بررسی مقایسه‌ای روش‌های استخراج و طیف جرمی ترکیبات شیمیایی عصاره «مان» گیاه شکرتیغال (*Echinops dichorus* L.) و مقایسه اثر انواع عصاره‌های «مان» بر روی رده سلول‌های سرطانی روده CaCO2

بابک مختاری[1*]، مریم کلاهی[2]، ندا میرزایی[3]

۱- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- کارشناس ارشد شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
* آدرس مکاتبه: اهواز، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز
تلفن: ۳۳۳۳۱۰۴۵ (۰۶۱)، نمابر: ۳۳۳۳۱۰۴۲ (۰۶۱)
پست الکترونیک: bmokhtari@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۳ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۹/۱

چکیده

مقدمه: شکرتیغال (*Echinops dichorus* L.) گیاهی دارویی از خانواده کاسنی است که در اثر فعالیت نوعی حشره سرخرطومی روی بعضی از گونه‌های این جنس، ترکیبی به نام «مان» به دست می‌آید.

هدف: در این تحقیق حلال و روش‌های مختلف عصاره‌گیری در استخراج ترکیبات آلی از بخش مان شکرتیغال مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی: جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی عصاره‌های بخش مان شکرتیغال با استفاده از دستگاه GCMS صورت گرفت. بررسی ویژگی‌های ضدسرطانی عصاره مان با استفاده از روش‌های NBT و MTT به دو روش سوکسله و ماسراسیون با دو حلال اتانول و ان هگزان، انجام شد.

نتایج: نتایج بررسی‌های فیتوشیمیایی حضور ترکیبات ساپونینی، استروئیدی، گلیکوزیدسیانوژنیک، تانن‌دار و آلکالوئیدی را نشان داد و آنالیز عصاره‌های ماسراسیون، پرگولاسیون و دستگاه سوگسله با حلال اتانول بوسیله دستگاه GCMS نشان داد که هر سه عصاره مان سرشار از اسیدهای چرب می‌باشد. آنالیز طیف‌های GC، ۲۷ ترکیب در روش ماسراسیون، ۳۰ ترکیب در روش پرکولاسیون و ۱۰ ترکیب با استفاده از دستگاه سوکسله را نشان داد. نتایج بررسی میزان بقاء سلولی نشان داد که کمترین بقا سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصاره اتانولی و ان- هگزانی به روش ماسراسیون بود. نتایج آزمون NBT بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی و ان- هگزانی به روش ماسراسیون می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بهترین روش و حلال جهت استخراج ترکیبات آلی عصاره تام محصول مان گیاه شکرتیغال، دستگاه پرکولاتور به همراه حلال اتانول است. اما برای استخراج اسیدهای چرب و ترپن‌های موجود در گیاه روش سوکسله پیشنهاد می‌شود. تمامی عصاره‌های شکرتیغال (مان) خواص سیتوکسی خوبی نشان دادند که بیانگر وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی این عصاره‌ها است.

گل‌واژگان: شکرتیغال، پرکولاسیون، سوکسله، طیف سنج جرمی، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

مواد شیمیایی موجود در گیاهان را می‌توان به دو دسته کلی تقسیم‌بندی کرد. دسته اول مواد حاصل از متابولیسم اولیه گیاه نظیر پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌باشند. دسته دوم فرآورده‌های حاصل ازمتابولیسم ثانویه گیاهی نظیر ترکیب‌های فنولیک، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها هستند [۱]. از آنجا که این ترکیبات به صورت عصاره یا پودرهای گیاهی در صنایع غذایی و دارویی مصرف گسترده‌ای دارند، فعالیت‌های زیادی برای استخراج، خالص‌سازی و تعیین ساختمان مولکولی ترکیبات به دست آمده از گیاهان صورت گرفته است [۲].

گونه شکرتیغال (*Echinops dichorus* L.) از خانواده آفتابگردان (آستراسه) می‌باشد و تاکنون ۱۳۰ گونه از آن در سراسر جهان گزارش شده است که در اروپای شرقی و جنوبی، شمال و مناطق گرمسیری آفریقا و آسیا پراکنده هستند [۳]. بر اساس فلور ایرانیکا، فراوانی ۵۴ گونه از شکرتیغال در نقاط مختلف ایران گزارش شده است [۴]. این گیاه به طور بسیار گسترده مورد بررسی قرارگرفته است و ترکیبات زیادی از گونه‌های مختلف آن به دست آمده است. در واقع *Echinops* به عنوان گونه‌ای پیچیده از تیوفن‌های استیلنی محسوب می‌شوند. از جمله ترکیبات ویژه در شکرتیغال می‌توان به لاکتان سیسکیوتن، آلکالوئید، لیگنان، فلاونوییدها و هیدروکسیسینات اشاره نمود. با این وجود با مطالعات انجام شده باز هم می‌توان بیان کرد که شواهد فیتوشیمیایی بسیاری درباره ترکیبات این گیاه وجود ندارد [۵]. فرآورده نسبتاً شیرینی که به صورت طبیعی یا در اثر فعالیت حشرات از برگ، پوست، شاخه و یا در اثر شکافتن تنه بعضی از درختان به بیرون تراوش می‌کند را، «مان» می‌نامند. در ایران هفت نوع مان مهم وجود دارد که عبارتند از گز خوانسار، گز علفی، شیرخشت، ترنجبین، بید خشت، شکر سرخ و شکر تیغال [۶]. مان شکر تیغال از فعالیت یک گونه حشره سرخرطومی با نام علمی (*Larinus vulpes* olive.) روی بعضی از گونه‌های این جنس به دست می‌آید. مواد تشکیل‌دهنده پیله‌ی این حشره که از ترشحات گیاه شکرتیغال ساخته شده است، دربردارنده‌ی سلولز، نشاسته، مواد آلبومینوییدی است و همچنین به مقدار جزئی چربی و مقدار زیادی از (در حدود ۲۵ درصد) قند ترهالوز در ساختار خود دارد. این مان دارای طعمی شیرین و لعاب‌دار بوده که به عنوان برطرف‌کننده سرفه و تحریک دستگاه تنفسی تحتانی، تب‌بر، نرم‌کننده دستگاه گوارش و طعم‌دهنده در طب سنتی کاربرد وسیعی دارد. شکرتیغال به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانتی تری‌هالوز، به عنوان یک ضدسرطان به کار می‌رود [۷]. همچنین برای درمان بیماری‌های مختلف مانند اسهال، میگرن، ناراحتی‌های قلبی، بیماری‌های عفونی مختلف، علیه کرم‌های روده وبواسیر مورد مصرف قرار می‌گیرد [۷].

بر اساس تحقیقات انجام شده این گیاه دارای انواع زیادی از ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی، ترپنوئیدی، چربی‌ها، استروئیدها و پلی‌استیلن‌ها است. پژوهش‌های انجام شده نشان داده‌اند شکرتیغال دارای فعالیت ضدباکتری، آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچ می‌باشد [۳]. برای مثال ده نوع ماده پلی تینیل که از ریشه گونه (*E. grijissi*) استخراج شده خاصیت حشره‌کشی دارد. چهار نوع ماده فنولیکی که از گونه *E. echinatus* به دست آمده از قارچ‌کش‌های قوی می‌باشند [۶].

با توجه به بررسی اطلاعات موجود، تاکنون در ایران روش‌های استخراج و شناسایی مواد مؤثره مان مورد بررسی قرار نگرفته است و در اکثر بررسی‌ها به شناسایی و گروه‌بندی شیمیایی قندهای موجود در مان بسنده شده است [۷]. لذا با توجه به اهمیت شکرتیغال در درمان بیماری‌های مختلف، شناسایی ترکیبات آلی شکرتیغال (مان) از اهمیت خاصی برخوردار است. بنابراین در این تحقیق، هدف آن است که ابتدا به شناسایی مواد شیمیایی اصلی (بررسی فیتوشیمیایی) گیاه پرداخته شود، سپس اثر حلال‌های متفاوت و روش‌های عصاره‌گیری مختلف مورد بررسی قرار گیرد تا روش مناسب، جهت استخراج بهینه ترکیبات آلی از این گیاه معرفی شود. همچنین عصاره مان به دو روش سوکسله و ماسراسیون با استفاده از دو حلال اتانول و ان هگزان، بمنظور بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان روده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

شکرتیغال و بخش مان گیاه مورد بررسی در این تحقیق خردادماه سال ۹۲ از منطقه خوزستان (اهواز) جمع‌آوری شد. شناسایی گونه گیاه توسط پژوهشکده گیاهان دارویی دانشکده داروسازی اهواز انجام پذیرفت. کد هرباریومی گیاه A14020002P می‌باشد. پس از خشک شدن به دور از تابش مستقیم خورشید، نمونه‌ها آسیاب شدند.

انتخاب بهترین حلال برای استخراج ترکیبات

در اولین مرحله کار می‌بایست حلال مناسب جهت استخراج عصاره تام مشخص شود. مقدار ۲۵ گرم از پودر گیاه به هر یک از ظروف درب‌دار حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های دی‌کلرومتان، اتیل استات، n- هگزان، استونیتریل، اتانول ۹۶ درصد، دی اتیل اتر و کلروفرم اضافه شد. پس از گذشت ۵ روز طی همزدن مکرر، محلول صاف شد [۹]. سپس حلال با روش تقطیر در خلاء تبخیر شد. در نهایت جهت جلوگیری از تخریب، عصاره‌ی به دست آمده، در یخچال نگهداری شدند. برای بالا بردن اطمینان هر آزمایش سه بار تکرار شد.

بررسی‌های فیتوشیمیایی

آزمون‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی پودر سرشاخه هوایی و بخش مان گیاه، با استفاده از روش‌های استاندارد جهت شناسایی متابولیت‌های ثانویه انجام شد [۸]. این آزمون‌ها جهت بررسی ترکیبات گیاهی شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلانوئیدها، تانن‌ها و استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین C و پروتئین صورت گرفت.

شناسایی آلکالوئید

به منظور شناسایی آلکالوئید از دو معرف مایر و واگنر استفاده شد [۹، ۸].

شناسایی تانن

شناسایی تانن‌ها با استفاده از دو واکنش رنگی با محلول آهن (III) کلرید و واکنش ایجاد رسوب با محلول استات سرب انجام شد [۸].

شناسایی استروئیدها

این آزمون با استفاده از اسید سولفوریک و ایجاد رنگ قرمز انجام شد [۱۰].

شناسایی ترپنوئید

شناسایی ترپنوئیدها با استفاده از آزمون لیبرمن بورشارد (Liebermann – Burchard test) [۱۱] و آزمون سالکوسکی (Salkowski's test) انجام شد [۱۲].

شناسایی ساپونین

۰/۵ گرم از پودر گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. با ایجاد کف پایدار به ارتفاع حداقل ۱ سانتی‌متر، جواب آزمون مثبت است [۸].

شناسایی فلاونوئیدها

الف) ۰/۵ گرم عصاره را در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول حل نموده و به آن ۰/۵ گرم پودر روی و ۵ قطره اسید کلریدریک غلیظ اضافه شد. وجود رنگ قرمز، نشان‌دهنده وجود آنتوسیانین و ترکیب‌های فلاونوئیدی است.

ب) چند قطره محلول سدیم هیدروکسید را به عصاره اضافه شد. ایجاد رنگ زرد، نشان‌دهنده حضور ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد [۱۳].

شناسایی پروتئین‌ها

برای شناسایی پروتئین‌ها در عصاره از معرف Biuret (محلول سدیم هیدروکسید به همراه ۲ قطره محلول مس سولفات ۱ درصد) استفاده شد. تشکیل رنگ بنفش نشانه وجود پروتئین است [۱۳].

عصاره‌گیری از گیاه

پس از شناسایی مواد شیمیایی اصلی گیاه، به منظور بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات آلی در شکرتیغال (مان)، حلال و روش‌های استخراج گوناگون مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر مرحله پس از اتمام عملیات عصاره‌گیری، درصد بازده عصاره به دست آمده به کمک فرمول زیر تعیین شد.

۱۰۰ × (وزن خشک گیاه / وزن عصاره) = درصد بازده

تعیین بهترین روش عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات

آزمون بهترین حلال جهت تعیین بهترین روش عصاره‌گیری، روش‌های ماسراسیون، پرکولاسیون و استخراج مداوم با استفاده از دستگاه سوکسله با یکدیگر مقایسه شدند.

روش ماسراسیون: در این روش ۱۰ گرم از پودر بخش مان گیاه با اندازه‌ی ذره‌ی ۵۰۰ میکرومتر در ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد، ابتدا برای ۱۵ دقیقه به کمک هم‌زن شیشه‌ای سوسپانسیون کاملا یکنواختی ایجاد شد سپس درب ارلن را بسته و برای مدت ۴۸ ساعت توسط همزن مغناطیسی محلول هم زده شد. حجم عصاره حاصل پس از عبور از صافی به بالن دستگاه تقطیر منتقل شد و با اعمال خلاء در دمای ۶۵-۷۰ درجه سانتی‌گراد تقطیر محلول فوق تا تغلیظ شدن آن ادامه یافت. جهت جلوگیری از تخریب نمونه، عصاره در یخچال نگه‌داری شد [۱۴].

روش پرکولاسیون: مقدار ۱۰ گرم از بخش مان گیاه قبل از انجام عصاره‌گیری در ۳۰ درصد از حلال مورد نظر خیسانده شد. توده حاصل به مدت دو ساعت به حال خود واگذاشته شد، پودر گیاهی مرطوب شده به طور یکنواخت به دکانتوری انتقال داده شد (ضمن وارد کردن نمونه فشار ملایمی هم بر روی توده گیاهی وارد شد). سپس بر روی آن به طور مرتب حلال اتانول ۹۶ درصد اضافه شد. شستشو با اتانول تا بی‌رنگ شدن حلال ادامه یافت. سپس حلال توسط تبخیرکننده چرخان، تقطیر شد. جهت جلوگیری از تخریب نمونه، عصاره در یخچال نگه‌داری شد [۱۴].

روش استخراج مداوم (سوکسله): مقدار ۱۰ گرم از بخش مان گیاه در انگشتانه دستگاه سوکسله ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس با استفاده از ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۹۶ درصد عمل عصاره‌گیری انجام شد. جهت کامل شدن عصاره‌گیری نمونه، ۲۰ مرتبه عمل تخلیه عصاره به داخل بالن صورت گرفت. سپس حلال تحت خلاء تبخیر شد. جهت جلوگیری از تخریب نمونه، عصاره در یخچال نگه‌داری شد [۱۱].

تجزیه عصاره‌ها

به منظور شناسایی ترکیبات، عصاره‌های به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent ۵۹۷۵، تزریق شد. گستره‌ی طیف جرمی از ۵۰ تا ۵۵۰ m/z می‌باشد، گاز حامل، هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت انتخاب شد. از مقایسه طیف‌های جرمی مربوط به ترکیبات پیشنهادی، با طیف گزارش شده در کتب مرجع و همچنین بررسی الگوهای شکسته شدن، ترکیبات عصاره شناسایی شدند [۱۵].

عصاره‌گیری جهت آزمون های ضدسرطان

برای بررسی اثر مان بر سلول‌های سرطانی از دو روش عصاره‌گیری ماسراسیون و سوکسله توسط دو حلال اتانول و ان هگزان همانند روش کار عصاره‌گیری جهت استخراج ترکیبات، استفاده شد.

کشت سلولی

رده‌ی سلولی آدئوکارسینومای اپی تلیال روده‌ی بزرگ انسانی (NCBI code: C139 ،CaCO2) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی ۲۵ cm^2 (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ $\mathring{C}$ و ۵ CO_2 درصد کشت داده شدند [۱۶].

بررسی سمیت عصاره‌ی مان شکرتیغال با روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصاره‌ی مان شکرتیغال بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده است. پس از حل شدن کامل کریستال‌ها، توسط دستگاه خوانش الایزا جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۰ nm اندازه‌گیری شد. همه‌ی آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شد [۱۶].

تست NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

جهت بررسی میزان کاهش ROS ها در سلول‌های تیمار شده ۲۰۰ میکرولیتر NBT ۰/۰۱ ٪ (۰/۰۱ g در ۱۰۰ mL فسفات بافر سالین) به حفره‌ها اضافه و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ ℃ انکوبه شدند. سپس به نمونه‌ها ۱۰۰ µL فسفات بافر سالین افزوده و با دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پس از جداسازی مایع رویی، ۶۰ µL دی متیل‌سولفوکسید و ۶۰ µL پتاسیم هیدروکسید ۲ mol L-1 به رسوب حاصل از مرحله قبل اضافه و جذب در طول موج ۵۴۰ nm قرائت شد. نتایج بر اساس میزان جذب فورمازون تولید شده گزارش شد [۱۷].

آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS انجام شد، مقایسهٔ میانگین داده‌ها با روش دانکن انجام شد. نمودارهای مقایسه میانگین با نرم‌افزار Excel (۲۰۱۰) رسم شدند [۱۸].

نتایج

با توجه به نتایج به دست آمده از عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف عصاره تام در حلال اتانول دارای بیشترین بازده وزنی-وزنی می‌باشد. بازده وزنی - وزنی عصاره حاصل از حلال *n*-هگزان با اختلاف معنی‌داری کمتر از اتانول است (جدول شماره ۱).

نتایج بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی در (جدول شماره ۲) ارائه شده است.

آنالیز عصاره‌ها

بر اساس تفسیر طیف‌های GC، ترکیبات موجود در عصاره گیاه شکرتیغال (مان)، در روش ماسراسیون ۲۷ ترکیب، پرکولاسیون ۳۰ ترکیب و با استفاده از دستگاه سوکسله ۱۰ ترکیب شناسایی شد که اصلی‌ترین و عمده‌ترین ترکیبات حاصل از هر روش در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۱- بازده وزنی - وزنی عصاره‌های شکرتیغال (مان) با حلال‌های مختلف

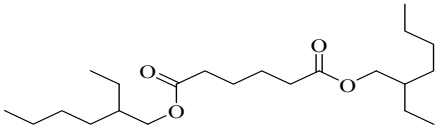
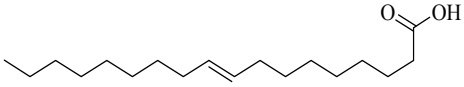
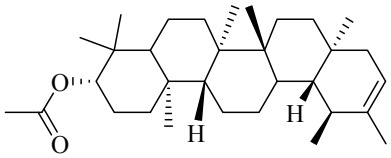
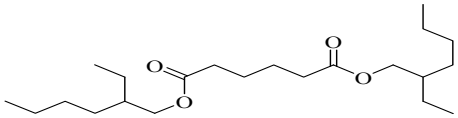
نوع حلال	میزان عصاره (گرم)	بازده وزنی _ وزنی عصاره (٪)
***n*- هگزان**	۰/۲۳۳ a	۰/۹۳۲ a
متان کلرو دی	۰/۰۹۳ b	۰/۳۷۲ b
اتانول	۰/۴۲ c	۱/۶۸ c
استونیتریل	۰/۱۲۸ d	۰/۵۱۲ d
اتر اتیل دی	۰/۰۹۶ b	۰/۳۸۴ b
کلروفرم	۰/۰۸۹ b	۰/۳۵۶ b
استات اتیل	۰/۰۷۸ b	۰/۳۱۲ b

حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ است.

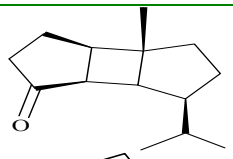
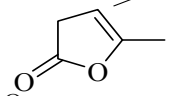
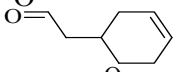
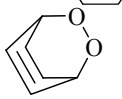
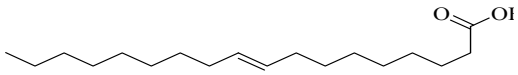
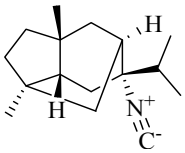
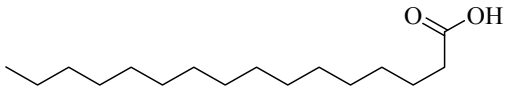
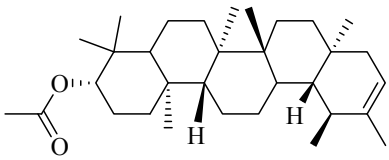
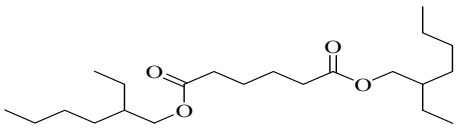
جدول شماره ۲ – بررسی‌های فیتوشیمیایی بر روی اندام‌های گیاه شکرتیغال

مواد مؤثره	آلکالوئید		فلاونوئید		ترپنوئید		ساپونین	تانن		استروئید	پروتئین	گلیکوزیدسیانوژنیک
آزمون‌های انجام شده	آزمون مایر	آزمون واگنر	آزمایش Pew	آزمون سدیم هیدروکسید	آزمون لیبرمن بورشارد	آزمون سالکوسکی	آزمون کف کنندگی	آزمون استات سرب	کلروفریک آزمون	استفاده از اسیدسدلفوریک	معرف Biuret	کاغذ آغشته به پیکرات سدیم
شکر تیغال (مان)	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+
سرشاخه هوایی شکرتیغال	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+

جدول شماره ۳- عمده‌ترین ترکیبات عصاره شکرتیغال با روش‌های متفاوت عصاره‌گیری

ردیف	نام ترکیب (نوع ماده مؤثره)	درصد ترکیب	ساختار ترکیب
	ترکیبات به روش ماسراسیون		
۱	بیس (۲- اتیل هگزیل) استر **(اسیدچرب)**	۹۰/۳۸	
۲	(E)-۹-اکتادکانوئیک اسید **(اسیدچرب)**	۱/۶۱	
۳	لوپئول استات **(ترپن)**	۲/۵	
	ترکیبات به روش سوکسله		
۴	بیس (۲- اتیل هگزیل) استر **(اسیدچرب)**	۸۹/۸۳	

ادامه جدول شماره ۳-

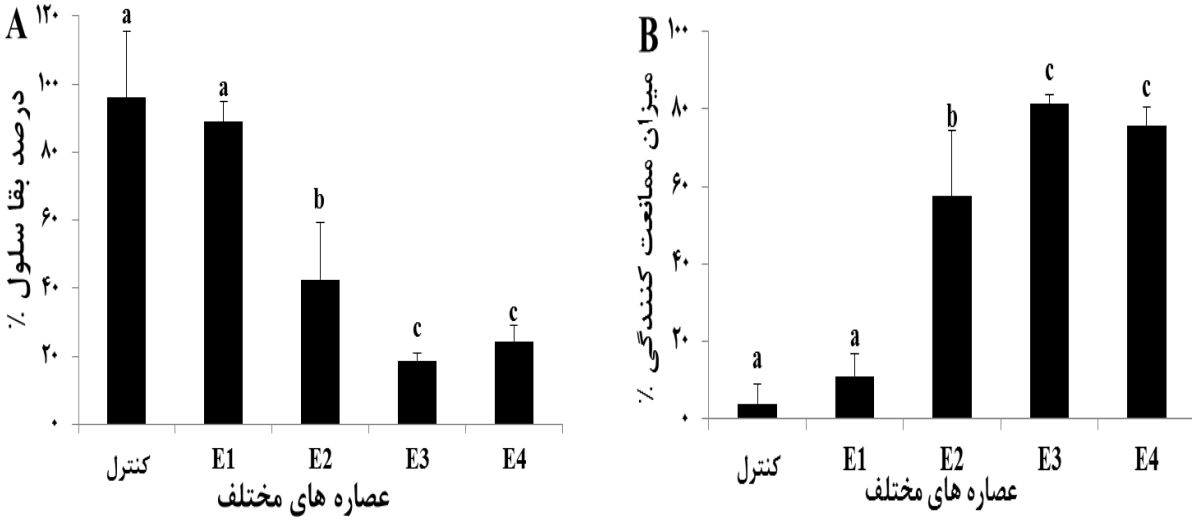
ردیف	نام ترکیب (نوع ماده مؤثره)	درصد ترکیب	ساختار ترکیب
۵	۱۱- نوربونان- ۱- اون **(ترپن)**	۱/۹۴	
۶	۲(۳H)- فوران اون- ۵- متیل **(هتروسیکل)**	۱/۸۹	
۷	۳- سیکلوهگزن- ۱- استالدهید **(هیدروکربن)**	۱/۵۰	
۸	۲،۳- دی اکسابی سیکلو [۲،۲،۲] ۵- اکتن **(ترپن)**	۱/۰۸	
	ترکیبات به روش پرکولاسیون		
۹	۹-اکتادکانوئیک اسید **(اسیدچرب)**	۲۸/۲۱	
۱۰	۶- ایزوسیانو- ۶- ایزوپروپیل – ۱و۳ α- دی متیل- اکتاهیدرو- ۱و۵- متانو- ایندن **(ترپن)**	۱۲/۷۷	
۱۱	ان- هگزادکانوئیک اسید **(اسیدچرب)**	۱۱/۱۲	
۱۲	لوپئول استات **(ترپن)**	۱۰/۳۰	
۱۳	بیس (۲- اتیل هگزیل) استر **(اسیدچرب)**	۶/۳۹	
۱۴	Eicosane **(هیدروکربن)**	۶/۰۸	$C_{20}H_{42}$

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT

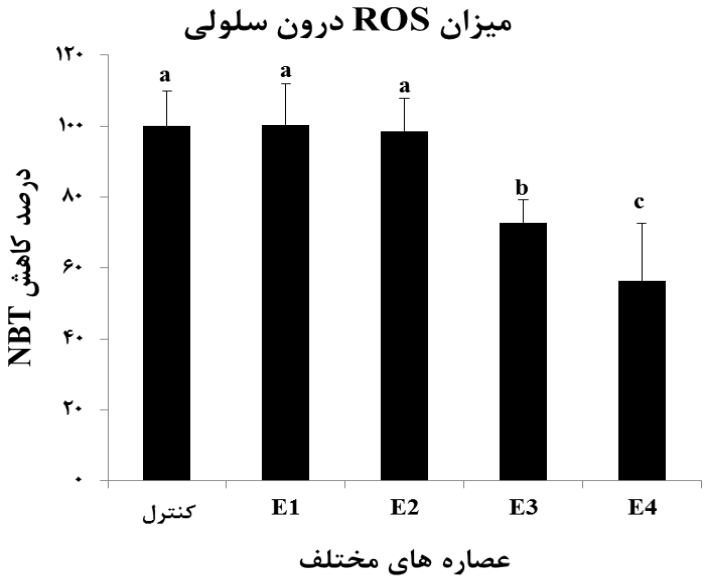
از مقایسه داده‌های به دست آمده از سنجش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره اتانولی و عصاره ان- هگزانی به روش‌های ماسراسیون و سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمارشده با سه عصاره (ان- هگزانی به دو روش سوکسله و ماسراسیون و اتانولی به روش ماسراسیون) نسبت به گروه کنترل در سطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار بود. اما گروه تیمار شده با عصاره اتانولی به روش سوکسله نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت. میانگین زیستی سلول‌های تیمار شده عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (عصاره ۳) اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره ان- هگزانی به روش ماسراسیون (عصاره ۴) در اندازه‌گیری درصد بقا سلول نشان نداد. همچنین میزان ممانعت‌کنندگی سلول‌های تیمار شده با عصاره اتانولی به روش ماسراسیون بیشترین اختلاف را نسبت به گروه کنترل نشان داد. کمترین میزان ممانعت‌کنندگی مربوط به عصاره اتانولی با دستگاه سوکسله می‌باشد (شکل شماره ۲).

اندازه‌گیری درصد رادیکال‌های آزاد NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

از مقایسه داده‌های به دست آمده از میزان درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره اتانولی و عصاره ان- هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین کاهش NBT در زمان ۲۴ ساعت در برخی گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار بود. میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد عصاره اتانولی و ان- هگزانی به روش ماسراسیون نسبت به همدیگر و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند. میزان فعالیت رادیکال‌های آزاد عصاره اتانولی و ان- هگزانی به روش سوکسله نسبت به همدیگر و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۲- سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT در عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (E1)، عصاره ان- هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (E2)، عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (E3) و عصاره ان- هگزانی به روش ماسراسیون (E4). A: درصد بقاء سلول، B: درصد میزان ممانعت‌کنندگی. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.



شکل شماره ۳- درصد کاهش NBT در عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (E1)، عصاره ان- هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (E2)، عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (E3) و عصاره ان- هگزانی به روش ماسراسیون (E4). حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P< ۰/۰۵ است.

بحث

گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آنها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد تشکیل‌دهنده آن دارد. لذا در اولین مرحله کار می‌بایست حلال مناسب جهت استخراج ترکیبات گیاهی تام مشخص شود. با توجه به این که مواد گیاهی شامل گروه وسیعی از ترکیبات هستند که ساختارهای متفاوت و اغلب قطبی دارند، ممکن است به علت اتصال گروه‌های غیرقطبی به این ترکیبات، در حلال‌هایی با قطبیت کمتر نیز انحلال یابند [۱۹]. لذا در این مطالعه، حلال‌های مختلف قطبی و غیرقطبی مورد بررسی قرارگرفته است. از طرف دیگر، تأثیر روش‌های مختلف عصاره‌گیری مثل ماسراسیون، پرکولاسیون و استخراج مداوم با استفاده ازدستگاه سوکسله در استخراج عصاره تام گیاه شکرتیغال بررسی شده‌اند. نتایج به دست آمده از عصاره‌گیری محصول مان گیاه شکرتیغال با حلال‌های مختلف، با توجه به وزن عصاره حاصل نسبت به مقدار گیاه استفاده شده، نشان داد که بازده وزنی- وزنی عصاره حاصل از حلال‌های اتانول و ان- هگزان اختلاف کمتری دارند ولی با این تفاوت که عصاره به دست آمده از *n*- هگزان روغنی و فرار بوده و در دمای محیط تبخیر شد. لذا چنین استنباط می‌شود که حلال اتانول جهت استخراج ترکیبات گیاهی کارایی بیشتری دارد در نتیجه حلال اتانول به عنوان حلال بهینه انتخاب شد. اتانول به دلیل قطبی بودن، بسیاری از ترکیبات قطبی را در خود حل می‌نماید.

نتایج به دست آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترکیب‌های ساپونینی و آلکالوئیدی (به مقدار زیاد)، گلیکوزیدسیانوژنیک و استروئیدی را در محصول مان و سرشاخه هوایی گیاه شکرتیغال تأیید می‌کند. در حالی که ترکیب‌های فلاونوئیدی و تانن‌دار در این گونه شکرتیغال (*Echinops dichorus*) یافت نشد. این نتایج را می‌توان با گونه‌های دیگر این گیاه مقایسه کرد به عنوان مثال در بخش‌های مختلف گونه عراقی (*E. heterophyllus*) ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و استروئیدی وجود دارد. اما حضور ترکیبات تانن‌دار و ساپونینی در این گونه تأیید نشده است.

بخش هوایی گونه مصری (*E. spinosissmus*) نیز دارای آلکالوئید است [۲۰]. در بسیاری از تحقیقات گزارش شده است که مقدار و نوع متابولیت‌های ثانویه در بین گونه‌های یک گیاه و حتی در بخش‌های مختلف یک گونه از گیاه، تغییرپذیر است. این به دلیل عواملی مانند ارتفاع محل جمع‌آوری (کوهستان یا دشت)، آب و هوا، رطوبت و سایر عوامل محیطی است [۲۰].

نتایج به دست آمده از استخراج ترکیبات آلی گیاه شکرتیغال با استفاده از روش‌های مختلف عصاره‌گیری نشان می‌دهد که روش سوکسله کمترین کارآیی را در استخراج ترکیبات آلی تام دارد که نشان‌دهنده این است که در روش سوکسله، دمای بالا منجر به تخریب برخی ترکیبات آلی عصاره تام می‌شود. اما دو روش ماسراسیون و پرکولاسیون بیشترین کارایی را در استخراج ترکیبات عصاره تام نشان می‌دهند. از مقایسه این دو روش، ماسراسیون بدلیل عدم صرفه‌جویی در وقت دارای اهمیت کمتری است و از طرفی این روش موجب از بین رفتن مواد دارویی در باقیمانده گیاهی می‌شود. ولی روش پرکولاسیون بعلت کوتاهی مدت عصاره‌گیری و صرفه‌جویی در مقدار حلال نسبت به سایر روش‌ها در استخراج عصاره تام در اولویت قرار دارد [۲۱]. پژوهش‌های فیتوشیمیایی گیاه شکرتیغال ترکیبات جدیدی از این گونه شامل ۴ مورد تریپرتین، ۶ مورد فلاونویید و موادی دیگر مانند متاکسی فلاون را معرفی کرد [۲۲]. بر طبق نظریه هاربورن (۱۹۷۷) ماده فلاونول از نظر ارزش نسبی، می‌تواند به عنوان یکی از مواد مؤثره با ارزش تکاملی در گیاه شکرتیغال در نظر گرفته شود [۲۲]. با بررسی ژنتیکی شکرتیغال می‌توان بیان نمود که تنوع فیتوشیمیایی در این گیاه مهم‌تر وقابل بحث‌تر از تنوع مولکولی است، زیرا از لحاظ فیتوشیمیایی الگوهای جایگزین بسیاری برای شکرتیغال وجود دارد که همگی قابل بررسی می‌باشد [۳].

در این پژوهش با توجه به طبقه بندی‌های فیتوشیمیایی ترکیبات شناسایی شده، درصد استخراج اسیدهای چرب در هر سه روش (ماسراسیون، پرکولاسیون و سوکسله) بالا است. مهم‌ترین آنها بیس (۲- اتیل هگزیل) استر (که در روش ماسراسیون ۹۰/۳ درصد، در روش سوکسله ۸۹/۸ درصد و در روش پرکولاسیون ۶/۳ درصد)، هگزادکانوئیک اسید (در روش پرکولاسیون ۱۱/۱ درصد) و اولئیک اسید (در روش پرکولاسیون ۲۸/۲ درصد، در روش ماسراسیون ۱/۶ درصد) می‌باشد.

طبق پژوهش‌های انجام شده ترکیبات گلیکوزیدی و فلاونوئیدی مختلفی از برگ و بذر خشک‌شده‌ی *Echinops orientalis Trauv* با حلال متانول استخراج شدند. عصاره‌ها و ترکیبات استخراج شده برای آزمایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند. در حالی که عصاره بذر و برگ فعالیت از بین برنده‌ی رادیکال‌های DPPH بالا و ABTS متوسط را داشتند، فلاونوئیدهای جدا شده فعالیت پاکسازی رادیکال کاتیون بالا را نشان دادند [۲۳]. همچنین در پژوهشی دیگر از قسمت‌های هوایی شکرتیغال آلکالوئیدها، اکینوپسین، اکینوپسیدین و اکینوزولینون شناسایی شدند. اخیراً ترکیبات مختلفی از دسته آلکالوئیدها، گلیکوزیدی و فلاونوئیدی از گل-های *Echinops echinatus* استخراج شده است [۲۴]. علاوه بر اکینوپسین، اکینوپسیدین و چند اسید چرب، یک ترکیب جدید جدا شده از برگ‌ها و ساقه‌ی *Echinops niveus* به عنوان ۳- متیل‌تری‌اکونتان شناسایی شده است [۲۵].

نتایج حاصل از سنجش توانایی زیستی نشان می‌دهد که کمترین بقا سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصاره ان-هگزانی و اتانولی به روش ماسراسیون بوده است. حلال ان-هگزان دمای جوش بین ۶۳ تا ۶۹ درجه سانتی‌گراد داشته و علاوه بر آن حلالیت مواد روغنی، اسیدهای چرب و تانن‌ها در آن بالا می‌باشد [۲۱]. به نظر می‌رسد وجود شرایطی چون گردش حلال، حرارت (جوشش حلال) در روش سوکسله (با حلال ان- هگزان و اتانول) باعث می‌شود که میانگین میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدی و...) کمتر از روش خیساندن باشد [۲۱]. بر اساس یافته‌های محققین این ترکیبات ماده موثر اصلی محصول مان شکرتیغال است، که دارای اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد و زنده‌مانی انواع سلول‌های سرطانی می‌باشد. حضور انواع آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در شکرتیغال گزارش شده است [۳].

در بررسی میزان کاهش رادیکال آزاد در سلول‌های تیمار شده به روش NBT مشخص شد که عصاره شکرتیغال

(محصول مان) دارای فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید است که این ویژگی مربوط به آنتوسیانین‌ها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره می‌باشد [۲۶]، این ترکیبات علاوه بر این توان کلایته کردن فلزات را دارند [۲۷]. همچنین نتایج آزمون NBT نشان می‌دهد که عصاره اتانولی به روش ماسراسیون دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همانطور که بند فوق گفته شد حلال اتانول برای استخراج ترکیبات فنلی مناسب می‌باشد، که این ترکیبات نقش مهمی در جذب رادیکال‌های آزاد سلول‌ها دارند. اخیراً در پژوهش‌های انجام شده، یک گلوکوزید فلاوون ضدالتهابی فعال، از برگ‌های *Echinops echinatus* گزارش شده است. در پژوهش‌های مختلف انجام شده بر روی گونه‌های *Echinops* ترکیبات مختلفی از دسته آلکالوئیدها، آسیل فلاون گلیکوزیدها و فلاونوئیدها استخراج و شناسایی شدند. همچنین علاوه بر اکینوپسین و اکینوپسیدین، یک آلکالوئید جدید اکینوزولانین باتوجه به بررسی داده‌های طیفی آن در گونه *Echinops echinatus* شناسایی شده است [۲۸]. پژوهش‌های انجام شده بوسیله هایمت و کیدان (Hymete and Kidane) در سال ۱۹۹۱ نیز نقش ترکیبات موجود در شکرتیغال را در درمان عفونت‌های روده به دلیل حضور ترکیبات فلاونوییدی نشان می‌دهد [۲۹].

از بین روش‌های عصاره‌گیری این پژوهش، در استخراج و جداسازی اسیدهای چرب، ترپن‌ها، رزین‌ها و صمغ (که در مقابل حرارت پایدارند) روش سوکسله مناسب‌تر می‌باشد. زیرا در روش‌های دیگر اغلب همراه با این ترکیبات (اسیدهای چرب و...)، مواد دیگری نیز وجود دارد که بر روی درجه حلالیت آنها تأثیرگذار می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در مجموع برای استخراج اسیدهای چرب و ترپن‌های موجود در گیاه، روش سوکسله، روش کاراتری است. همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تمامی عصاره‌های به دست آمده از شکرتیغال (مان) خواص سیتوکسی خوبی نشان دادند و وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده به دو روش سوکسله و ماسراسیون با حلال‌های اتانول و ان- هگزان را تأیید می‌کند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره ۸۴۶۷۰ /۹۳/۳/۲ و ۶۴۹۷۰ /۹۳/۴/۱۲) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Kadkhoda Z, Sedaghat S, Rezazadeh ShA, NaghdiBadi HA, Taghizad Farid R and Hariri Akbari F. Determination of alkaloids amount from Iranian *Papaver bracteatum* Lindl. by HPLC. *J. Herbal Drugs* 2011; 2 (1): 39 - 43.

2. Asgari S, Khadiv Parsi P, Rezazadeh S and Pirali Hamedani P. Experimental Optimization of Solid- Liquid Extraction. *NSMSI* 2011; 30 (3): 61-68.

3. Khadim E J, Abdulrasool AA and Awad ZJ. Phytochemical Investigation of Alkaloids in the Iraqi *Echinops heterophyllus*. *Iraqi. J. Pharm. Sci.* 2014; 23 (1): 26 - 34.

4. Rechinger KH. Flora Iranica. Vols, Graz, (ed) 1963-2012, pp: 1-176.

5. Makabel B, Baysanb A, Tan Ch, Meng F, Chi X and Zhongmei Z. Chemical constituents from the aerial parts of *Echinops integrifolius*. *ISSN*. 2014; 2 (40): 144-147.

6. Nasirzadeh AAR, Javidtash I and Riasat M. Identification of echinops Species and Study on some Biological Characteristics of Larinus Vulpes

ouv. As Manna Producer in Fars Province. *I .J. Med. Aromatic Plants* 2005; 21 (3): 335 - 346.

7. Takavar S and Mohamadi M. Producers Factors and Mechanisms of Manna in Iran. *J. Med. Plants* 2008; 4 (28): 28 - 37.

8. Mahdavi Meyman Z and Mir-Tajaddinni SM. Phytochemical Evaluation of 30 Plant Species Collected from Shahrbabak (Kerman/Iran). *J. Kerman Univ. Med. Sci*. 2006; 13 (2): 95-102.

9. Kokate C K, Gokhale S B and Purohit APA. Textbook of Pharmacognosy. Nirali Prakashan. 29th ed. 2009, 635.

10. Amzad Hossain M, AL-Raqmi KAS, AL-Mijizy ZH, Weli AM and Al-Riyami Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown Thymus vulgaris. *Asian Pacific J. Tropic. Biomed*. 2013; 3 (9): 705 - 710.

11. Nasrabadi M, Halimi M and Nadaf M. Phytochemical Screeningand Chemical Composition of Extract of Muscari neglectum. *Middle-East J. Sci. Res.* 2013; 14 (4): 566 - 569.

12. Satheesh Kumar B, Suchetha Kumari N, Vadisha SB, Sharmila K.P and Mahesh Prasad B. Preliminary phytochemical screening of various extracts of punica granatum peel. Whole fruit and seeds. *NUJHS*. 2012; 2 (4): 2249 - 7110.

13. Arora M and Kaur P. Phytochemical screening of orange peel and pulp. *IJRET*. 2013; 12 (2): 517-522.

14. Kolahi M, Mokhtari B and Mirzaee N. A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Pomegranate Extracts Spongy Tissue on Colon Cancer Cells CaCO2. *Jundishapur Sci. Med. J*. 2016; 15 (2): 201-215.

15. Adams RP. Identification of essential oil components by Gas chromography / Mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 2007, 804 p.

16. Khazraei-Moradian S, Andalib A, Ganjalikhani-Hakemi M, Safari Z, Zare A and Kardar Gh. A. The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines. *J. Isfahan. Med. Sch*. 2014; 32 (298): 1-9.

17. Freeman R and King B. A. modification to the N.B.T. test. *Lancet* 1971; 2 (7734): 1154 - 1154.

18. Himes JH, Park K and Styne D. Menarche and assessment of body mass index in adolescent girls. *J. Pediatr*. 2009; 155 (3): 393 - 7.

19. Naderi Hajy Bagher Candy M and Rezaee MB. Primory Phytochemical investigation of Echium amoenium. *Iranian Med. Aromatic Plants Res*. 2004; 20 (3): 377-383.

20. Razzak Mahmood AA and Khadeem EJ. Phytochemical Investigation of Flavonoids Glycoside in the Iraqi *Echinops Heterophyllus*. *Pharm. Globale Int. J. Comprehensive Pharm*. 2013; 9 (4): 1 - 8.

21. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G and Kaur H. Phytochemical screening and Extraction. *Int. Pharm. Sci*. 2011; 1 (1): 98-106.

22. Guo S, Deng Q, Xiao J, Xie B and Sun Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method. *J. Agric. Food. Chem*. 2007; 55: 3134 - 40.

23. Erenler R, Yilmaz S, Aksit H, Sen O. Genc N. Elmastas M and Demirtas I. Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated from Echinops orientalis Trauv. *Rec. Nat. Prod.* 2014; 8 (1): 32-36.

24. Maurya SK, Kushwaha AK, Seth A. Ethnomedicinal Review of Usnakantaka (Echinops echinatus Roxb.). *Pharmacog Rev.* 2015; 9 (18): 149-154.

25. Rajendra S, Bhakuni Yogendra N and Shukla Raghunath S. Thakur, Alkaloids and lipid constituents of *Echinops niveus*. *Phyto*. 1990; 29 (8): 2697-2698.

26. Zarezadeh Mehrizi R A, Emam-Djomeh Z, Shahedi Bagh Khandan M, Loni E Akhavan H R and Biabani J. Identification and quantification of anthocyanins in pomegranate peel extract. *JFST*.

2015; 12 (49): 31-40.

27. Zolfaghari B and Yegdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. *J. Herbal Drugs* 2010; 1 (1): 51-55.

28. Chaudhury Prabir k and Thakur Raghunath s. An Acylated flavone apigenin 7-o-jh-(4”~cwp coumaroyl) glucoside from *echinops echlnatus*. 1986; 25 (7): 1770 - 1771.

29. Hymete A and Kidane A. Screening for Anthelmintic Activity in Two *Echinops spp*. *Ethiop. Pharm. J*. 1991; 9: 67 - 71.

A Comparison Study of Extraction Methods and Mass Spectrum for Compounds in *Echinops dichrous* and Comparison of Effects of Extracts on Colon Cancer Cells CaCo2

Mokhtari B (Ph.D.)[1*], Kolahi M (Ph.D.)[2], Mirzaei N (M.Sc. Student)[3]

[1]- Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Departmen of Organic Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

*Corresponding auther: Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Tel: +98-61-33331045. Fax: +98-61- 33331042

E-mail: bmokhtari@scu.ac.ir

Abstract

Background: Echinops (*Echinops dichorus* L.) from the Asteraceae family is a plant which obtained from the kind of insect activity on some species and generated a compound that is called "mann".

Objective: Identification of the main chemical compounds of plant, solvent and different methods of extracting in extraction of these compounds is evaluated.

Methods: Isolation and identification of extracts constituents is done with GC/MS. In order to evaluate anticancer characteristics, ethanolic and n-Hexane extracts from Manna has been obtained using Maceration and Soxhlet Apparatus methods. The effects of these extracts on CaCO2 cells have been evaluated using MTT and NBT values.

Results: The results of phytochemical investigations showed that saponin, steroids, glycoside cyanogenic, tannin and alkaloid compounds are existence. In the GC-MS analysis of extracting showed that fatty acids and terpenes as major constituents in Manna. Based on results, 27 different components in the Maceration method, 30 different components in the percolation and 10 different components in the Soxhlet Apparatus method were identified. The results of MTT showed the least cell survival value of treated cancerous cell was concerned to ethanolic and n-Hexane-derived extract using Maceration method. NBT test results represent the antioxidant properties of ethanolic and n-Hexane extracts using Maceration method.

Conclusion: The use of ethanol and Percolation are the best approach for extracting organic compounds of Manna, but to extract the fatty acids and terpenes of plants, Soxhlet method is proposed. All the extracts of Echinops (Mann) showed good cytotoxic properties that represent the presence of antioxidant compounds these extracts.

Keywords: Echinops, Mass Spectroscopy, Percolation, Secondary metabolyts, Soxhlet