

استخراج و خالص‌سازی لیگنان زیست‌فعال ماتایی‌رزینول موجود در گره‌های گونه‌ی سرو سیمین (*Cupressus arizonica*)

چکیده

لیگنان ماتایی‌رزینول (MR) گره سرو سیمین جداسازی، شناسایی و خالص‌سازی شد. پیش استخراج با حلال هگزان به‌منظور حذف ترکیبات چربی‌دوست و به دنبال آن، استخراج ترکیبات آب‌دوست موجود در مواد استخراجی گره‌ها با روش غوطه‌وری در حلال اتانول - آب (۱:۹۷/۷) انجام شد. همچنین ماتایی‌رزینول، با استفاده از پتاسیم استات خالص‌سازی گردید. شناسایی عصاره‌ها در تمام مراحل با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی GC/MS انجام شد. نتایج نشان داد که تعداد ترکیبات شناسایی‌شده در کروماتوگرام حاصل از عصاره اتانولی اولیه زیاد است که تعداد زیادی از این ترکیبات را قندها و ترکیبات آروماتیکی تشکیل می‌دهند. همچنین تعداد ترکیبات در کروماتوگرام‌های حاصل از رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ که در اثر افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی حاصل‌شده‌اند، نسبت به عصاره اتانولی اولیه کم‌تر است که این امر بیانگر تأثیر پتاسیم استات در خالص‌سازی عصاره اتانولی است. مقدار لیگنان MR در عصاره اتانولی اولیه، رسوب و محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ به ترتیب ۱/۳، ۳۲/۵۹، ۴۰/۴۴ درصد است و شدت پیک MR در عصاره‌های خالص‌سازی شده نسبت به عصاره اتانولی اولیه بیش‌تر است که این موضوع نیز نشان‌دهنده خلوص بیش‌تر لیگنان ماتایی‌رزینول در این عصاره‌ها است.

واژگان کلیدی: سرو سیمین، مواد استخراجی، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی، گره چوب، لیگنان، ماتایی‌رزینول.

اکرم صداقت^۱
علی عبدالخانی*^۲
فرامرز خدائیان چگینی^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳ دانشیار، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات:
abdolkhani@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۰

مقدمه

از تنه نیز است. گره‌ها به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع سرشار از ترکیبات پلی‌فنول و به‌ویژه لیگنان‌ها، در طبیعت محسوب می‌شوند که واجد ارزش اقتصادی بالایی بوده و از آن‌ها در صنایع غذایی، داروسازی و در تولید مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می‌گردد [۱، ۲]. در سال‌های اخیر، نقش و اثرات مفید آنتی‌اکسیدان‌ها

گره بافت ترمیمی است که در اثر قطع شاخه‌ها ایجاد می‌شود و باعث محافظت درخت در برابر عوامل مخرب زیستی می‌شود [۱]. ترکیبات فنولی و سمی موجود در مواد استخراجی بافت گره بیش‌تر از سایر قسمت‌های درخت است و لیگنان موجود در گره‌ها ۱۰۰ برابر بیش‌تر

HL-60 سرطان خون انسان^۳ نشان داده است [۹].
 به دلیل اثرات سرطان زای آنتی اکسیدان های سنتزی و ضرورت جایگزینی آنتی اکسیدان های طبیعی با آن ها، تحقیقاتی بر روی شناسایی آنتی اکسیدان های طبیعی و به ویژه پلی فنول ها از بافت گره درختان انجام شده است. Si و همکاران (۲۰۱۲)، مواد استخراجی شاخه های گونه *Pinus banksiana Lambert* را از نظر فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار دادند و یک لیگنان گلیکوزید جدید با نام ۶-آلفا-فیلیرین شناسایی شد [۱۰]. Pisspanen و همکاران (۲۰۰۸)، ترکیبات موجود در مواد استخراجی گره های گونه *Picea abies* را با استفاده از آنالیز GC/MS مطالعه کردند و لیگنان های ایزوهیدروکسی ماتایی رزینول، ماتایی رزینول، هیدروکسی ماتایی رزینول، آلفا کونیدندریک اسید، آلفا کونیدندریک، سکویا زولاریسیرزینول و لاریسیرزینول شناسایی شد [۱۱]. Holmbom و همکاران (۲۰۰۳)، ترکیبات شیمیایی تعدادی از گره های سوزنی برگان و پهن برگان را مورد مطالعه قرار دادند؛ نتایج نشان داد که گره های سوزنی برگان شامل ۱۵-۵٪ (w/w) از ترکیبات پلی فنول می باشند که لیگنان ها ترکیب عمده و اصلی این پلی فنول ها محسوب می شوند. در گونه *Picea abies*، گره ها شامل ۲۴-۶٪ لیگنان می باشند که ترکیب ۷-هیدروکسی ماتایی رزینول (HMR)، ۸۵-۷۰٪ این لیگنان ها را تشکیل می دهد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که لیگنان ها با اتانول و یا حتی با آب استخراج می شوند و با اضافه کردن پتاسیم استات به مواد استخراجی استخراج شده با اتانول، HMR موجود در محلول، ته نشین می شود [۱].

اخیراً تولید فنول های زیست فعال^۴ از گیاهان مورد توجه قرار گرفته است که با توجه به وجود ترکیبات استخراجی فنولی در گره ها، استخراج فنول های زیست فعال از آن ها، تولید ترکیبات زیست فعال^۵ و استفاده از آن ها در صنایع دارویی، غذایی و تولیدات آرایشی و بهداشتی، ضرورت پیدا می کند تا ترکیبات فنولی و به خصوص لیگنان ها در مقیاس صنعتی از گره ها استخراج شوند و زمینه ای برای افزایش نقش تجاری جنگل ها و تولیدات جنگلی فراهم گردد. با توجه به

در برابر اختلالات و بیماری های ناشی از تنش اکسایشی، بیش تر مورد توجه قرار گرفته است [۳]. بر اساس شیوه های تولید آنتی اکسیدان ها، این ترکیبات به دو دسته آنتی اکسیدان های سنتزی و آنتی اکسیدان های طبیعی تقسیم بندی می شوند [۳]. آنتی اکسیدان های سنتزی مانند بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA)، پروپیل گالات (PG)، توکوفرول و تری آرپل-بوتیل هیدروکینون (TBHQ) رایج ترین آنتی اکسیدان های مورد استفاده در صنایع غذایی می باشند و در رژیم غذایی انسان وجود دارند. گزارش های اخیر نشان داده اند که این ترکیبات در وقوع شماری از بیماری ها از جمله ایجاد سرطان نقش دارند [۳]؛ به همین دلیل در این سال ها از نقطه نظر ایمنی، آنتی اکسیدان های طبیعی موجود در گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته اند [۳].

پلی فنول ها دسته ای از متابولیت های ثانویه گیاهی می باشند و گروه بزرگی از ترکیبات آنتی اکسیدانی را تشکیل می دهند، که خود شامل لیگنان ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانیدین ها، اسیدهای فنولی و استیلبن ها می باشند [۳]. این ترکیبات باعث محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری زا می گردند. از جمله اثرات سودمند این پلی فنول ها می توان به فعالیت های ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد آلرژیک، ضد ترومبوتیک، ضد ویروسی، ضد سرطان، اثر حفاظتی از کبد و اثرات بازکنندگی رگ ها اشاره نمود [۳]. لیگنان ها مهم ترین ترکیب فنولی موجود در گره های سوزنی برگان می باشند [۱، ۴]، که از نظر بیولوژیکی فعال هستند و خواص آنتی تومور، آنتی ویروس، آنتی میکروبی و آنتی اکسیدان دارند [۵]؛ فعالیت آنتی اکسیدانی لیگنان ها به تعداد و محل قرارگیری گروه های هیدروکسیل در ساختار آن ها بستگی دارد [۶].

ماتایی رزینول (MR)^۱ از جمله لیگنان های ممالیان^۲ است که می تواند باعث کاهش احتمال ابتلا به سرطان سینه و بیماری های قلبی و عروقی شود [۲، ۵، ۷]. MR فعالیت سیتوتوکسین قابل توجهی را در برابر سلول های L۹۲۹ موش نشان داده است [۷]. این لیگنان فعالیت فیتواستروژنیک دارد [۷] و از رونوشت HIV در سلول های لمفوسیتی H۹ جلوگیری نموده است [۸، ۹]، همچنین ماتایی رزینول فعالیت سیتوتوکسین قابل توجهی را با مقدار IC_{۵۰} کمتر از ۱۰۰ ng/ml در برابر سلول های

^۱ . Matairesinol

^۲ . Mamalian lignans

^۳ . Human leukemic HL-60 cells

^۴ . Bioactive phenols

^۵ . Bioactive compound

از واکنشگر BSTFA و ۰/۳ میلی‌لیتر پیریدین مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه عمل‌آوری شد. به دلیل پایداری اندک ترکیبات سایلبل‌دار شده، عمل سایلبل‌دار کردن، ۲۴ ساعت قبل از آنالیز با GC/MS انجام گردید. جداسازی و شناسایی اجزاء مواد استخراجی نمونه‌های سایلبل‌دار شده به‌وسیله GC/MS، تحت شرایط ذیل انجام شد:

ستون HP5-MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، گاز حامل هلیوم، سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه، با برنامه دمایی ۶۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و شیب دمایی ۶ درجه بر دقیقه.

شناسایی طیف‌های جرمی از طریق مقایسه با طیف‌های پایه موجود در بانک اطلاعاتی رایانه دستگاه GC/MS و پایگاه‌های اطلاعاتی Wiely و NIST انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبات عصاره‌ها با کروماتوگرافی

گازی (GC)

شکل ۱ نشان می‌دهد که تعداد ترکیبات شناسایی شده در کروماتوگرام حاصل از عصاره اتانولی اولیه (الف) زیاد است که تعداد زیادی از این ترکیبات را قندها و ترکیبات آروماتیکی تشکیل می‌دهند و لیگنان ماتایی‌رزینول که در زمان بازداری ۴۰/۳۹ دقیقه شناسایی شده است، ۱۱/۳ درصد از این عصاره را تشکیل می‌دهد. شکل‌های (ب) و (ج) نشان می‌دهند که تعداد ترکیبات در کروماتوگرام‌های حاصل از رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ که در اثر افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی حاصل شده‌اند، نسبت به عصاره اتانولی اولیه کم‌تر است که این امر بیانگر تأثیر پتاسیم استات در خالص‌سازی عصاره اتانولی است. در کروماتوگرام (ب) سه پیک شاخص در زمان‌های بازداری ۲۴/۳۸، ۳۰/۷۳ و ۳۹/۳۶ دقیقه مشاهده می‌شود که به ترتیب مربوط به یک ترکیب ترپنوبیدی، هپتاکوزان و لیگنان ماتایی‌رزینول است که این ترکیبات به ترتیب ۲۱/۶۴، ۹/۳۵ و ۳۲/۵۹ درصد از رسوب بعد از سانتریفیوژ را تشکیل می‌دهند. همچنین در کروماتوگرام (ج)، دو پیک شاخص در زمان‌های بازداری ۲۴/۴۳ و ۳۹/۴۸ دقیقه مشاهده می‌شود که به ترتیب مربوط به یک ترکیب ترپنوبیدی و لیگنان ماتایی‌رزینول است که این ترکیبات به ترتیب ۲۵/۲۹ و ۴۰/۴۴ درصد از محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ را تشکیل می‌دهند. کروماتوگرام‌های GC ارائه‌شده نشان می‌دهند که شدت پیک MR در عصاره‌های

این که گونه سرو سیمین از جمله درختان سوزنی‌برگ مقاوم به خشکی است و با شرایط اقلیمی شهر کرج سازگار است، در تحقیق حاضر استخراج و خالص‌سازی لیگنان ماتایی‌رزینول از بافت گره‌های چوبی این گونه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه چوبی

گره‌های زنده گونه سرو سیمین (*Cupressus arizonica*)، جداسازی و در شرایط کنترل‌شده و به‌دوراز نور، رطوبت و دما با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی به آرد چوب تبدیل شد و طبق استاندارد TAPPI شماره T257CM-85 به‌صورت آرد چوب با اندازه ذرات ۴۰ و ۶۰ مش مورد استفاده قرار گرفت. همچنین مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه گردیده است.

استخراج عصاره گره چوبی

به‌منظور استخراج و حذف ترکیبات چربی‌دوست از بافت گره چوبی، نمونه آرد چوب با استفاده از حلال هگزان و با روش غوطه‌وری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت استخراج شد. در ادامه آرد گره چوبی پس از خشک شدن به‌منظور جداسازی ترکیبات آب‌دوست با استفاده از حلال اتانول - آب (۱:۹ v/v) و با روش غوطه‌روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت استخراج گردید.

خالص‌سازی با استفاده از پتاسیم استات

به‌منظور خالص‌سازی لیگنان موجود در عصاره اتانولی از پتاسیم استات استفاده شد [۱]. به این منظور مقداری پتاسیم استات به عصاره اتانولی اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس بر روی رسوب و محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ آنالیز GC/MS انجام گردید.

شناسایی ترکیبات عصاره با کروماتوگرافی

گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC/MS)

عصاره اتانولی و عصاره‌های خالص‌سازی شده با پتاسیم استات قبل از تزریق به ستون کروماتوگرافی، مشتق‌سازی گردید. عملیات سایلبل‌دار کردن عصاره‌ها با استفاده از واکنشگر BSTFA^۱ به همراه پیریدین انجام شد. به این منظور، حدود ۰/۱ گرم از هر یک از عصاره‌ها با ۰/۳ میلی‌لیتر

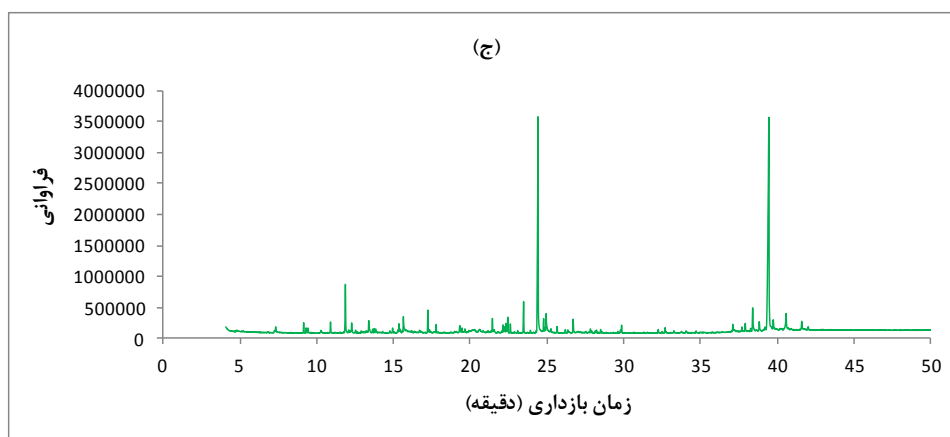
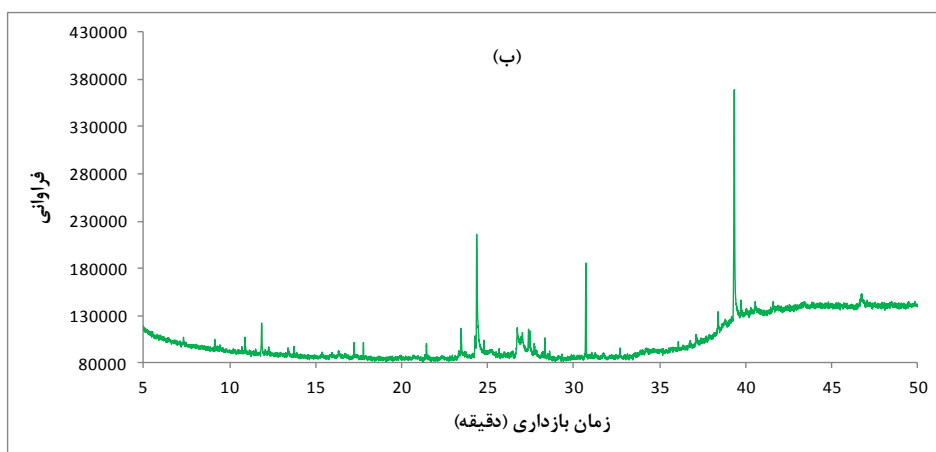
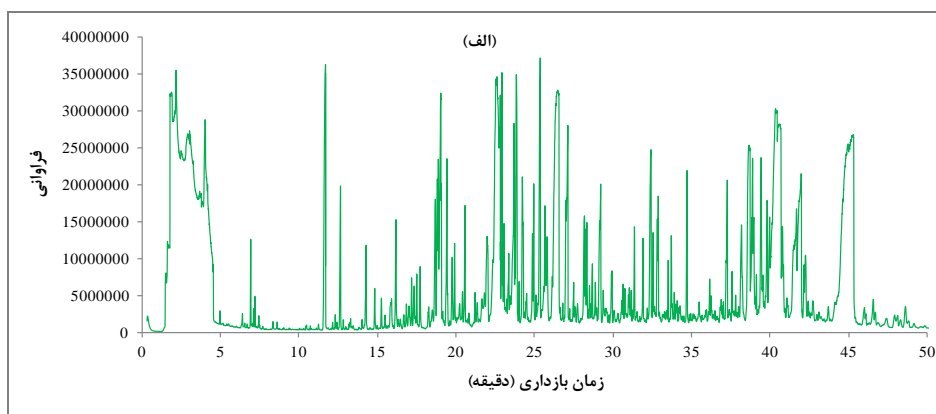
^۱ . N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoro acetamide

استخراج و خالص‌سازی لیگنان زیست‌فعال ماتایی‌رزینول موجود در...

از سانتریفیوژ به ترتیب ۱۱/۳، ۳۲/۵۹ و ۴۰/۴۴ درصد از عصاره را به خود اختصاص می‌دهد. این مقادیر نشان می‌دهند که در اثر افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی، خلوص لیگنان ماتایی‌رزینول در رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ افزایش یافته است. شکل ۲ فرمول ساختاری لیگنان ماتایی‌رزینول شناسایی شده در بافت گره گونه سرو سیمین را نشان می‌دهد.

خالص‌سازی شده نسبت به عصاره اتانولی اولیه بیش‌تر است. که این موضوع نیز نشان‌دهنده خلوص بیش‌تر لیگنان ماتایی‌رزینول در این عصاره‌ها است.

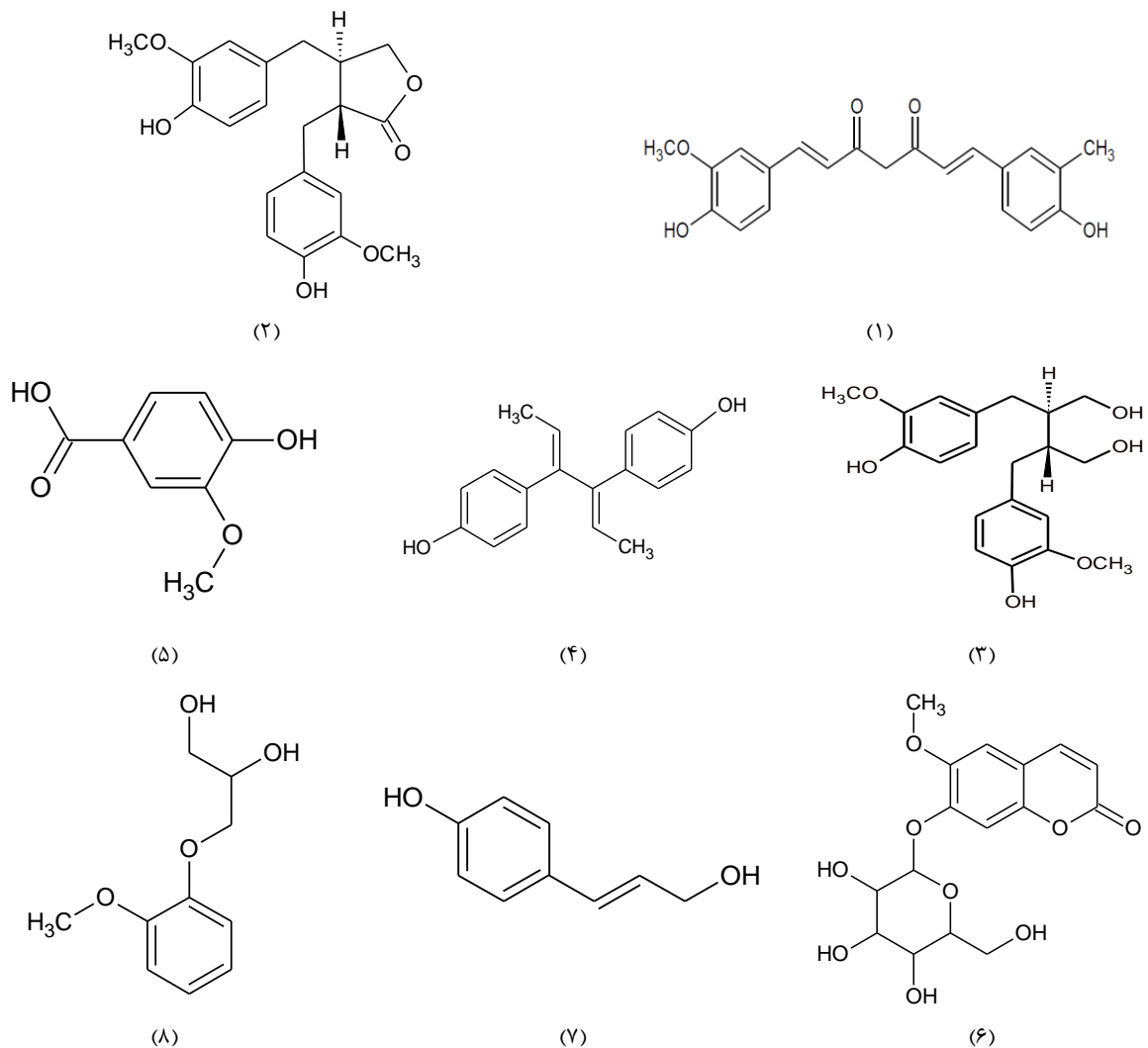
جدول ۱، بازده گروه‌های اصلی ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتانولی و عصاره‌های خالص‌سازی شده را نشان می‌دهد. جدول ۱ نشان می‌دهد که لیگنان ماتایی‌رزینول در عصاره اتانولی اولیه و رسوب و محلول بعد



شکل ۱- کروماتوگرام‌های گازی (GC) الف) عصاره اتانولی اولیه، ب) رسوب بعد از سانتریفیوژ ج) محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ

جدول ۱- بازده (%) گروه‌های اصلی ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتانولی گونه سرو سیمین و عصاره‌های خالص‌سازی شده این گونه

نام ترکیب	عصاره اتانولی اولیه	رسوب عصاره بعد از سانتریفیوژ	محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ
قندها (۶)	۱۷/۹۶	۱/۵۷	۴/۹۵
مونومرهای آروماتیکی (۵، ۸)	۶/۲		۶/۸۹
ترکیبات آروماتیکی	۱۲/۴	۴/۵۴	
* مونومرهای فنولی زیست‌فعال (۷)			
(a) اسیدهای فنولی زیست‌فعال	۳/۲۳		۰/۹۸
(b) سایر مونومرهای فنولی زیست‌فعال	۶/۰۸	۵/۰۷	۸/۶۹
* لیگنان‌ها			
(a) لیگنان ماتایی‌رزینول (MR) (۲)	۱۱/۳	۳۲/۵۹	۴۰/۴۴
(b) سکوآی زولاریسیرزینول (۳)		۲/۱	۰/۷۶
(c) داینسترول (۴)	۰/۴		
دی آریل هپتانوئید کورکومین (۱)	۰/۹		



شکل ۱-۲ (۱) دی آریل هپتانوئید کورکومین، (۲) لیگنان ماتایی‌رزینول (MR)، (۳) لیگنان سکوآی زولاریسیرزینول، (۴) لیگنان داینسترول، (۵) مونومر آروماتیکی بنزوئیک اسید، (۶) قند اسکوپولین، (۷) مونومر فنولی پاراکوماریل الکل، (۸) مونومر آروماتیکی گوآیفنسین

نتیجه‌گیری

از رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ را تشکیل می‌دهد. در نتیجه می‌توان بیان کرد که با افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی حاصل از گره‌گونه سرو سیمین، خلوص لیگنان ماتایی‌رزینول در رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ افزایش یافته است و MR را می‌توان به ترتیب با خلوص ۳۲/۵۹ و ۴۰/۴۴ درصد به دست آورد.

نتایج این تحقیق نشان داد که لیگنان ماتایی‌رزینول (MR)، مهم‌ترین ترکیب فنولی گره‌های گونه سرو سیمین است که ۱۱/۳ درصد از عصاره اتانولی حاصل از گره‌های این گونه را تشکیل می‌دهد. همچنین با افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی حاصل و به دنبال آن انجام سانتریفیوژ، این لیگنان به ترتیب ۳۲/۵۹ و ۴۰/۴۴ درصد

مراجع

- [1] Holmbom, B., Echerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K. and Willfor, S., 2003. Knots in trees-A new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews*, 2: 331-340.
- [2] Holmbom, B., Willfor, S., Hemming, J., Pietarinen, S., Nisula, L., Eklund, P. and Sjöholm, R., 2007. Knot in trees: A rich source of bioactive polyphenols. In: *Materials, chemicals and energy from forest biomass*. Eds: Argyropoulos, D., Oxford University press. 350-362.
- [3] He, Ch., Pan, Y., Ji, X. and Wang, H: Antioxidant introduction., 2012. In: *Antioxidant polymers synthesis, production and applications*, Cirillo, G., and Iemma, F Ed., Scrivener publication, Calabria, Italy. 1-23.
- [4] Neacus, M., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Pietarinen, S. P., Ahotupa, M. O., Holmbom, B. R. and Willfor, S. M., 2007. Antioxidant flavonoids from knotwood of *Jack pine* and European aspen. *Holz Roh werkt*, 65: 1-6.
- [5] Umezawa, T., 2001. *Chemistry of extractives*. Kyoto: Kyoto university press. 213-232.
- [6] Sok, D. E., Cui, H. S. and Kim, R. M., 2009. Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants. *Food, nutrition and agriculture*, 1: 87-95.
- [7] Deyama, T. and Nishibe, S., 2010. Pharmacological properties of lignans in: *lignin and lignin*, Eds: Heitner, C., Dimmel, D. R and Schmidt, J. A, CRC press, New York: 585-620.
- [8] Kim, C. Y., Ahn, M. J. and Kim, J., 2006. Preparative isolation and purification of arctigenin and matairesinol from *Forsythia koreana* by Centrifugal partition chromatography. *Separation Science*, 29: 656-659.
- [9] Fischer, J., Reynolds, A. J., Sharp, L. A. and Sherburn, M. S., 2004. Radical Carboxylation approach to lignans, total synthesis of arctigenin, matairesinol and related natural products. *Organic letters*, 6: 1345-1348.
- [10] Si, C. L., Jiang, J. Z., Liu, S. C., Hu, H. Y., Ren, X. D., Yu, G. J. and Xu, G. H., 2012. A new lignan glycoside and phenolics from the branch wood of *pinus banksiana* Lambert. *Holzforchung*, 67 (4): 357-363.
- [11] Piispanen, R., Willfor, S., Saranpää, P. and Holmbom, B., 2008. Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) Knotwood: within-stem variation and the effect of fertilization at two experimental sites in Finland. *Trees*, 22: 317-328.

Extraction and purification of matairesinol bioactive lignan from Arizona, cypress (*Cupressus arizonica*)

Abstract

Matairesinol lignan (MR) of Arizona cypress was isolated, characterized and purified. Wood flour was pretreated with hexane to remove the lipophilic moieties and then soaked in ethanol-water (9:1 v/v) to isolate the phenolic extractives. Matairesinol fraction of the extractives was purified with potassium acetate. Identification of extract moieties were performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Analyzing the unpurified extractives indicated the presence of aromatic and sugar impurities within the extract. The results showed that purification of the isolated extractives with potassium acetate led to the reduction of the impurities. In addition, the amount of MR lignan in the original ethanol extract, sediment and clear solution after centrifugation was determined as 11.3, 32.59 and 40.44%, respectively.

Keywords: arizona cypress, extractives, gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), wood knot, lignan, matairesinol (MR).

A. Sedaghat¹
A. Abdolkhani²
F. Khodaian Chegini³

¹ MSc., Dept. of wood and paper science and technology, Faculty of Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

² Associate Prof., Dept. of wood and paper science and technology, Faculty of Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

³ Associate Prof., Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran.

Corresponding author:
Abdolkhani@ut.ac.ir

Received: 2015.01.05
Accepted: 2016.02.09