

استخراج و شناسایی آسارونیک اسید و دو فنیل پروپانویید از قسمت‌های هوایی گیاه *Haussknechtia elymaitica* Boiss.

زهره حبیبی^{۱*}، مهدیه قویدل^۲ و مریم یوسفی^۳

*۱- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم، گروه شیمی، دانشگاه شهید بهشتی، پست الکترونیک: z_habibi@sbu.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

۳- استادیار، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد کشاورزی- ابن‌سینا، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹

چکیده

در این تحقیق، قسمت‌های هوایی گیاه *Haussknechtia elymaitica* Boiss. که بومی ایران بوده و از خانواده چتریان (Umbelliferae) می‌باشد، در فصل گلدهی از اطراف ایلام جمع‌آوری شد و عصاره کلروفرمی آن مورد بررسی قرار گرفت. آسارونیک اسید و دو فنیل پروپانویید به نام‌های ترانس-آسارون و ترانس-متیل ایزواوژنول از عصاره کلروفرمی جداسازی شده و پس از خالص‌سازی با استفاده از طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته مورد شناسایی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: *Umbelliferae*، *Haussknechtia elymaitica* Boiss.، فنیل پروپانویید، آسارونیک اسید.

مقدمه

بریدگی‌های بسیار و معمولاً منتهی به دم‌برگ غلاف‌داری

است که ساقه را در محل اتصال به آن فرا می‌گیرد.

در بین گیاهان تیره چتریان، گونه‌های دارویی فراوانی

وجود دارد که بسیاری از آنها در طب سنتی مورد استفاده

قرار می‌گیرند. برخی از آنها مانند جعفری، شوید، کرفس،

رازیانه، گشنیز، زیره و ... ریشه، برگ و یا میوه آنها مورد

استفاده غذایی دارند. البته در بین گیاهان این تیره انواع سمی

و کشنده هم یافت می‌شود (زرگری، ۱۳۷۶). از بین

جنس‌های مهم تیره چتریان از نظر تعدد نوع می‌توان

Hydrocotyle (۷۸ گونه)، *Sanicula* (۳۰ گونه)، *Buplerum*

(۱۰۰ گونه)، *Pimpinella* (۲۰۰ گونه)، *Peucedanum*

(۲۰۰ گونه) و *Ferula* (۶۰ گونه) را نام برد.

تیره چتریان (Umbelliferae) (Apiaceae)

خانواده چتریان، بسیار وسیع و مشهور است و حدود

۳۰۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه علفی معطر دارد. اگرچه

گونه‌های مربوط به این خانواده در سرتاسر جهان

پراکنده‌اند ولی تمرکز اصلی آنها در مناطق معتدله و

نواحی کوهستانی است. گل‌آذین چتری و برگ‌های اغلب

مرکب از بریدگی‌های باریک و نازک، گیاهان این خانواده

را از سایر گیاهان به خوبی متمایز می‌نماید. این گیاهان

به‌واسطه دارا بودن گل‌آذین چتری، چتریان نامیده می‌شوند

و گیاهانی عموماً علفی، یک یا چندساله و دارای سه ساقه

اغلب راست یا خزنده و معمولاً شیاردار می‌باشند.

برگ‌های آنها متناوب ساده و یا دارای پهنک منقسم به

جنس *Haussknechtia* (کرفس سفید)

نام فارسی این گیاه کرفس سفید می‌باشد و در انگلیسی به آن *johour* می‌گویند. این جنس در ایران یک گونه گیاه دائمی به نام *H. elymaitica* دارد که اغلب در نواحی کوهستانی و جنگل‌های بلوط زاگرس در استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال بختیاری و لرستان می‌روید. این گیاه بومی ایران است و تا به حال در هیچ نقطه دیگر جهان شناخته نشده است (مظفریان، ۱۳۷۵).

طبق بررسی‌های انجام شده در چکیده نامه‌های شیمی هیچگونه بررسی فیتوشیمیایی بر روی عصاره گیاه *H. elymaitica* صورت نگرفته است، از همین رو این تحقیق اولین گزارش از بررسی ترکیب‌های شیمیایی گیاه مذکور می‌باشد.

مواد و روشها**عصاره‌گیری و جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره**

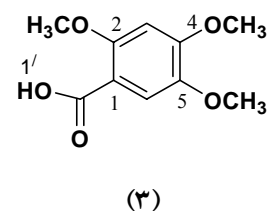
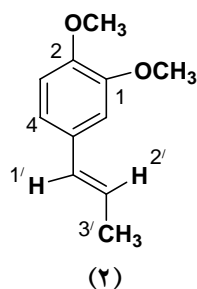
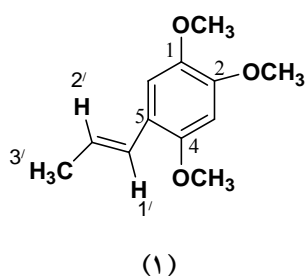
به منظور عصاره‌گیری از گیاه *H. elymaitica*، ۲۶۰ گرم از قسمت‌های هوایی گیاه خرد و عصاره کلروفرمی آن توسط روش سوکسله استخراج گردید (Luque de Castro & Priego-Capotea, 2010).

پس از اتمام مراحل عصاره‌گیری و جهت چربی‌گیری، عصاره بدست آمده در حداقل متانول حل شده و در فریزر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از صاف کردن و تبخیر حلال به وسیله تبخیرکننده چرخان، عصاره باقی مانده به شکل یک عصاره غلیظ سبز

(۶ گرم) بدست آمد و برای جداسازی اجزای آن از کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. ستون توسط سیلیکاژل مرکب ۶۰ (۰/۰۹-۰/۰۶) پر شد و شستشوی ستون توسط حلال کاملاً غیرقطبی *n*-هگزان آغاز گردید، سپس قطبیت حلال شوینده با اتیل استات افزایش یافت. حجم حلال‌هایی که در هر نوبت اضافه می‌گردید ۱۰۰ ml و حجم اجزای جمع‌آوری شده در هر ارلن ۵۰ ml بود. در پایان، ستون با متانول شسته شد تا تمامی اجزای باقی مانده از ستون خارج شود و نهایتاً در ۴۵ ارلن با حجم ۵۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید. از اجزای بدست آمده، کروماتوگرافی با لایه نازک با استفاده از ورقه‌های آلومینیومی پوشیده از سیلیکا تهیه شد. اجزای مشابه به هم اضافه شدند و برای خالص‌سازی بیشتر از کروماتوگرافی ستونی (با ستون‌های کوچکتر) و کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای) استفاده گردید. به منظور شناسایی نمونه‌های خالص شده توسط $^1\text{H NMR}$ و مقایسه داده‌ها با مقادیر گزارش شده در منابع علمی انجام شد.

نتایج

از گیاه *H. elymaitica* دو فنیل پروپانوید به نام‌های ترانس-آسارون (۱) و ترانس-متیل ایزواوژنول (۲) و یک مشتق بنزوئیک اسید (۳) به نام آسارونیک اسید خالص‌سازی شد.



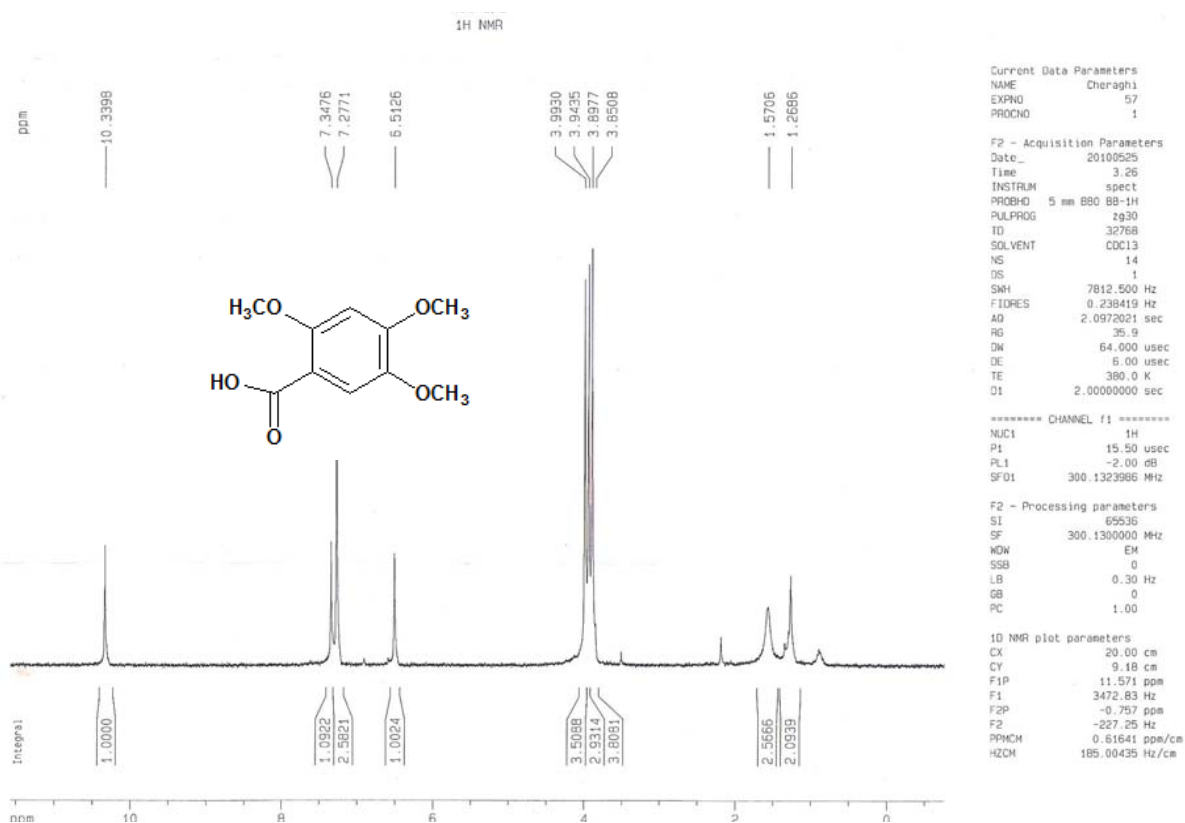
مولکولی ترکیب $C_{11}H_{14}O_2$ و وزن مولکولی آن ۱۷۸/۲۲۷ می‌باشد (Kouznetsov & Arenas, 2009). داده‌های طیفی با داده‌های گزارش شده در منابع علمی مقایسه و ساختار پیشنهادی تأیید گردید (Patra & Mitra, 1981).

ترکیب شماره ۳: آسارونیک‌اسید (Asaronic acid) نام دیگر این ترکیب ۲، ۴، ۵-تری متوکسی‌بنزوئیک اسید است. این ترکیب به صورت کریستال‌های بی‌رنگ سوزنی‌شکل و دارای نقطه ذوب $143^{\circ}C$ می‌باشد و از اجزای ۲۶-۲۳ با شستشو با مخلوط حلال‌های n -هگزان، اتیل‌استات (۱:۱) و به میزان ۲۰ میلی‌گرم جداسازی و شناسایی گردید. این ترکیب دارای فرمول مولکولی $C_{10}H_{12}O_5$ و وزن مولکولی ۲۱۲/۲۰ می‌باشد. داده‌های طیفی با داده‌های گزارش شده در منابع علمی مقایسه و ساختار پیشنهادی تأیید گردید (Ranaweera & Dayananda., 1996).

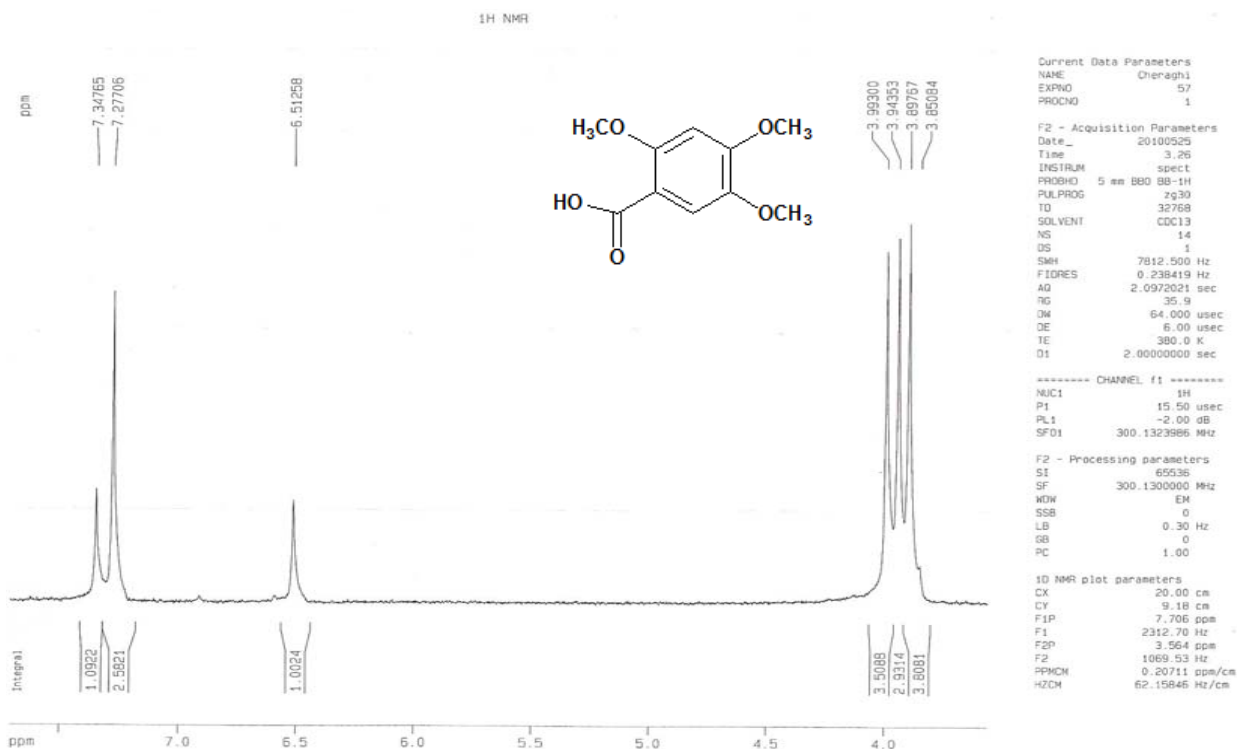
ترکیب شماره ۱: ترانس آسارون (*Trans-Asarone*) نام‌های دیگر این ترکیب آلفا-آسارون و یا ترانس-۱، ۲، ۴-تری‌متوکسی-۵ (۱-پروپنیل) بنزن می‌باشد. این ترکیب به صورت کریستال‌های بی‌رنگ سوزنی‌شکل و دارای نقطه ذوب $61^{\circ}C$ می‌باشد و از اجزای جدا شده ۸-۱۲ در قطبیت حلال n -هگزان: اتیل‌استات ۴:۱ و به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم جداسازی گردید. فرمول مولکولی این ترکیب $C_{12}H_{16}O_3$ و وزن مولکولی آن ۲۰۸/۲۵ می‌باشد. داده‌های طیفی با داده‌های گزارش شده در منابع علمی مقایسه و ساختار پیشنهادی تأیید گردید (Patra & Mitra, 1981; Xu et al., 2009).

ترکیب شماره ۲: ترانس- متیل ایزوژنول (*Trans-Methyl isoeugenol*)

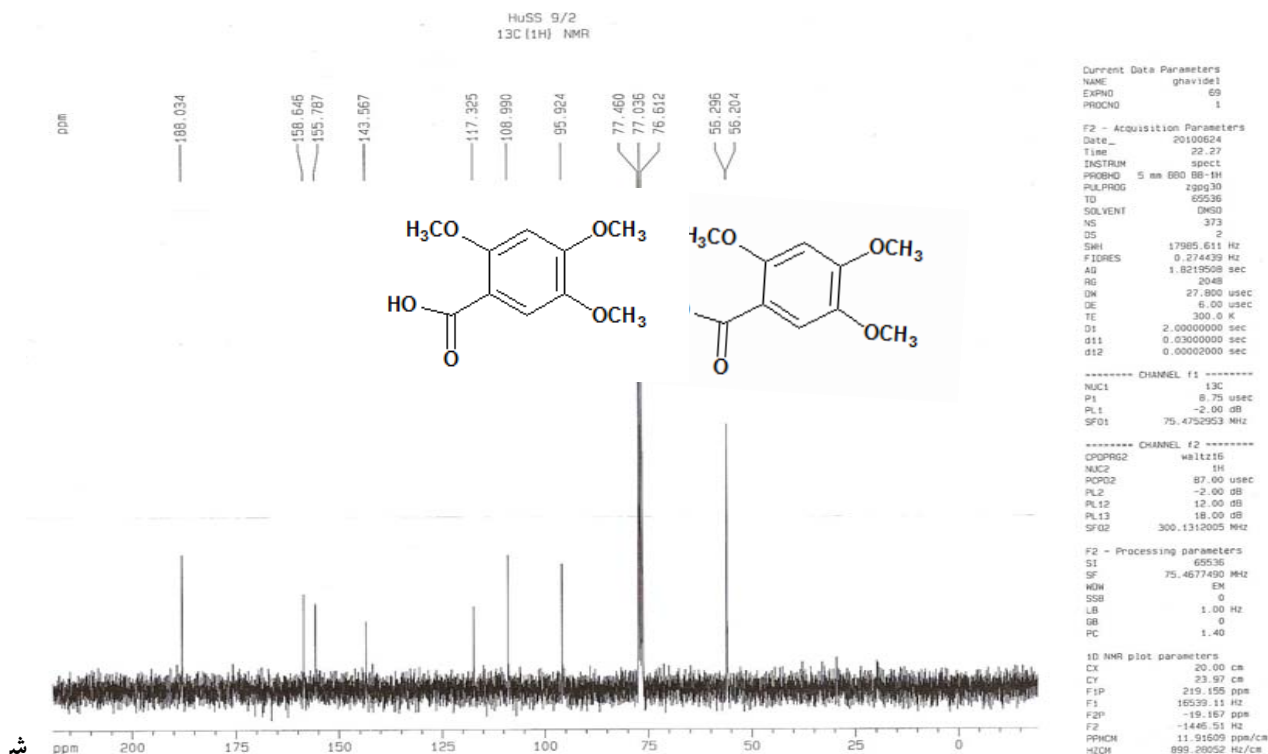
نام دیگر این ترکیب ترانس- ۱، ۲-دی‌متوکسی-۴- (۱-پروپنیل) بنزن است و از اجزای ۲۳-۱۶ جدا شده و با شستشوی مخلوط حلال‌های n -هگزان، اتیل‌استات (۲:۱) به صورت روغنی با رنگ متمایل به زرد و به میزان ۳۰ میلی‌گرم جداسازی و شناسایی گردید. فرمول



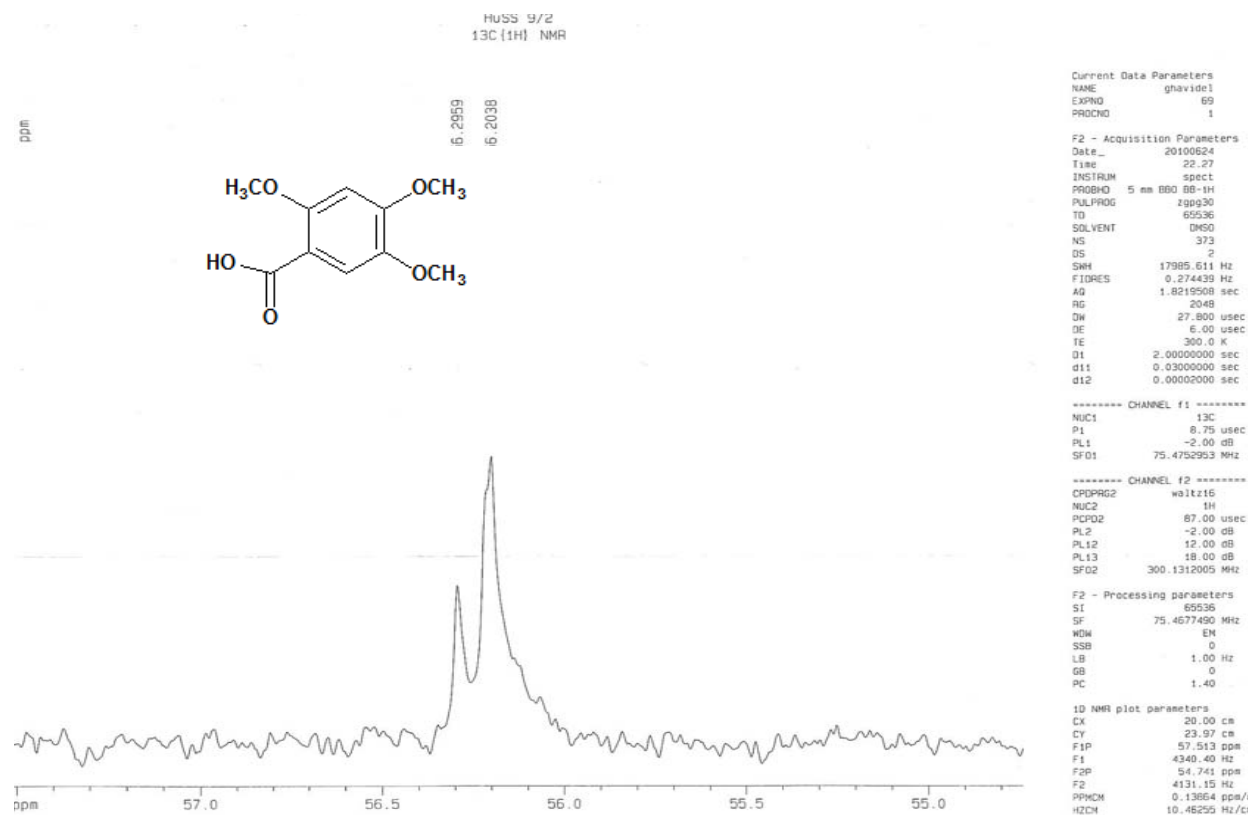
شکل ۱- طیف ¹H NMR ترکیب آسارونیک اسید



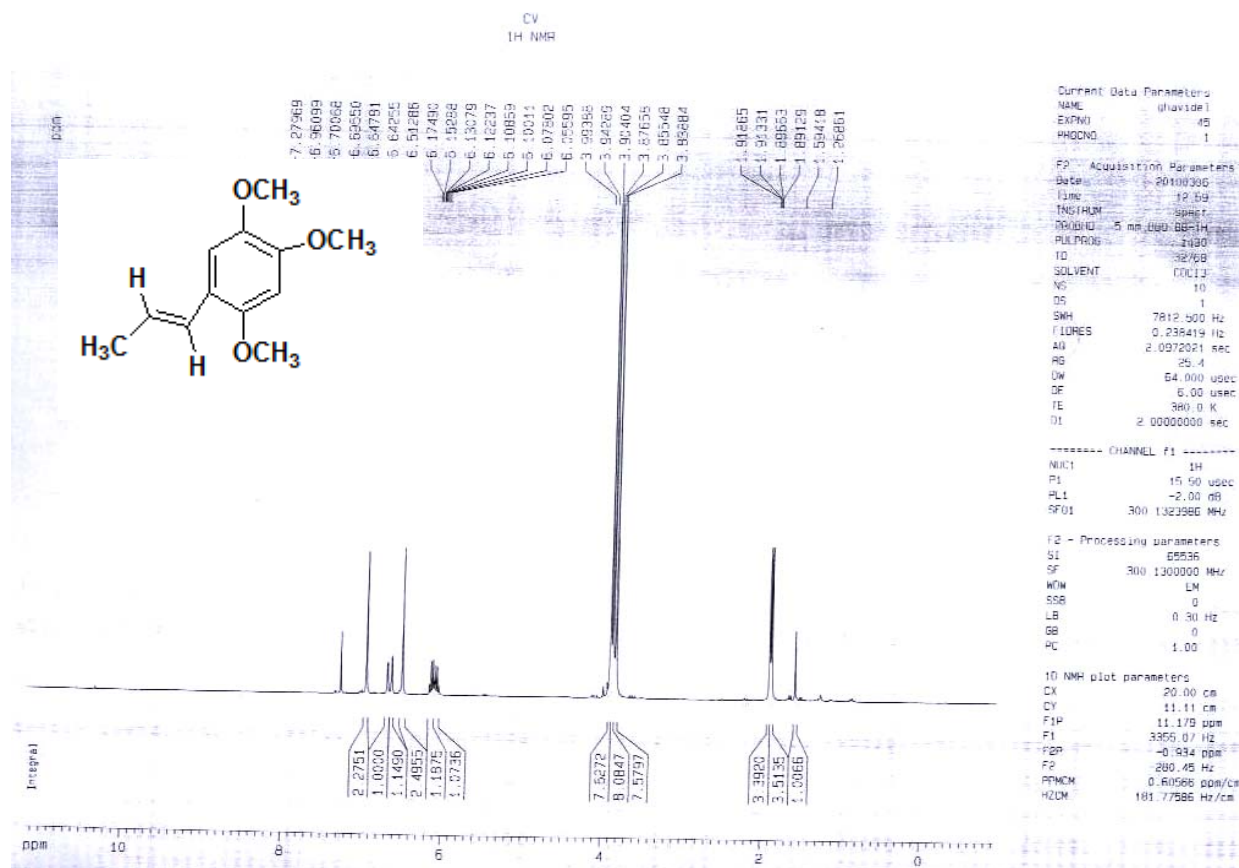
شکل ۲- طیف گسترده ¹H NMR ترکیب آسارونیک اسید



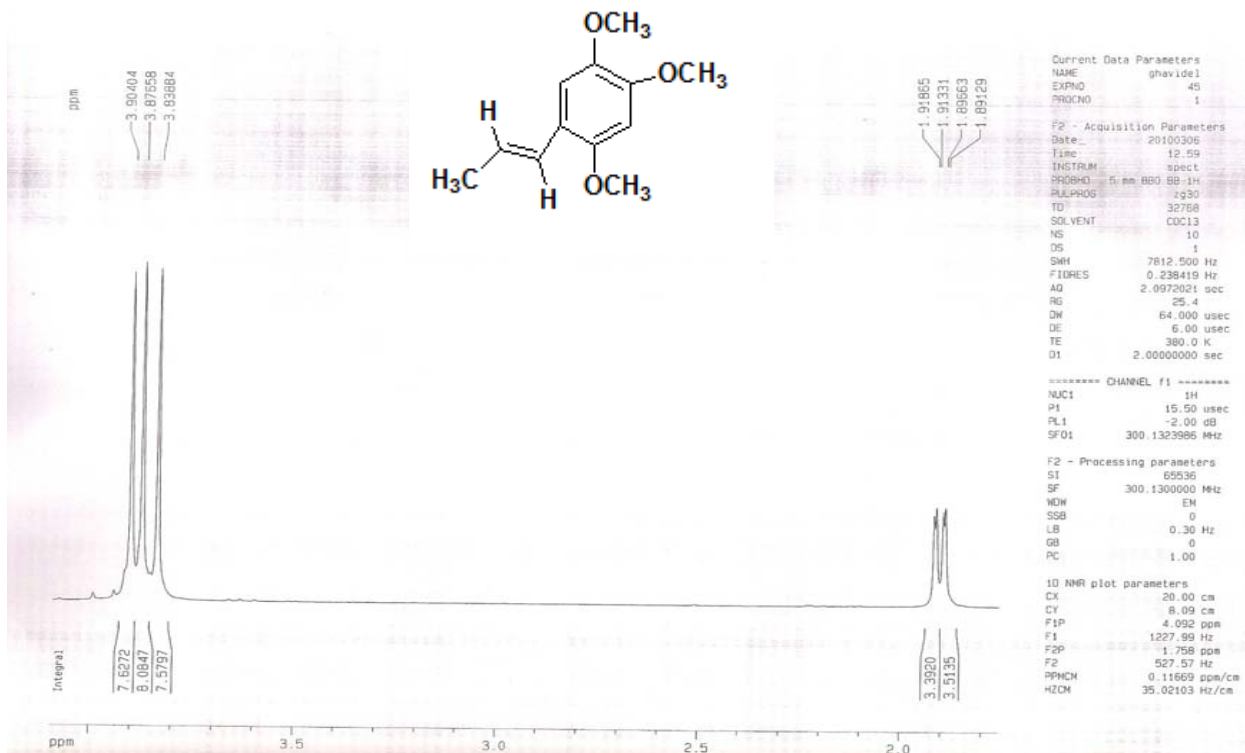
کل ۳- طیف ^{13}C NMR ترکیب آسارونیک اسید



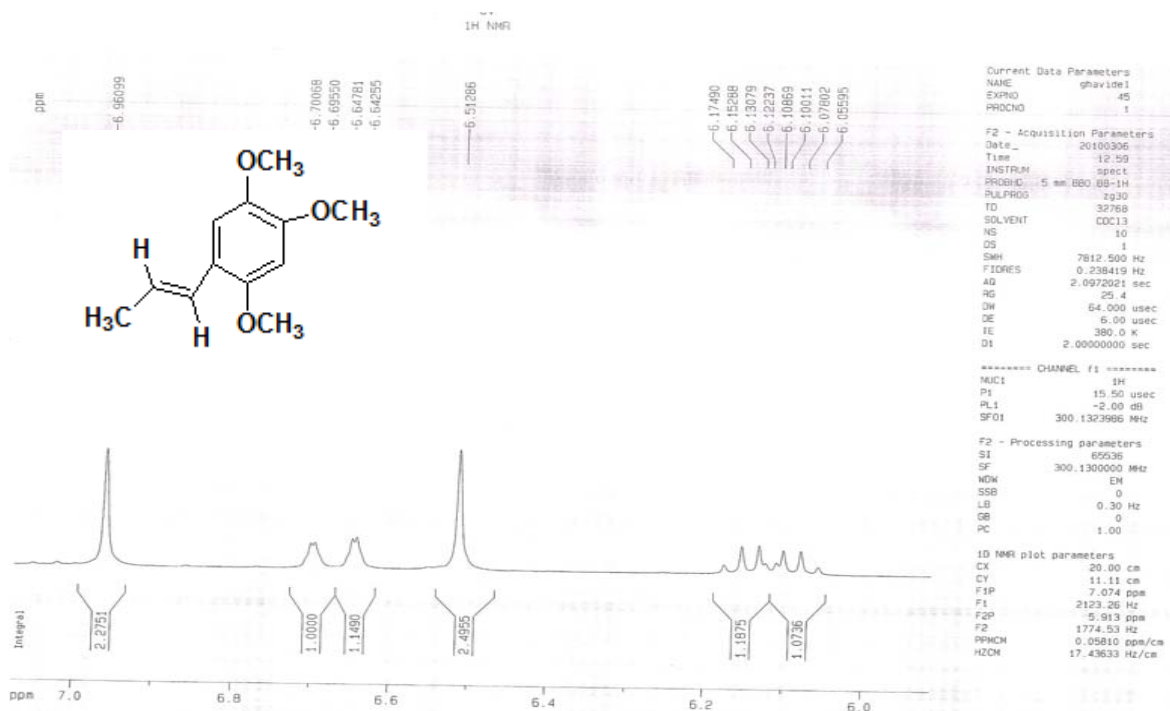
شکل ۴- طیف گسترده ^{13}C NMR ترکیب آسارونیک اسید



شکل ۵- طیف ¹H NMR ترکیب ترانس- آسارون



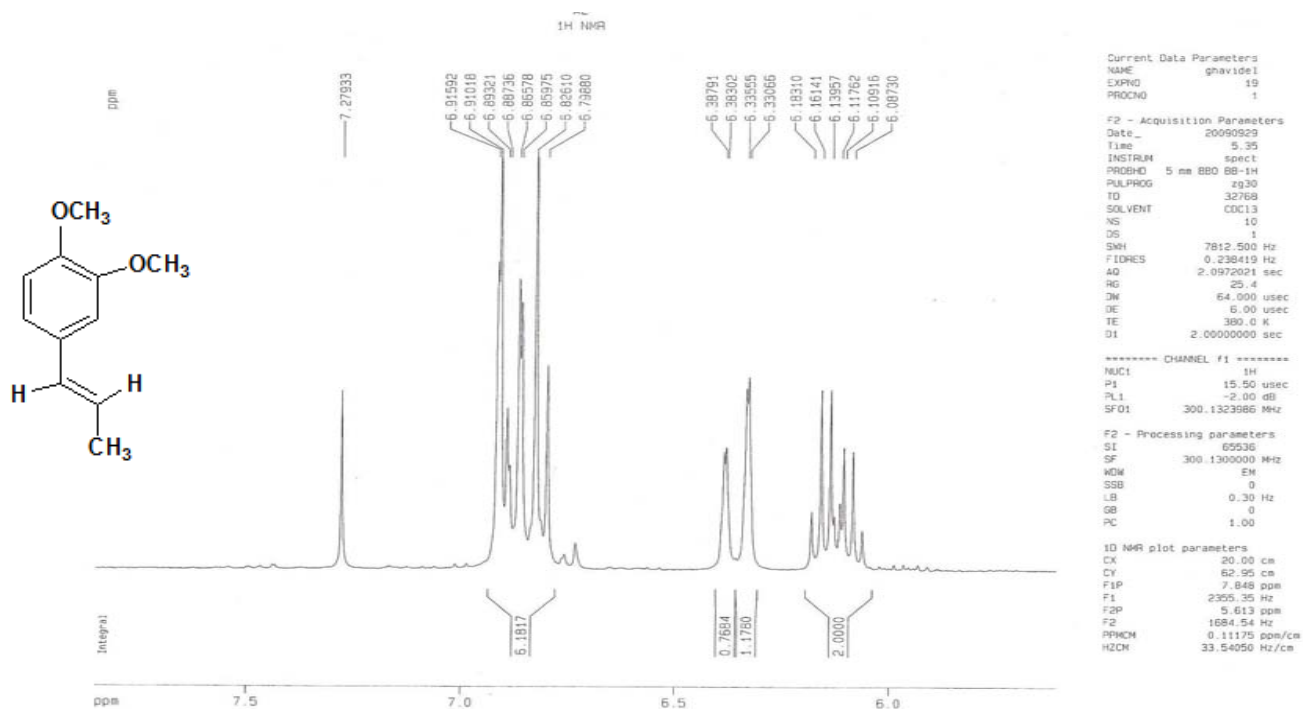
شکل ۶- طیف گسترده ¹H NMR ترکیب ترانس- آسارون



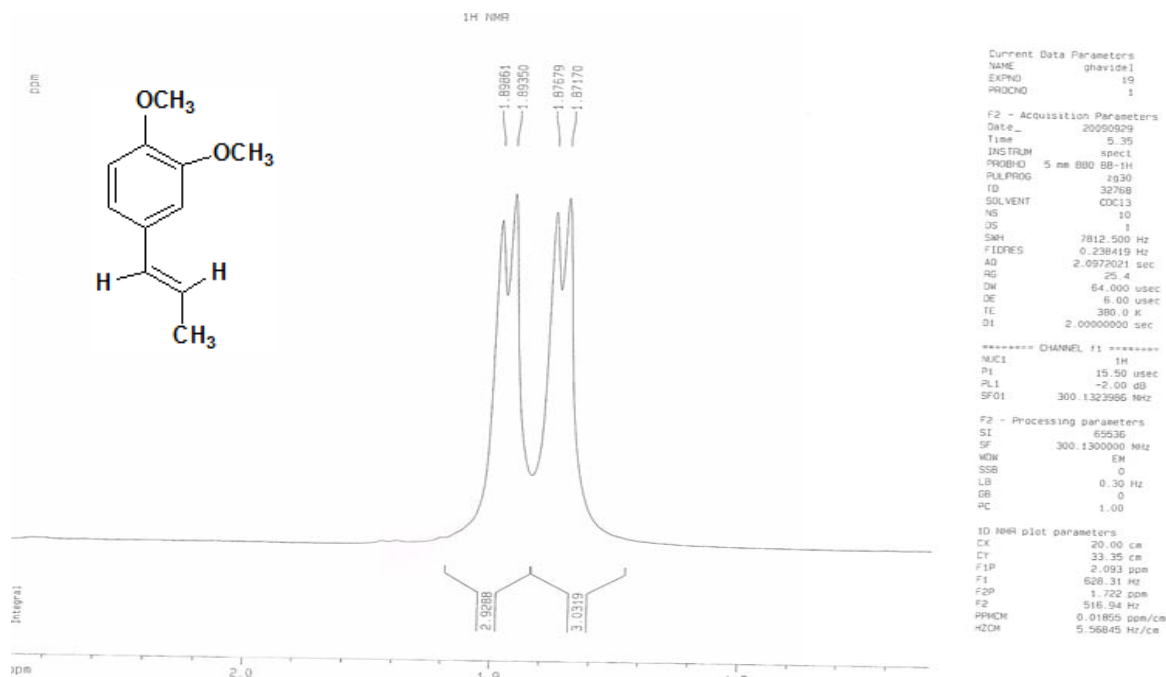
شکل ۷- طیف گسترده ^1H NMR ترکیب ترانس-آسارون



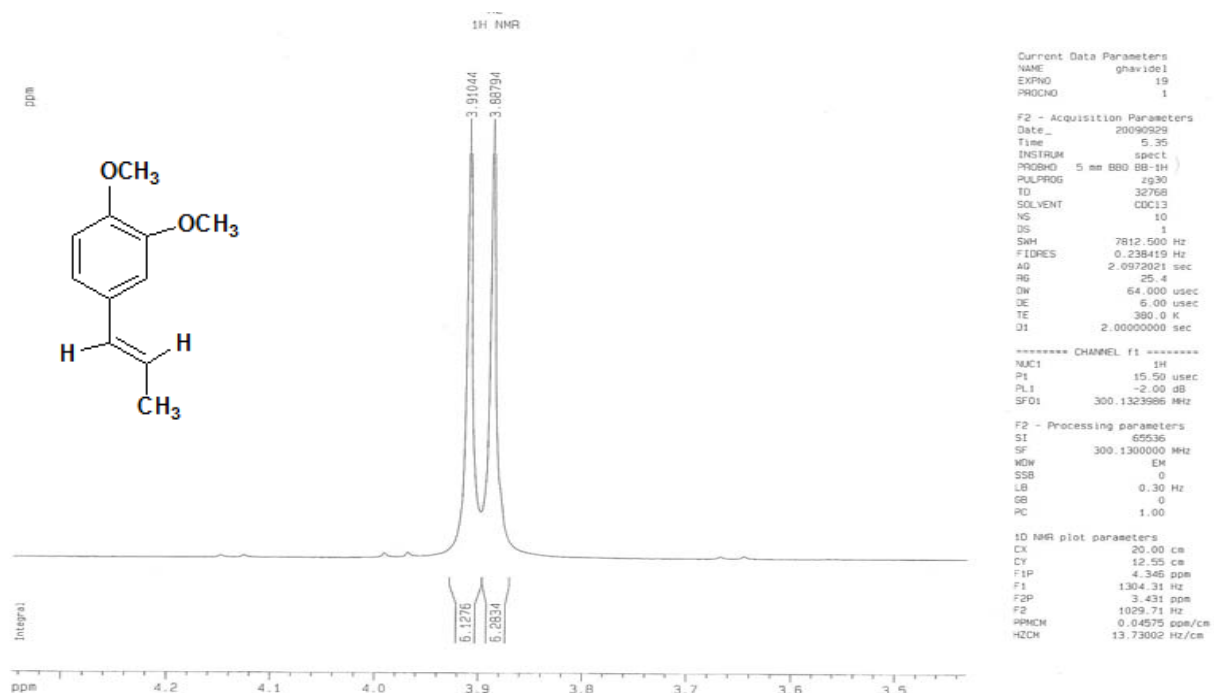
شکل ۸- طیف ^1H NMR ترکیب ترانس-متیل ایزوآسارونول



شکل ۹- طیف گسترده ¹H NMR ترکیب ترانس- متیل ایزواوژنول



شکل ۱۰- طیف گسترده ¹H NMR ترکیب ترانس- متیل ایزواوژنول



شکل ۱۱- طیف گسترده ^1H NMR ترکیب ترانس-متیل ایزواونول

بحث

ترانس- آسارون دارای فعالیت ضدصرع بوده و حملات صرع را به طور قابل توجهی کاهش می دهد (Miao *et al.*, 2008) و سنگ های صفراوی را که در کیسه صفرا یا مجرای صفراوی تشکیل می شوند، از بین می برد (Chamorro *et al.*, 1993). مطالعات نشان داده که ترانس- آسارون دارای فعالیت زیستی بوده و یک کاهنده کلسترول قوی می باشد که با افزایش کلسترول خوب و کاهش کلسترول بد، چربی خون را کاهش می دهد (Karwicka *et al.*, 2008).

همچنین نتایج آزمایش های انجام شده بر روی موش های آزمایشگاهی نشان داده که ترانس- آسارون فقط در غلظت های بالا به DNA سلولی آسیب می رساند، که منجر به جهش های ژنتیکی یا سرطان می شود و ایجاد نقایص جنینی می کند و در مقادیر پایین هیچ یک از این پدیده ها مشاهده نگردیده است (Chamorro *et al.*, 1999).

در طیف ^1H NMR ترکیب شماره ۱ (ترانس آسارون) پیام های مربوط به حلقه بنزن به صورت دو پیام یکتایی در ۶/۹۶ و ۶/۵۱ ppm ظاهر شده و به ترتیب مربوط به هیدروژن های H-۶ و H-۳ می باشند. همچنین یک پیام دوتایی- چهارتایی در ۶/۷۷ ppm مربوط به H-۱' مشاهده می شود که با H-۲' به صورت ترانس با ثابت شکافتگی ۱۵/۸ Hz و با متیل اولفینی با ثابت شکافتگی ۱/۵ Hz جفت شده است. پیام دوتایی- چهارتایی در ۶/۱۱ ppm با ثابت های شکافتگی ۱۵/۸ Hz و ۶/۶ مربوط به H-۲' است که با H-۱' و متیل اولفینی جفت شده است. سه پیام یکتایی در ۳/۸۴، ۳/۸۸ و ۳/۹۰ مربوط به سه گروه متوکسی هستند و پیام دوتایی- دوتایی نیز در ۱/۹۰ ppm با ثابت شکافتگی ۱/۵ Hz و ۶/۶ نیز مربوط به گروه متیل اولفینی است که با H-۱' و H-۲' جفت شده است.

ترانس- متیل ایزواوژنول با غلظت در حدود ۱۰۰-۵ ppm به عنوان یک چاشنی یا طعم‌دهنده در مخلوط چاشنی‌ها و تهیه شکلات استفاده می‌شود (Moshonas & Shaw, 1978) و همچنین به عنوان دافع آفات کشاورزی به ویژه لارو نیز بکار می‌رود (Ranaweera & Dayananda, 1996).

در طیف $^1\text{H NMR}$ ترکیب شماره ۳ شش نوع هیدروژن وجود دارد که پیام یکتایی در میدان پایین در ۱۰/۳۴ ppm، مربوط به هیدروژن اسیدی است. پیام‌های مربوط به دو هیدروژن حلقه بنزن در ۷/۳۵ و ۶/۵۱ ppm ظاهر شده‌اند و به ترتیب مربوط به هیدروژن‌های H-۳ و H-۶ می‌باشد که H-۳ به دلیل وجود اثردهندگی گروه متوکسی از طریق رزونانس از دو طرف، پوشیده‌تر از هیدروژن دیگر است. سه پیام دیگر مربوط به سه گروه متوکسی هستند که در میدان بالا و در ۳/۹۰ ppm، ۳/۹۴ و ۳/۹۹ دیده می‌شود.

آسارونیک اسید به عنوان یک حدواسط در سنتز حشره‌کش‌ها، در تهیه مواد رنگی، مواد آرایشی و همچنین در داروسازی و سنتزهای آلی نیز استفاده می‌شود. به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان گفت: از عصاره کلروفومی گیاه *H. elymaitica* یک مشتق بنزوئیک اسید شناخته شده به نام آسارونیک اسید و دو فنیل پروپانوئید شناخته شده به نام‌های ترانس- متیل ایزواوژنول و ترانس آسارون بدست آمد که در این میان دو ترکیب آخر درصد بالایی از عصاره را تشکیل می‌دادند. از آنجا که ترانس- آسارون دارای خواص بیولوژیکی فراوانی می‌باشد و این گیاه نیز بومی ایران است، تا به حال در هیچ نقطه دیگر از جهان شناخته نشده است، پس می‌توان این گیاه را به عنوان منبع خوبی از این دو ماده گزارش نمود. در ضمن با توجه

(Chamorro et al., 1993؛ Salazar et al., 1992). علاوه بر این آسارون و گیاهان حاوی آن برای سایر مقاصد درمانی، مانند استفاده از آن به عنوان مسکن، آرام‌بخش، ضداسپاسم، ضدزخم معده، ضدسرطان، مقوی معده و اشتها آور نیز بررسی شده‌اند (Chamorro et al., 1993؛ Weiss, Hu & Ji, 1986؛ Poplawski et al., 2000؛ Chen, 1967؛ Belova et al., 1985؛ 1988).

علاوه بر اثرات ذکر شده، ترانس- آسارون یک ماده سمی برای پشه‌ها و کرم‌های گرد بوده و روند تغذیه طبیعی را در آنها مختل می‌نماید (Momin & Nadir, 2002).

در طیف $^1\text{H NMR}$ ترکیب شماره ۲ پیام دوتایی در ۶/۸۶ ppm با ثابت شکافتگی ۱/۷ Hz مربوط به H-۶ است که با H-۴ به صورت متا جفت شده است. پیام دوتایی- دوتایی در ۶/۹۰ ppm با ثابت‌های شکافتگی ۱/۷ Hz و ۷/۵ نیز مربوط به H-۴ است که با H-۳، H-۶ به صورت اورتو و متا جفت شده است. همچنین پیام دوتایی در ۶/۸۱ ppm با ثابت شکافتگی ۷/۵ Hz مربوط به H-۳ است که با H-۴ به صورت اورتو جفت شده است. پیام دوتایی- چهارتایی در ۶/۳۶ ppm مربوط به H-۱ می‌باشد که با H-۲ به صورت ترانس با ثابت شکافتگی ۱۵/۷ Hz و با متیل اولفینی با ثابت شکافتگی ۱/۵ Hz جفت گردیده است. پیام دوتایی- چهارتایی دیگر که در ۶/۱۳ ppm ظاهر شده است، ثابت‌های شکافتگی ۱۵/۷ Hz و ۶/۵ دارد و مربوط به H-۲ است که با H-۱ و متیل اولفینی جفت شده است. پیام‌های یکتایی که در ۳/۸۹ ppm و ۳/۹۱ مشاهده می‌شوند مربوط به پروتون‌های گروه‌های متوکسی هستند و پیام دوتایی- دوتایی در ۱/۸۸ ppm با ثابت‌های شکافتگی ۶/۵ Hz و ۱/۵ نیز مربوط به گروه متیل اولفینی است.

- Kouznetsov, V.V. and Arenas, D.R.M., 2009. First green protocols for the large-scale preparation of γ -diisoeugenol and related dihydro (1H) indenenes via formal [3+2] cycloaddition reactions. *Tetrahedron Letters*, 50(14): 1546-1549.
- Luque de Castro, M.D. and Priego-Capotea, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16): 2383-2389.
- Miao, J.K., Wu, X.M., Chen, Q.X. and Zhang, X.P., 2008. Experimental study on the antiepileptic properties of alpha-asarone in different epilepsy models. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 24: 1660-1662.
- Momin, R.A. and Nadir, M.G., 2002. Pest-managing efficacy of *trans*-asarone isolated from *Daucus carota* L. seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16): 4475-4478.
- Moshonas, M.G. and Shaw, P.E., 1978. Compounds new to essential orange oil from fruit treated with abscission chemicals. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 26(6): 1288-1290.
- Patra. A. and Mitra, A.K., 1981. Constituents of acorus calamus: structure of acoramone. carbon-13 NMR spectra of *cis*- and *trans*-asarone. *Journal of Natural Products*, 44(6): 668-669.
- Poplawski, J., Lozowicka, B., Dubis, A.T., Lachowska, B., Witkowski, S., Siluk, D., Petruszewicz, J., Kaliszan, R., Cybulski, J., Strzałkowska, M. and Chilmonczyk, Z., 2000. Synthesis and hypolipidemic and antiplatelet activities of alpha-asarone in humans (*in vitro*); mice (*in vivo*) and rats. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(20): 3671-3676.
- Ranaweera, S.S. and Dayananda, K.R., 1996. Mosquito-larvicidal activity of ceylon citronella {*Cymbopogon Nardus* (L.) Rendle} oil fractions. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 24(4): 247-252.
- Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., Mendoza, T., Pages, N. and Chamorro, G., 1992. Teratogenic action of alpha-asarone in the mouse. *Journal de Toxicologie Clinique et Experimentale*, 12(3): 149-154.
- Weiss, R.F. 1988. *Herbal Medicine*. AB Arcanum Bucks, UK, 362p.
- Xu, G., Liu, C., Zhang, W. and Zuo, G., 2009. A Practical Synthesis of α -asarone via Iodine-Catalyzed Isomerization of α , β -asarone. *Organic Preparations and Procedures International*, 41(2): 152-155.

به درصد بالای ترانس آسارون در این گیاه، می‌توان در آینده بررسی‌های بیشتری در زمینه تبدیل آن با استفاده از بایو کاتالیزورها در واکنش‌های زیست تبدیل و تهیه مشتقات آن انجام داد.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی بدلیل حمایت مالی پروژه و جناب آقای دکتر ولی‌الله مظفریان که جمع‌آوری و شناسایی گیاه را بر عهده داشتند.

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳۷۶. گیاهان دارویی (جلد چهارم). انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۶۹ صفحه.
- مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایرانی. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۵۹۶ صفحه.
- Belova, L.F., Alibekov, S.D., Baginskaia, A.I., Sokolov, S.Ia. and Pokrovskaiia, G.V., 1985. Asarone and its biological properties. *Journal Farmakologiya i toksikologiya*, 48(6): 17-20.
- Chamorro, G., Salazar, M., Salazar, S. and Mendoza, T., 1993. Pharmacology and toxicology of *Guatteria gaumeri* and alpha-asarone. *Revista de Investigacion Clinica*, 45(6): 597-604.
- Chamorro, G., Salazar, M., Tamariz, J., Díaz, F. and Labarrios, F., 1999. Dominant lethal study of alpha-asarone in male and female mice after sub-chronic treatment. *Phytotherapy Research*, 13(4): 308-311.
- Chen, J.J., 1967. Status epilepticus treated by alpha-asarone. Report of 18 cases. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 4(3): 217-218.
- Hu, B.Y. and Ji, Y.Y., 1986. Research on the anticarcinogenic activation of *Acorns calamus*. *Chung His I Chieh Ho Tsa Chih*, 6: 480-483.
- Karwicka, E., Marczewska, J., Anuszewska, E., Łozowickab, B. and Chilmonzyka, Z., 2008. Genotoxicity of α -asarone analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(11): 6069-6074.

Extraction and identification of asaronic acid and two phenylpropanoids from the aerial parts of *Haussknechtia elymaitica* Boiss.

Z. Habibi^{1*}, M. Ghavidel² and M. Yousefi³

1*- Corresponding author, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

E-mail: z_habibi@sbu.ac.ir

2- MSc. Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

Received: December 2010

Revised: May 2012

Accepted: May 2012

Abstract

The aerial parts of *Haussknechtia elymaitica* Boiss. (Umbelliferae) which is endemic to Iran were collected during the flowering stage from Ilam province. The chloroform extract of *H. elymaitica* was investigated and asaronic acid and two phenyl propanoids, *trans*-asarone and *trans*-methyl isoeugenol were isolated. The structure of these natural products was elucidated using ¹H and ¹³C NMR data.

Key word: *Haussknechtia elymaitica* Boiss., Umbelliferae, phenylpropanoid, asaronic acid.