

جداسازی و شناسایی و تعیین مقدار Gingerol ها از ریزوم زنجبیل

دکتر حسین ناظمیه^۱، دکتر عباس دل آذر^۲، دکتر جلیل افشار^۳، دکتر بابک اسکندری^۴

Title: Isolation Identification and Quantitative determination of Gingerols in ginger roots.

Authors: Nazemiyeh, H.¹, Delazar, a.², Afshar, J.³, Eskandari, B.⁴,

Abstract: The rhizomes of ginger were obtained from local market and then macroscopic and microscopic properties of powder evaluated. The characteristic components were similar with *Zingiber officinale*. Ground rhizomes were repeatedly extracted with acetone on room temperature and then combined extractes were evaporated in vacuum to afford a residue, which diluted by distilled water and extracted with petroleum ether and ethylacetate respectively. The evaluations with TLC showed that the most of active ingredients present in petroleum ether fraction. The remaining of this extract after evaporation of solvent was fractionated on silicagel column (silica gel G60 70-230 Mesh, Merck) using gradient of Petr. Ether/ EtOAc (92.5:7.5__ 90:10) and Petr. Ether/ EtoAc/CHCl₃ (80:15:15__ 55:40:5) to afford 7 main groups of fractions. Fractions 4-7 were purified by prep. TLC method and finally the [6] – gingerol and mixture of [8] and [10] gingerol were obtained. Using UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR the presence of these components in ginger rhizome, documented. Quantitative analysis of these compounds showed that the [6]gingerol, mixture of [8] , [10]- gingeroles and total amount of gingerols in the rhizome were 4.96%, 6.43% and 11.04% respectively.

Key words: [6]-gingerol, Ginger, Isolation of gingerols.

۱- استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.

۲- استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.

۳- استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.

۴- Pharm D.

خلاصه

ریزوم زنجبیل مورد بررسی از بازار داخل خریداری گردید. بررسی ویژگیهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی پودر ریزوم خریداری شده و مقایسه آن با مشخصات گونه *Zingiber officinale* حاکی از یکسان بودن این دو نمونه بود. استخراج ترکیبات موثره توسط حلال آستون صورت پذیرفت. عصاره حاصل توسط روشهای فراکسیونه نمودن با حلالهای مختلف، روشهای کروماتوگرافی و TLC تحت جداسازی واقع گردید و در نهایت ترکیب gingerol - [6] و مخلوط دو ترکیب gingerol - [10] و [8] حاصل گردید. تعیین ساختمان ترکیبات فوق به کمک بررسی طیف های $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, IR, UV صورت پذیرفت. جهت تعیین مقدار gingerol - [6] ابتدا اقدام به رسم منحنی کالیبراسیون توسط نمونه خالص gingerol - [6] در طول موج ۲۸۲ نانومتر گردید و سپس gingerol - [6] حاصل از مقدار معینی از ریزوم توسط منحنی کالیبراسیون مذکور تعیین مقدار گردید مخلوط gingerol - [10] و [8] نیز به طریق مشابه و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مربوطه تعیین مقدار شد بر این اساس مقدار gingerol - [6] ۴/۶۱ درصد و مخلوط gingerol - [10] و [8] تواما ۶/۴۳ درصد تعیین گردیدند و در مجموع مقدار gingerol های تام در این پودر ۱۱/۰۴ درصد برآورد گردید.

گل واژه گان : زنجبیل ، تعیین مقدار gingerol ها ، gingerol - [6]

مقدمه

ضد درد (۳)، ضد ویروس (۸)، ضد میگرن (۹)، اثرات اینوتروپیک مثبت (۱۰)، صفراآور (۳) و آنتی تومور (۱۱) آن مربوط می باشد.

اولئورزین ها، ترکیبات شیمیایی عمده ریزوم زنجبیل را تشکیل می دهند. اسانس ها به میزان ۴-۱ درصد در ریزوم یافت می شوند و عطر و طعم و بوی گیاه را سبب میگردند (۱۲). اسانس عمدتاً از منوترپنها، و سزکوئی ترپنهای هیدروکربنه و مشتقات اکسیژنه آنها و نیز ترکیبات آروماتیک تشکیل می یابد. رزین های زنجبیل اجزاء غیر فراری هستند که از نظر ساختمان شیمیایی جزء کتون های فنلی محسوب میگردند و خصوصیات سوزاننده و تندی از خود نشان می دهند. این ترکیبات از گروههای شیمیایی مختلفی تشکیل شده اند که عمده ترین آنها gingerol ها و shogaol می باشند.

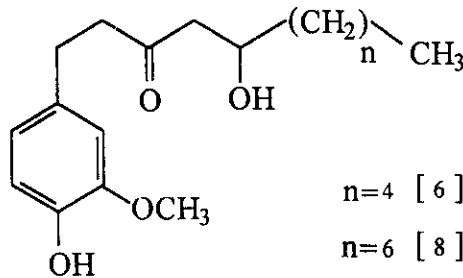
زنجبیل هم اکنون در رده ده ادویه برتر جهان تجارت ادویه جات قرار دارد و از زمان های بسیار دور به منظور کاربرد در پزشکی و نیز استفاده در پخت و پز کشت می شده است (۱). این گیاه در چین ۲۵۰۰ سال سابقه مصرف دارد و تقریباً در نیمی از ترکیبات دارویی گیاهی مشرق زمین یافت می شده است (۲).

ریزوم خشک شده زنجبیل، قطعه نامنظم منشعب و مسطحی است که حالتی افقی داشته و در ازای آن ۳-۶ سانتیمتر ، پهنای آن ۳-۴ سانتیمتر و ضخامت آن حداکثر ۲ سانتیمتر میباشد. گاهی دارای شکاف طولی بوده، رنگ زرد نخودی یا قهوه ای روشن دارد که ظاهری فیبری به ریزوم می بخشد (۳).

خواص درمانی زنجبیل به اثرات ضد تهوع (۴-۵)، ضد اولسر دستگاه گوارشی (۶-۷)، ضد التهاب (۸و۳)،

عمومی ۳' - متوکسی، ۴' - هیدروکسی فنیل ۵-
هیدروکسی آلکان ۳ اون می باشند.

Gingerol ها اجزاء ایجاد کننده مزه تند زنجبیل بوده و همینطور خواص ضد تهوع اولئورزین ها را موجب می گردند. (۱۸-۱۳) این ترکیبات دارای ساختمان



n=4 [6] - gingerol

n=6 [8] - gingerol

n=8 [10] - gingerol

استخراج اولئورزین ها

۳۰۰ گرم از پودر ریزوم زنجبیل به دفعات متعدد با آستون خیسانده و عصاره گیری شد. عصاره های آستونی حاصل تحت شرایط خلاء و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تا حصول مایع ویسکوز و قهوه ای رنگ تغلیظ گردید. باقیمانده حاصل با مقداری آب مقطر رقیق شده و به درون قیف دکانتاسیون منتقل شد. سپس به مقدار هم حجم آن اتر دوپترول افزوده و مخلوط حاصل به هم زده شد. فاز اتر دوپترولی حاصل جدا و فاز مایی مجدداً توسط حلال آلی استخراج گردید. این عمل ۳ مرتبه تکرار و عصاره های اتر دو پترولی حاصل روی هم افزوده شد. سپس فاز مایی مجدداً ۴ مرتبه توسط اتیل استات استخراج شد. فازهای مایی، اتر دوپترولی و اتیل استاتی به کمک TLC روی سیلیکاژل و سیستم هگزان- آستون (۲: ۸) مورد بررسی قرار گرفتند. کروماتوگرام های حاصل نشان دادند که بیشترین تراکم مواد موثره در فاز اتر دو پترولی وجود دارد. بنابراین جهت ادامه بررسی فاز اتر دو پترولی تحت شرایط خلاء و دمای پائین تغلیظ گردید.

Shogaol ها محصولات حاصل از هیدروکسیلاسیون gingerol ها هستند (۳).

ترکیبات رزینی دیگری نیز همانند Zingerone (۲) و Paradol ها (۱۲) از ریزوم جدا شده اند که تصور می شود به ترتیب از تجزیه و دهیدروکسیلاسیون gingerol ها حاصل می گردند.

بخش تجربی

-تجهیزات و مواد مورد مصرف

طیف های UV توسط اسپکتروفتومتر UV 2100 Shimadzu و طیف های IR توسط اسپکتروفتومتر FT-IR BOMEM-Hartmann & Brau MS- Series و طیف های NMR پروتون و کربن توسط دستگاه NMR 200 MHz Spectrospin 200 Bruker تهیه شده است. کلیه حلال ها و مواد مورد استفاده در این تحقیق ساخت کارخانه Merck می باشند. ریزوم زنجبیل مورد بررسی از بازار ایران تهیه شد و مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن با زنجبیل رسمی مورد مقایسه و تأیید قرار گرفت.

کروماتوگرافی ستونی

۸ گرم از باقیمانده فاز اتر دو پترولی بر روی بستر silica gel G60 70-230 Mesh, Merck) سیلیکاژل درون ستون اضافه شد و توسط گرادیان حلال های اتر دو پترولی- اتیل استات (۱۰:۹۰) \rightarrow (۷/۵:۹۲/۵) و اتر دو پترولی- اتیل استات- کلروفرم (۵:۴۰:۵۵) \rightarrow (۵:۱۵:۸۰) کروماتوگرافی شد و بدین ترتیب ۲۱۷ فراکسیون هر یک به حجم ۱۰ میلی لیتر حاصل شد. فراکسیون های فوق به کمک TLC بر روی سیلیکاژل و سیستم های حلال مختلف در حضور معرف وانیلین سولفوریک اسید ۱ درصد (۱۲) بررسی و در مجموع ۷ فراکسیون عمده از اختلاط نمونه های مشابه حاصل شد. ظهور رنگ سبز در حضور معرف وانیلین سولفوریک اسید ۱ درصد بیانگر وجود gingerol ها و Shogaol ها می باشد. در کروماتوگرام های فراکسیون های ۴ تا ۷ (پلیت سیلیکاژل و سیستم حلال هگزان- استن ۲:۸) دو باند با Rf های ۰/۳۲-۰/۳۰ و ۰/۶۰-۰/۵۵ به رنگ سبز مشاهده گردیدند که به ترتیب مربوط به gingerol ها و Shogaol ها بودند. در تمامی فراکسیون ها میزان Shogaol ها نسبت به gingerol ها بسیار اندک بود.

جداسازی و خالص سازی gingerol ها

روش TLC پره پاراتیو (سیلیکاژل GF₂₅₄ و فاز متحرک تولوئن- اتیل استات (۴۵:۱۰۵) (۱۹) جهت خالص سازی gingerol ها بکار برده شد. باند مربوط به gingerol ها پس از ۲ بار پیشروی بوسیله سیستم مذکور به ۳ باند (۰/۵۶-۰/۵۲ و ۰/۲۵) (Rf) تبدیل شد. باند پائینی که عمده ترین ماده را تشکیل می داد مجزا بوده و دو باند فوقانی به صورت دمبلی مشاهده گردیدند. مقایسه Rf این ترکیبات با مقادیر

گزارش شده آشکار ساخت که لکه های جدا شده به ترتیب از پائین به بالا مربوط به gingerol [6]-, gingerol [8], gingerol [10] میباشند.

باند مربوط به gingerol [6]- به طور مجزا و باند مربوط به مخلوط gingerol [8]-, و gingerol [10]- به صورت توام تراشیده شده و توسط حلال آستون از سیلیکاژل استخراج گردید. کوشش های بعدی جهت جداسازی gingerol [8]-, و gingerol [10]- به کمک روش های رایج به نتیجه ای نیاانجامید (به دشواری جداسازی این دو ترکیب در غالب رفرانس ها اشاره شده و معمولا مخلوط این دو ماده مورد بررسی قرار گرفته است). در نهایت، آستون این عصاره ها تبخیر و باقیمانده های آنها در یخچال نگهداری گردیدند.

ترسیم طیف های ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR, UV

حدودا ۱ تا ۲ میلی گرم از باقیمانده هر یک از دو باند جدا شده در ۱ تانول حل و طیف UV آنها ترسیم گردید. طیف IR دو باند مذکور بصورت مجزا با حل کردن آنها در ۰/۵ میلی لیتر کلروفرم و چکاندن چند قطره بر سطح KBr و سپس تبخیر حلال و نتیجتا تشکیل لایه نازکی از ماده بر سطح سل ترسیم گردید. طیف ¹³C-NMR, ¹H-NMR باند خالص با (Rf = ۰/۲۵) در حلال کلروفرم دو تهره (CDCl₃) ترسیم گردید.

تعیین مقدار gingerol ها

برای تعیین مقدار gingerol [6]- و نیز مخلوط دو ترکیب gingerol [8]- و gingerol [10]- ابتدا منحنی کالیبراسیون هر یک از دو باند جدا شده به صورت مجزا ترسیم شد. بدین منظور سه غلظت مختلف از هر نمونه تهیه و جذب آنها در طول موج ۲۸۲ نانومتر

طیف UV (اتانول)

۲۲۸ و ۲۸۲ (nm)

طیف IR (KBr)

۱۲۷۰، ۱۵۱۶، ۱۶۰۲، ۱۷۰۷، ۲۸۵۶، ۲۹۲۸

۱۰۳۳، $558(\text{Cm}^{-1})$ طیف $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)یک توده چند شاخه در $\delta = 6/70 - 6/95$ ppm

معادل سه پروتون

یک پیک پهن در $\delta = 5/41$ ppm معادل یک

پروتون

یک پیک در $\delta = 3/93$ ppm معادل سه پروتونیک توده چند شاخه در $\delta = 2/72 - 2/95$ ppm

معادل چهار پروتون

یک توده پهن و چند شاخه در $\delta = 1/21 - 1/55$ ppm

معادل هشت پروتون

یک پیک سه شاخه در $\delta = 0/94$ ppm معادل سه

پروتون.

طیف $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)

به جدول ۱ مراجعه شود.

تعیین گردید. این عمل برای هر غلظت دو بار دیگر تکرار و میانگین اعداد حاصل محاسبه شد. با توجه به غلظت ها و میانگین جذب های مربوطه، منحنی کالیبراسیون برای هر باند ترسیم گردید.

سپس ۱۰ گرم پودر ریزوم زنجبیل در دستگاه سوکسله توسط حلال آستون عصاره گیری شد.

پس از تبخیر آستون، ۰/۵۵ گرم باقیمانده حاصل توسط حلال آستون حل و به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. ۱۵۰ میکرولیتر از آن به صورت خطی بر روی پلیت سیلیکاژل GF₂₅₄ پره پاراتیولکته گذاری گردید. پلیت حاصله، در سیستم حلال اتر دو پترول- اتیل استات (۷:۳) کروماتوگرافی گردید و باند مربوط به gingerol [6] به طور مجزا و باند مربوط به مخلوط [10]-gingerol و [8]-gingerol به صورت توام تراشیده و بوسیله اتانول از سیلیکاژل استخراج شد. عصاره های اتانولی به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب آنها در طول موج ۲۸۲ نانومتر تعیین گردید و نهایتاً با استفاده از منحنی های استاندارد مربوطه اقدام به تعیین مقدار [6]-gingerol و مخلوط [10]-gingerol و [8]-gingerol گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی طیف های ترسیم شده برای لکه با R_f معادل ۰/۲۷ - ۰/۲۵ در سیستم حلال اتر دو پترول- اتیل استات (۷:۳)، بشرح زیر میباشد.

جدول ۱-: جابجایی شیمیایی کربن های [6]-gingerol در حلال CDCl_3

کربن	δ ppm	کربن	δ Ppm	کربن	δ ppm	کربن	δ Ppm
۱	۳۶/۸۴	۶	۲۹/۷۰	۱'	۱۳۲/۹۰	۳'- OCH ₃	۵۶/۲۹
۲	۴۵/۸۵	۷	۲۵/۵۴	۲'	۱۱۱/۳۹		
۳	۲۱۱/۴۲	۸	۳۲/۱۴	۳'	۱۴۴/۴۰		
۴	۴۹/۷۷	۹	۳۳/۰۰	۴'	۱۴۷/۳۰		
۵	۶۸/۰۸	۱۰	۱۴/۴۳	۵'	۱۱۴/۷۹		
				۶'	۱۲۱/۱۵		

بحث و نتیجه گیری

در طیف UV دو پیک در طول موج های ۲۸۲ نانومتر و ۲۲۸ نانومتر مشاهده می شود که با طیف [6]-gingerol [6] مطابقت کامل دارد.

در طیف IR باند های جذبی موجود در اعداد موجی ۲۹۲۸، ۲۸۵۶، ۱۷۰۷، ۱۶۰۲، ۱۵۱۶، ۱۲۷۰ و ۱۰۳۳ و پیک های ناحیه ۱۰۳۳ - ۵۵۸ عدد موجی به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی حلقه آروماتیک، ارتعاشات کششی زنجیره هیدروکربنی و گروه کربونیل، ارتعاشات خمشی گروه استری، ارتعاشات خمشی زنجیره هیدروکربنی و ارتعاشات خمشی حلقه آروماتیک می باشد. همچنین الگوی موجود در حد فاصل ناحیه ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ عدد موجی، نشانگر ۳ استخلافی بودن حلقه آروماتیک می باشد.

در طیف $^1\text{H-NMR}$ ، یک پیک چند شاخه در ppm $\delta = (6/70 - 6/95)$ مشاهده میشود که معادل سه پروتون است و مربوط به پروتونهای حلقه آروماتیک میباشد. یک پیک پهن به ارزش یک لذا با توجه به نتایج حاصل از طیف های $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و IR، یافته های حاصل از بررسیهای کروماتوگرافیک، ساختمان شیمیایی [6]-gingerol برای این ماده اثبات می گردد. طیف های IR و UV مربوط به لکه با RF معادل با ۵۶/۰ - ۵۲/۰ در سیستم حلال اتر دو پترو- اتیل استات (۳:۷) نیز دقیقاً شبیه به ترکیب [6]-gingerol بوده و به دلیل عدم خالص سازی دو ترکیب موجود در این باند از ترسیم طیف های NMR آن صرف نظر شد. با توجه به اطلاعات موجود، میزان Rf و شکل لکه کاملاً محرز گردید که این باند مخلوط دو ترکیب [8]-gingerol و [10]-gingerol می باشند.

پروتون در ppm $\delta = 5/41$ مشاهده میشود که مربوط به پروتون گروه هیدروکسیل الکلی می باشد. در ناحیه ppm $\delta = 3/93$ پیک شارپ با انتگراسیون سه پروتون مربوط به گروه متوکسی است. در ناحیه ppm $\delta = (2/72 - 2/95)$ توده چند شاخه معادل ۴ پروتون مربوط به پروتونهای گروه CH₂-CH₂ حد فاصل بین گروه کربونیل و حلقه آروماتیک می باشد. یک توده پهن و چند شاخه معادل ۸ پروتون در ناحیه ppm $\delta = (1/21 - 1/55)$ مشاهده میشود که مربوط به زنجیره هیدروکربنی حد فاصل گروه متیل و کربن β- هیدروکسی می باشد و در نهایت پیک سه شاخه واقع در ppm $\delta = 0/94$ به ارزش سه پروتون مربوط به گروه متیل است.

نتایج حاصل از طیف $^{13}\text{C-NMR}$ این ترکیب در جدول ۱- نشان داده شده است. جابجایی شیمیایی مربوط به کربن های این ماده با مقادیر گزارش شده برای [6]-gingerol [6] مطابقت دارد (۲۰ و ۱۰).

نتایج حاصل از تعیین مقدار gingerol های ریزوم زنجبیل تأییدی بر اوفیسینال بودن ریزوم بکار برده شده است (۲۱). میزان تام gingerol ها ۱۱/۰۴ درصد و همچنین میزان [6]-gingerol و مخلوط [10]-gingerol و [8] به ترتیب ۴/۶۱ و ۶/۴۳ درصد تعیین گردیدند. قطعاً در صورت استفاده از ریزوم پوست دار ماده موثره بیشتری حاصل می گردد. با توجه به اینکه در اغلب مقالات منتشر شده [6]-gingerol به عنوان ماده موثره ریزوم زنجبیل معرفی شده است لذا می توان از این روش جهت استاندارد نمودن عصاره ها و کنترل فرآورده های داروئی تولید شده از ریزوم زنجبیل استفاده نمود.

References:

- 1- Bown D. The RHS Encyclopedia of Herbs and Their Uses, Dorling Kindersley Limited, London, 1996, 223, 373.
- 2- Awang D.V. Ginger, Can. Pharm.J., 1992, 125, 309-311.
- 3- Xiaorui Z. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, World Health Organization, Geneva, 1999, 277-286.
- 4- Morwrey D.B., Clayson D.E. Motion Sickness, Ginger and Psychophysics, The Lancet, 1982, 20, 655-657.
- 5- Yamahara J., Rong H.Q., Naitoh Y., Kiani T., Fujimura H. Inhibition of cytotoxic drug -induced vomiting in suncus by a ginger constituent, J. Ethnopharmacol., 1989, 27: 353-355.
- 6- Yamahara J., Mochizuki M., Rong H.Q., Matsuda H., Fujimura H. The Anti-ulcer effect in rats of ginger constituents, J. Ethnopharmacol., 1988, 23: 299-304.
- 7- Denyer C.V., Jackson P., Loakes D.M., Ellis M.R., Young D.A. Isolation of antirhinoviral sesquiterpenes from ginger, J. Nat. Prod., 1994, 57: 658-662.
- 8- Mascolo N., Jain R., Jain Sc., Capasso F. Ethnopharmacologic investigation of ginger, J. Ethnopharmacol., 1989, 27: 129-140.
- 9- Mustafa T., Srivastava K.C. Ginger (*Zingiber officinale*) in migrain headache, J. Ethnopharmacol., 1990, 29: 267-273.
- 10- Shoji N., Iwasa A., Takemoto T., Ishida Y., Ohizumi Y. Cardiotoxic principles of ginger (*Zingiber officinale*), J. Pharm. Sci., 1982, 71: 1174-75.
- 11- Park K.K., Chun K.S., Lee J.M., Lee S.S., Surh Y.J. Inhibitory effects of [6] - gingerol on phorbol ester induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice, Cancer Lett., 1998, 129: 139-144.
- 12- Connell D.W. The chemistry of the essential oil and oleoresin of ginger, Flavour. Ind., 1970, 1, 677-693.
- 13- He X.G., Bernart M.W., Lian L.Z., Lin L.Z. High-performance liquid chromatography Electrospray Mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger, J. Chromatogr., 1998, 796: 327-334.
- 14- Bailey L.H. The standard cyclopedia of horticulture, Vol. 1, The Macmillan Company, New York, 1961, 21.
- 15- Ody P. The herb society's complete medicinal herbal, Dorling kindersley Book London., 1993, 115.
- 16- Preece W.E. Encyclopedia Britannica, Vol. 10, William Benton, Chicago, 1968, 422.
- 17- Kirtikar K.R., Basu B.D. Indian medicinal plants, Vol. IV, Bishen Singh

Mahendra Pal Singh, New Delhi, 1975, 2435 – 2438.

18- Ohwi J. Flora of Japan, Smithsonian Institution Washington D.C., 1965, 316-7.

19- Farthing J.E., O'neill M.J. Isolation of gingerols from powdered root of ginger by countercurrent chromatography, J. Liq. Chromatogr., 1990, 13: 941-950.

20- Breitmaier E., Voelter W. Carbon-13 NMR Spectroscopy, Third ed., VCH, Weinheim, 1989, 182-325.

21- Narasimhan S., Govindorajan V.S. Evaluation of spices and oleoresin-VI-Pungency of ginger components, gingerols and shogaols and quality, J. Food, Technol., 1978, 13(1),31-36.