مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی
۴۸:۱۵ (۱۴۰۴) ۱-۱۵
Journal of Quantum Chemistry and Spectroscopy (JQCS)

مقایسه عصاره های الکلی و آلکالوییدی درخت سرخدار به روش طیف‌سنجی FT-IR

آرزو باغبان[۱] ، محمد مومن هروی[۱*]، سید عبدالرحیم رضایی[۱]، محسن تفقدی[۱] ، محمدرضا بزرگمهر[۱]
[۱]گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ ثبت اولیه:۱۴۰۴/۰۱/۱۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده:۱۴۰۴/۰۳/۲۲ ، تاریخ پذیرش قطعی:۱۴۰۴/۰۴/۱۱

چکیده

ویروس لنفوتروپیکT انسانی نوع یک (HTLV-1) یک رترو ویروس سرطان زا، که تاکنون حدود ۱۵تا ۲۰ میلیون نفر را با سرطان در دنیا آلوده ساخته است. هیچ درمانی برای عفونت HTLV-1 یا بیماری های مرتبط با آن وجود ندارد و کشور ما در منطقه اپیدمیک قرار دارد. برای بررسی ترکیبات فعال زیستی و ساختار مورد نظر از طیف سنجی FTIR برای سرشاخه های درخت سرخداراستفاده شد. استخراج ترکیبات آلکالوییدی درخت سرخدار با استفاده از روش استخراج کلاسیک و استخراج نوین به کمک اولتراسوند (UAE) صورت گرفت. مقایسه بین عصاره های الکلی و آلکالوییدی و روش استخراج با کمک طیف سنجی FTIR بررسی و مقایسه شدند. در نهایت روشUAE به عنوان روش جامع، سریع و غیر مخرب برای مواد فعال عصاره آلکالوییدی انتخاب شد، سپس آنالیز های بیشتر با کروماتوگرافی GC-MS روی عصاه آلکالوییدی منجر به شناسایی ترکیب ($C_{17}H_{13}NO_6$) شد. که بسیار انتظار می رود، بتواند ریزلوله‌هایی که به عنوان اجزای ساختاری یاخته‌ها در تقسیم سیتوپلاسم شرکت می‌کنند را سرکوب کند. مهار ویروسی در مراحل اولیه، از ادامه چرخه آلودگی و تکثیر ویروس جلوگیری می کند. بنابراین عصاره آلکالوییدی استخراجی می تواند به عنوان داروی ضد تکثیر و ضد ویروسی مفید باشد، انتظار می رود با بررسی های بیشتر سلولی و حیوانی بتوان ترکیب ($C_{17}H_{13}NO_6$) را به عنوان عامل ضد ویروسی معرفی کرد.

واژه های کلیدی : ***آلکالوئید، اولتراسونیک، درخت سرخدار، طیف‌سنجی FTIR،کروماتوگرافی GC-MS.***

۱. مقدمه

گیاهان دارویی بسیار مورد توجه محققین حوزه بیوتکنولوژی هستند، زیرا بیشتر صنایع دارویی برای تولید ترکیبات موثره دارویی به گیاهان دارویی وابسته هستند. توانایی پردازش گیاهان برای سنتز مولکول‌های آلی گوناگون متابولیت‌های ثانویه نامیده می‌شود. سازه‌های اسکلت کربنی منحصر به فرد خواص اولیه متابولیت‌های ثانویه گیاه را تشکیل می‌دهند[۱]. درخت سرخدار با نام علمی

***عهده دار مکاتبات:** محمدمومن هروی
نشانی: گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
تلفن:۰۲۳۳۲۳۹۴۲۸۹ **پست الکترونیک:**E-mail:Heravi@iau.ac.ir

T. baccata یکی از سوزنی برگان متعلق به خانواده Taxaceae است. سرخدار درختی است سایه پسند که به صورت مخلوط با سایر گونه های جنگلی، در لایه زیرین جنگل های مرطوب نواحی مدیترانه‌ای و برخی نقاط آسیا مثل شمال ایران یافت می‌شود. ارزش دارویی گونه *T. baccata* به واسطه وجود ماده Paclitaxel با نام تجاری تاکسول Taxolدر برگ های سوزنی آن می باشد. سرخدار به خاطر داشتن ترکیبات تاکسول مهم ترین داروی ضد سرطان (رحم، سینه، تخمدان، پروستات، ریه، سلول‌های سنگفرشی سر و صورت) محسوب می‌شود[۲]. از طرفی در هند و ژاپن به عنوان داروی ضدعفونی کننده و آرام بخش و در درمان آسم، برونشیت، صرع، مشکلات قاعدگی و سوء هاضمه استفاده می‌شود. سرخدارها حاوی ترکیبات سمی متعددی از جمله حداقل ده آلکالوئید، نیتریل (استرهای گلیکوزید سیانوژنیک)، افدرین و اسانس آنها هستند[۳].

HTLV-1 یک ویروس بسیار قدیمی است که به نظر می رسد از هزاران سال پیش بشر به آن مبتلا شده است. به نظر می رسد که این ویروس در طول قرون گذشته از قاره آفریقا به سایر مناطق جهان گسترش پیدا کرده است. ویروس لنفوتروپیکT انسانی نوع یک (HTLV-1) به عنوان یک رترو ویروس سرطان زا، تاکنون حدود ۱۵ تا ۲۰میلیون نفر را با سرطان در دنیا آلوده ساخته است[۴]. عفونت HTLV-1 در نواحی مختلف جهان نظیر ژاپن، جزایر کارائیب، آمریکای مرکزی و جنوبی، آفریقا و برخی از مناطق خاور میانه از قبیل ایران به صورت اندمیک شیوع یافته است. بیماری های اصلی ایجاد شده توسط HTLV-1 شامل لوسمی سلول T بالغین، میلوپاتی وابسته به HTLV-1 یا فلج اسپاستیک مناطق حاره ای و همچنین رنج وسیعی از بیماری های التهابی مزمن می باشد[۵]. در جدیدترین مطالعه که توسط جهاد دانشگاهی مشهد در سال ۱۳۸۸ انجام شد، شیوع عفونت HTLV-1 در جمعیت عمومی مشهد بیش از ۲ درصد اعلام گردید که همچنان عفونت بومی منطقه ما محسوب می‌گردد. در حال حاضر هیچ درمانی برای ریشه کنی عفونت HTLV-1 وجود ندارد[۶].

از آنجایی که ترکیبات فعال زیستی در مقادیر کم در گیاهان سنتز می شوند و در ماتریکس گیاه قرار می‌گیرند، گاهی اوقات با سایر ترکیبات موجود در گیاه کمپلکس می شوند، روش استخراج مناسب آنها بسیار حیاتی است. دو روش اصلی استخراج برای ترکیبات فعال زیستی وجود دارد: روش‌های کلاسیک یا معمولی و روش‌های غیر متعارف. روش های کلاسیک شامل استخراج سوکسله، خیساندن، انفوزیون، نفوذ، هضم، جوشانده، بخار آب و تقطیر با آب است[۷]. از معایب روش های مرسوم می توان به مصرف بیشتر حلال های آلی با خلوص بالاتر، هزینه بیشتر، راندمان استخراج کمتر، زمان پردازش طولانی و دمای بالاتر اشاره کرد. روش‌های غیر متعارف به عنوان فناوری‌های سبز شناخته می‌شوند. از آنجایی که مصرف انرژی و حلال آلی کاهش می یابد، این روش ها می توانند برای محیط زیست مفید تلقی شوند. مهم ترین روش ها استخراج با امواج اولتراسوند، آنزیمی، مایکروویو و پالسی به کمک میدان الکتریکی، استخراج مایع تحت فشار و استخراج سیال فوق بحرانی است [۸]. کیفیت یک عصاره و کارایی یک روش تحت تأثیر عوامل متعددی است: مواد گیاهی و آماده سازی نمونه قبل از استخراج، نوع حلال، تکنیک استخراج، شرایط فیزیکوشیمیایی و غیره. روش های کلاسیک (خیساندن و استخراج سوکسله) معمولاً در آزمایشگاه های تحقیقاتی یا در شرکت های تولیدی کوچک

استفاده می شوند. استخراج به کمک مایکروویو (MAE)، استخراج به کمک اولتراسوند (UAE) و استخراج مایع فوق بحرانی (SFE) به گروهی از روش‌های مدرن تعلق دارند[۹].

عصاره سرخدار، ماتریکس گیاه پیچیده است و استخراج ترکیبی از مواد را تولید می کند. هنگامی که هدف تولید عصاره ای با دامنه باریکی از اثرات فیزیولوژیکی باشد، اولین مرحله آماده سازی و استخراج نمونه حیاتی است. بنابراین، حلال ها و تکنیک استخراج باید با دقت انتخاب شوند. نقش بالقوه روش های استخراج انتخابی برای مراحل بعدی تولید عصاره اهمیت قابل توجهی دارد[۱۰]. سالیانه تعداد زیادی از درختان سرخدار برای استخراج تاکسول، پوسته کامل جدا می‌شود که منجر به مرگ گیاه چند صد ساله می شود[۱۱]. اما سر شاخه ها و برگهای گیاه دور ریخته می‌شوند که در این مطالعه سعی شده بیشتر به ترکیبات استخراج شده به صورت خاص از سر شاخه های گیاه و استفاده از آن به عنوان مهار کننده دارویی در جهت قطع کمتر گیاه و حتی جایگزین کردن آن به جای قطع کامل این گیاه با ارزش و باستانی در جهت حفظ این میراث کهن استفاده گردد. درتعداد محدودی از مطالعات صورت گرفته عصاره کامل سرخدار از نظر دی ترپنوئیدها، لیگنان ها، استروئیدها، استرول ها و بیوفلاونوئیدها هم مورد بررسی قرار گرفته است. اما گزارشی از استفاده به صورت گستره مشابه استخراج تاکسول و تولید دارو از سایر مشتقات گیاه نشده است. در این مطالعه به منظور ارزیابی کامل خواص عصاره های بدست آمده از سر شاخه های گیاه سرخدار و بررسی عملکرد آن بر ویروس HTLV-1 ، استخراج متوالی با استفاده از حلال‌هایی با قطبیت مختلف برای استخراج استفاده شد. برای ارزیابی و مقایسه کارایی روش‌های استخراج به کمک اولتراسوند (UAE) و استخراج تبخیر برگشت پذیر(مارسیون) استفاده شد. برای جداسازی و ارزیابی دقیق مواد فعال بیولوژیکی در عصاره های به دست آمده از آنالیز طیف سنجی جرمی گازی استفاده شد. علاوه بر آن به روش اسپکتروفتومتری تجزیه و تحلیل شدند تا پتانسیل روش برای غربالگری ترکیبات مشخص شود. ظرفیت ضد ویروسی عصاره‌های به‌دست‌آمده با روش های نوری بررسی شد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. جمع آوری گیاه مورد نظر

با موافقت و همکاری اداره کل منابع طبیعی استان گلستان، پنج درخت مختلف از جنگل‌های توسکستان و ارتفاعات گلوگاه واقع در استان گلستان (ایران) به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شد. نمونه توسط مرکز تحقیقات علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، به عنوان *T. baccata* طبقه بندی و تحت شماره (شماره: No: E1358-FUMH) طبقه بندی و تایید شد. این مطالعه با توجه به گونه های در حال انقراض بسیار ارزشمند است، زیرا استفاده از شاخه‌های درخت سرخدار جوان منجر به کمترین آسیب به گیاه اصلی و جلوگیری از مرگ آن می شود. برای به دست آوردن ترکیبات آلکالوئیدی جدید با خواص سمی مشابه در سرشاخه های درختان *T.baccata*جوان هستیم، بنابراین شاخه های درخت جوان جدا شده در آزمایشگاه در دمای اتاق و در سایه خشک شدند. شاخه های خشک شده به قطعات کوچک با اندازه مشابه بریده شدند، سپس به صورت پودرهای ریز آسیاب شدند و در نهایت قبل از انجام

فرآیند استخراج در مکانی خنک و خشک نگهداری شدند تا ترکیبات آلکالوئیدی با خواص سمی مشابه درخت اصلی به دست آید.

۲-۲. استخراج

نحوه دقیق استخراج به طور طبیعی به بافت و محتوای آب ماده گیاهی استخراج شده و نوع ماده ای که جدا می‌شود بستگی دارد. الکل، در هر صورت، یک حلال همه منظوره خوب برای استخراج اولیه است. بنابراین، ترکیبات را می‌توان در مخلوط کن خیس کرد و در نتیجه فیلتر شد. با این حال، این فرآیند تنها در صورتی واقعا ضروری است که استخراج جامع انجام شود. موفقیت استخراج مواد از بافت سبز با الکل به عنوان حلال به طور غیر مستقیم با حذف کلروفیل با استفاده از یک حلال آلی قبل از استخراج مواد مرتبط است. در این مطالعه، عصاره با استفاده از تکنیک های معمول استخراج مطابق با مواد مورد نظر تهیه شد.

برای این منظور، دو روش استخراج انتخاب شد، استخراج ترکیبات از برگ و پوست گیاه جداگانه تعیین و اثرات آنها مقایسه گردید. روش های استخراج مورد مطالعه به شرح زیر است:

الف)استخراج تبخیر برگشت پذیر(مارسیون)

ب)استخراج در حمام اولتراسونیک (UAE)

۲-۳. استخراج تبخیر برگشت پذیر

روش شیمیایی کلاسیک برای به دست آوردن ترکیبات آلی از بافت خشک شده گیاه (چوب تنه اصلی، دانه های خشک، ریشه، برگ) استخراج مداوم مواد پودری در دستگاه سوکسله با طیف وسیعی از حلال ها صورت میگیرد که با اتر، نفت و کلروفرم (برای جداسازی) شروع می شود. (لیپیدها و ترپنوئیدها) و سپس استفاده از الکل و اتیل استات (برای ترکیبات قطبی تر). این روش برای استخراج ترکیبات از نمونه های در مقیاس گرم مناسب است [۱۲]. با این حال، استفاده از این روش به ندرت منجر به جداسازی کامل اجزای تشکیل دهنده می شود و ممکن است همان ترکیبات (به نسبت های مختلف) در چند بخش بازیافت شوند. عصاره با فیلتراسیون شفاف شده و سپس در خلاء غلیظ می شود. این روش معمولاً در یک اواپراتور چرخشی انجام می‌شود که محلول‌های حجیم را تا حجم‌های کوچک، بدون ضربه، در دمای بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد متمرکز می‌کند.

پودر شاخه درخت خشک شده (۸۰ گرم) در ۷۰۰ میلی لیتر متانول در یک بشر ریخته شد و با فویل آلومینیومی پوشانده شد. مخلوط به مدت سه روز در جای خنک و دور از نور نگهداری شد. پس از ۷۲ ساعت، مخلوط به داخل بشر به بالون منتقل شد و سپس با استفاده از حمام آب گرم در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ ساعت رفلاکس شد. مخلوط برای جداسازی محلول (فاز متانول) فیلتر شد و سپس در اواپراتور چرخشی در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد خشک شد. پودر حاصل در ظرف مناسب در دمای انجماد برای مراحل بعدی نگهداری شد.

٤-۲. استخراج در حمام اولتراسونیک

پودر شاخه درخت خشک شده (۸۰ گرم) در ۷۰۰ میلی لیتر متانول در یک بشر ریخته شد و با فویل آلومینیومی پوشانده شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳ ± ۴۰ درجه سانتیگراد تحت درمان اولتراسونیک قرار گرفت. مخلوط از فیلتر عبور داده شد و محلول حاصل کاملاً جدا شد. محلول در اواپراتور چرخشی در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد خشک شد و پودر ریز به دست آمد. پودر به دست آمده در یک ظرف مناسب در یخچال نگهداری شد[۱۳].

۵-۲. خالص سازی آلکالوییدی

مقایسه دو روش برای تهیه عصاره ها نشان داد که استخراج با حمام اولتراسونیک کارآمدتر از روش استخراج تبخیر برگشت پذیر است. مزایای روش استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک، زمان استخراج، تعداد مراحل و دمای فرآیند کمتری را نسبت به روش سنتی با راندمان استخراج بالاتر نشان می‌دهد. برای این منظور، برگ ها و شاخه های گیاه را قبل از انتقال به حمام اولتراسونیک در یک حلال آلی مانند دی کلرومتان، استونیتریل، هگزان، کلروفرم، استون و اتیل استات ریخته شد [۱۴].

استخراج و خالص سازی بر روی ستون های جاذب سیلیکاژل انجام شد و محلول سپس در اواپراتور چرخشی در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد خشک شد تا پودر ریز تهیه شود. وجود آلکالوئیدها در عصاره ها با معرف هایی مانند واگنر، دراجندورف و اسید پیکویک از طریق تشکیل رسوب و تغییر رنگ نمونه تایید شد. علاوه بر این، عصاره آلکالوئید با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) برای اطمینان از ساختار و ترکیب عصاره‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت [۱۵].

٦-۲. طیف سنجی *IR*

طیف FTIR عصاره های جامد با استفاده از طیف سنج مدل Perkin Elmer Spectrum 100 (USA) بر اساس تهیه قرص KBr (تکنیک گلوله KBr) در محدوده عدد موجی ۴۰۰-۴۰۰۰ cm^{-1} به دست آمد[۱۶]. مقایسه طول موج ماکزیمم برای عصاره های مختلف از جهت نوع عصاره گیری در شکل ۱تا ۴ نشان داده شده است. همچنین، حداکثر پیک ها به صورت مقایسه ای در جدول ۱ برای عصاره های مختلف به دست آمده که با طول موج ماکزیمم سموم استاندارد نیز مقایسه شده است.

۷-۲. کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (*GC-MS*)

یک کروماتوگرافی گازی GC-MS سری Varian CP-3800 همراه با یک طیف‌سنج جرمی سه‌قطبی چهارقطبی Varian 1200 L و یک نمونه‌گیر خودکار CTC COMBI PAL (Varian Inc.)، Palo Alto برای تمام آنالیز نمونه‌ها استفاده شد. عصاره ها با یک ستون مویین سیلیکا ذوب شده VF-5 (واریان ۳۰ متر،۰/۲۵ میلی متر، ۰/۲۵ میکرومتر) و قبل از آن یک ستون محافظ غیرفعال شده (۵ متر ۰/۲۵ میلی متر در روز، Restek Corp) جدا شدند. فشار سر ستون روی ۱۳/۲ psi تنظیم شد و سرعت جریان ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه با استفاده از He به عنوان گاز حامل بود. دمای ستون به صورت زیر برنامه ریزی شد: دمای اولیه ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه و به ۱۳۰ درجه سانتیگراد در ۱۰ درجه سانتیگراد در دقیقه افزایش یافت، در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دقیقه به ۲۳۰

درجه سانتیگراد افزایش یافت و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد در دقیقه به ۲۹۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت. به مدت ۵/۵ دقیقه کل زمان اجرا ۴۰ دقیقه بود. دمای انژکتور در ۲۸۰ درجه سانتیگراد حفظ شد و حجم تزریق در حالت بدون تقسیم ۰/۱ میکرولیتر بود. دمای منبع یون و خط انتقال به ترتیب ۲۴۰ و ۳۰۰ درجه سانتیگراد بود. ولتاژ ضریب الکترون با تنظیم خودکار روی ۱۴۰۰ ولت تنظیم شد. آرگون به عنوان گاز برخورد برای تمام آزمایشات MS/MS استفاده شد و فشار در سلول برخورد در ۱/۸ Torr تنظیم شد. یون پیش‌ساز تعیین‌شده به انتقال یون محصول و انرژی‌های برخورد مربوطه در جدول ۲-۳ فهرست شده‌اند. ترکیبات به‌دست‌آمده از عصاره‌های خالص شده در ۱ میلی‌لیتر دی کلرومتان به‌مدت ۲ دقیقه گردابی شدند و سپس در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز آلی جدا شد و ۱/۰ میکرولیتر از آن برای شناسایی ترکیبات به GC-MS تزریق شد. [۱۷] که در (شکل ۵)قابل مشاهده است.

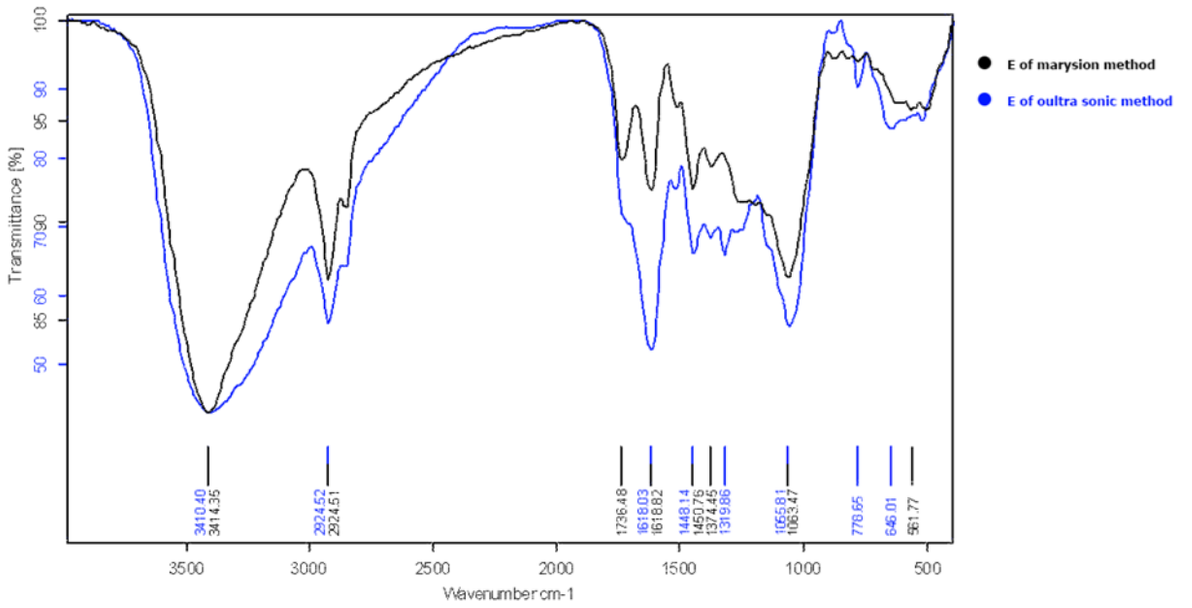
۳. نتایج و بحث

۱-۳. طیف سنجی IR

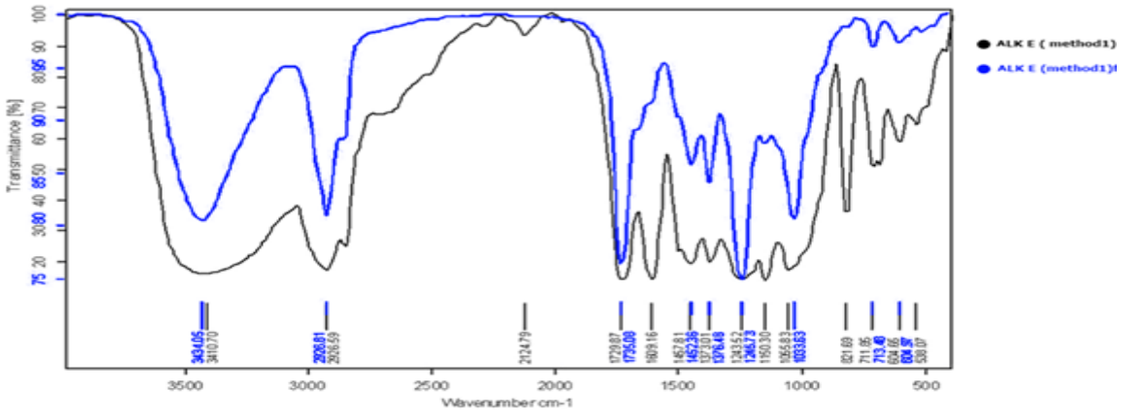
طیف FTIR عصاره های جامد با استفاده از طیف سنج مدل PerkinElmer Spectrum 100 (USA) با تهیه قرص های KBr (تکنیک گلوله KBr) در محدوده عدد موجی ۴۰۰-۴۰۰۰ سانتی متر در ۱ به دست آمد. طیف های حاصل در شکل ۵ ارائه شده است و پیک های برجسته برای عصاره های مختلف درجدول ۱ مقایسه شده است[۱۸].

تجزیه و تحلیل نشان داد که ارتعاش کششی نامتقارن O-H گروه کربوکسیل در موقعیت ارتو به گروه NO_2 در حدود cm^{-1} ۳۴۳۱ ظاهر شد. این تغییر به یک عدد موج بالاتر در مقایسه با ارتعاش O-H گروه کربوکسیل ممکن است به ماهیت الکترون گیر گروه نیترو و تاثیر آن بر استحکام پیوند کووالانسی O-H در گروه کربوکسیل نسبت داده شود. این مقدار کمی بالاتر از سایر ارتعاشات کربوکسیلیک OH ($\upsilon = 3317\ cm^{-1}$) است که در قسمت ۳-نیتروفتالیک اسید وجود دارد. علاوه بر این، نوارهای ۳۱۷۰ و ۱۶۲۹ cm^{-1} به ترتیب با ارتعاش کششی N-H در قسمت ۲-aminopyrimidine و ارتعاش کشش کربونیل در گروه کربوکسیل از نصفه ۳-nitro phthalic اسید مرتبط هستند. نوارهای قوی در ۱۶۲۹ و ۱۳۷۷ cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات نامتقارن و متقارن گروه NO_2 در قسمت ۳-نیتروفتالیک اسید نسبت داده می شود. علاوه بر این، نوارهای قوی در cm^{-1} ۱۱۰۳ و ۱۲۴۱ با ارتعاش کششی C-N در قسمت پیریمیدین مطابقت دارد. فرض بر این است که دو نوار ارتعاشی در محدوده cm^{-1} ۱۰۳۰ تا ۸۰۰، ارتعاشات خمشی درون صفحه و خارج از صفحه حلقه‌های معطر هستند، از جمله حلقه بنزن در قسمت اسید ۳-نیتروفتالیک و حلقه آروماتیک هتروسیکلیک در به ترتیب قسمت پیریمیدین. نوار در cm^{-1} ۷۰۰ نشان دهنده وجود کشش C-N پیوند گروه NO_2 به حلقه بنزن در قسمت ۳-نیتروفتالیک اسید است. وجود اسید ۳-نیتروفتالیک و نصفه ۲-آمینو پیریمیدین در عصاره ها نشان می دهد که اکثر اجزای این عصاره ها آلکالوئید هستند (شکل ۱-۴).

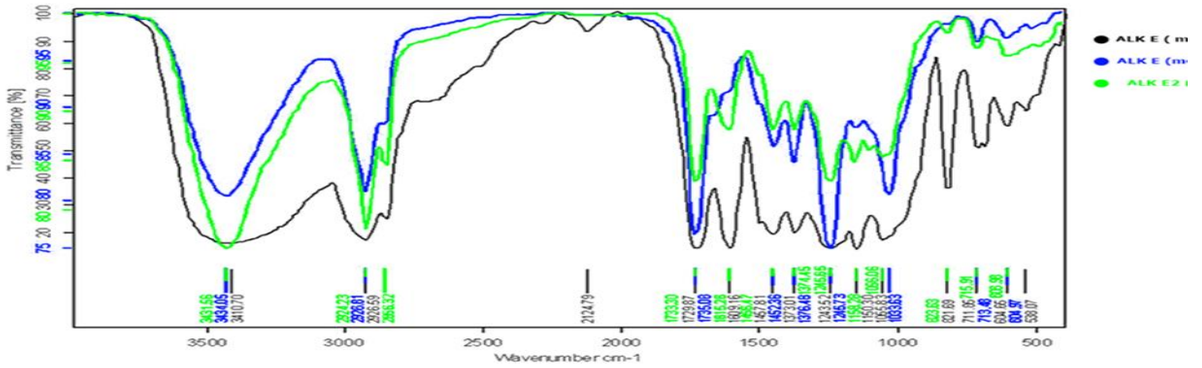
درشکل ۱ مقایسه کیفیت عصاره گیری و مقایسه روش استخراج بین روش کلاسیک مارسیون و روش جدید حمام اولتراسونیک می باشد. با توجه به خروج پیک های ماکزیمم در نواحی مورد نظر در اسپکتروسکوپی IR استخراج بهتر و پیک های شارپ در عصاره گیری به روش اولتراسونیک مشاهده می‌شود. بنابراین برای بقیه عصاره گیری های الکلی و آلکالوییدی از روش حمام اولتراسونیک استفاده شد. در شکل۲ مقایسه عصاره گیری الکلی بین برگ های جدا شده و پوسته گیاه انجام شد که با توجه به نواحی خروج و مقایسه پیک ها با سموم استاندارد در جدول ۱ عصاره استخراج شده از برگ ها قسمت بیشتری از سموم را شامل می‌شود اما پیکهای شارپ در آن دیده نمی‌شود، در صورتیکه در پوسته گیاه سموم کمتر اما با درصد خلوص بیشتری قابل مشاهده است. در شکل ۳ عصاره گیری الکلی در برگ و پوسته با خالص سازی دو مرحله ای آلکالوییدی مقایسه شد. عصاره الکالوییدی در نواحی خروج به عصاره الکلی پوسته بسیار شبیه تر است اما در نقاط خاص بسیار شارپ تر و اختصاصی تر می باشد. در شکل ۴ با توجه به اسپکتروسکوپی IR به بررسی ومقایسه دو روش خالص سازی برای استخراج آلکالویید ها پرداختیم که با تاکسول خالص مقایسه شد، با توجه به نواحی پیک ها روش اول خالص سازی گستره بیشتری از سموم را شامل می‌شود اما درصد کمتری دارند زیرا پیک ها پهن و کوتاه می باشند. در روش دوم خالص سازی پیک ها بسیار شارپ تر در نواحی ۲۹۲۶،۱۷۲۹،۱۲۵۹ است که نشان دهنده مقادیر بیشتری از سموم تاکسین A,B است حتی بیشتر از تاکسول خالص. همچنین در نواحی ۷۱۳،۱۵۵۵۰،۱۶۰۹که بقیه سموم را شامل می‌شود تاکسول دارای پیک های بسیار شارپ تر از عصاره آلکالوییدی می باشد.



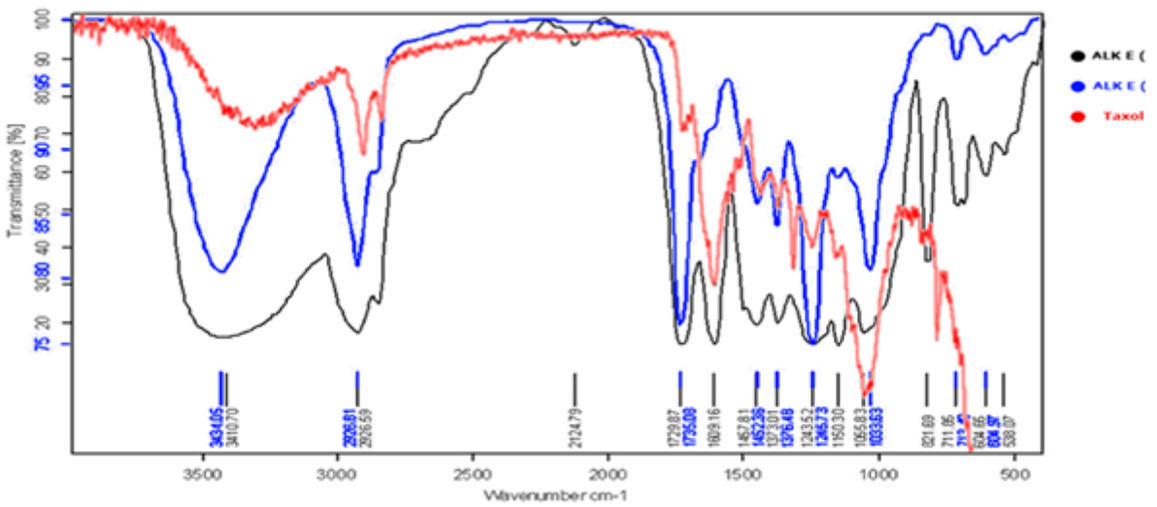
شکل ۱. مقایسه کیفیت عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیا هی توسط دو روش عصاره گیری استخراج تبخیر برگشت پذیر (Marysion) و روش حمام اولتراسونیک با استفاده از طیف‌سنجی IR، خطوط سیاه نشان دهنده روش مارسیون و خطوط آبی عصاره گیری به روش حمام اولتراسونیک می باشد.



شکل۲. مقایسه کیفیت عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیا هی توسط دو روش عصاره گیری استخراج تبخیر برگشت پذیر (Marysion) و روش حمام اولتراسونیک با استفاده از طیف‌سنجی IR، خطوط سیاه نشان دهنده روش مارسیون و خطوط آبی عصاره گیری به روش حمام اولتراسونیک می باشد.



شکل۳. مقایسه کیفیت استخراج عصاره های استخراج شده از برگ و پوست سرخدار با استفاده از طیف سنجی IR و رنگ آبی نشان دهنده عصاره استخراجی از پوسته درخت سرخدار و رنگ سیاه عصاره استخراج شده از برگ در مقایسه با عصاره آلکالوئیدی خالص شده با استفاده از روش دوم که با رنگ سبز قابل مشاهده است.



شکل ٤. مقایسه کیفیت استخراج عصاره های استخراج شده خالص شده با هدف استخراج آلکالوییدی با استفاده از طیف سنجی IR رنگ آبی نشان دهنده عصاره استخراجی آلکالوییدی روش ۱ در مقایسه با عصاره آلکالوئیدی خالص شده با استفاده از روش ۲ که با رنگ مشکی قابل مشاهده است،رنگ قرمز نشان دهنده سم تاکسول خالص است که در نقاط کلیدی تایید کننده روش خالص سازی ۱و۲ می باشد.

جدول۱. مقایسه طول موج ماکزیمم پیک ها در طیف سنجی IR در عصاره های استخراج شده با سموم استاندارد موجود در درخت سرخدار.

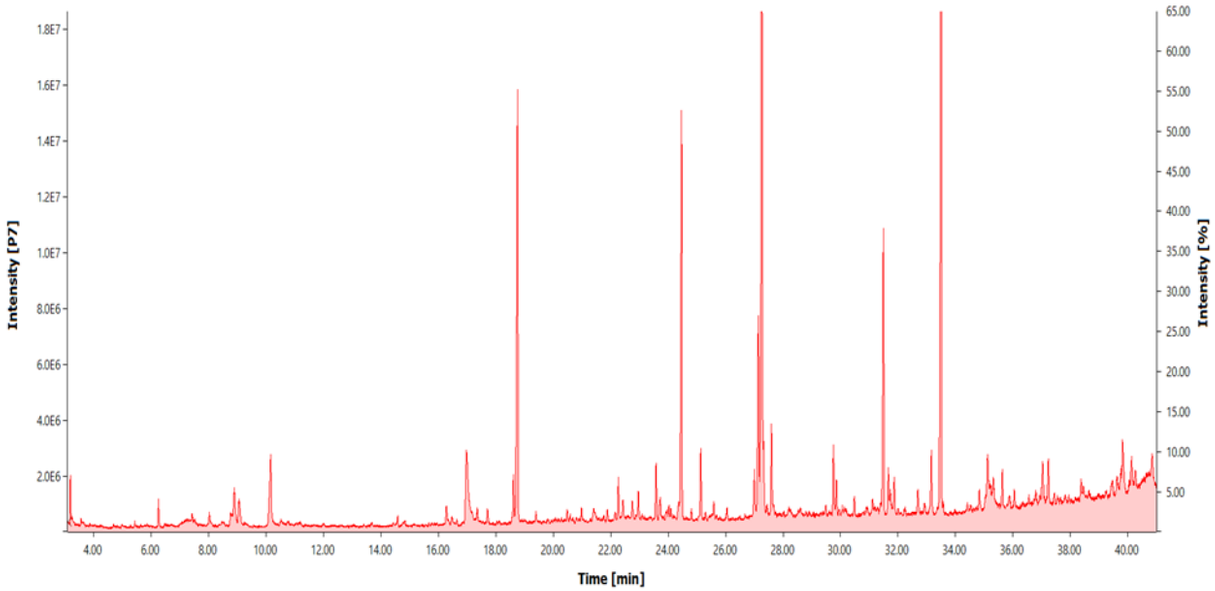
ترکیبات	طول موج ماکزیمم	فرمول شیمیایی
Taxin A	(1780-1250) λ	$C_{35}H_{47}NO_{10}$
2-Deacetyl taxin A	(1734-1691) λ	$C_{35}H_{45}NO_{9}$
TaxinB	(3578-1730) λ	$C_{33}H_{45}NO_{8}$
Iso Taxin B	--------	$C_{33}H_{45}NO_{8}$
Alcohol Extract	(1055-1618-292-3410) λ	--------
Alkaloid Extract	(1241-1732-1629-3431) λ	--------
Leaves Alcohol Extract	(1243-1729-3410) λ	--------
Bark Alcohol Extract	(1245-1735-3434) λ	--------

۲-۳. کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS)

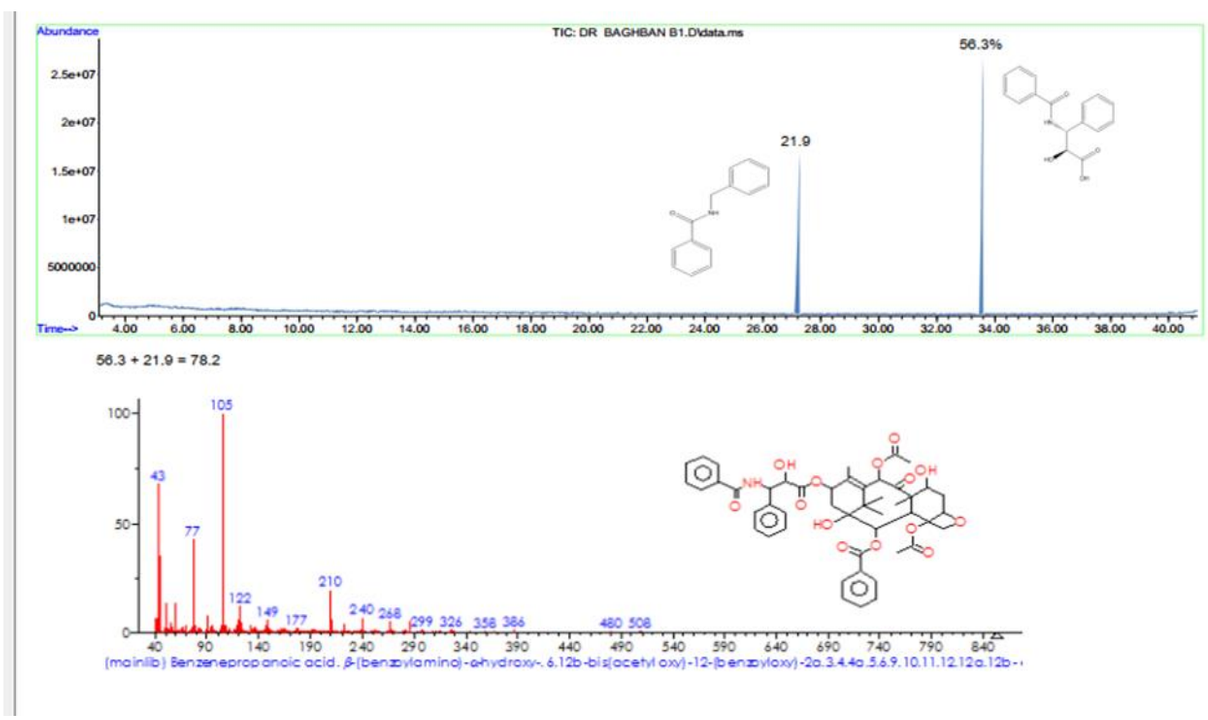
کروماتوگراف به سه کتابخانه (NIST08، wiley7n.l، PMW_Tox3.l) مجهز شد و شناسایی ترکیبات با استفاده از این پایگاه‌های داده انجام شد. [۱۹]ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره آلکالوئید Taxus baccata توسط GC-MS شناسایی شدند و ۴۸ پیک را نشان دادند (شکل ۱). بیشترین درصد استخراج، تقریباً ۲۷/۶۱ درصد از عصاره خروجی، شامل نمک ها، اسیدهای چرب استر گیاهان (تری ترپن ها)، در حالی که ۲۵/۵۱ درصد عصاره را استرهای اسید فتالیک تشکیل می داد. بیشترین درصد استخراج حدود ۲۷/۶۱ درصد از عصاره را اسیدهای چرب استر نمک گیاهان (تری ترپن ها) و ۲۵/۵۱ درصد عصاره را استرهای اسید فتالیک تشکیل می دهند (جدول ۲) سایر خروجی های مهمی که فعالیت بیولوژیکی در مهار سلول های سرطانی و ویروس ها دارند در مقالات مشابه بسیار بررسی شدند.

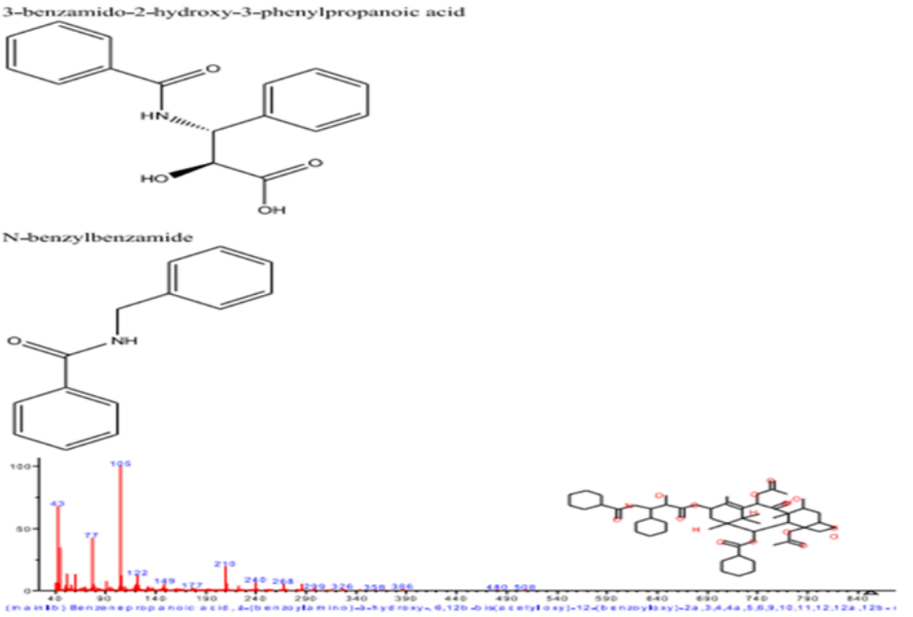
در این مطالعه تمرکز اصلی ما روی بدست آوردن عصاره الکالوییدی و مواد نیتروژن دار است که حدود ۳۰ درصد از ترکیبات موجود در عصاره را شامل میشود در بین ترکیبات بدست آمده ترکیب

2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-8-methoxy-3-nitro-2H-chromene(C17H13NO6) از ترکیبات موجود در عصاره آلکالوئید با فعالیت بیولوژیکی که ترکیبات شیمیایی توسط GC-MS بر روی عصاره آلکالوئیدی درخت سرخدار شناسایی شد که ساختار آن قابل مشاهده است .(شکل ۶)



شکل۵. نمودار کروماتوگرافی GC-MS مواد استخراجی حاصل از عصاره آلکالوییدی درخت سرخدار، برای هر ترکیب شناسایی‌شده، زمان ماند (RT) منطقه اوج درصد به‌دست آمد.





شکل ٦.ترکیب 2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-8-methoxy-3-nitro-2H-chromene (C17H13NO6) از ترکیبات موجود در عصاره آلکالوئید با فعالیت بیولوژیکی که ترکیبات شیمیایی توسط GC-MS بر روی عصاره آلکالوئیدی درخت سرخدار شناسایی شدند.

جدول ۲. مقایسه درصد خروج ترکیبات استخراجی در طیف سنجی جرمی /گازی از لحاظ نوع ترکیبات موثره گیاهی

بررسی نوع ترکیبات استخراجی در طیف سنجی جرمی /گازی	ترکیبات الکلی	ترکیبات آروماتیک	ترکیبات آلکالوییدی	ترکیبات نیتروژن گوگرددار	اسیدهای چرب استروئیدی
عصاره آلکالوییدی خالص شده از روش دوم	4.82	15.23	24.59	4.34	45.8

٤. نتیجه گیری

استخراج با کمک اولتراسونیک فناوری است که از حمام یا کاوشگر اولتراسونیک برای تولید حباب‌های کاویتاسیون استفاده می‌کند. UAE دارای مزایای عملکرد ساده، مصرف حلال کم، زمان استخراج کوتاه و دمای فرآیند پایین است. بنابراین کاربردهای بالقوه ای در استخراج گیاهان دارد. علاوه بر این، کاویتاسیون به راحتی تحت تأثیر خواص فیزیکی حلال، مانند ویسکوزیته، کشش سطحی، و فشار بخار اشباع آن قرار می گیرد. بنابراین، انتخاب حلال های مناسب برای UAE از اهمیت ویژه ای برخوردار است.که این مزایا باعث شد که ما برای استخراج آلکالوییدی از روش استخراج اولتراسونیک با حلال های آلی استفاده کنیم وهمچنین

کیفیت روش با توجه به FTIR نیز تایید شد[۲۰]. اثر انگشت و احراز هویت هر گونه گیاهی به دلیل ترکیب مولکولی متمایز خود دارای اثر انگشت طیفی FTIR منحصر به فرد است. این اثر انگشت می تواند برای احراز هویت مواد گیاهی و تشخیص تقلب یا جایگزینی استفاده شود. به طور خلاصه، طیف‌سنجی FTIR یک روش جامع، سریع و غیر مخرب برای آنالیز مواد فعال گیاهی ارائه می‌دهد. توانایی آن در شناسایی گروه های عاملی، احراز هویت گونه ها، ارزیابی کیفیت و کمی سازی ترکیبات فعال، آن را به ابزاری ارزشمند در تجزیه و تحلیل داروهای گیاهی تبدیل می کند[۲۱, ۲۲]. شناسایی و مقایسه از بیومولکول ها طی دهه ۱۹۴۰ طیف سنجی IR انجام شد. تبدیل به یک ابزار پذیرفته شده برای شخصیت پردازی شوداز بیومولکول‌ها، و با پیشرفت تکنولوژی، ثابت شده است که FTIR در آن مفید است بررسی تغییرات ترکیبات بدست آمده از عصاره آلکالوئیدی T. baccata به دقت از جهت تعیین خواص زیستی موثر و دارویی در نقاط مهم و پیک های شارپ از جهت گروهای عاملی با استفاده از طیف سنجی IR فقط برای توضیح ساختاری بررسی شد.[۲۳] ترکیبات جدا شده از ماتریس های گیاهی عصاره از گیاه T. baccata همچنان منجر به ارائه سرنخ های جدید و مهم در دارویی شد. اهداف دارویی از جمله سرطان، HIV ایدز، آلزایمر، مالاریا، عفونت و در تعدادی رویداد برای کشف مواد دارویی جدید و تداخل یک دارو با هدف بیولوژیکی واثرات دارویی باید در نظر گرفته شود، که شامل جذب، توزیع، متابولیسم و حذف است. به منظور ارزیابی اهمیت هر یک از این عوامل در دارو، هر دو ویژگی ساختاری و فیزیکوشیمیایی دارو در نظر گرفته می شود. همچنین در بررسی گروه های مهم در سیستم های بیولوژیکی، خواصی مانند الکترواستاتیک پیوندها، پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای واندروالس و همچنین اثرات مربوط به انتقال الکترونو اثرات آبگریز، از اهمیت بالایی برخوردار هستند[۲۴].

بررسی های انجام شده FTIR و آنالیز کروماتوگرافی GC-MS بر روی عصاره آلکالوییدی استخراج شده از گیاه سرخدار در مقایسه با سموم استاندارد تایید کننده ترکیبات آلکالوییدی در عصاره بود. ایندول آلکالوئیدها، متابولیت های ثانویه با گستردگی وسیع می باشند که فعالیت دارویی بسیار متنوعی دارند. ایندول آلکالوئیدها و مشتقات آنها به طور گسترده در آزمایشات کلینیکی استفاده شده اند. مطالعات گسترده های فعالیت زیستی متنوع ایندول آلکالوئیدها از فعالیت ضدباکتریایی گرفته تا فعالیت ضدالتهابی و فعالیت ضدتوموری را نشان داده اند. علاوه بر این، ایندول آلکالوئیدها یک گروه امید بخش و فعال از بیومولکول ها هستند که فعالیت زیستی، سیتوتوکسیکی، ضد ویروسی، ضد انگلی و ضد التهابی را پوشش می دهند[۲۵]. آلکالوئیدها با اتصال به جایگاه اختصاصی شان در ساختار توبولین ها، از فروپاشی (ازهم پاشی) میکروتوبول ها جلوگیری می‌نمایند همچنین می‌توانند هم به توبولین های محلول در سیتوپلاسم و هم به توبولین های موجود در ساختار میکروتوبولها متصل گردد[۲۶]. که باعث ناهنجاری در رشد سلولی است که باعث فعال شدن فرایند آپپتوز در سلول می‌گردد. به‌علاوه، آزمایش‌های بالینی به تأیید کاربرد بالقوه T. baccata در درمان سرطان انسان است. علاوه بر این، اصلاح مصنوعی یا نیمه مصنوعی ترکیبات جدا شده، به‌ویژه آلکالوئیدهای تاکسان، می‌تواند به افزایش خواص دارویی آنها و بهینه‌سازی عملکرد آنها به عنوان یک ضد سرطان کمک کند[۲۷]، اما در این مطالعه هدف از مهار

میکروتوبول ها، مهار ویروسی در مراحل اولیه به شمار می‌رود و با مهار آن می‌توان از ادامه چرخه آلودگی این ویروس جلوگیری بعمل آورد. بنابراین عصاره آلکالوییدی استخراجی می تواند به عنوان تولید داروی ضد تکثیر و ضد ویروسی مفید باشد، زیرا هیچ درمانی برای عفونت HTLV-1 یا بیماری های مرتبط وجود ندارد. انتظار می رود ترکیب 2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-8-methoxy-3-nitro-2H-chromene ($C_{17}H_{13}NO_6$) که توسط کروماتوگرافی GC-MS بدست آمده است بتواند به صورت اختصاصی به عنوان عامل ضد ویروسی عمل کند[۲۸]. زیرا در مطالعات مشابه عملکرد ضد ویروسی ترکیبات مشابه آن به صورت تعدیل کننده های تعامل پروتئین ،مهار کننده ویروس سرخک RNA وابسته به RNA پلیمراز فعالیت پیچیده HTS Single[۲۹] و سنجش اولیه با توان بالای بیوشیمیایی برای شناسایی فعال‌کننده‌های لیگاز (فعال‌کننده‌های GPR151) اثبات رسیده است[۳۰].

این مطالعه انتخاب ($C_{17}H_{13}NO_6$) به‌عنوان کاندید بالینی برای درمان ویروس HTLV-1 نشان می‌دهد که می‌تواند تمام سنتز RNA ویروسی را بر اساس مطالعات مشابه در ویروس های RNA دار خاموش کند را بر می گزینند. اگرچه تعدادی از مسائل مهم باید قبل از کاربرد بالینی احتمالی آن مورد توجه قرار گیرد.

۵. مراجع

[1] Tiwari, R., and Rana, C. (2015) Plant secondary metabolites: a review, *International Journal of Engineering Research and General Science 3*, 661-670.

[2] Srinivasa Reddy, P., Jamil, K., Madhusudhan, P., Anjani, G., and Das, B. (2001) Antibacterial activity of isolates from Piper longum and Taxus baccata, *Pharmaceutical biology 39*, 236-238.

[3] Sharma, A., Sharma, A., Thakur, S., Mutreja, V., and Bhardwaj, G. (2022) A brief review on phytochemistry and pharmacology of Taxus baccata L, *Materials Today: Proceedings 48*, 1569-1574.

[4] Gessain, A., and Cassar, O. (2012) Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection, *Frontiers in microbiology 3*, 388.

[5] Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007) Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation, *Nature Reviews Cancer 7*, 270-280.

[6] Hedayati-Moghaddam, M., Fathimoghadam, F., Mashhadi, I. E., Soghandi, L., and Bidkhori, H. (2011) Epidemiology of HTLV-1 in Neyshabour, northeast of Iran, *Iranian Red Crescent Medical Journal 13*, 424.

[7] Gupta, A., Naraniwal, M., and Kothari, V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts, *International journal of applied and natural sciences 1*, 8-26.

[8] Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhare, M. S., Moharil, M. P., and Khelurkar, V. C. (2017) Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6*, 32-36.

[9] Farooq, S., Mir, S. A., Shah, M. A., and Manickavasagan, A. (2022) Extraction techniques, In *Plant extracts: Applications in the food industry*, pp 23-37, Elsevier.

[10] Yahya, N. A., Attan, N., and Wahab, R. A. (2018) An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds, *Food and bioproducts processing 112*, 69-85.

[11] Spjut, R. W. (2007) Taxonomy and nomenclature of Taxus (Taxaceae), *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 203-289.

[12] Niseteo, T., Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., and Budeč, M. (2012) Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition, *Food chemistry 134*, 1870-1877.
[13] Vinatoru, M., Mason, T., and Calinescu, I. (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials, *TrAC Trends in Analytical Chemistry 97*, 159-178.
[14] Tatzber, M., Stemmer, M., Spiegel, H., Katzlberger, C., Haberhauer, G., and Gerzabek, M. (2007) An alternative method to measure carbonate in soils by FT-IR spectroscopy, *Environmental Chemistry Letters 5*, 9-12.
[15] Jonsson, P., Gullberg, J., Nordström, A., Kusano, M., Kowalczyk, M., Sjöström, M., and Moritz, T. (2004) A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS, *Analytical Chemistry 76*, 1738-1745.
[16] Stuart, B. H. (2004) *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons.
[17] Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., and Kadhim, M. J. (2017) A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants, *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research 9*, 81-85.
[18] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., and Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics sonochemistry 34*, 540-560.
[19] Kumar, J. K., and Prasad, A. D. (2011) Identification and comparison of biomolecules in medicinal plants of Tephrosia tinctoria and Atylosia albicans by using FTIR, *Romanian Journal of Biophysics 21*, 63-71.
[20] Zou, H. B., Yang, G. S., Qin, Z. R., Jiang, W. Q., Du, A. Q., and Aboul-Enein, H. Y. (2005) Progress in quality control of herbal medicine with IR fingerprint spectra, *Analytical letters 38*, 1457-1475.
[21] Rijs, A. M., and Oomens, J. (2015) *IR spectroscopic techniques to study isolated biomolecules*, Springer.
[22] Shukla, U. (2024) Fourier transform infrared spectroscopy: A power full method for creating fingerprint of molecules of nanomaterials, *Journal of Molecular Structure*, 140454.
[23] Singh, T. P., and Singh, O. M. (2018) Recent progress in biological activities of indole and indole alkaloids, *Mini reviews in medicinal chemistry 18*, 9-25.
[24] Di Sotto, A., Valipour, M., Azari, A., Di Giacomo, S., and Irannejad, H. (2023) Benzoindolizidine alkaloids tylophorine and lycorine and their analogues with antiviral, anti-Inflammatory, and anticancer properties: promises and challenges, *Biomedicines 11*, 2619.
[25] Kochkin, D. V., Demidova, E. V., Globa, E. B., and Nosov, A. M. (2023) Profiling of taxoid compounds in plant cell cultures of different species of yew (Taxus spp.), *Molecules 28*, 2178.
[26] Schul, W., Chen, Y.-L., Yin, Z., Keller, T., and Shi, P.-Y. (2010) An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus, *Antiviral Research 86*, A24-A25.
[27] Cox, R. M., Sourimant, J., Govindarajan, M., Natchus, M. G., and Plemper, R. K. (2021) Therapeutic targeting of measles virus polymerase with ERDRP-0519 suppresses all RNA synthesis activity, *PLoS pathogens 17*, e1009371.
[28] Jiang, B.-C., Zhang, W.-W., Yang, T., Guo, C.-Y., Cao, D.-L., Zhang, Z.-J., and Gao, Y.-J. (2018) Demethylation of G-protein-coupled receptor 151 promoter facilitates the binding of Krüppel-like factor 5 and enhances neuropathic pain after nerve injury in mice, *Journal of Neuroscience 38*, 10535-10551.

Comparison of alcoholic and alkaloid extracts of *T. baccata* using FT-IR spectroscopy

Arezoo Baghban[1], Mohammad Momen Heravi[1*], S.A. Rahim Rezaee[1],
Mohsen Tafaghodi[1], Mohammadreza Bozorgmehr[1]
[1]*Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*

Submited: 08 April 2025, Revised: 12 June 2025, Accepted: 02 July 2025

Abstract

Human lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a carcinogenic retrovirus that has caused cancer in 15-20 million people worldwide. There is no cure for HTLV-1 infection or related diseases, and our country is in an epidemic zone. FTIR spectroscopy was used for the tops of yew tree branches to investigate bioactive compounds and the desired structure. The extraction of alkaloid compounds of yew tree was done using the Marsion technique and extraction with the help of ultrasound (UAE). The comparison of alcoholic and alkaloid extracts and the extraction method with the help of FTIR spectroscopy were investigated and compared. The UAE method was chosen as a comprehensive, rapid and non-destructive method for the active ingredients of alkaloid extract, then further analysis by GC-MS chromatography on alkaloid wood led to the identification of the compound ($C_{17}H_{13}NO_6$). As expected, it can suppress microtubules. Viral inhibition in the early stages prevents the continuation of the cycle of infection and replication of the virus. Therefore, the extracted alkaloid extract could be useful as an antiproliferative and antiviral drug. The compound ($C_{17}H_{13}NO_6$) is expected to be introduced as an antiviral agent with further cellular and animal research.

Keywords: *Alkaloids; Ultrasonics; T. baccata; FTIR spectroscopy; GC-MS chromatography.*