ID: 1185

Code: chconf17-11850571

گواهینامه پذیرش و ارائه مقاله

چهارمین کنفرانس بین المللی نوآوری های اخیر در

شیمی و مهندسی شیمی

4th International conference on Recent Innovations in Chemistry & Chemical Engineering

بدین وسیله گواهی می شود مقاله با عنوان:

بررسی فیتوشیمیایی عصاره اتیل استاتی Haplophyllumvirgatum گونه انحصاری ایران

بانویسندگی: فهیمه قاصری، فرح کریمی

در "چهارمین کنفرانس بین المللی نوآوری های اخیر در شیمی و مهندسی شیمی"

با مجوز به شماره ۱۶/۲۶۱۶۱۵ از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری در ۲۳ تیرماه ۱۳۹۶ در محل دانشگاه علامه طباطبایی، با حضور ایشان به صورت سخنرانی ارائه گردید.

این مقاله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC) و کنسرسیوم محتوای ملی (CIVILICA) نمایه خواهد شد. توفیق روز افزون شما را در عرصه های علمی و اجرایی کشور عزیزمان ایران آرزومندیم.

دکتر کریم زارع
رئیس کنفرانس

دکتر رضا غیاثی
دبیر علمی کنفرانس

دکتر فاطمه داداشیان
رئیس شورای سیاستگذاری

کد اختصاصی ISC : ۹۶۱۷۰۳۰۴۰۱

وبسایت کنفرانس: www.CHCONF.ir

بررسی فیتوشیمیایی عصاره اتیل‌استاتی *Haplophyllum virgatum* گونه انحصاری ایران

فهیمه قاصری[۱] ، فرح کریمی[۲]

۱-گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تهران دانشجوی کارشناسی ارشد

۲- دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تهران

f.ghaseri@gmail.com

خلاصه

گونه *Haplophyllum virgatum* از جنس سدابی و متعلق به خانواده مرکبات با رویش محدود به منطقه گنو در استان هرمزگان جمع‌آوری و به منظور بررسی‌های فیتوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفت. ریشه گیاه در حلال‌های هگزان اتیل‌استات و متانول حل شد که از این بین عصاره اتیل‌استاتی با دارا بودن خواص ضدسرطانی انتخاب و بررسی‌های بعدی بر روی این عصاره به منظور شناسایی ترکیبات موثر به روش‌های GC,HPLC، GC-MS و LC، LC-MS انجام شد. این اولین بررسی فیتوشیمیایی گیاه *H.virgatum var. virgatum* می‌باشد و حضور کلیه ترکیبات شناسایی شده در مورد این گیاه اولین گزارش ارائه شده در جهان است.

کلمات کلیدی: *Haplophyllum virgatum* ، سدابی، ، گنو، ، GC-MS ، LC-MS

مقدمه

تقریبا بیش از ۳۰ درصد داروهای تهیه شده در دنیا منشأ گیاهی دارند که یا مستقیما از گیاهان عصاره‌گیری شده و یا بر اساس فرمول شیمیایی ترکیبات گیاهی، تهیه و سنتز شده‌اند.

گیاهان جنس سدابی (*Haplophyllum*) از تیره مرکبات در منابع طب سنتی به عنوان گروهی از گیاهان دارویی که به طور معمول از گذشته‌های دور توسط بسیاری از جوامع مورد استفاده دارویی قرار گرفته‌اند شناخته می‌شوند [۱] جنس سدابی از تیره سداب (Rutaceae) با حدود ۷۰ گونه شامل گیاهانی علفی، پایا، با بویی نافذ به طور عمده در مناطق گرم، معتدل و نیمه گرمسیری نیمکره شمالی یافت می‌شود. تعداد ۳۰ گونه از جنس سدابی در ایران وجود دارد که ۱۴ گونه انحصاری کشور ایران می‌باشند. مطالعات انجام شده وجود ترکیبات آروماتیک مانند لیگنان‌ها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها و چندگروه از آلکالوئیدها را در گونه‌های این جنس تایید می کند [۲]

در این پژوهش عصاره اتیل استاتی ریشه و برگ گیاه *H. Virgatum var. Virgatum* که انحصاری ایران بوده و تنها رویشی محدود به منطقه گنو در استان هرمزگان دارد مورد مطالعه قرار گرفته است. طبق نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی

عصاره‌های مختلف ریشه این گیاه که پیش‌تر توسط همین گروه انجام شد (نتایج چاپ نشده) عصاره اتیل‌استاتی ریشه بر سه رده سلول سرطانی شامل RAJI (سلول‌های سرطانی لنفوسیت B)، HT-29 (سلول‌های سرطانی کولون) و N1 1321 (سلول‌های آستروسیتومای مغز انسانی) دارای سمیت سلولی است. بر این اساس بررسی‌های فیتوشیمیایی به منظور شناسایی ترکیبات موجود در این عصاره به روش‌های GC,HPLC، GC-MS , LC و LC-MS صورت گرفت. با توجه به اهمیت ترکیبات لیگنانی بعنوان داروی ضدسرطان، برای شناسایی لیگنان‌ها در این گیاه از تزریق همزمان استانداردهای Podophyllotoxin ، Lariciresinol، Matairesinol و Pinoresinol در HPLC و تشخیص پیک‌های مربوط در کروماتوگرام‌های حاصل و همچنین استفاده از الگوی آنالیز LC-MS استانداردها و مقایسه آن‌ها با نتایج LC-MS عصاره توسط نرم‌افزار Xcalibur استفاده شد که نتایج حضور هر چهار لیگنان را در این گیاه تایید نمود. نتایج حاصل از آنالیز GC-MS عصاره اتیل‌استاتی نیز با استفاده از منابع موجود مورد تفسیر قرار گرفت. مجموع این بررسی‌ها حضور ترکیباتی نظیر matairesinol ، Cubebinolide (Hinokinin) از گروه لیگنان‌ها را با احتمال بالاتر از ۹۳٪ براساس اطلاعات ذخیره شده در کتابخانه طیف سنجی جرمی (wiley7n.l) نشان داد. این اولین بررسی فیتوشیمیایی گیاه *H.virgatum var. virgatum* می‌باشد که نشان می‌دهد این گیاه حاوی ترکیباتی ضدسرطانی است.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره‌های گیاهی

گیاه کامل از استان هرمزگان، منطقه‌گنو جمع‌آوری شد و نمونه‌ها پس از پاکسازی و جداسازی اندام‌ها، دردمای اتاق و در محل تاریک خشک شدند. برگ و ریشه خشک شده آسیاب و وزن شد. به ۵۰۰ گرم از پودر برگ و ریشه گیاه در دو ارلن جدا ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان اضافه شد به مدت ۷۲ ساعت ارلن‌ها بر روی شیکر قرار گرفتند تا ترکیباتی از نوع چربی و رنگیزه ها جدا شده در بررسی‌های بعدی ایجاد مزاحمت ننمایند. عصاره هگزانی به وسیله کاغذ صافی جدا و به تفاله باقیمانده ۵۰۰ میلی‌لیتر اتیل‌استات اضافه گردید. پس از ۷۲ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، عصاره اتیل استاتی حاصل با استفاده از کاغذ صافی جدا و با دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ و خشک شد و مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفت.

بررسی ترکیبات لیگنانی به روش HPLC

از آنجا که اثرات ضدسرطانی ترکیبات لیگنانی گیاهی مانند پودوفیلوتوکسین ثابت شده است [۳] برای شناسایی لیگنان‌ها، در گونه *Haplophyllum virgatum* عصاره ریشه این گیاه به روش HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. از دستگاه HPLC analytical(Agilent 1260) استفاده شد، بخش متحرک شامل استونیتریل و آب مطابق با سیستم گرادیان جدول ۱ بود. ستون مورد استفاده از نوع C18-ODS-35 دارای طول ۲۵۰میلی‌متر و قطر۴/۶ میلی‌متر بوده وجذب لیگنان‌ها با دتکتور UV با طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد

جدول۱:مشخصات برنامه جریان و گرادیان دوره متحرک مورد استفاده در HPLC برای شناسایی لیگنان‌ها عصاره ریشه

زمان	جریان	استونیتریل	آب اسیدی
۰	۰/۸ میلی لیتردر دقیقه	٤۰	٦۰
۱۰	۰/۸ میلی لیتردر دقیقه	٦۷	۳۳
۱۷	۰/۸ میلی لیتردر دقیقه	٤۰	٦۰
۲۱	۰/۸ میلی لیتردر دقیقه	٤۰	٦۰

تایید حضور لیگنان‌ها با آنالیز HPLC و استانداردها

برای تائید حضور لیگنان‌ها ۴ لیگنان استاندارد شامل Pinoresinol (ساخت شرکت phyto Lab) matairesinol (ساخت cayman chemical company) lariciiresinol (ساخت Arbonova-finland) و podophilotoxin (ساخت new jersy) مطابق برنامه جدول ۱ به دستگاه HPLC تزریق شد، سپس یک میلی‌گرم از عصاره ریشه در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل و ۲۰ میکرولیتر این محلول به دستگاه تزریق و با استانداردها از نظر زمانی و شکل باندهای ایجاد شده مطابقت داده شد. برای تائید حضور لیگنان‌ها ۲۰ میکرولیتر ازعصاره محلول و ۲۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردها باهم مخلوط و به دستگاه تزریق شد.

طیف سنجی جرمی

روش LC-MS

برای تعیین وزن ترکیبات موجود در عصاره اتیل‌استاتی ریشه از آنالیز LC-MS استفاده شد. امروزه طیف سنجی جرمی (MS) همراه با قدرت جداسازی راهی برای انجام تجزیه و تحلیل شیمیایی مواد ایجاد کرده است.[۴] برای شناسایی ترکیبات موجود در عصاره‌اتیل‌استاتی ریشه وبرگ از دستگاه Termo fisherLC-MS ESI ion trap Finnigan LCQDECA وستون با مشخصات C18 :5µm استفاده شد، سرعت جریان حلال۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه وحلال مورد استفاده آب و استونیتریل بود.برای هر تزریق ۲۰ میکرولیتر عصاره استفاده گردید

روش GC-MS

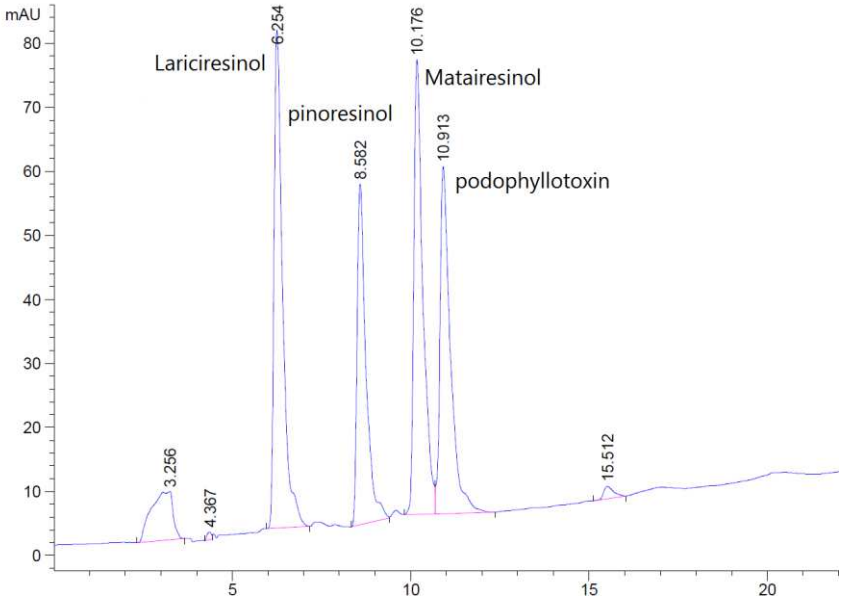
جهت تجزیه و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره اتیل‌استاتی ریشه و برگ، دستگاه کروماتوگرافی Agilent 7890N وMS 5975 Mode EI (ساخت امریکا) با ستون سیلیکای (HP-5 و ۳۰m ×۰/۲۵ mm) و قطردهانه ۰/۲۵ میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه دمایی: ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه سپس به نمونه ها دمای ۱۰ درجه سانتی گراد داده شد و در مدت ۱۵ دقیقه این دما به ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید طیف جرمی

ترکیبات موجود در عصاره ریشه و برگ با گزارش‌های ذخیره شده در کتابخانه طیف‌سنجی جرمی (wiley7n.l) مقایسه شد.

نتایج

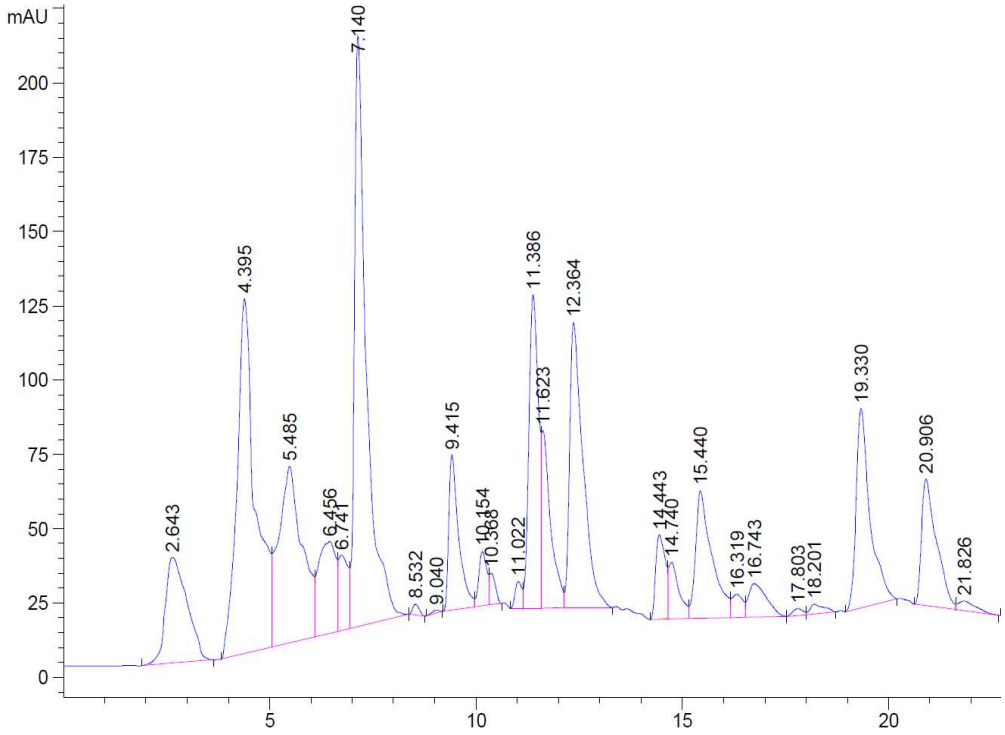
نتایج حاصل از HPLC

برای تایید حضور لیگنان‌ها ۴ لیگنان استاندارد تهیه و این ۴ استاندارد هم زمان به دستگاه تزریق شد، شکل۱ کروماتوگرام حاصل از این تزریق را نشان می‌دهد که باند دقیقه ۶/۲۵ مربوط به Lariciresinol دقیقه ۸/۵۸ pinoresinol دقیقه ۱۰/۱۷ Matairesinol و دقیقه ۱۰/۹۱ مربوط به podophyllotoxin می باشد.+

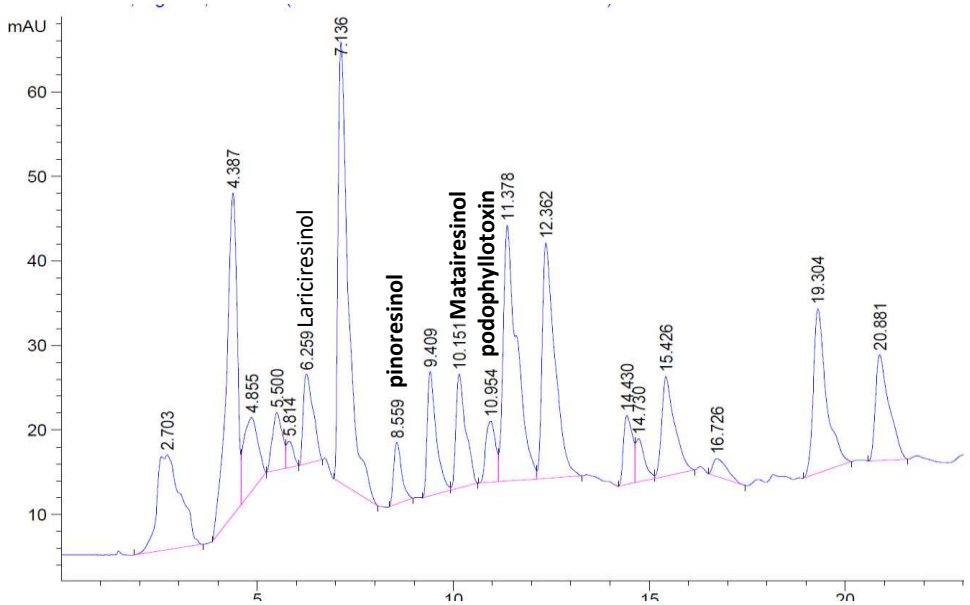


شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از HPLC ۴ لیگنان استاندارد

برای تایید حضور لیگنان‌های استاندارد در عصاره ریشه گونه *H.virgatum* ابتدا عصاره اتیل‌استاتی ریشه به دستگاه تزریق شد که در شکل۲ کروماتوگرام حاصل ازاین تزریق نشان داده شده است. سپس برای تایید حضور لیگنان‌ها عصاره ریشه و استانداردها با هم مخلوط و به دستگاه تزریق گردید نتایج نشان داد که باندهای مربوط به ۴ لیگنان استاندارد از نظر ارتفاع بلندتر شد که در شکل ۳ نمایش داده شده است .



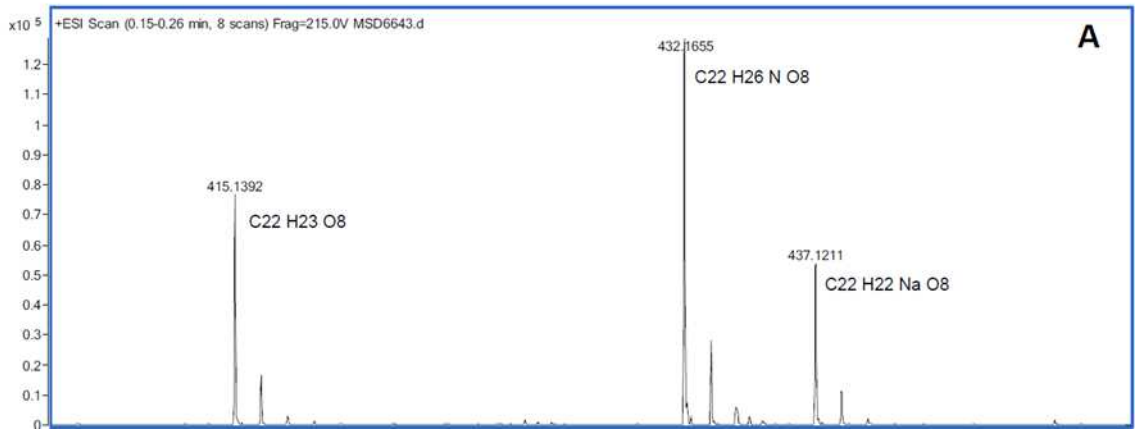
شکل۲: کروماتوگرام حاصل از HPLC عصاره اتیل‌استاتی ریشه *H.virgatum* برای شناسایی لیگنان‌ها

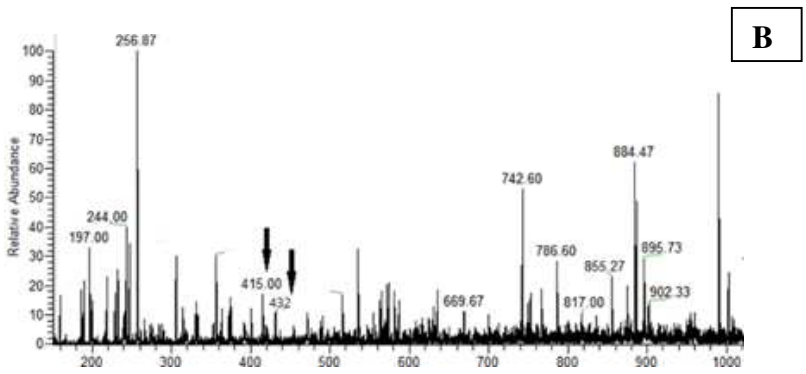


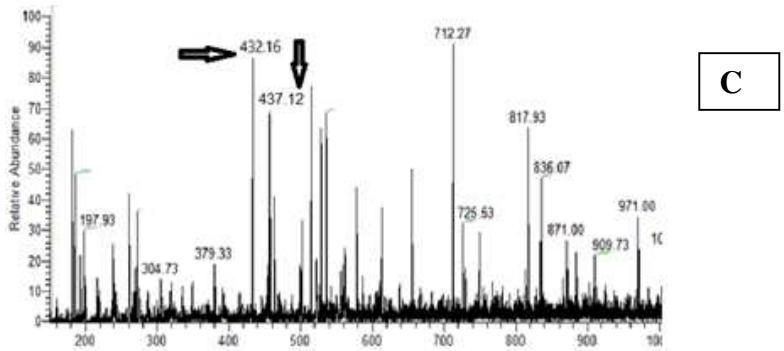
شکل۳: کروماتوگرام حاصل از HPLC عصاره اتیل‌استاتی ریشه H.virgatum وتزریق همزمان ۴ استاندارد برای تایید حضور لیگنان‌هایی مثل پودوفیلوتوکسین، ماتایرزینول،پینورزینول، لاریسی رزینول

نتایج LC-MS عصاره ریشه *H.virgatum*

برای اطمینان از وجود لیگنان‌های مورد نظر، عصاره اتیل‌استاتی ریشه با روش LC-MS مورد آزمایش قرار گرفت و از طرفی طیف LC-MS دو لیگنان podophyllotoxin و Lariciresinol نیز تهیه و با طیف‌های جرمی عصاره ریشه مطابقت داده شد، نتایج در شکل‌های ۴و ۵ نشان داده شده است.

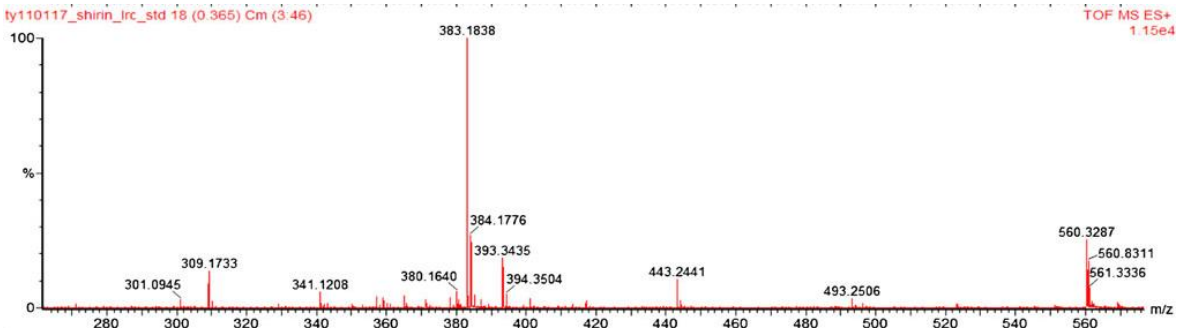




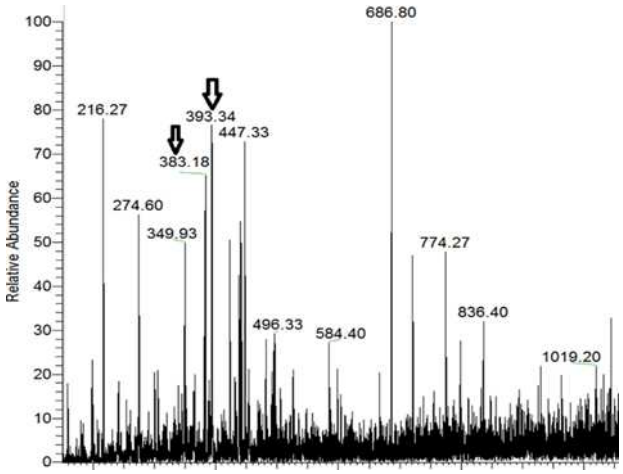


شکل ۴: (A) طیف جرمی استاندارد podophyllotoxin (B) و(C) :طیف جرمی عصاره ریشه

با توجه به طیف جرمی پودوفیلوتوکسین (الف) و تطابق طیف جرمی عصاره ریشه در زمان‌های بازداری ۱۴/۶۳ (ب) و ۱۶/۶۸(ج) با طیف استاندارد می‌توان وجود این ماده را در گیاه تایید کرد.



A



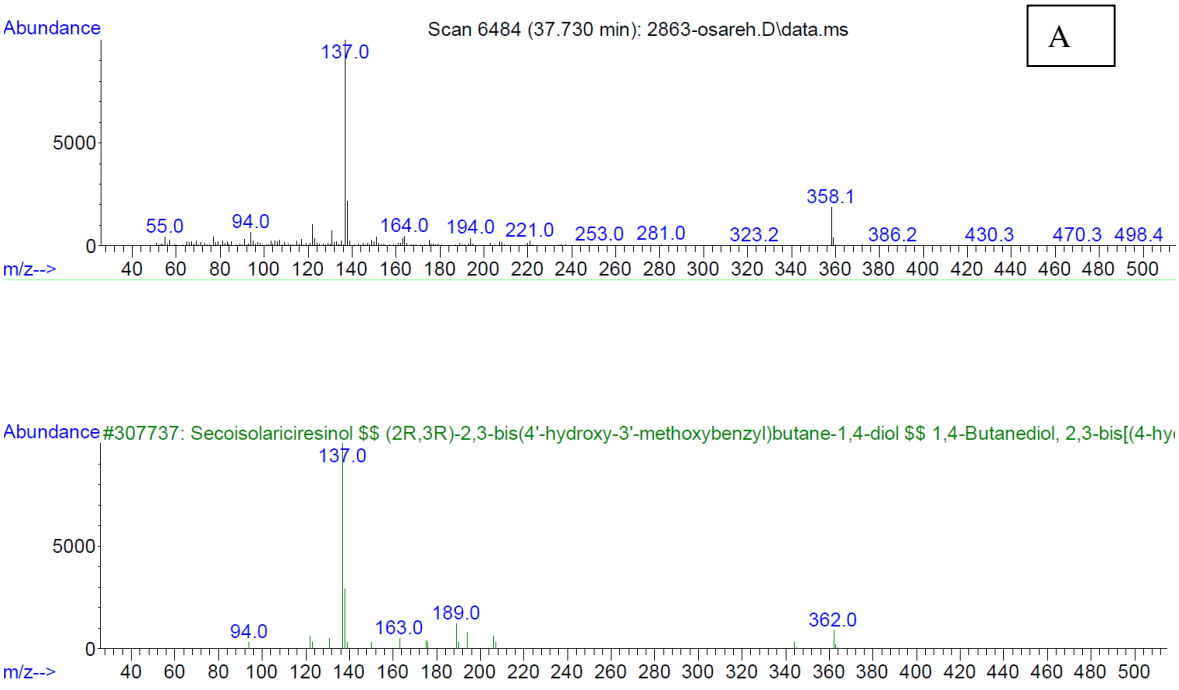
B

شکل ۵: (A)طیف استاندارد Lariciresinol (B) طیف جرمی عصاره اتیل‌استاتی ریشه با زمان بازداری۸/۳۷

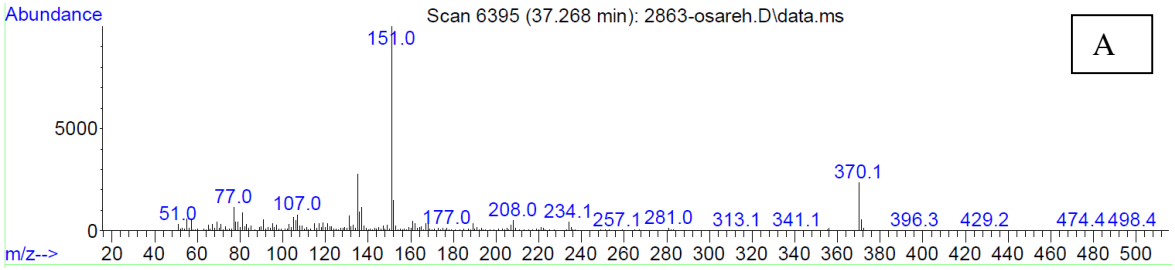
مقایسه طیف استاندارد Lariciresinol و طیف جرمی عصاره در دقیقه ۸/۳۷ پیک‌هایی با جرم ۳۸۳/۱۸ و ۳۹۳/۳۴ را در گیاه تایید می‌کند که در طیف استاندارد هم دیده می‌شود.

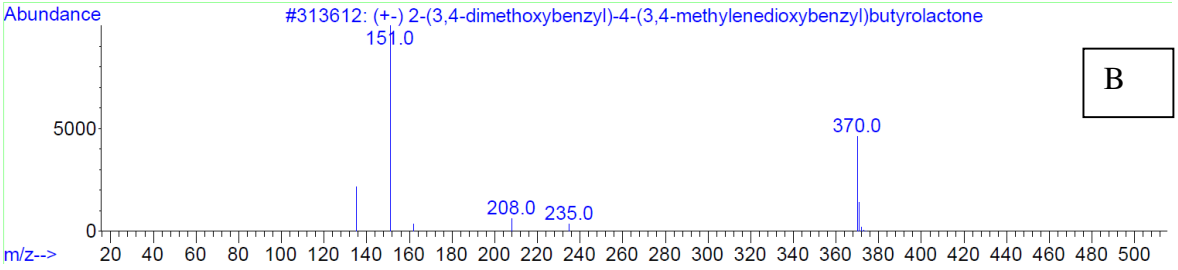
نتایج حاصل از GC-MS

ترکیبات موجود در عصاره ریشه و برگ گیاه *H.virgatum* با کمک روش GC-MS بررسی شد که علاوه بر متابولیت‌های اولیه تعدادی متابولیت ثانویه مانند آلکالوئیدها، لیگنان‌ها، کومارین‌ها و ترکیبات فنلی شناسایی شدند. دربین لیگنان‌های شناسایی شده توسط GC-MS می‌توان به Matairesinol با فرمول شیمیایی $C_{20}H_{22}O_6$ (2-3,4 dimethoxybenzyl)-4-(3,4- methylenedioxybenzyl)butyrolacton, با فرمول شیمیایی $C_{21}H_{22}O_6$ و Cubebinolide (Hinokinin) با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{18}O_6$ اشاره کرد که دارای اثرات ضدسرطانی می‌باشند.[۵و۶و۷]



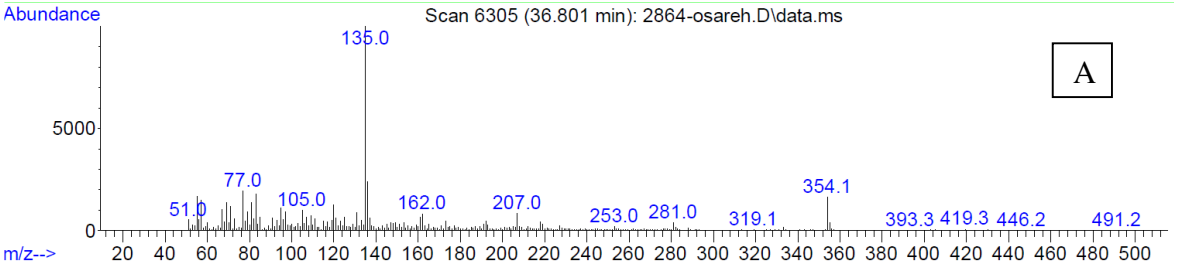
شکل ۶: (A)طیف جرمی عصاره اتیل‌استاتی ریشه و(B)طیف جرمی استاندارد matairesinol

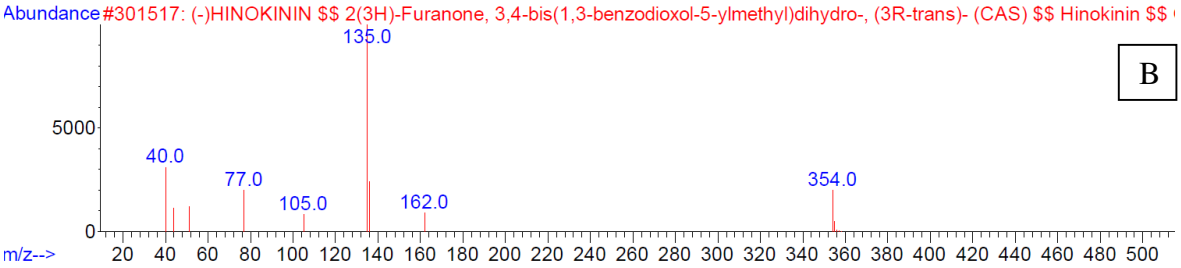




شکل۷: (A)طیف جرمی عصاره اتیل استاتی ریشه

(B)طیف جرمی استاندارد 2-3,4 (dimethoxybenzyl)-4-(3,4- methylenedioxybenzyl)butyrolacton





شکل۸: (A) طیف جرمی عصاره اتیل استاتی ریشه و (B)طیف جرمی استاندارد Hinokinin

نتیجه گیری

گیاهان عالی طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند با توجه به اهمیت دارویی اغلب این ترکیبات باعث شد که در پژوهش حاضر متابولیت‌های ثانویه گیاه *Haplophyllum virgatum* مورد بررسی قرار بگیرند، همچنین با توجه به عوارض جانبی بسیار زیاد شیمی درمانی برای بیماران سرطانی یافتن عوامل دیگری که باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی شوند لازم و ضروری می‌باشد. در این مطالعه نشان داده شد که برخی از ترکیبات استخراج شده ازعصاره اتیل‌استاتی ریشه گیاه *H.virgatum* دارای تاثیرات امیدوارکننده ای علیه برخی رده های سلولی سرطانی می‌باشد که البته این موضوع نیاز به مطالعات کامل‌تری در این زمینه دارد.

شناسایی به روش GC-MS حضور لیگنان‌هایی را دراین گیاه تایید می‌کند که خواص درمانی برخی از آنها تایید شده است و بخشی از فعالیت سمیت سلولی علیه رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی مربوط به این ترکیبات می‌باشد. نتایج حاصل ازHPLC به منظور شناسایی لیگنان‌ها، تزریق استانداردهای لیگنان‌ها وهمچنین مقایسه آنها با طیف‌های جرمی حاصل از LC-MS وجود لیگنان‌هایی مانند podophyllotoxin و Lariciresinol را در *H.virgatum* تایید می‌کند. بدیهی است برای شناسایی سایر ترکیبات موجود در این عصاره بررسی‌های وسیع‌تری در آینده انجام خواهد شد.

منابع

1--Olivia Jansen a, V. Akhmedjanova b, L. Angenot a, G. Balansard c, A. Chariot d, E. Ollivier c, M. Titsa, M. Fr´ed´erich(2006) Screening of 14 alkaloids isolated from Haplophyllum A. Juss. for their cytotoxic properties

2- Parimahe Parhooheh, Mawardi Rahmani, Najihah Mohd. Hashim Mohd. Aspollah Sukari & Gwendoline Cheng Lian ee (2012) Alkaloid Constituents of Haplophyllum laeviusculum (Rutaceae)

3- Belma KONUKLUGİL(1994) Lignans with Anticancer Activity

4- PETSALO (2011) Development of LC/MS techniques for plant and drug metabolism studies

5- Maria Carla Marcotullio *, Azzurra Pelosi and Massimo Curini (2014) Hinokinin, an Emerging Bioactive Lignan

6- Sus, Cheng (2015) Cytotoxicity of arctigenin and matairesinol against the T-cell lymphoma cell line CCRF-CEM

7- Belma KONUKLUGİL(1994) Lignans with Anticancer Activity

8- F. Karimi, M. Yousefzadi, M. H. Mirjalili, N. Rahmani and M. Zaeifi(2013) CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF Haplophyllum virgatum var. virgatum FROM IRAN