شناسایی و تعیین ساختمان ترکیب ضد سرطانی سورولین درگیاه دارویی *Psoralea corylifolia*

بهروز محمدپرست[۱*]، موسی رسولی[۲]، رضا داوری[۳]، علیرضا روستایی[٤]

[۱] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

[۲] استادیار گروه مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

[۳] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه پیام نور واحد اراک، اراک، ایران

[٤] مربی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸

چکیده

سورولین یکی از متابولیت‌های ثانویه با اثر ضد سرطانی می‌باشد که در گیاه *Psoralea corylifolia* وجود دارد. در تحقیق حاضر میزان سورولین، دایدزین و جنیستین در اندام‌های مختلف این گیاه در شرایط مزرعه وکشت درون شیشه‌ای بوسیله دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان سورولین در اندام‌های تولید شده در شرایط مزرعه‌ای بیشتر از شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. بیشترین میزان سورولین (۳۰۵۸µg/g fresh wt.) در بذرهای قهوه‌ای این گیاه وجود داشت. آنالیز کمی سورولین در کالوس‌های گرفته شده از قسمت‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان سورولین (µg/g fresh wt.۲۶۰۱/۸) در کالوس‌های گرفته شده از لپه می‌باشد. تعیین ساختمان شیمیایی سورولین برای اولین بار از کالوس بوجود آمده از لپه به وسیله تکنیک‌های طیف سنج مادون قرمز بسط فوریه (FT-IR)، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی ستونی و NMRH- صورت گرفت. به‌طوری‌که میزان R_f متعلق به سورولین در کروماتوگرافی لایه نازک ۰/٤۰ بدست آمد. همچنین میزان دایدزین و جنیستین در اندام‌های مختلف بررسی شده تنها در بذرها به مقدار بسیار اندک به‌ترتیب ۰/۹٤ و ۰/۲۰ میکروگرم بر گرم وزن‌تر بدست آمد.

واژگان کلیدی: *Psoralea corylifolia*، سورولین، HPLC، H-NMR.

*نویسنده مسئول: bmp2013@yahoo.com

مقدمه

گیاه *Psorallea corylifolia* متعلق به تیره *Fabaceae* و از گیاهان رو به انقراض می‌باشد. جنس *Psorallea* دارای ۱۳۰ گونه در مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری سرتاسر دنیا می‌باشد که برخی از آنها به‌صورت یکساله، دو ساله و چند ساله رشد نموده و مورد کشت و کار قرار می‌گیرند (Willis, 1966). گیاه *Psorallea corylifolia* چند ساله بوده و جهت رشد و نمو خاک‌های لومی با pH اسیدی و نسبتاً خنثی را ترجیح می‌دهد.

گیاه *Psorallea corylifolia* منبع غنی از مواد و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که آن را از لحاظ فارماکولوژیکی با ارزش ساخته است. بذرهای این گیاه دارای خواص ضد باکتری، دافع کرم روده، تقویت‌کننده قوای جنسی، ضدسم، آرام بخش، ادرا آور، ضدالتهاب و ضد سرطان می‌باشد (Joshi, 2000).

همچنین ارزش دارویی این گیاه به خاطر وجود ترکیبات با ارزشی مثل ایزوفلاونوئیدها[1] و فورانوکومارین‌ها[2] می‌باشد. فورانوکومارین‌ها از متابولیت‌های طبیعی می‌باشند که به دو دسته خطی سورولین[3] و غیرخطی آنژلیسین[4] تقسیم می‌شوند (Joshi, 2000). از بین همه ترکیبات با ارزش دارویی که در این گیاه وجود دارد، سورولین، دایدزین و جنیستین از مهمترین آنها می‌باشند. سورولین به‌عنوان دارو برای درمان سرطان پوست، خون، سینه و ریه استفاده می‌گردد (Oliveira et al., 2006). شناسایی و استخراج سورولین از بذر توسط برخی از محققین گزارش شده است (Guo, 2003; Ruan, 2007; Rajput, 2008).

شناسایی و استخراج سورولین از قسمت‌های مختلف گیاه *Psoralea corylifolia* در شرایط کشت مزرعه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی توسط Ding et al., 2004؛ Dong et al., 2003؛ Innocenti et al., 1984 و Qiao et al., 2007 مورد بررسی قرار گرفته است.

گیرارد و همکاران (۲۰۰٤) قسمت‌های متفاوت هوایی گیاه *Phebalium brachycalyx* را بوسیله روش‌های کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی لایه نازک مورد آنالیز قرار دادند. تمام متابولیت‌های مربوط به گروه کومارین با استفاده از این تکنیک‌ها استخراج گردید. نتایج آنها وجود ترکیبات سورولین، ایزوگوزفرول، مونواستات و هراکلینول را در گیاه بررسی شده نشان داد.

علی و همکاران (۲۰۰۸) برای آنالیز سورولین از *Psoralea corylifolia* از روش TLC[5] استفاده نمودند. در این روش فاز متحرک، حلال‌های ان- هگزان، استون و اسید فورمیک به نسبت‌های (v/v/v) ۰/۰۲۵ : ۲:۱ مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج آنها نشان داد که میزان R_f[6] مربوط به سورولین ۰/۳۲ می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق شناسایی و تعیین میزان سورولین در قسمت‌های متفاوت گیاه *Psoralea corylifolia* کالوس‌های گرفته شده از آن، گیاهان گرفته شده از کالوس و تعیین ساختمان سورولین استخراج شده از کالوس‌های گرفته شده از لپه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia* از آزمایشگاه فارماکولوژی واقع در قازی‌آباد در ایالت اوتارپرادش[7] هندوستان خریداری گردید و در باغ گیاه‌شناسی دانشگاه دهلی در اسفند ماه کشت شد.

1- Isoflavonoids
2- Furanocoumarins
3- Psoralen
4- Angelicin
5- Thin layer chromatography
6- Retention factor
7- Attar pradesh

برگ، ساقه، گره، ریشه و بذرهای سبز گیاهان رشد یافته در مزرعه به‌عنوان اندام‌های گیاهی برای کشت بافت انتخاب گردیدند. ریز نمونه‌های تهیه شده به‌مدت ۲۰ دقیقه با آب جاری شستشو شدند و سپس با ماده ضد عفونی کننده "باویستین" ۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر با دور ۱۵۰rpmجهت عاری سازی هر چه بهتر آنها از مواد آلوده کننده، تیمار گردیدند. سپس ریز نمونه‌ها جهت حذف کامل "باوستین" چندین بار با آب مقطر دوبار تقطیر شده شستشو شدند. در مرحله بعد ریز نمونه‌ها با "مرکوریک کلراید" ۱ درصد به‌مدت دو دقیقه ضد عفونی و در نهایت ٤ تا ٥ بار با آب مقطر دوبار تقطیر شده شستشوی کامل شدند.

محیط کشت مورد استفاده: محیط کشت اصلی MS[1] (۱۹٦۲) و B_5(Gamborget. al., 1986) برای ریز ازدیادی اندام‌های متفاوت گیاه *Psorallea corylifolia* استفاده گردید. نمک‌های محیط کشت (AR[2]) شرکت کوالیژن[3] و گلکسوفاین بمبئی[4] برای تهیه محلول پایه مورد استفاده قرار گرفتند. محیط‌های اصلی بوسیله انواع هورمون‌های رشد مثل بنزیل آدنین(BA) و ایندول بوتریک اسید (IBA) (شرکت سیگما کشور آمریکا) تیمار شدند.

آنالیز فتوشیمیایی: نمونه گیاهی از اندام‌های مختلف شامل ریشه، گره ساقه، برگ، جوانه، گل و بذر گیاه*Psorallea corylifolia* تهیه و برآورد سورولین از طریقHPLC انجام شد. ۱ گرم از نمونه‌های تازه بافت‌های متفاوت گیاه تهیه و بوسیله ازت مایع خرد گردید و سپس بوسیله حلال اتانول استخراج شد. دستگاه HPLC استفاده شده در این تحقیقاز نوع Shimazh-4A بود که مشخصات آن شاملستون C18، حلال متانول، حجم تزریق ۲۰µl، نرخ جریان ۰/۵ml/min و تشخیص دهنده UV بود. همچنین شدت UV مناسب برای نمونه و استاندارد جهت استفاده در دستگاه HPLC، بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر به‌منظور تشخیص سورولین در این تحقیق مشخص گردید.

شناسایی سورولین از طریق کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): برای شناسایی سورولین از چندین سیستم ترکیبی حلال‌های متفاوت استفاده گردید. این سیستم‌ها شامل: اتیل استات/ سیکلو هگزان، اتیل استات/ هگزان، هگزان/دی کلرومتان، پترولیوم اتر/ سیکلو هگزان، کلروفرم، کلرفرم/ پترولیوم اتر، اتیل استات/ بنزین، پترولیوم اتر/ دی کلرومتان و کلروفرم/متانول بودند. همچنین سیستم‌های استفاده شده در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درصد به کار برده شدند. شاخصR_f که بیانگر مقدارعددی منحصر به فرد هر ترکیب در سیستم حلالی مورد استفاده می‌باشد از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده ترکیب}}{\text{فاصله طی شده حلال}} \quad \text{(رابطه ۱)}$$

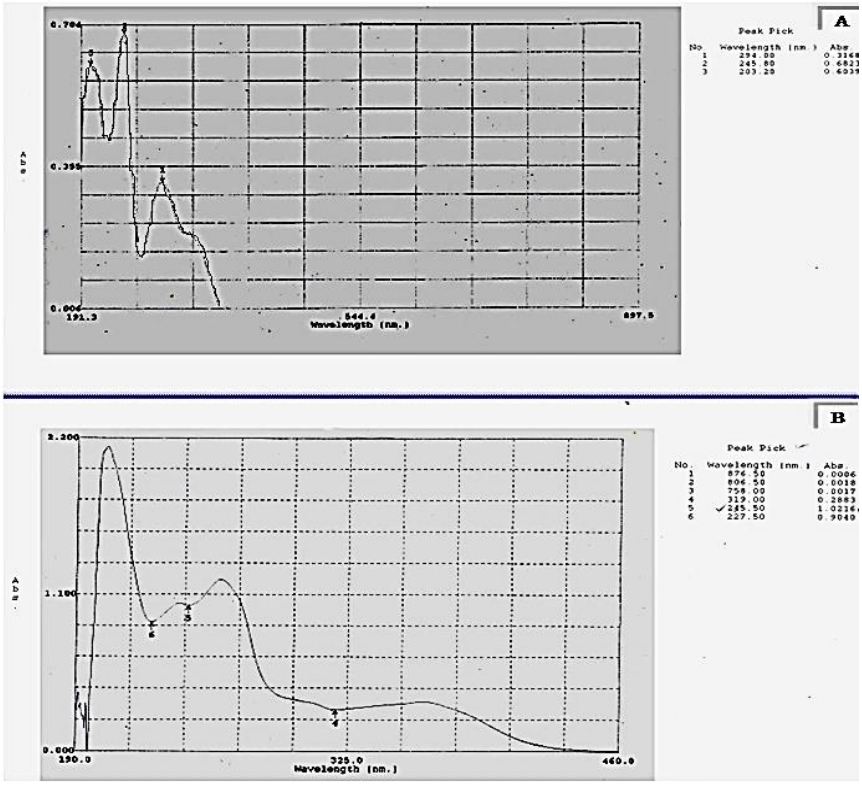
استخراج سورولین از طریق کروماتوگرافی ستونی: ۵۰۰ گرم از کالوس‌های خشک شده از لپه *Psorallea corylifolia* که در شرایط کشت درون شیشه ای بدست آمده بود بوسیله دستگاه سوکسله با حلال متانول به مدت۲٤ ساعتاستخراج گردید. عصاره استخراجی در آب به صورت سوسپانسیون درآمد و بوسیله حلال پترولیوم اتر[5] استخراج گردید. کروماتوگرافی ستونی کالوس‌های خشک شده از لپه *Psorallea corylifolia* بوسیله پروتوکل تغییر شکل یافته انجام گرفت (Lee et al., 2007).

1- Murashige and Skoog
2- Analyctical grade
3- Qualigens
4- Glaxo Fine Chemicals
5-Petroleum ether

نتایج

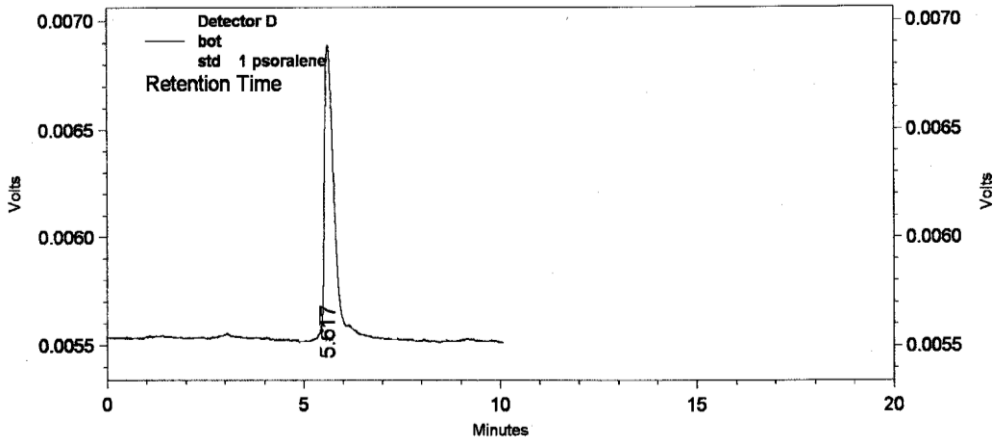
میزان سورولین در اندام‌های مختلف گیاه: نتایج حاصل از اسپکتروم اشعه ماوراء بنفش (UV) با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر جهت تشخیص سورولین حاصل از گیاه *Psorallea corylifolia* برای نمونه و استاندارد ۲٤٤ nm بدست آمد (شکل ۱). همچنین نتایج بدست آمده از آنالیز کروماتوگرام با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که زمان بازداری[1] مربوط به سورولین ۵/٤ می‌باشد (شکل۲).

نتایج نشان داد که میزانسورولین در شرایط مزرعه‌ای، درون شیشه‌ای، کالوس‌های گرفته شده از اندام‌های مختلف و گیاهان گرفته شده از کالوس، متفاوت می‌باشد.تعیین مقدار سورولین از قسمت‌های مختلف گیاه شامل ریشه، گره، برگ، جوانه، گل، براکته وبذرها نشان داد که بیشترین میزان سورولین (µg/g ۳۰۳۸fresh wt.) در بذرهای قهوه‌های وجود دارند (جدول ۲). مقایسه مقدار سورولین در اندام‌های مختلف گیاه در شرایط مزرعه‌ای و درون شیشه‌ای نشان داد که میزان سورولین در شرایط مزرعه‌ای بالاتر می‌باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق برای اولین بار وجود سورولین را در کالوس گزارش نمود. آنالیز کمی سورولین برای کالوس‌های گرفته شده از قسمت‌های متفاوت نشان داد که بیشترین میزان این ماده (µg/g freshwt ۲٦۰۱/۸) در کالوس‌های گرفته شده از لپه وجود دارد (جدول ۱). همچنین برآورد میزان "دایدیزین" و "جینیستین" نیز در قسمت‌های متفاوت گیاه صورت گرفت. نتایج بدست نشان داد که تنها در بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia* مقدار اندکی مواد ضد سرطانی "دایدیزین" و "جینیستین" وجود دارد که مقدار آنها در جدول ۲ ذکر شده است.



شکل ۱: کرواتوگرام اشعه ماورای بنفش (UV) سورولین حاصل از گیاه *Psorallea corylifolia*A: استاندارد و B: نمونه.

1-Retention time



شکل۲: کروماتوگرام HPLC مرتبط به سورولین بازمان بازداری ۵/٦ دقیقه

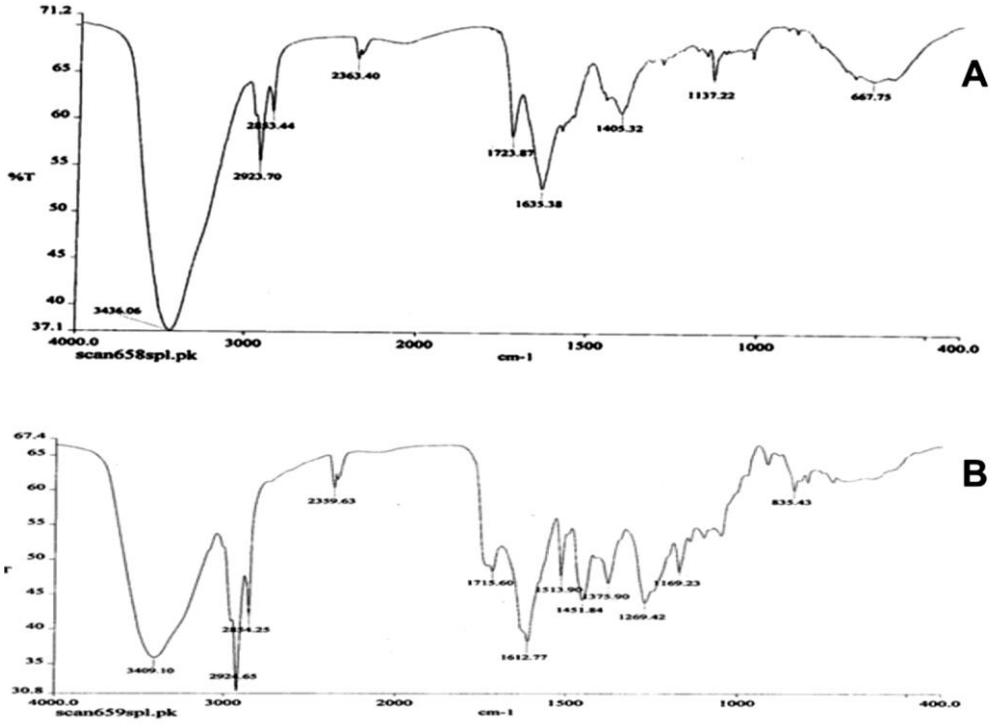
جدول ۱: برآورد سورولین از اندام‌های مختلف گیاه در شرایط مزرعه، کشت درون شیشه‌ای و کالوس‌های گرفته شده از قسمت‌های متفاوت گیاه.

اندام گیاهی	شرایط مزرعه		شرایط درون شیشه ای		کالوس‌های مشتق شده از اندام‌های مختلف گیاهی		گیاهان مشتق شده از کالوس	
	سطح	میزان‌سورولین µg/g fresh wt.	سطح	میزان‌سورولین µg/g fresh wt.	سطح	میزان‌سورولین µg/g fresh wt.	سطح	میزان‌سورولین µg/g fresh wt.
بذرهای قهوه‌ای	۱٦۳۳۸۲	۳۰۵۸						
گل	۱۲۳۳۹۷	۲۲۷۲/۲						
جوانه	۱۲۰۲٦۵	۲۲۵۱						
برکته	۷۷۸۹۸	۱٤۵۸						
گره	۵۹۱٦۰	۱۱۰۷/۳	۳۹۸۱۲/۳	۷٤۵/۲				
برگ	۵٦۲۳۵	۱۰۵۲/۷	۲۲۷۰٤	٤۲۵				
ریشه	۵۲۹۷۸	۹۸٦	۱۷۸٤۲	۳۳۵				
کالوس‌های گرفته شده از لپه					۱۳۹۰۰۸	۲٦۰۱/۸		
کالوس‌های گرفته شده از گره					۱۰۰۲٦۲	۱۸۷٦/٦		
کالوس‌های‌گرفته شده از برگ					۷۸٤۲۹	۱٤٦۸		
کالوس‌های‌گرفته شده از ریشه					۵٦۷۲۹	۱۰٦۲		
گیاهان مشتق‌شده از کالوس برگ							۲۸۵۳٤	۵۳٤/۱
گیاهان مشتق‌شده از کالوس گره							۳۰۵۷۸/٦	۵۷۲/۳

جدول ۲: برآورد میزان دایدیزین و جینیستین در بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia*.

نمونه	سطح	مقدار (µg/g fresh wt.)
استاندارد دایدیزین	۷٤٥۳۳۸۱.۳	۲۰
نمونه دایدیزین	٦۹٥۰۱	۰/۹٤
استانداردجینیستین	۷۳۰۲٥۷۱۳	۲۰
نمونه جینیستین	۱٤۸۲٦٥	۰/۲

آنالیز فتوشیمیایی: دستگاه طیف سنج مادون قرمز (FT-IR) در وضوح $4/00\ cm^{-1}$ با آشکار کننده $LiTaO_3$ حضور ترکیبات مختلف در استاندارد و عصاره استخراجی کالوس‌های گرفته شده از لپه را نمایان ساخت. اسپکتروم (FT-IR) استاندارد و نمونه حضور پیک‌های $3436/06\ cm^{-1}$ و $3509/1\ cm^{-1}$ را آشکار نمود که نشان‌دهنده گروه OH بود. گروه OH آشکار شده در این اسپکتروم متعلق به آب و یا اتانول مورد استفاده برای استخراج سورولین می‌باشد (شکل۳). همچنین اسپکتروم (FT-IR) استاندارد و نمونه حضور پیک‌های $1612/77\ cm^{-1}$ و $1635/38\ cm^{-1}$ را نمایان ساخت که در نتیجه حضور گروه فعال OH^- بود (شکل ۳). علاوه بر این، اسپکتروم نمونه و استاندارد حضور پیک‌های $1723/87\ cm^{-1}$ و $1715/60\ cm^{-1}$ را مشخص نمود که نشان‌دهنده گروه کربونیل در آنها می‌باشد. طرح ارائه شده بوسیله دستگاه طیف سنج مادون قرمز (FT-IR) برای نمونه و استاندارد تشابه زیادی را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳: اسپکتروم FT-IR مربوط به عصاره استخراجی از کالوس‌های گرفته شده از لپه گیاه *Psorallea corylifolia* (استاندارد=A وعصاره استخراجی=B)

نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که از بین سیستم‌های حلالی ترکیبی متفاوت استفاده شده، در ٤ سیستم ماده سورولین با وضوح متفاوت دیده شد. سیستم حلالی اتیل استات/ سیکلو هگزان به‌عنوان بهترین سیستم جهت جداسازی سورولین از عصاره استخراجی، شناسایی شد. در این سیستم R_f مربوط به سورولین ۰/٤۰ بدست آمد که در مقایسه با سایر سیستم‌ها نقطه بدست آمده در نسبت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ دارای وضوح بالایی بود (جدول۳).

این موضوع نشان دهنده استخراج بالای سورولین توسط این سیستم در مقایسه با سایر سیستم‌های حلالی می‌باشد. بخش محلول در حلال پترولیوم اتر در کروماتوگرافی ستونی قرار گرفت و قطبی بودن آن بوسیله حلال اتیل استات به‌صورت ۱٪ افزایش پیدا نمود، بطوری‌که ٦۰ تا نمونه ۱۰۰ میلی‌لیتری بدست آمد. همچنین کروماتوگرافی لایه نازک بافاز متحرکاتیل استات/ سیکلوهگزان (۱۰:۹۰) سورولینرا آشکار نمود. میزان R_f نقاط یا ترکیبات ظاهر شده روی پلیت TLC محاسبه گردید. به‌طوری‌که نمونه‌های شماره‌های ۳۸-۳۵ دارای R_f = ۰/٤ بودند که نشان‌دهنده سورولین می‌باشد.

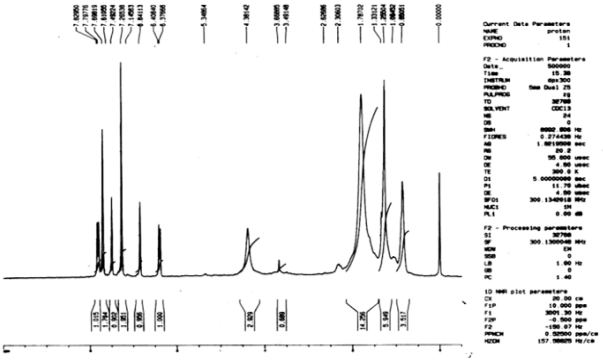
اسپکتروم H-NMR متعلق به سورولین وجود سیگنال‌های ۷/۷۹، ۷/٦۹، ۷/٤۹، ٦/۸٤ و ٦/٤٦ را مشخص نمود که مرتبط به پروتون‌های Ha، Hb، Hc، Hd و He در ساختمان سورولین می‌باشند (جدول ۳؛ شکل‌های ٤ و ۵). همچنین وجود سیگنال ۷/۲٦ به حلال $CDCl_3$ نسبت داده شد.

جدول ۳: میزان R_f مربوط به سورلین در سیستم‌های حلالی ترکیبی مختلف استفاده شده.

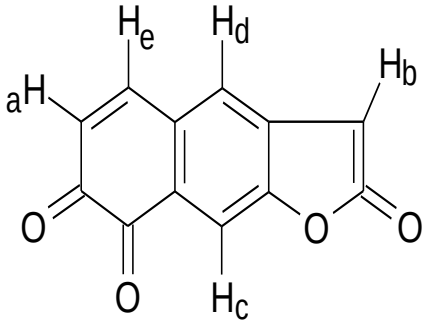
سیستم حلال	میزانR_f
کلروفرم/ متانول	۰/۵۷
کلروفرم	۰/۵۰
پترولیوم اتر/ سیکلوهگزان	۰/٤٦
اتیل استات/ سیکلو هگزان	۰/٤۰
کلروفرم/ پترولیوم اتر	۰/۳۵
هگزان/ دی کلرو متان	۰/۳۰

جدول ٤: داده‌های اسپکتروم H-NMR برای ماده سورولین.

شماره	دلتاΔ	پروتون‌ها	Multiplicity	J value
۱	۷/۷۹	Ha	(d)	9Hz
۲	۷/٦۹	Hb	(s)	-
۳	۷/٤۹	Hc	(s)	-
٤	٦/۸٤	Hd	(s)	--
۵	٦/٤٦	He	(d)	9Hz



شکل ٤: اسپکتروم H-NMR سوورولین در حلال $CDCl_3$



شکل ٥: ساختمان شیمیایی ماده سوورولین

بحث

مطالعات انجام شده روی آنالیز شیمیایی سوورولین حضور و توزیع آن را در گیاه *Psorallea corylifolia* توسط محققین مختلف آشکار ساخته است (Paturde et al., 2000; Murali et al., 2002; Dong et al., 2003; Ding et al., 2004; Qiao et al., 2007). هر چند تحقیقات قبلی آنالیز بیوشیمیایی سوورولین در اندام‌های متفاوت گونه‌های مختلف جنس سوورولیا را ارائه نموده‌اند اما هیچ یک از پژوهش‌ها تاکنون حضور سوورولین را در کالوس‌های مشتق شده از گیاهان این جنس به‌عنوان منبع تجاری تولید کننده ماده ضدسرطانی گزارش ننموده‌اند. سوورولین، یکی از مواد ضدسرطانی با ارزشی می‌باشد که برای اولین باراز کالوس‌های گیاه *Psorallea corylifolia* در این تحقیق شناسایی و تعیین مقدار گردید. از طرفی ماده ضدسرطانی سوورولین از بذرهای گیاه مورد بررسی نیز استخراج شد. نتایج بدست آمده با یافته‌های محققین مختلف (Liu et al., 2004؛ Rajput et al., 2008؛ Ruan et al., 2007؛ Qiao et al., 2006) که وجود سوورولین را در بذرهای گیاه *Psorallea corylifolia* گزارش کرده بودند، مطابقت داشت. علاوه بر موارد ذکر شده، وجود این ماده ضد سرطانی در قسمت‌های مختلف سایر گیاهان نیز گزارش شده است. به‌طوری‌که گیرارد و همکاران (٢٠٠٤) وجود سوورولین را در بذرهای گیاه *Phebalium brachycalyx* گزارش نمودند.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که مقدار سوورولین در شرایط مزرعه، شرایط کشت درون شیشه‌ای، کالوس‌های بوجود آمده و گیاهان حاصل از کالوس متفاوت می‌باشد. از طرفی دلیل اینکه بیشترین میزان سورلین بدست آمده در لپه‌ها وجود داشت شاید به خاطر وجود و بیان بیشتر ژن‌های عامل تولید کننده این ماده ضد سرطانی باشد.

حلال‌ها یکی از عامل‌های مهم جدا سازی می‌باشند که در پروسه استخراج حلال برای جداسازی ماده مورد نظر یا خارج کردن ناخالصی‌ها ضروری می‌باشد. انتخاب حلال براساس جدول طبقه‌بندی آنها بر پایه قطبی و غیرقطبی بودن و همچنین بر اساس مطالعات قبلی صورت می‌گیرد. علاوه بر اسیدیته حلال‌ها، قطبیت، حجم و میزان حلالیت از جمله ویژگی‌های دیگر آنها می‌باشند که در نحوه استفاده و تعیین مناسب ترین حلال مورد نظر، نقش اساسی دارند (Pandey, 2009). شناسایی حلال‌های مناسب جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه در مطالعات داروسازی و تهیه داروهای گیاهی به عنوان یک ابزار کلیدی و کاربردی می‌باشد (Xu et al., 2007). از آنجایی که که حلال قطبی مناسب ترکیبات قطبی و حلال غیرقطبی برای ترکیبات غیرقطبی بهتر می‌باشد. لذا با استفاده از هر دو نوعدر کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه گیاهان را بسته

به نوع ترکیب استخراج نمود. محققین مختلف نقش حیاتی حلال را در شناسایی ترکیب سورولین مورد تاکید قرار داده‌اند (Guo et al., 2003; Rajput and Rai 2008; Ali et al., 2008).

بنابراین، شناسایی حلال مناسب جهت استخراج بیشترین میزان سورولین از اندام‌های مختلف گیاه حاوی این ماده ضروری می‌باشد. سورولین به‌عنوان یک فورانوکومارین از لحاظ ساختمانی یک ترکیب با قطبیت پایین می‌باشد. حلال‌های مختلف مثل اتیل استات، سیکلو هگزان، هگزان، متانول، پترولیوم اتر و بنزیل برای استخراج سورولین در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که اتیل استات/سیکلو هگزان (به نسبت ۹۰:۱۰) بهترین وضوح را برای سورولین روی صفحه TLC نمایان ساخت. در طی این آزمایش عصاره استخراجی از کالوس‌های لپه در داخل کروماتوگرافی ستونی قرار گرفت و سپس حلال اتیل استات/ سیکلو هگزان به عنوان فاز متحرک در نظر گرفته شد. نتیجه حاصل از این ترکیب، بدست آمدن مقدار زیادی از محلول حاوی مواد موجود در عصاره لپه را در پی داشت.

کروماتوگرافی همراه با اسپکتوفتومتری ابزار مناسب و قوی جهت تعیین و ارزیابی سریع ساختمان ترکیبات پیچیده می‌باشند. اسپکتروم FT-RI و H-NMR مربوط به استاندارد و نمونه، حضور سورولین را در کالوس نشان دادند. علیرغم اهمیت بالای فومارکومارین‌ها نحوه بیوسنتز و همچنین پایه ژنتیکی این ترکیبات مخصوصا در مورد فورانوکومارین‌های خطی مثل سورولین کمتر شناخته شده است.

جهت شناسایی و تعیین ساختمان ترکیبات آلی H-NMR و 13-NMR بیشترین کاربرد را دارند. H-NMR ساختار ترکیب شیمیایی مورد نظر را با شناسایی موقعیت هیدروژن‌ها تعیین می‌نماید (Furniss et al., 1991). تعیین ساختمان سورولین در این تحقیق با استفاده از داده‌های بدست آمده از تکنیک H-NMR نیز بر اساس موقعیت گروه‌های هیدروژن صورت گرفت.

نتیجه‌گیری نهایی

بطور کلی نتایج این بررسی نشان می دهد که میزان سورولین بیشتر از میزان دایدزین و جنیستین در اندام‌های مختلف مورد بررسی می‌باشد. همچنین میزان سورولین در اندام‌های مختلف در شرایط مزرعه بیشتر از شرایط کشت درون شیشه ایمی‌باشد. نتایج کروماتوگراف‌های دستگاه HPLC در شرایط مزرعه و کشت درون شیشه‌ای نشان می دهد که بیشترین میزان سورولین در بذرهای قهوه‌ای و کالوس‌های گرفته شده از لپه می‌باشد. حلال‌ها که یکی ازعوامل مهم جداسازی می‌باشند در جداسازی سورولین از عصاره با استفاده از تکنیکهای کروماتوگرافی لایه نازک و ستونی نقش اصلی را داشتند بطوریکه در نهایت سورولین بوسیکه دستگاه H-NMR تعیین ساختمان گردید.

منابع

1. Ali, J., Akhtar, S., Baboota, N.Y.S., and Ahmad, S. 2008. Thin-Layer Chromatographic analysis of psoralen in babchi (*Psoralea corylifolia*) oil. Acta Chromatograph. 20: 277–282.
2. Ding. J., Zhang, Q., and Zhang, L. 2004. Determination of psoralen and isopsoralen in *Psoralea corylifolia* L. from different habitats. J. Chin. Med. Mat. 27: 817-8.
3. Dong, T.N., Bae, K., Kim, Y.H., Hwang, G.S., Heo, O.S., Kim, S.E., and Kang, J.S. 2003. Quantitative determination of psoralen and angelicin from some medicinal herbs by high performance liquid chromatography. Arch. Pharmacol. Res. 26: 516-520.
4. Furniss, B., Hannaford, A., Smith, P.W.G., and Tatchell, A.R. 1991. Textbook of Practical Organic Chemistry. Longman, London, pp: 100-600.

5. Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1986. Plant cell cultures. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res. 50: 151-158.
6. Girard, C., Muyard, F., Columbian, M., Tillequin, F., Waterman, P.L.G., and Bevalot, F. 2004. Coumarin from Phelabium brachycalyx. Biochem. System. Ecol. 33: 1193-1201.
7. Guo, J., Wu, H., Weng X., Yan, J., and Bi, K. 2003. Studies on extraction and isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* L. and the antitumor effect of the constituents *in vitro*. J. Chin. Med.Mate. 26:185-187.
8. Innocenti, G., Cappelletti, E.M., and Caporale, G. 1984. Morphological and chemical characteristics of some Australian *Psoralea* species. Int. J. Crude Drug Res. 22: 97-109.
9. Joshi, S.G. 2000. Medicinal Plants. Oxford & IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi.
10. Li, H.L., Zhang, W.D., Han, T., Zhang, C., Liu, R.H., and Chen, H.S. 2007. Tetrahydro-protoberberine alkaloids from *Corydalis saxicola*, Chem. Nat. Comp. 43: 173-175.
11. Liu, R., Li, A., Sun, A. and Kong, L. 2004. Preparative isolation and purification of psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatog. A1057: 225-228.
12. Murali, B., Amit, A., Anand, M.S., and Venkataraman B.J. 2002. An HPLC method for simultaneous estimation *of psoralen bakuchicin*and bakuchiol in *Psoralea corylifolia*. J. Nat. Remedies, 2: 76-79.
13. Oliveira, A.M. A.G., Raposo. M., Manuela, M., Oliveira, C.A.M.F., Machado, A.E.H., Puapairoj, P., Pedro, M., Nascimento, M.S.J., Portela, A.C., and Pinto, M. 2006. Psoralen analogues: synthesis, inhibitory activity of growth of human tumor cell lines and computational studies. Eur. J. Med. Chem. 41:367-372.
14. Pandey, V. and Agrawal, V. 2009. Bioprospecting of Spilanthes species-Micro propagation and bioassay guided isolation of larvicidal compounds against malaria and filarial vectors. Ph.D. Thesis. Department of Botany, University of Delhi.
15. Paturde, J.T., Wankhade, S.G., Khode, P.P., Deo, D.D. and Ghotol, P.U. 2000. Evaluation of improved babchi (*Psoralea corylifolia*) genotypes with high psoralen content. Agri. Sci. Digest. 20:104-105.
16. Qiao, C.F., Han, Q.B., Kong, J.Z., Mo, S.F., Kong, L.D., Kung, H.F., and Xu, H. 2007. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Fructus psoraleae*by high-performance liquid chromatography. J. Sep. Sci. 30: 813-818.
17. Rajput, S.J. Zade, V. and Rai, P. 2008. Studies on extraction, isolation and estimation of psoralen from the fruits of *Psoralea corylifolia*. Phcog. Mag. 4:52-56.
18. Ruan, B., Kong, L.Y., Takaya, Y. and Niwa, M., 2007. Studies on the chemical constituents of *Psoralea corylifolia* L. J. Asian Nat. Prod. Res. 9: 41- 44.
19. Singh, S. 2003. Effect of some heavy metals on in vitro morphogenesis and psoralen content in *Psoralea corylifolia* Linn. an endangered medicinal legume. M.Phil. Dissertation, Department of Botany, University of Delhi, India.
20. Willis, J.C. 1966. A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
21. Xu, D. and Redman- Furey, N. 2007. Statistical cluster analysis of pharmaceutical solvent. Int. J. Pharmaceutics 339: 175-188.