, Zanjan.

4- Research Institute of Forests and rangelands, P. O. Box: 13185-116, Tehran.

Extraction, Separation and Identification of Flavonoides (Quercetine and Robinine) from *Robinia pseudoacacia* L.

F. Sefidkon¹, A. Agha-Vali Jamaat², M. Alinia Rodsari³ and K. Jimand⁴

Abstract

Robinia pseudoacacia (Black locust) is an ornamental tree with beautiful flowers. Its main distribution is North America which spreads to Europe, Asia and Iran. Today, it is naturalized in Iran and grows in every where.

Previously, we reported chemical composition of the essential oil and absolute of hexan extract of *R. pseudoacacia*.

In this research, the flavonoids from flowers and leaves of *Robinia pseudoacacia* were investigated. The extracts of flowers and leaves of *R. pseudoacacia* were obtained by Soxhlet apparatus (by petroleum ether, benzen, chlorform, acetone and methanol) and also by maceration in methanol-water (9:1) and then methanol-water (1:1) and extraction with chlorform and hexan. After purification and separation of the extracts by P.C, HPLC, column and flash chromatography, two flavonoids, Quercetine and Robinine were obtained as pure compounds. Structure of the compounds were characterized by HPLC (using standards), U.V. and ¹HNMR.

Key words: *Robinia pseudoacacia*, Flavonoids, Quercetin, Robinine.

1- Research Institute of Forests and rangelands, P. O. Box: 13185-116, Tehran.

E-mail: frsef@rifr-ac.ir

2- Zanzan University, Faculty of Science, Chemistry Department, Zanzan.

3- Zanzan University, Faculty of Science, Chemistry Department, Zanzan.

4- Research Institute of Forests and rangelands, P. O. Box: 13185-116, Tehran.