جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۲ شمارهٔ ۱ ، صفحهٔ ٦٥ - ٦٨ ، (۱۳۸۵)

استخراج و جداسازي تركيب خواب‌آور گلبرگهاي *Rosa damascena* Mill.

سید محمد سیدی[۱]، حسن رخشنده[۲] و حمید صادقیان[۳]

۱- دانشیار گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، e-mail: smseyedi@yahoo.com

۲- استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- دانشجوی دکترای شیمی آلی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در این تحقیق استخراج و جداسازی هدفمند ترکیبهای گلبرگهای گیاه *Rosa damascena* (از تیرهٔ *Rosaceae*) به منظور یافتن عامل موثر خواب آور آن، انجام پذیرفته است. حداقل دوز موثر خواب آور بر روی موش های نژاد Balb-C مبنای استخراج و جداسازی ترکیبها قرار گرفت. استخراجهای مختلفی توسط حلالهای کلروفرم، اتانول و آب صورت گرفت که از میان آنها عصارهٔ اتانولی بهترین اثر را با حداقل دوز mg/kg ۵۰۰ نشان داد. کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC) حضور پنج ترکیب عمده را در این عصاره نشان داد که از میان آنها مادهٔ مورد نظر توسط کروماتوگرافی ستونی جداسازی گردید. آزمونهای فیزیولوژیکی حداقل دوز خواب آور ترکیب جدا شدهٔ مورد نظر را، mg/kg ۱۵ تعیین کرد. همچنین ساختمان شیمیایی ترکیبهای جدا شده از ستون، توسط تکنیک های طیف سنجی Mass ، IR و NMR مورد بررسی قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: *Rosa damascena*، خواب آور، کروماتوگرافی، تانن.

مقدمه

تا به حال اثرات بیولوژیکی مختلفی از اسانس و عصاره‌های قطبی و غیر قطبی گلبرگهای *Rosa damascena* گزارش شده است. در سالهای اخیر مقالاتی در رابطه با خواص ضد التهابی (رخشنده و همکاران، ۱۳۸۳) ضد سرفه (Rakhshandeh *et al.*, 2003)، ضد ویروسی (Mahmood *et al.*, 1996) و درنهایت خواب‌آوری (Rakhshandeh *et al.*, 2004) عصاره‌های آبی و الکلی گلبرگهای این گیاه به چاپ رسیده است. در این تحقیق، پیرو نتایج گزارش شده در مورد اثرات خواب‌آوری عصارهٔ الکلی گلبرگهای گیاه مذکور که بر روی موش های Balb-C آزمایش شده بود، سعی شد تا ترکیب یا ترکیبهای شیمیایی موثر موجود در عصارهٔ این گلبرگها، مطابق با دوز خواب‌آوری آن بر روی موش‌های آزمایشگاهی، جداسازی گردند.

مواد و روشها

صفحات TLC (سیلیکاژل ٦٠ اف ٢٥٤، شرکت مرک آلمان)، سیلیکاژل ٦٠ مخصوص ستون کروماتوگرافی (٠/٠٤ – ٠/٠٦٥ میلی‌متر) بود.

دستگاههای استفاده شده شامل طیف سنج IR، مدل Buck 500، طیف سنج جرم Varian، مدل Match 7A، طیف سنج NMR (500 MHz) شرکت Brucker، آنالیزگر عنصری Thermofinnigan مدل Flash EA 1112. بودند.

گلهای *Rosa damascena* به شمارهٔ هرباریوم ۰۱-۱۸۰٤-۲٥٤ توسط بخش کشت و صنعت گلاب نادر مشهد تهیه و ارسال شده بود. کلیهٔ حلالها از شرکت مرک آلمان و پانراک اسپانیا خریداری شده است.

برای هر آزمایش خواب‌آوری تعداد بیست موش نر Balb-C با محدودهٔ وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم انتخاب شد، بعد محلولی از عصارهٔ بدست آمده با دوز مورد نظر به ده عدد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

از آنها تزریق شد. بعد از ۳۰ دقیقه، ۰/۰۳ میلی گرم پنتوباربیتال به ازای هر گرم وزن، به همهٔ موش‌ها به منظور ایجاد خواب تزریق گردید. از لحظهٔ شروع خواب هر موش تا موقع بیدار شدن، زمان گرفته می‌شد و با زمان خواب موش های عصاره نگرفته (گروه شاهد) مقایسه می‌گشت و در صورت قابل قبول بودن از دوز های پایین تر استفاده می‌شد (Rakhshandeh *et al.*, 2004).

جهت تعیین قوی ترین عصاره و اینکه عامل خواب آور مورد بحث از نظر قطبیت در چه وضعیتی قرار دارد، توسط سه سیستم حلالی آب، اتانول۹٦٪ و دی کلرومتان از گلبرگهای خشک شدهٔ *Rosa damascena* با روش خیساندن عصاره گیری شد و پس از تغلیظ شدن کامل، مورد آزمون خواب‌آوری قرار گرفتند که از میان آنها نمونهٔ اتانولی بهترین اثر را با حداقل دوز mg/kg ۵۰۰ از خود نشان داد.

با توجه به نتایج بدست آمده مقدار ۲۵۰ گرم از گلبرگهای خشک شده در سه زمان هشت ساعته و هر بار توسط ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای اتاق خیسانده شد تا عمدهٔ مواد محلول در آب گلبرگها که اثر خواب‌آوری از آنها مشاهده نشده بود، استخراج گردند. سپس توسط اتانول ۹٦٪ مطابق روش ذکر شده، از گلبرگهای خیس عصاره گیری بعمل آمد. بعد از تغلیظ کردن، نمونهٔ الکلی اثر خواب‌آوری با حداقل دوز mg/kg ۱۰۰ از خود نشان داد.

در مرحلهٔ بعد فرآوردهٔ الکلی بدست آمده، به وسیلهٔ حلال دی کلرومتان در دستگاه سوکسله مورد استخراج قرار گرفت تا مواد قابل حل در دی کلرومتان که اثر خواب‌آوری نداشتند از آن جدا شوند. نمونهٔ مورد استخراج که حدود ۵۰٪ از وزن آن کاسته شده بود (مادهٔ **E**)، اثر خواب‌آوری با حداقل دوز mg/kg ۵۰ نشان داد.

مادهٔ **E** به دلیل عدم تغییر رنگ با منیزیم در اسید کلریدریک غلیظ (Markham, 1982) ، عدم ایجاد کف پایدار در آب (Paris *et al.*, 1965) و تغییر رنگ ندادن با محلول ساب نیترات بیسموت و یدید پتاسیم در استیک اسید (Evans, 1989)، به ترتیب فاقد فلاونوئید، ساپونین و آلکالوئید بود، ولی ایجاد رسوب با محلول مایی ژلاتین و آبی رنگ کردن معرف فریک کلراید (Evans, 1989) مشخص نمود که مادهٔ **E** به طور عمده حاوی تانن بوده است. ایجاد رنگ با معرف یدات پتاسیم (Hartzfeld *et al.*, 2002) و عدم واکنش با اسید نیترو و وانیلین هیدروکلراید (Bate-Smith, 1972)، نشان داد که مواد عمدهٔ تشکیل دهندهٔ **E** از نوع گالوتانن می‌باشد. کروماتوگرام لایهٔ نازک (TLC) با فاز متحرک اتیل استات، آب، استون، اسید فرمیک (نسبت ۵ : ۱ : ۳ : ۱) در زیر نور ماوراء بنفش (طول موج ۲۵٤ نانومتر) چهار ترکیب قابل توجه را در فراوردهٔ **E** نشان داد. از میان این چهار ترکیب، دو مورد به تانن‌ها تعلق داشتند و در برابر معرف فریک کلراید آبی رنگ می‌شدند (شکل ۱).

ترکیبهای فوق توسط ستون کروماتوگرافی پر شده از سیلیکاژل اسید شویی شده (۱۰×۳ سانتیمتر) و با فازهای متحرک اتیل استات- هگزان (۵۰ :۵۰) ، اتیل استات و در نهایت اتانول ۸۰٪، مورد جداسازی قرار گرفتند (جدول ۱).

نتایج

از میان اجزاء جدا شده تنها جزء $\mathbf{E_{A4}}$ اثر خواب‌آوری با حداقل دوز mg/kg ۱۵ از خود نشان داد. با تحلیل های شیمیایی و دستگاهی (پاراگراف بعدی) مشخص شد که $\mathbf{E_{A2}}$، گالیک اسید و $\mathbf{E_{A3}}$، ۲، ٤، ٦ تری-O- گالویل-D-گلوکز می‌باشد. در مورد ساختمان شیمیایی $\mathbf{E_{A4}}$ بدلیل کافی نبودن اطلاعات طیفی، نمی‌توان پیشنهادی ارائه داد. با توجه به تحلیل‌ها و طیف‌های موجود، احتمالاً $\mathbf{E_{A4}}$ به دستهٔ فسفوگلیکوزیدها تعلق دارد. تحلیل عنصری $\mathbf{E_{A4}}$ ۳۹/٤۲٪ کربن، ٤/۸۲٪ هیدروژن، ۳۸/۸۵٪ اکسیژن و ۱٦/۹۱٪ فسفر را نشان می‌دهد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Gallic Acid (**E_{A2}**). Light yellow needles, mp 238° (dec), pH(1%) 2.8, TLC (silica gel), R_f 0.93, ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSOd_6$): δ 6.92 (*s*, 2H, galloyl), 8.5 – 10.5 (broad pick, 4H in total, OH of galloyl and carboxylic acid). IR (KBr) 3370, 3292, 3046, 1701, 1617, 1307, 1224, 1024, 867, 703 cm^{-1}. MS m/z (relative intensity) 170 (M^+, 0.5), 167 (91), 150 (68).

2,4,6-Tri-O-galloyl-D-glucose (**E_{A3}**). A brown amorphous powder, TLC (silica gel), R_f 0.83, ^{1}H NMR (500 MHz, $DMSOd_6$): δ 6.80-6.90 (6H in total, galloyl), 5.28 (1H, *d*, *J* = 3.6 Hz, α-anomer H-1), 4.70 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, β-anomer H-1), 4.64 (1H, *dd*, *J* = 9, 3.6 Hz, α-anomer H-2), 4.78 (1H, *dd*, *J* = 8.4, 8 Hz, β-anomer H-2), 4.25 (1H, *t*, *J* = 9 Hz, α-anomer H-3), 4.87 (1H, *t*, *J* = 8.4 Hz, β-anomer H-3), 5.04 (1H, *t*, *J* = 9, α-anomer H-4), 5.01 (1H, *t*, *J* = 8.4 Hz, β-anomer H-4), 4.15-4.25 (3H, *m*, α-anomer H-5, 6), 3.77 (1H, *ddd*, *J* = 2, 6, 8.4 Hz, β-anomer H-5), 3.90 (1H, *ddd*, *J* = 2, 6, 13 Hz, β-anomer H-6). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSOd_6$): δ 167.84, 167.32, 146.92, 139.96, 122.19, 122.38, 122.48, 110.55, 11.13, 97.07, 91.74, 77.20, 75.66, 73.48, 73.16, 73.09, 73.00, 70.35, 68.91, 64.29, 64.19. IR (KBr) 3422, 3048, 2946, 1728, 1621, 1324, 1182, 1063, 798 cm^{-1}. (Found: C, 43.19; H, 4.61. $C_{27}H_{24}O_{18}.6H_2O$. requires: C, 43.55; H, 4.84%.)

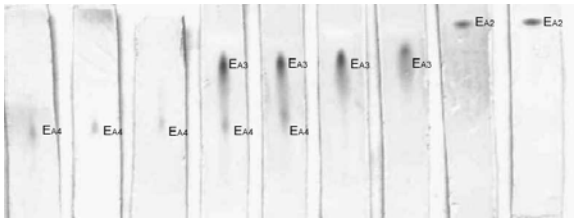
هیدرولیز **E_{A3}** (۱۰ میلیگرم) در اسید سولفوریک ۵٪ (۲ میلی لیتر) به صورت رفلاکس در مدت ٤ ساعت، اسید گالیک و گلوکز را ایجاد کرد. گلوکز با کیت آنزیمی و گالیک اسید توسط TLC و HPLC شناسایی شدند (Xin-Min *et al.*, 1987).

بحث

تحقیق فوق جداسازی ترکیبهای گیاهی را بر اساس خواص بیولوژیکی آن نشان می‌دهد. بر این اساس ابتدا با انجام چند مرحله استخراج که توأم با آزمایشهای بیولوژیکی انجام می‌پذیرد، عصاره‌ای را بدست می‌آوریم که با کمترین دوز جواب بدهد. با چنین عملی غلظت ترکیب مورد نظر در عصاره بالا رفته و امکان جداسازی آن بیشتر می‌شود. اگر درصد یک ترکیب بیولوژیک در نمونه ای از گیاه بسیار پایین باشد و بخواهیم از ابتدا فراوردهٔ تام اولیهٔ آن را با کروماتوگرافی مورد جداسازی قرار دهیم، به دلیل تعدد سایر ترکیبها در عصاره، موفق به جدا کردن مادهٔ مورد نظر نخواهیم شد. برای مثال در این کار پژوهشی، لکهٔ مربوط به **E_{A4}** در کروماتوگرام لایهٔ نازک تهیه شده از عصارهٔ تام الکلی اولیه دیده نشد، در حالی که در کروماتوگرام‌های بدست آمده از عصارهٔ **E**، به راحتی قابل تشخیص بود.

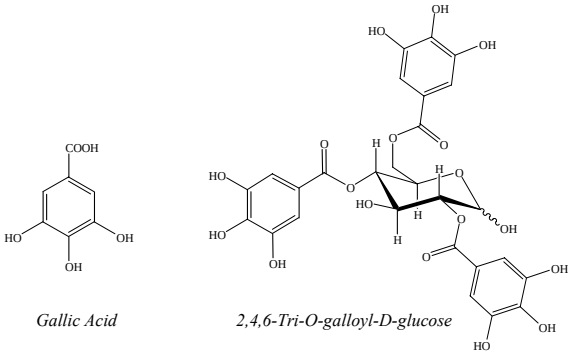
جدول ۱- اطلاعات مربوط به اجزای جداشده از ستون کروماتوگرافی

وزن	نام	شکل ظاهری	R_f
38 mg	E_{A1}	جامد بی شکل قهوه ای روشن	0.96
82 mg	E_{A2}	بلور های سوزنی ریز زرد روشن	0.93
44 mg	E_{A3}	پودر بی شکل قهوه ای	0.81
34 mg	E_{A4}	پودر بی شکل قهوه ای	0.53



شکل ۱- کروماتوگرام‌های لایهٔ نازک تهیه شده از خروجی‌های ستون با فاز متحرک اتیل استات، آب، استون، اسید فرمیک (نسبت ۵ : ۱ : ۳ : ۱) و معرف فریک کلراید. همان طور که مشاهده می‌شود فقط E_{A2} وE_{A3} به معرف فریک کلراید به خوبی جواب داده‌اند. (E_{A1} به دلیل عدم ایجاد رنگ با فریک کلراید در TLCها مشخص نیست.)

- Bate-Smith, E.C., 1972. Journal of Phytochemistry, 11: 115-1157.
- Evans, W.C., 1989. Treas and Evan's Pharmacognosy. Balliere Tindall, 338: 546-547.
- Hartzfeld, P.W., Forner, R. and Hunter, M.D., 2002. Journal of Agric Food Chemistry, 50: 1785-1790.
- Mahmood, N., Piacente, S. and Pizza, K., 1996. The Anti-HIV Activity and Mechanisms of Action of Pure Compounds Isolated from *Rosa damascena.* Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications, 229 (1759): 73-79.
- Markham, K.R., 1982. Techniques of Flavonoids Identification. Academic press, London, UK.
- Paris, R.R. and Moyse, H., 1965. Métiers Medical. Tome, Paris, 133 p.
- Rakhshandeh, H., Hosseyni, M. and Dolati, K., 2003. Antitussive Effect of *Rosa damascena* in Guinea Pigs. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2: 231-234.
- Rakhshandeh, H., Hosseyni, M. and Dolati, K., 2004. Hypnotic Effect of *Rosa damascena* in Mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3: 181-185.
- Xin-Min, C. and Yoshida T., 1987. Journal of Phytochemistry, 26(2): 515-517.



منابع مورد استفاده

- رخشنده، ح.، دولتی، ک.، حسینی، م. و اسماعیل زاده، م.، ۱۳۸۳. بررسی اثرات ضد دردی و ضد التهابی گل محمدی. مجلهٔ علوم پایهٔ پزشکی ایران، ۷(۳): ۱۵٦-۱۵۱.

Extraction and Separation of Sedative Compounds from Petals of *Rosa damascena* Mill.

S. M. Seyyedi[1], H. Rakhshandeh[2] and H. Sadeghian[3]
1- Department of Pharmacology, Medical Science University of Mashhad, e-mail: smseyedi@yahoo.com
2- Department of Chemistry, Ferdowsi University of Mashhad
3- PhD student of Ferdowsi University

Abstract

In this research, the extraction and separation of sedative compounds of *Rosa damascena* Mill. (from Rosaceae family) was studied. The minimum dosage of sedative effect was the basis of physiological tests (on Balb-C mouse) which has done in Mashhad University of medical sciences. Several extractions were done by ethanol, chloroform and water, among which the extracted syrup from ethanol showed the best effect (500mg/kg). This syrup showed five main spots on TLC (thin layer chromatography), from which the desired compound was separated by column chromatography. The physiological tests of the pure compound from column chromatography showed that the minimum effective dosage was 15mg/kg. The chemical structure of separated compounds was also studied by Mass, IR and NMR spectroscopy.

Key words: *Rosa damascena,* sedative, chromatography, tannin.