

رسالة محمد



دانشگاه علوم پزشکی تهران
پردیس بین الملل دانشکده داروسازی

پایان نامه
جهت اخذ درجه دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

خالص سازی هدایت شونده با زیست-آزمون عصاره تام گیاه
Centaurea bruguierana (DC.) Hand. -Mazz.
در بررسی اثر ضد لوسمی
مطالعه *in vitro*

اساتید راهنما:

دکتر مهدی وزیریان

دکتر مهناز خانوی

نگارش:

گلنوش میرزاحسینی

اسفند ۹۵

چکیده

امروزه سرطان بعد از بیماری‌های قلبی عروقی دومین علت عمده مرگ و میر انسان‌ها است. توسعه داروهای شیمی‌درمانی که بیشترین خاصیت ضد تومور و کمترین عارضه ناخواسته را دارا باشند، هدف مطلوب در درمان سرطان است. ترکیبات طبیعی با وجود سال‌ها توجه به داروهای سنتتیک، هنوز منبع بسیار مهمی در تامین نیازهای دارویی بشر هستند.

گیاه *Centaurea bruguierana* subsp. *belangerana*، گیاهی بومی ایران و دارای سابقه مصرف محلی به صورت دارویی جهت ناراحتی‌های گوارشی است. بر اساس گزارشات اثرات سمیت سلولی مناسب از سایر گونه‌های جنس *Centaurea*، نمونه میوه‌دار گیاه از استان بوشهر، شهرستان برازجان در شهریور ۹۴ جمع‌آوری و توسط گیاه‌شناس شناسایی شد. عصاره‌گیری با اتانول ۸۰ درصد انجام شد. عصاره تام حاصل به روش *solid phase fractionation* روی سیلیکاژل، به فرکشن‌های کلروفومی، اتیل‌استاتی، اتردوپترولی و متانولی تقسیم گردید.

سمیت سلولی فرکشن‌ها به روش MTT بر روی رده‌های سلولی سرطانی لوسمی میلوزنز مزمن؛ K-562، آدنوکارسینومای سینه؛ MCF-7، آدنوکارسینومای معده؛ AGS و کولون؛ SW742 مورد بررسی قرار گرفت. فرکشن کلروفومی که واجد بیشترین اثر سمیت سلولی بر روی رده‌ی سلولی K-562 بود، با خالص‌سازی بیشتر روی ستون کروماتوگرافی (سیلیکاژل) به ۱۴ زیرفرکشن تقسیم شد.

با بررسی اثر سمیت سلولی زیرفرکشن‌ها، بخش واجد قوی‌ترین اثر سمیت مورد خالص‌سازی بیشتر توسط کروماتوگرافی ستونی با سیلیکاژل فاز معکوس (C-18) و کروماتوگرافی ستونی سفادکس LH-20 انجام گرفت. در نهایت با روش‌های اسپکتروسکوپیک شامل $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ ، سه فلاونوئید به نام‌های Cirsimaritin، Cirsilinelol و Eupatilin برای نخستین بار از این گیاه جداسازی و با مقایسه با طیف استاندارد ترکیبات گزارش شده در منابع منتشر شده شناسایی شد.

کلمات کلیدی:

Centaurea bruguierana، ضد لوسمی، خالص‌سازی، فرکشن کلروفومی، سمیت سلولی، آزمون MTT

Abstract

Nowadays, cancer is the second leading cause of death among people, after cardiovascular disease. The development of chemotherapeutic agents with the most potent and fewer adverse effects is the major goal of cancer therapy. Natural products are still a valuable source of medicinal supplement of human being and this has begun a new era, even after years of introduction of synthetic drugs.

Centaurea bruguierana (DC.) Hand.Mazz (Asteraceae family) is an endemic medicinal plant in Iran with medicinal applications in folk medicine including gastrointestinal diseases. Based on literature review with many significant cytotoxic activity reports of *Centaurea* species, the plant was collected from Borazjan (Bushehr province) in September 2016 and authorized by herbalist. After drying and grinding, the plant material was extracted by ethanol 80%. The total extract was then partitioned into four fractions including chloroform, petroleum ether, ethyl acetate and methanol by solid phase fractionation on silica gel.

Cytotoxic effect of fractions was examined by MTT assay in K562 (chronic myelogenous leukemia), AGS (gastric adenocarcinoma), MCF-7 (Breast adenocarcinoma) and SW742 (colon adenocarcinoma) cell lines. The Chloroform fraction, with the lowest LC₅₀ against K-562 cell lines, was partitioned into 14 subfractions by column chromatography on silica gel.

The most potent subfraction in MTT assay was subjected to further purification by reversed phase (C18) silica gel and sephadex LH-20 column chromatography. Three flavonoids including Cirsimaritin, Cirsilinelol and Eupatilin were isolated for the first time from the species and the structures were confirmed by spectroscopic data including ¹H-NMR and ¹³C-NMR and by comparison to published data in literature.

Keywords: *Centaurea bruguierana*, Anti-leukemia, Purification, Chloroform fraction, Cytotoxicity, MTT assay



Tehran University of Medical Sciences

International Campus

Faculty of Pharmacy

Pharm D. Dissertation

Title

Bio-assay guided purification of *Centaurea bruguierana* (DC.) Hand.-
Mazz total extract by evaluation of anti-leukemia effect (an invitro
study)

Supervisors

Dr. Mahdi Vazirian

Dr. Mahnaz Khanavi

By

Golnoush Mirzahosseini

March 2017