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

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

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 (۱:۹v/v) 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 ۱۱/۳، 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.

مقدمه

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 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

در برابر اختلالات و بیماری‌های ناشی از تنش اکسایشی، بیش‌تر موردتوجه قرار گرفته است [۳]. بر اساس شیوه‌های تولید آنتی‌اکسیدان‌ها، این ترکیبات به دو دسته آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی تقسیم‌بندی می‌شوند [۳]. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند بوتیلات‌هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلات‌هیدروکسی آنیزول (BHA)، پروپیل‌گالات (PG)، توکوفرول و تری‌آریل-بوتیل هیدروکینون (TBHQ) رایج‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های مورداستفاده در صنایع غذایی می‌باشند و در رژیم غذایی انسان وجود دارند. گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که این ترکیبات در وقوع شماری از بیماری‌ها ازجمله ایجاد سرطان نقش دارند [۳]؛ به همین دلیل در این سال‌ها ازنقطه‌نظر ایمنی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند [۳].

پلی‌فنول‌ها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند و گروه بزرگی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را تشکیل می‌دهند، که خود شامل لیگنان‌ها، فلاونوییدها، آنتوسیانیدین‌ها، اسیدهای فنولی و استیلبن‌ها می‌باشند [۳]. این ترکیبات باعث محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردند. ازجمله اثرات سودمند این پلی‌فنول‌ها می‌توان به فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد آلرژیک، ضد ترومبیوتیک، ضدویروسی، ضد سرطان، اثر حفاظتی از کبد و اثرات بازکنندگی رگ‌ها اشاره نمود [۳].

لیگنان‌ها مهم‌ترین ترکیب فنولی موجود در گره‌های سوزنی‌برگان می‌باشند [۱، ۴]، که از نظر بیولوژیکی فعال هستند و خواص آنتی‌تومور، آنتی‌ویروس، آنتی‌میکروبی و آنتی‌اکسیدان دارند [۵]؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی لیگنان‌ها به تعداد و محل قرارگیری گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آن‌ها بستگی دارد [۶].

ماتایی‌رزینول (MR)[1] ازجمله لیگنان‌های ماماليان[2] است که می‌تواند باعث کاهش احتمال ابتلا به سرطان سینه و بیماری‌های قلبی و عروقی شود [۲، ۵، ۷]. MR فعالیت سیتوتوکسین قابل‌توجهی را در برابر سلول‌های L۹۲۹ موش نشان داده است [۷]. این لیگنان فعالیت فیتواستروژنیک دارد [۷] و از رونوشت HIV در سلول‌های لمفوسیتی H۹ جلوگیری نموده است [۸، ۹]، همچنین ماتایی‌رزینول فعالیت سیتوتوکسین قابل‌توجهی را با مقدار $IC_{۵۰}$ کمتر از ۱۰۰ng/ml در برابر سلول‌های HL-۶۰ سرطان خون انسان[3] نشان داده است [۹].

به دلیل اثرات سرطان‌زای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و ضرورت جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با آن‌ها، تحقیقاتی بر روی شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و به‌ویژه پلی‌فنول‌ها از بافت گره درختان انجام شده است.

Si و همکاران (۲۰۱۲)، مواد استخراجی شاخه‌های گونه *Pinus banksiana Lambert* را ازنظر فیتوشیمیایی موردبررسی قراردادند و یک لیگنان گلیکوزید جدید با نام ۶- آلفا-فیلیرین شناسایی شد [۱۰].Pisspanen و همکاران (۲۰۰۸)، ترکیبات موجود در مواد استخراجی گره‌های گونه *Picea abies* را با استفاده از آنالیز GC/MS مطالعه کردند و لیگنان‌های ایزوهیدروکسی ماتایی‌رزینول، ماتایی‌رزینول، هیدروکسی ماتایی‌رزینول، آلفاکونیدنیدریک‌اسید، آلفاکونیدنیدرین، سکوآی زولاریسیرزینول ولاریسیرزینول شناسایی شد [۱۱]. Holmbom و همکاران (۲۰۰۳)، ترکیبات شیمیایی تعدادی از گره‌های سوزنی‌برگان و پهن‌برگان را موردمطالعه قراردادند؛ نتایج نشان داد که گره‌های سوزنی‌برگان شامل (w/w) ۱۵-۵٪ از ترکیبات پلی‌فنول می‌باشند که لیگنان‌ها ترکیب عمده و اصلی این پلی‌فنول‌ها محسوب می‌شوند. در گونه‌ی *Picea abies*، گره‌ها شامل ۲۴-۶٪ لیگنان می‌باشند که ترکیب ۷- هیدروکسی ماتایی‌رزینول (HMR)، ۸۵-۷۰٪ این لیگنان‌ها را تشکیل می‌دهد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که لیگنان‌ها با اتانول و یا حتی با آب استخراج می‌شوند و با اضافه کردن پتاسیم استات به مواد استخراجی استخراج‌شده با اتانول، HMR موجود در محلول، ته‌نشین می‌شود [۱].

اخیراً تولید فنول‌های زیست‌فعال[4] از گیاهان موردتوجه قرار گرفته است که با توجه به وجود ترکیبات استخراجی فنولی در گره‌ها، استخراج فنول‌های زیست‌فعال از آن‌ها، تولید ترکیبات زیست‌فعال[5] و استفاده از آن‌ها در صنایع دارویی، غذایی و تولیدات آرایشی و بهداشتی، ضرورت پیدا می‌کند تا ترکیبات فنولی و به‌خصوص لیگنان‌ها در مقیاس صنعتی از گره‌ها استخراج شوند و زمینه‌ای برای افزایش نقش تجاری جنگل‌ها و تولیدات جنگلی فراهم گردد. با توجه به

---

1 . Matairesinol
2 . Mamalian lignans
3 . Human leukemic HL-60 cells
4 . Bioactive phenols
5 . Bioactive compound

این‌که گونه سرو سیمین ازجمله 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 مورداستفاده قرار گرفت. همچنین مواد شیمیایی مورداستفاده 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 (v/v ۱:۹) 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 سایلیل‌دار کردن عصاره‌ها با استفاده از واکنشگر BSTFA[1] به همراه پیریدین انجام شد. به این منظور، حدود ۰/۱ گرم از هر یک از عصاره‌ها با ۰/۳ میلی‌لیتر از واکنشگر BSTFA و ۰/۳ میلی‌لیتر پیریدین مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه عمل‌آوری شد. به دلیل پایداری اندک ترکیبات سایلیل‌دار شده، عمل سایلیل‌دار کردن، ۲۴ ساعت قبل از آنالیز با GC/MS انجام گردید. جداسازی و شناسایی اجزاء مواد استخراجی نمونه‌های سایلیل‌دار 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

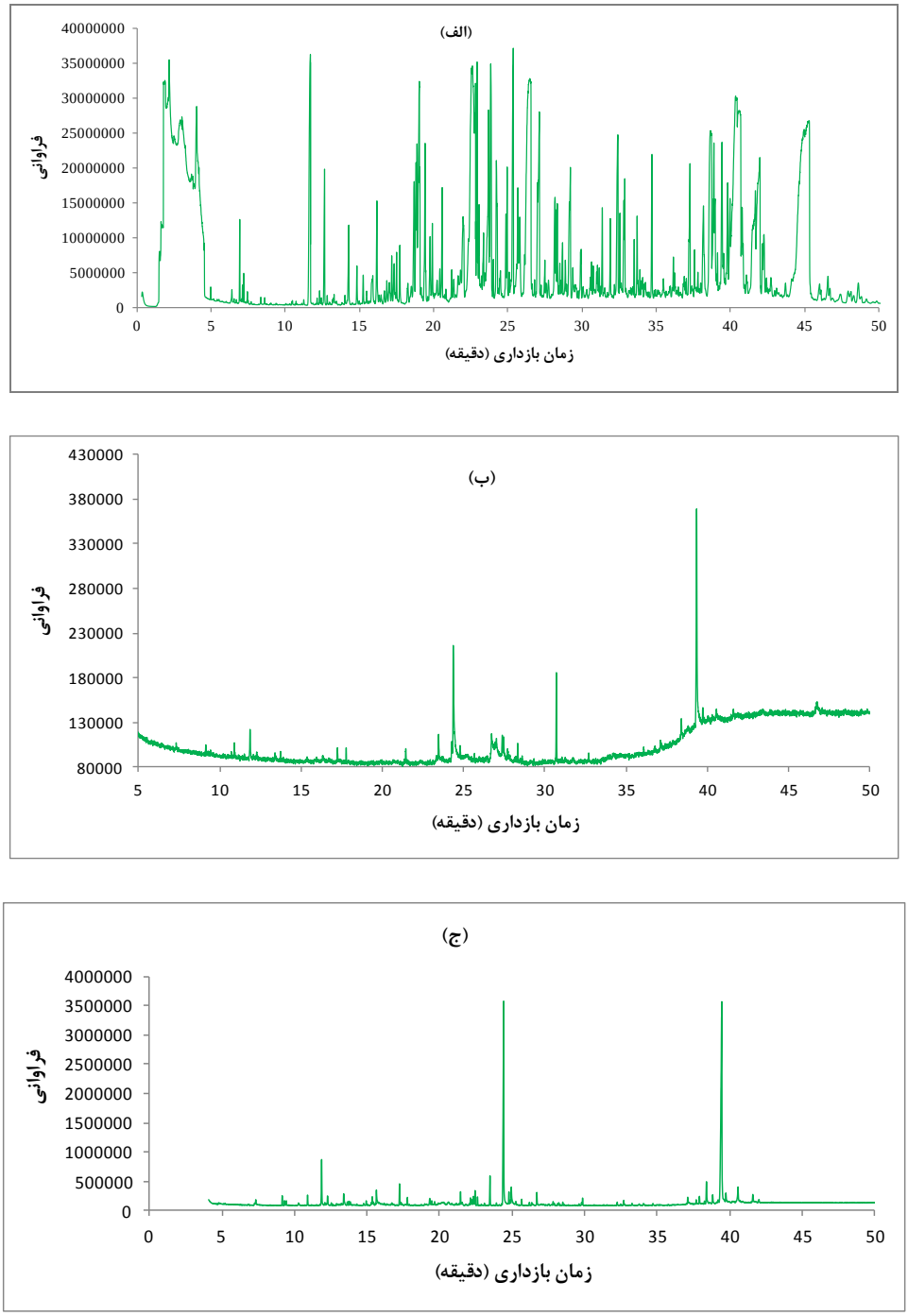
شناسایی ترکیبات عصاره‌ها با کروماتوگرافی گازی (GC)

شکل ۱ نشان می‌دهد که تعداد ترکیبات شناسایی‌شده 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 حاصل‌شده‌اند، 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 ترپنوییدی، 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 ترپنوییدی و لیگنان ماتایی‌رزینول است که این ترکیبات به ترتیب ۲۵/۲۹ و ۴۰/۴۴ درصد از محلول شفاف بعد از سانتریفیوژ را تشکیل می‌دهد. کروماتوگرام‌های GC ارائه‌شده نشان می‌دهند که شدت پیک MR در عصاره‌های

[1] . N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoro acetamide

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

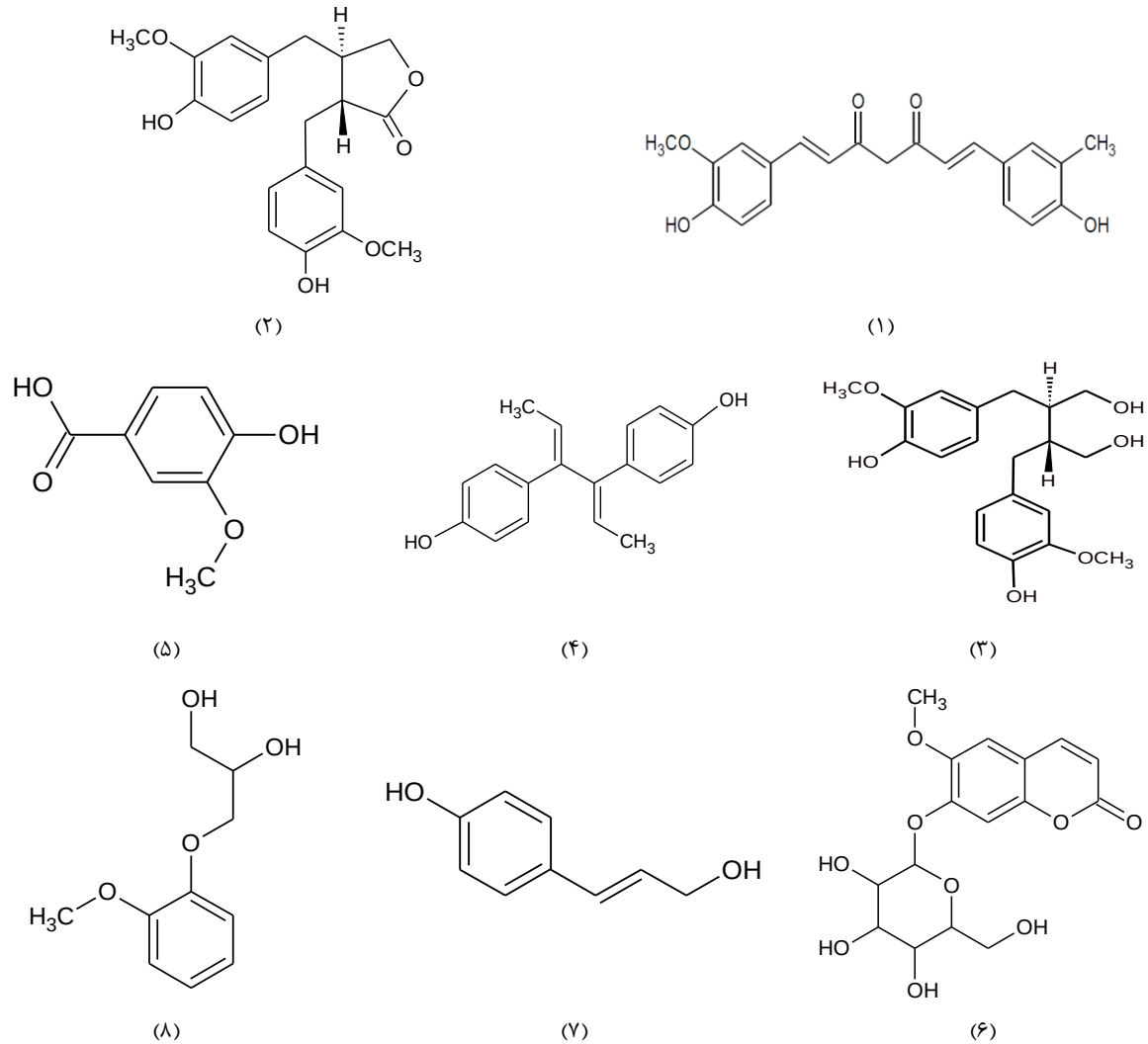
جدول ۱، بازده گروه‌های اصلی ترکیبات شناسایی شده در عصاره اتانولی و عصاره‌های خالص‌سازی شده را نشان می‌دهد. جدول ۱ نشان می‌دهد که لیگنان ماتایی‌رزینول در عصاره اتانولی اولیه و رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ به ترتیب ۱۱/۳، ۳۲/۵۹ و ۴۰/۴۴ درصد از عصاره را به خود اختصاص می‌دهد. این مقادیر نشان می‌دهند که 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.



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 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

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 از رسوب و محلول بعد از سانتریفیوژ را تشکیل می‌دهد. درنتیجه می‌توان بیان کرد که با افزودن پتاسیم استات به عصاره اتانولی حاصل از گره گونه 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.

مراجع

[1] Holmbom, B., Echerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjoholm, 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 Sjoholm, 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 systhesis, production and applications, cirillo, G., and Iemma, F Ed., Scrivener publication, Calabria, Italy. 1-23.

[4] Neacus, M., Eklund, P. C., Sjoholm, 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 werkst, 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, NewYork: 585-620.

[8] Kim, C. Y., Ahn, M. J. and Kim. J., 2006. Apreparative isolation and purification of arctigenin and matairesinal 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 Carboxyrylation 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. Anew lignan glycoside and phenolics from the branch wood of *pinus banksiana* Lambert. Holzforschung, 67 (4): 357-363.

[11] Piispanen, R., willfor, S., saranpaa, P. and Holmbom, B., 2008. Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) Knotwood: within- stem vaviation 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*)

A. Sedaghat[1]
A. Abdulkhani[2]
F. Khodaian Chegini[3]

[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

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).