بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی ترکیبات طبیعی موجود در اسانس و عصارهٔ گیاه دارویی *Epilobium hirsutum* L. به روش‌های مختلف کروماتوگرافی و طیف سنجی

فاطمه السادات تفریشی[۱]، محبوبه طاهرخانی[۲*]

[۱] دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه آموزشی فیتوشیمی و شیمی فناوری اسانس، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه شیمی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۲/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۸/۱۳

چکیده

جنس *Epilobium* در طب سنتی دارای خواص دارویی ضد التهابی، ضد اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد تومـوری، ضـد درد و ضد آندروژنیک می‌باشد. در این تحقیق اندام‌های هوایی گونه بید علفـی کرکـی .*Epilobium hirsutum* L در مرحلـهٔ گلـدهی از ارتفاعات البرز مرکزی استان مازندران، بین سیاه بیشه و پل زنگوله در تاریخ ۲۸ تیرماه ۱۳۹۶ جمع آوری و از نظر ترکیبات موثرهٔ فرار در اسانس و ترکیبات طبیعی موجود در عصاره مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار گرفت. اسانس این گیاه به روش تقطیر با آب بـا ستفاده از دستگاه کلونجر استخراج و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف سنج جرمی (GC-MS) مورد ارزیابی کیفی و کمی قرار گرفت. نتایج نشان داد در اسانس این گیاه عمده‌ترین ترکیبات مربوط به آلفا- پینن با مقدار ۲۱/۶۵ درصد، دلتا-کادینن (۱۵/۲۹ درصد) و ۱و۸- سینئول (۱۲/۲۴ درصد) بوده است. ترپن‌های هیدروکربنی بیشترین غلظت را در روغن اسانسـی این گیاه به خود اختصاص داده بودند. ترکیب طبیعی موجود در عصـارهٔ گیـاه *E. hirsutum* توسـط تکنیـک‌هـای کرومـاتوگرافی ستونی، صفحه‌ای و لایهٔ نازک (TLC) خالص‌سازی و در نتیجه یک ترکیب طبیعی به نام اِپی گالو کاتچین گالات از عصـارهٔ ایـن گیاه استخراج و توسط تکنیک‌های طیف سنجی ^{13}C-NMR، ^{1}H-NMR و DEPT شناسایی و تعیین ساختار مولکولی شد. عصارهٔ گیاه، به روش خیساندن در حلال استخراج و از لحاظ وجود ترکیبات فلاونوئیدی (روش شینودا)، تانني (معـرف فریـک کلرایـد)، آلکالوئیدی (تست مایر)، گلیکوزیدی (روش کلر کیلیانی) و ساپونینی (روش فورث) مـورد بررسـی فیتوشـیمیایی قـرار گرفـت. درنتیجه وجود ترکیبات طبیعیِ فلاونوئیدی (ایجاد رنگ قرمز)، آلکالوئیدی (تشکیل رسوب زرد)، کـاتکول تـانن‌هـا (رنـگ سـبز تیره)، ساپونین (لایه کفی پایدار) و گلیکوزیدی (ایجاد لایه سبز-آبی) در عصارهٔ این گیاه اثبات شد.

واژه‌های کلیدی: اِپی گالو کاتچین گالات، اسانس، بررسی فیتوشیمیایی، بید علفی کرکی، عصاره، فلاونوئید

*نویسنده مسئول: mahtaherkhani@yahoo.com

مقدمه

جنس *Epilobium* از تیرهٔ Onagraceae دارای بیش از ۲۰۰ گونه در سراسر دنیا می‌باشد (Granica et al., 2014). گونه‌های جنس *Epilobium* و عصاره‌های آن در طب سنتی بسیار پر کاربرد بوده و دارای خواص دارویی فراوانی نظیر ضدالتهابی، ضداکسیدانی، ضدتوموری، ضدمیکروبی، ضد درد و ضد آندروژنیک هستند (Vitalone and Allkanjari, 2018) از میان گونه‌های این جنس گونه‌های *E. angostifolium* L.، *E. parviflorum* Schreb و *E. hirsutum* L. از پراکندگی بیشتری برخوردار بوده و به همین دلیل نسبت به سایر گونه‌ها شناخته شده تر می باشند. به گیاهان چند سالهٔ این جنس، به دلیل شباهت برگ آن‌ها به بید، Willowherb نیز گفته می‌شود (Battinelli et al., 2001). فلور ایران شامل ۱۸ گونه از جنس *Epilobium* می‌باشد (Azizian,2005). بررسی میزان تنوع متابولیت‌های ثانویه در بین قسمتهای هوایی گیاهان *Epilobium hirsutum* و *E. parviflorum* توسط تکنیک GC-MS ۷٤ ترکیب را نشان داد که از این میان ٤٦ ترکیب مربوط به متابولیت‌های ثانویهٔ فلاونوئیدی (۸ مورد)، اسیدهای فنولیک (۲٦ مورد)، استروئیدها (۳ مورد) و ترپنها (۵ مورد) به عنوان بیشترین ترکیبات طبیعی موجود در این گیاهان بودند (Mohammadi Bazargani et al., 2021). گیاه *Epilobium hirsutum* با نام‌های بید علفی کرکی و علف خر کرکی گیاهی است چند ساله با ساقه افراشته و بلند که تمام بخش‌های گیاه پوشیده از کرک‌های بلند و سفید نازک و ابریشمی می‌باشد. گل‌های آن دارای چهار گلبرگ به رنگ ارغوانی تا قرمز پر رنگ و میوهٔ آن به شکل کپسول باریکی است که از انتها می شکفد و دانه‌های ریز سبک کرکدار آن در هوا پراکنده می‌شود (Azizian, 2005). جنس *Epilobium* سرشار از ترکیبات فنولیک اسید، فلاونوئیدی و تانن‌ها می‌باشد (Tóth et al., 2009; Jürgenson et al., 2012). مطالعات اثرات بیولوژیکی نشان داده است که عصارهٔ گونه‌های مختلف این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی (Pirvu et al., 2019; Steenkamp et al., 2006; Borchardt et al., 2008; Bartfay et al., 2012; Kosalec et al., 2008)، مهارکننده تکثیر سلولهای سرطانی (Vitalone et al., 2001)، ضد التهابی (Kiss et al., 2011; Hevesi et al., 2009; Pirvu et al., 2019)، اثرات مفید در رفع بیماری‌های دستگاه گوارش (Pourmorad et al., 2007)، ضد درد و داروی مسکن (Vitali et al., 2006; Tita et al., 2001) و عامل آنتی اکسیدانت قابل توجه (Tóth et al., 2009; Kiss et al., 2011; Hevesi et al., 2009) می‌باشد. در یک مطالعه خواص فیتوشیمیایی و فعالیتهای ضد تشنجی و آنتی اکسیدانی گیاه*E. hirsutum* به صورت *in vitro* و *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصارهٔ این گیاه حاوی مقدار زیادی محتوای فنولیک و ترکیبات آنتی اکسیدان بوده و به صورت سنتی در درمان صرع توسط مردم محلی ترکیه استفاده می‌شود. همچنین عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* دارای خاصیت ضد تشنج بالایی می‌باشد و با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به عنوان ضد اکسیدان و ضد صرع مورد مصرف قرار می‌گیرد (Dzhafar et al., 2020). گیاه *E. hirsutum* دارای قدرت ضد میکروبی و همچنین اثرات ضد التهابی می‌باشد (Pirvu et al., 2015). گونهٔ *E. hirsutum* دارای تانن، الاجیک اسید، ساپونین، آلکالوییدها و فلاونوئیدها می‌باشد (Granica et al., 2014; Tóth et al., 2009; Jürgenson et al., 2012; Pakravan et al., 2012). سرشاخه‌های هوایی و ریشه‌های گونه *E. hirsutum* حاوی فلاونوئیدها، استروئیدها و تانن می باشند (Granica et al., 2014) و در صنایع آبزی پروری هم با استفاده از عصاره

بخش‌های هوایی این گیاه اثرات قابل ملاحظه ای در کاهش مرگ و میر آبزیان گزارش شده است (Pakravan et al., 2012). عصارهٔ برگ، ریشه و گل این گونه دارای خواص آنتی باکتریایی بالایی می‌باشد (Kunduhoglu et al., 2011). همچنین عصاره متانولی این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی (Mohammadi Bazargani, 2015) بوده و به عنوان یک عامل ضد درد قوی (Pourmorad et al., 2007) شناخته می‌شود. عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* غنی از ترکیبات فنولی بوده و موجب مهار اکسیداسیون چربی‌ها می‌شود که در صنایع غذایی اثری مطلوب قلمداد می‌گردد (Cando et al., 2014). اسانس این گیاه به عنوان یک آنتی باکتریال در مقابل سویه‌های میکروبی عمل می کند (Eghmazi et al., 2015; Auwal et al., 2014). این گونه سرشار از متابولیت‌های ثانویه با خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی نظیر تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدهاست (Granica et al., 2014; Tóth et al., 2009; Jürgenson et al., 2012; Pakravan et al., 2012; Cando et al., 2014; Eghmazi et al., 2015). در روغن اسانسی گیاه *E. hirsutum* ترکیبات مونوترپن اکسیژن دار با غلظت بالا شناسایی شده است (Eghmazi et al., 2015). بررسی منابع نشان می‌دهد که خواص دارویی متعددی در مورد این گونه گزارش شده است لذا با توجه به گستردگی این گیاه در ایران، هدف از این تحقیق بررسی فیتوشیمیایی، تعیین ساختار مولکولی ترکیب طبیعی عمده و بررسی روغن اسانسی گیاه *E. hirsutum* در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منابع گیاهی مورد استفاده: در این پژوهش، با آغاز فصل رشد، اندام‌های هوایی گیاه *Epilobium hirsutum* از منطقه حفاظت شده البرز مرکزی، استان مازندران، بین سیاه بیشه و پل زنگوله (مختصات جغرافیایی ″29 ′20 °51 :E و ′11 °36 :N ″92 ، ارتفاع از سطح دریا ۲۲۲۹ متر) در ۲۸ تیر ماه سال ۱۳۹۶ جمع آوری شده با استفاده از منابع معتبر گیاه شناسی شناسایی شد و در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با کد اختصاص ACECR- IMPH-7069-1 ثبت شده است. نمونهٔ گیاهی جمع آوری شده به آزمایشگاه گیاه شناسی منتقل گردید. گیاه مورد نظر پس از آماده سازی نمونه‌های استاندارد هرباریومی، توسط منابع معتبر گیاه شناسی مانند فلورا ایرانیکا، رستنی‌های ایران، Flora del Iran، Flora Orientalis و فلور رنگی ایران به دقت شناسایی شده و در نهایت نمونهٔ Voucher به صورت معتبر و مؤثر در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با کد اختصاصی IMPH-7069 ثبت و مستند سازی گردید.

استخراج، خالص سازی و شناسایی ترکیب طبیعی: به منظور استخراج عصاره از گیاه به روش خیساندن در حلال، یک کیلوگرم از اندام هوایی خشک و خرد شدهٔ گیاه به مدت ۷۲ ساعت در مخلوط متانول: دی اتیل اتر: هگزان به نسبت ۱:۱:۱ در پرکولاتور در محلی تاریک خیسانده شد. مخلوط حاصل توسط قیف بوخنر صاف و توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد تا شیرهٔ سبز غلیظ و ویسکوزی حاصل شد. به منظور جدا کردن چربی‌ها و ترکیبات اشباع با زنجیره‌های بلند، عصاره حاصل را با میزان کمی از متانول حل و به دکانتور حاوی ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و سپس توسط ٤۰۰ میلی لیتر حلال هگزان طی چند مرحلهٔ در دکانتور چربی گیری شد. به این ترتیب که فاز بالایی (فاز هگزان و مواد چربی و هیدروکربن‌های حل شده در آن) جدا و مجدداً، محلول فاز پایین به دکانتور انتقال داده شد و مرحلهٔ قبلی تکرار گردید تا

جایی که نهایتاً کل عصاره چربی زدایی و فاز هگزان مصرفی به بی‌رنگی رسید. فاز هگزان (مواد غیر قطبی و چربی) کنار گذاشته شد و فاز پایین (فاز اصلی) مجدداً به دکانتور منتقل و مشابه با مرحله قبلی عمل شد، با این تفاوت که در این مرحله، از ٤٥٠ میلی لیتر حلال اتیل استات برای حل کردن مواد قطبی استفاده شد. فاز اصلی (فاز بالایی شامل اتیل استات و مواد قطبی) جدا و جمع‌آوری شد و توسط دستگاه روتاری (دمای ٤٥ درجه سانتیگراد و ٢٥ دور در دقیقه) تا تشکیل عصارهٔ ویسکوز تغلیظ شد. به عصاره تغلیظ شده مقداری سیلیکاژل مخصوص کروماتوگرافی ستونی افزوده و به کمک روتاری، به صورت پودری خشک، جذب سیلیکاژل گردید و برای اضافه شدن به ستون کروماتوگرافی آماده شد. ستون کروماتوگرافی توسط دوغابی متشکل از حلال هگزان و سیلیکاژل مخصوص کروماتوگرافی آماده و سپس عصاره ای که جذب سیلیکاژل شده بود به ستون اضافه و جهت جداسازی ترکیبات طبیعی با پلاریته‌های مختلف، شست و شوی ستون با هگزان (حلال غیر قطبی) آغاز و به تدریج با افزودن تدریجی حلال اتیل استات، پلاریته به سمت نیمه قطبی و سپس مرحله بعدی با افزودن مقادیر مشخصی از حلال متانول، پلاریته به سمت قطبی تغییر نمود. نهایتاً ستون کروماتوگرافی با ١٠٠٪ متانول شسته شد. درب فراکسیون‌های خارج شده از ستون توسط فویل‌های منفذ دار پوشانده و به مدت چند روز در تاریکی در جای ساکن نگهداری و سپس از نظر وجود بلور و وجود ترکیبات طبیعی بررسی شد. به منظور شناسایی ترکیب طبیعی موجود در فراکسیون حاوی عصاره و برای مشخص کردن تعداد ترکیب‌ها در هر فراکسیون، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. در تکنیک TLC، از نسبت‌های معینی از حلال‌های آلی نظیر دی اتیل اتر، هگزان، اتیل استات و متانول به عنوان فاز متحرک و از کاغذ TLC لکه گذاری شده با چهار فرکشن متوالی به عنوان فاز ساکن استفاده گردید. سپس کروماتوگرام‌های حاصله زیر نور UV بررسی و فرکشن‌هایی که از نظر شکل کروماتوگرام مشابه بودند مخلوط گردیدند و مجدداً به مدت سه الی چهار روز در فضای تاریک به صورت ساکن نگهداری شدند. در نهایت تعداد فراکسیون‌های حاصله به ٢٢ عدد رسید که از فرکشن‌های ١٧ و ١٨ یک بلور مربوط به ترکیب طبیعی استخراج شد. بلور به‌دست‌آمده با حلال اتر خالص سازی و برای شناسایی ساختار مولکولی از آن طیف‌های DETP، ^{13}C-NMR، ^{1}H NMR و IR گرفته شد.

آنالیز روغن اسانسی: کل اندام هوایی گیاه *E. hirsutum* به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت دو ساعت اسانس گیری شد. سپس اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف سنج جرمی تزریق و اجزای متشکله آن شناسایی گردید. نمونه با دستگاه GC/MS با ستون HP- 5MSبه طول ٣٠ متر، قطر داخلی ٠/٢٥ میلی‌متر، ضخامت فیلم ٠/٢٥ میکرومتر و گاز حامل هلیم آنالیز شد. سرعت جریان گاز حامل ١ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی ٧٠ الکترون ولت انتخاب گردید. برنامه دمایی دستگاه به این صورت تنظیم شد: ابتدا دما به مدت ٣ دقیقه در ٦٠ درجه سانتیگراد نگه داشته شد، سپس به دمای ٢٢٠ درجه سانتیگراد با سرعت ٥ درجه سانتیگراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ٥ دقیقه دراین دما باقی ماند، سرعت جریان هلیوم به‌عنوان گاز حامل ١ میلی‌لیتر در دقیقه بود. به منظور شناسایی ترکیبات موجود در اسانس، با توجه به زمان بازداری هر پیک، ضریب بازداری کواتس (KI) برای هر یک محاسبه و با مقادیر اندیس کواتس موجود در جداول استاندارد مقایسه شد. سپس با توجه به مطالعهٔ طیف‌های جرمی

به‌دست‌آمده و مقایسه و بررسی آنها با ترکیبات استاندارد و کتابخانه دستگاه GC-MS، اجزای تشکیل دهندهٔ اسانس شناسایی شد.

بررسی فیتوشیمیایی

بررسی وجود آلکالوئیدها: به منظور تشخیص آلکالوئیدها، یک گرم از پودر خشک عصارهٔ گیاه توزین شد و به آن ۲۰۰ میلی لیتر اسید استیک ۱۰٪ در اتانول در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری اضافه و به مدت ۲٤ ساعت در یک ظرف در بسته در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از ۲٤ ساعت محلول صاف و در روتاری در دمای ٤٥ درجه تغلیظ شد تا حجم آن به یک چهارم رسید. سپس معرف مایر (پتاسیم یدید جیوه) به‌صورت قطره قطره اضافه شد تا جایی‌که محلول کدر شده و یا ترکیبات آلکالوئیدی به‌صورت رسوب زردرنگ در ته لوله آزمایش مشاهده شود. مقدار رسوب تشکیل شده نشان دهنده محتوای نسبی ترکیبات آلکالوئیدی در نمونه است (Safavi et al., 2013).

بررسی وجود گلیکوزیدها: به منظور تشخیص وجود گلیکوزیدها، یک گرم از پودر خشک عصارهٔ گیاه توزین و سپس در ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال حل گردید، به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلرید آهن III افزوده و سپس ۱ میلی لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. ایجاد رنگ قرمز–قهوه ای به‌صورت یک حلقه در فاصلهٔ بین دو لایه اسید استیک و اسیدسولفوریک و یا ایجاد لایه سبز آبی در بالای آن نشان دهنده وجود گلیکوزیدها است (Krishnaiah et al., 2007).

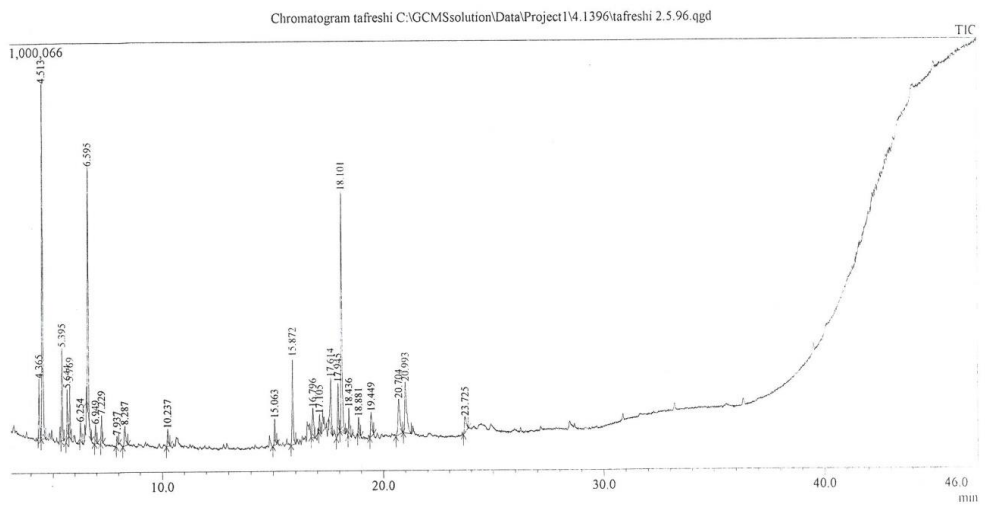
بررسی وجود ساپونین‌ها: به منظور تشخیص ساپونین‌ها، ۵ گرم از پودر عصارهٔ خشک شدهٔ گیاه در ۵ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری گرما دهی و سپس صاف شد. ۲ میلی لیتر از نمونه با ۳ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. مشاهدهٔ کف بعد از گرم کردن و تکان دادن بیانگر وجود ساپونین‌ها است. برای تائید این نکته ۱ قطره روغن خوراکی به نمونه اضافه نموده و خاصیت امولسیون کنندگی ساپونین‌ها بدین صورت اثبات شد (Nurdiani et al., 2012).

بررسی وجود فلاونوئیدها: به منظور تشخیص فلاونوئیدها، ۱ گرم از پودر عصارهٔ خشک گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و ٤ میلی‌لیتر متانول ۵۰٪ به آن اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکروگرم فلز منیزیم به آن افزوده و در بن ماری در دمای ٤٥ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد، نمونه فیلتر شد و از مایع فیلتر شده ٤ میلی لیتر برداشته و ۱ میلی لیتر اسیدکلریدریک غلیظ به آن افزوده شد. مشاهدهٔ رنگ قرمز نشان دهندهٔ فلاونوئید و رنگ نارنجی نشان دهندهٔ وجود فلاون است (Padmaja et al., 2011).

بررسی وجود تانن‌ها: به منظور تشخیص تانن‌ها، نیم گرم از پودر خشک عصاره را در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و پس از جوشاندن نمونه آن را صاف کرده و با اضافه نمودن قطره قطره از کلرید آهن III ۰/۱ ٪ ، رنگ سبز تیره تشکیل شد که نشان دهندهٔ وجود کتکول تانن‌ها می‌باشد. درصورتی‌که نمونه دارای رنگ آبی سیاه شود تأیید کننده وجود گالیک تانن‌ها در نمونه است (Hafez Ghoran et al., 2014; Auwal et al., 2014; Tiwari et al., 2011).

نتایج

آنالیز اسانس: نتایج حاصل از آنالیز اسانس حاصل از گیاه *Epilobium hirsutum* توسط دستگاه GCMS در کروماتوگرام زیر (شکل ۱) و جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱: کروماتوگرام کلی GC-MS روغن اسانسی گیاه *Epilobium hirsutum*

با توجه به تفسیر طیف‌های GCMS به‌دست آمده از اسانس گیاه *E. hirsutum*، به میزان ۹۶/۸٤ درصد از روغن اسانسی شناسایی شد. از این میان۳۲/۶۲٪ مربوط به مونوترپن هیدروکربن دار، ۱۵/۸۱٪ مونوترپن اکسیژن‌دار، ۳۳/۶۵٪ سزکوئی ترپن هیدروکربنی، ۱۲/٤۳٪ سزکوئی ترپن اکسیژن‌دار و ۲/۳۳٪ را ترکیبات غیرترپنی به خود اختصاص داده بودند. با توجه به نتایج حاصل، در این روغن اسانسی بیشترین غلظت را ترکیبات ترپنی هیدروکربنی به خود اختصاص داده اند. در اسانس این گیاه بیشترین غلظت مربوط به ترکیب آلفا-پینن (۲۱/۶۵٪)، سپس دلتا-کادینن (۱۵/۲۹٪) و ۱و۸- سینئول (۱۲/۲٤٪) بوده است (جدول ۱).

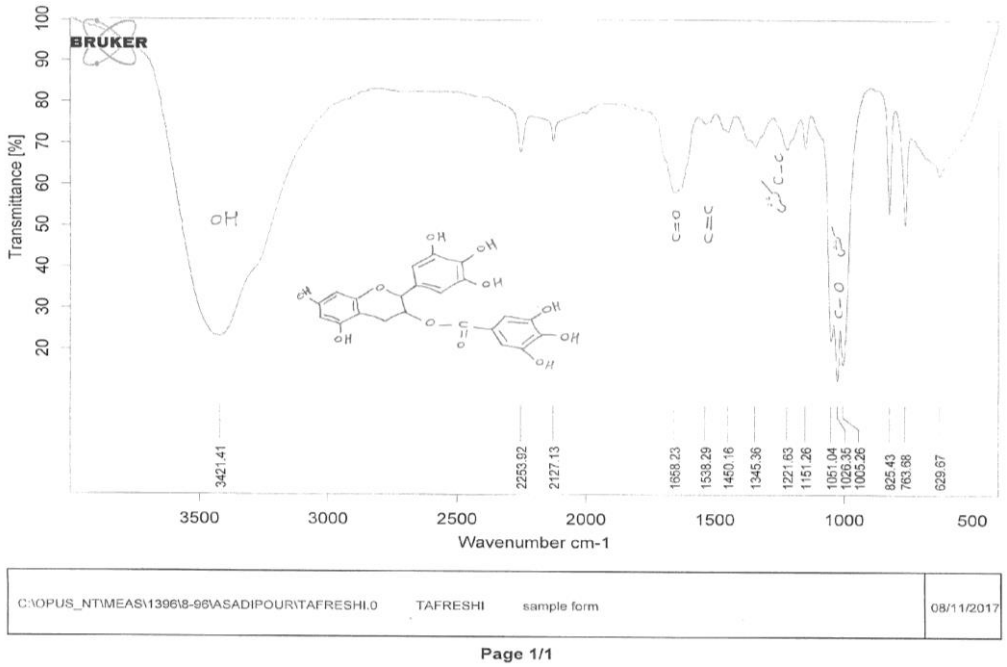
جدول ۱: ترکیبات موجود در اسانس گیاه *Epilobium hirsutum* L.

ردیف	نام ترکیب	KI	نوع ترکیب	ترکیب درصد
۱	آلفا- پینن	۹٤۸	مونوترپن هیدروکربنه	۲۱/٦۵
۲	بتا- پینن	۹۵۲	مونوترپن هیدروکربنه	٤/۷٦
۳	بتا- میرسن	۹۵۸	مونوترپن هیدروکربنه	۲/۵۵
٤	دکان	۱۰۱۵	آلکان (غیر ترپنی)	۲/۳۳
۵	آلو- اوسیمن	۱۰۲۵	مونوترپن هیدروکربنه	۱/۰۳
٦	۱و۸- سینئول	۱۰۳۰	مونوترپن اکسیژنه	۱۲/۲٤
۷	اوسیمن	۱۰۵۲	مونوترپن هیدروکربنه	۲/٦۵
۸	بای سیکلو{٤,۱,۰} هپتان- ۳- ال-٤و۷و۷-تری متیل	۱۰۹۲	مونوترپن اکسیژنه	۰/۵۰
۹	لینالول	۱۱۰۰	مونوترپن اکسیژنه	۱/۸۲
۱۰	٤- ترپینئول	۱۱۳۷	مونوترپن اکسیژنه	۱/۲۵
۱۱	بتا- بوربونن	۱۳۳۹	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱/۵۲
۱۲	ترانس- کاریوفیلن	۱٤۳۸	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۵/٤۱
۱۳	آرومادندرن	۱٤۷۵	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۲/٦۱

۰/۸۷	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱٤۹٦	آلو- آروماددندرن	۱٤
۳/٤۱	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱٤۷۰	آلفا- آمورفن	۱۵
۲/۹٤	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱٤۷۵	گاما- مورولن	۱٦
۱۵/۲۹	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱۵۱۹	دلتا-کادینن	۱۷
۱/٦۰	سزکوئی ترپن هیدروکربنه	۱۵۲۳	آلفا-مورولن	۱۸
۲/۱٦	سزکوئی ترپن اکسیژنه	۱۵۷۳	کاریوفیلن اکسید	۱۹
٤/۲۲	سزکوئی ترپن اکسیژنه	۱۵۸۰	بتا-کادین-٤-ان-۱۰-ال	۲۰
٦/۰۵	سزکوئی ترپن اکسیژنه	۱٦۷٦	آلفا-کادینول	۲۱
٪ ۳۲/٦۲			مونوترپن هیدروکربنه	
٪ ۱۵/۸۱			مونوترپن اکسیژنه	
٪ ۳۳/٦۵			سزکویی ترپن هیدروکربنه	
٪ ۱۲/٤۳			سزکویی ترپن اکسیژنه	
٪ ۲/۳۳			غیر ترپنی	
٪ ۹٦/۸٤			کل	

شناسایی ترکیب طبیعی

نتایج حاصل از طیف IR ترکیب استخراج شده از گیاه *E. hirsutum*: همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، در طیف‌سنجی FTIR نوار جذبی ناحیه cm^{-1} ۳٤۲۱/٤۱ مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل (OH) در ترکیب طبیعی می‌باشد که به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی به‌صورت پهن ظاهر شده است. همچنین نوار جذبی cm^{-1} ۱۲۲۱/٦۳ مربوط به ارتعاش کششی C-C و نوار cm^{-1} ۱٦۵۲/۹٦ مربوط به ارتعاش کششی C=O کربونیل است. نوار جذبی cm^{-1} ۱۰۲٦/۳۵ نیز مربوط به ارتعاش کششی C-O و cm^{-1} ۱۵۳۸/۲۹ مربوط به ارتعاش کششی C=C در ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات است.



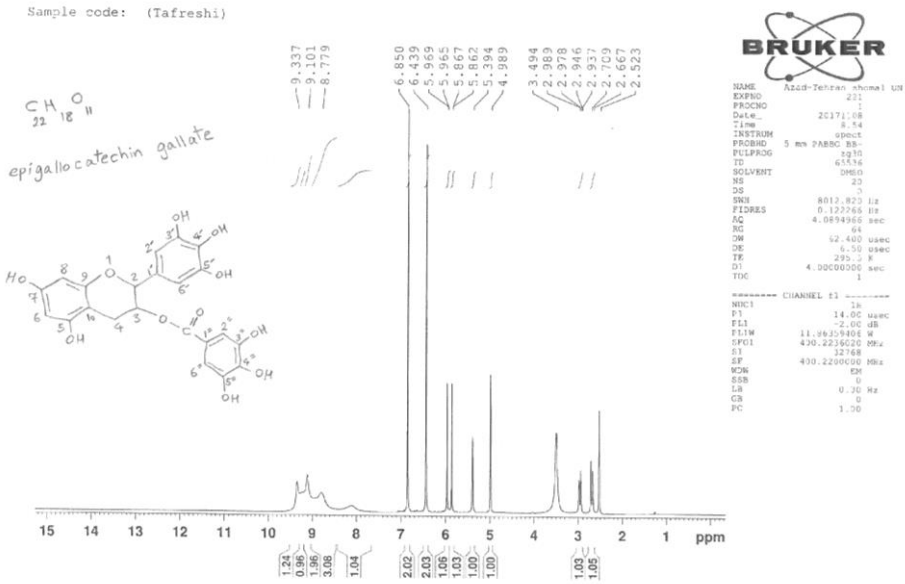
شکل ۲: طیف IR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات

نتایج حاصل از طیف ^{1}H-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات استخراج شده از گیاه *E. hirsutum*

نتایج طیف ^{1}H-NMR در شکل ۳ و جدول ۲ آورده شده است. مجموعاً ۱۸ هیدروژن طبق انتگرال داده شده در طیف در مولکول اِپی گالو کاتچین گالات وجود دارد. پیک حلال DMSO در ناحیهٔ ۲/۵۲۳ و H_2O موجود در حلال (به‌صورت HOD) پیک خود را در دلتای ۳/٤۹٤ و هردو بدون انتگرال آمده‌اند. همانطور که در طیف ^{1}H-NMR دیده می‌شود، شش هیدروژن آروماتیک با شماره‌های ۸، ٦، ۲′ و ٦′ و همچنین ۲″ و ٦″ در ناحیهٔ ٥/۸٦٤ تا ٦/۸٥۰ ظاهر شده‌اند که دلیل جابجایی شیمیایی بالای هیدروژن‌های آروماتیک، اثر آنیزوتروپی همسانگرد می‌باشد. هیدروژن‌های ۲′ و ٦′ و همچنین ۲″ و ٦″ به دلیل تقارن، به‌صورت دو به دو باهم و به‌صورت دو براود سینگلت و هر کدام با انتگرال دو هیدروژن ظاهر شده‌اند. هیدروژن‌های آروماتیک شمارهٔ ٦ و ۸ نیز به‌دلیل کوپلاژ با هیدروژن متا در حلقهٔ آروماتیک به‌صورت دو پیک دوشاخه (دابلت) با ثابت کوپلاژ متا J= ۲/۳ هرتز و در دلتاهای به ترتیب ٥/۹٦۷ و ٥/۸٦٤ ppm ظاهر شده است. به تعداد ۸ هیدروژن مربوط به گروه هیدروکسیل، در ناحیهٔ ۸ تا ۹/۳۳۷ ppm به صورت پهن ظاهر شده اند. در ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات، هیدروژن‌های ۲ و ۳ به دلیل اتصال به اتم الکترونگاتیو اکسیژن، نپوشیده شده و در دلتای به ترتیب ٤/۹۸۹ و ٥/۳۹٤ ppm به‌صورت دو پیک براود سینگلت و هر کدام با انتگرال ۱ ظاهر شده‌اند. هیدروژن‌های ٤α و ٤β به‌صورت دو پیک دوشاخه (دابلت) با ثابت کوپلاژ J=۱٦/٥ هرتز و هر کدام با انتگرال یک هیدروژن در دلتاهای به‌ترتیب ۲/۹٦۲ و ۲/٦۸۸ ppm ظاهر شده است.

جدول ۲: نتایج حاصل از طیف ^{1}H-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات

انتگرال	ثابت کوپلاژ J (Hz)	شکافتگی	جابجایی شیمیایی δ (ppm)	شماره پروتون
۱	۲/۳	d	٥/۹٦۷	٦
۱	۲/۳	d	٥/۸٦٤	۸
۱	--	brs	٥/۳۹٤	۳
۱	--	brs	٤/۹۸۹	۲
۲	--	brs	٦/٤۳۹	۲′ و ٦′
۲	--	brs	٦/۸٥۰	۲″ و ٦″
۱	۱٦/٥	d	۲/۹٦۲	٤α
۱	۱٦/٥	d	۲/٦۸۸	٤β
۸	--	--	۸ تا ۹/۳۳۷	پیک‌های پهن ۸ گروه OH



شکل ۳: طیف ^{1}H-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات

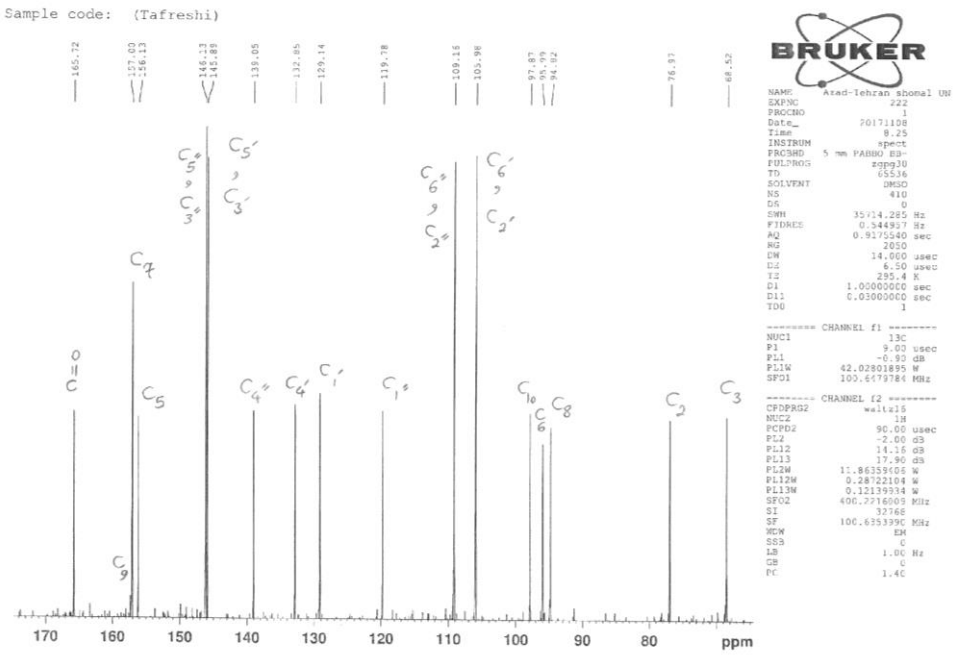
نتایج حاصل از طیف ^{13}C-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات استخراج شده از گیاه *E. hirsutum*:

طیف ^{13}C-NMR به همراه بزرگنمایی آن در شکل ٤ آورده شده است. در طیف ^{13}C-NMR نیز ۱۸ پیک مربوط به ۲۲ کربن مطابق با فرمول بسته ظاهر شده است. سه کربن آلکانی با شماره‌های ۲، ۳ و ٤ در ترکیب موجود است که به ترتیب در دلتاهای ۷٦/۹۷ ، ٦۸/۵۲ و ۲٦/۲۵ ppm، قابل رؤیت می‌باشند که علت بالاتر بودن دلتای کربن ۲ و ۳ اتصال به اتم الکترونگاتیو اکسیژن و نپوشیده شدن این دو کربن می‌باشد. الکترونگاتیوی بالای اکسیژن در گروه کربونیل موجب می‌شود که سیگنال مربوط به گروه کربونیل در شیفت شیمیایی بالاتری یعنی در ناحیهٔ دلتای ۱٦۵/۷۲ ppm ظاهر شود. بنابراین در این ترکیب، نپوشیده ترین کربن مربوط به کربنِ کربونیل و سپس مربوط به کربن‌های باند دوگانهٔ آروماتیک می‌باشد که در آن کربن‌های آروماتیکی که به اکسیژن اتصال دارند (۹، ۷، ۵، ″۳ و ″۵، ′۳ و ′۵ ، ″٤، ′٤) در دلتاهای بالاتری نسبت به آنهایی هستند که به اتم اکسیژن اتصال ندارند (′۱ ، ″۱، ″۲ و ″٦، ′۲ و ′٦ ، ۱۰، ٦ و ۸). پیک‌های مربوط به کربن‌های آروماتیک در طیف ^{13}C-NMR، از ناحیهٔ ۹٤/۸۲ تا ۱۵۸ ppm آمده اند که تحت تأثیر استخلاف مربوطه می‌تواند مقداری جابجا شوند.

همانطور که در شکل ٤ دیده می‌شود با توجه به متقارن و هم ارز بودن کربن‌های ″۳ و ″۵، ′۳ و ′۵ به صورت دو به دو باهم و همچنین کربن‌های ′٦ و ′۲، ″۲ و ″٦ نیز با یکدیگر، هر دو کربن باهم در یک مکان ظاهر شده‌اند. ما بقی پیک‌ها متقارن نبوده و هر کدام به‌صورت جداگانه پیک مربوط به خودشان را می دهند. پیک هفت شاخهٔ حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) در ناحیهٔ ۳۹/۲۳ تا ٤۰/٤۸ ظاهر شده است.

نتایج حاصل از طیف DEPT ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات استخراج شده از گیاه *E. hirsutum*: همانطور که در طیف DEPT (شکل ۵) دیده می‌شود، کربن‌های CH و CH_3 به‌صورت سر بالا و کربن‌های CH_2 به‌صورت سر پایین در طیف DEPT قابل رؤیت است و کربن‌های نوع چهارم نیز در این طیف ظاهر نمی گردند. در این ترکیب، تنها یک پیک سر پایین در طیف DEPT مشاهده می‌شود

که آن هم مربوط به کربن شماره ٤ (CH_2) می‌باشد. ۱۲ مورد کربن نوع چهارم با شماره‌های ۷، ۵، ۱۰، ۹، ′۱، ′۳، ′٤، ′۵، ″۱، ″۳، ″٤ و ″۵ که هیدروژنی ندارند در طیف DEPT ظاهر نمی‌شود. سایر پیک‌های سر بالا در طیف DEPT، دلیل بر کربن‌های CH در ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات است، زیرا کربن CH_3 در این ترکیب نداریم.



شکل ٤: طیف ^{13}C-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات

شکل ۵: طیف DEPT در کنار طیف ^{13}C-NMR ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات

از نتایج به‌دست‌آمده از طیف‌سنجی‌های بالا، ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات با ساختار شناسایی شد. **نتایج حاصل از تست‌های فیتوشیمیایی:** بررسی‌های فیتوشیمیایی عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* نشان داد که در تست شینودا در تشخیص فلاونوئیدها، رنگ نارنجی مایل به قرمز ظاهر شد که نشان دهنده وجود فلاونول به میزان بسیار زیاد است. رنگ سبز تیره در تست تشخیص تانن توسط فریک کلراید، وجود کاتکول تانن‌ها را ثابت کرد. تست مایر در تشخیص آلکالوئید، رسوب زرد رنگ تشکیل شد که تأیید کننده وجود ترکیبات آلکالوئیدی در عصارهٔ گیاه است. در تست کلر کیلیانی در تشخیص گلیکوزید، لایه سبز-آبی ایجاد شده در بالای نمونه نشان‌دهنده مقداری گلیکوزید در نمونه است. در تست فورث در تشخیص ساپونین مقدار اندکی کف در سطح نمونه تشکیل شد که نشان دهنده میزان اندک ساپونین در عصاره این گیاه بود.

بحث

پژوهش حاضر نشان داد که عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* غنی از ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، آلکالوییدها، گلیکوزیدها، تانن‌ها می‌باشد. همچنین در این تحقیق از عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* یک ترکیب فلاونوئیدی به نام اِپی گالو کاتچین گالات به روش طیف سنجی NMR استخراج و شناسایی شد. عصارهٔ گیاه حاوی محتوای ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدانی بوده و دارای خاصیت ضد تشنج و ضد صرع بوده و در طب سنتی مورد مصرف قرار می‌گیرد (Dzhafar et al., 2020). گیاه *E. hirsutum* دارای قدرت ضد میکروبی و همچنین اثرات ضد التهابی می‌باشد (Pirvu et al., 2015). ترکیبات فلاونوئیدی، اسیدهای فنولیک، استروئیدها و ترپن‌ها به عنوان بیشترین متابولیت‌های ثانویه موجود در اندام‌های هوایی گیاه *E. hirsutum* می باشند (Mohammadi Bazargani et al., 2021). در مطالعه قبلی، فعالیت آنتی اکسیدانی فعالیت ضدمیکروبی و پتانسیل تولید عصاره با استفاده از حلال‌های مختلف برگ علف بید *E. hirsutum*تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرارگرفت. بر این اساس، عصاره متانولی این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه گونه‌های باکتریایی *S. aureus* و *E. coli* از خود نشان داد. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی برای نمونه متانولی برحسب میلی مول آهن در میلی گرم وزن خشک عصاره به میزان ۱۵٤/٦۱mmol/mg بدست آمد. همچنین بیشترین پتانسیل تولید عصاره برای عصاره متانولی با بازده ۲۷۳/۳ میلی‌گرم به ازای دو گرم ماده خشک گیاهی مشاهده گردید (Mohammadi Bazargani,2015). بر اساس نتایج یک تحقیق دیگر، عصاره متانولی سرشاخه *E. hirsutum* به عنوان یک عامل ضد درد قوی در موش‌ها عمل می‌کند (Cando et al., 2014). عصاره گیاه *E. hirsutum* غنی از ترکیبات فنولی بوده و موجب مهار اکسیداسیون می‌شود (Cando et al., 2014). در سال ۲۰۱۵، از آنالیز روغن اسانسی گیاه *E. hirsutum* جمع‌آوری شده از منطقهٔ گوهر کرمان، سی و دو ترکیب با غلظت ۹۹/۸ درصد شناسایی شد. بیشترین غلظت مربوط به ترکیب pulegone با غلظت ۷٤/٦ درصد بود. همچنین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، اسانس این گیاه به عنوان یک آنتی باکتریال در مقابل سویه‌های میکروبی عمل می کند(Eghmazi et al., 2015). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۲ توسط پاکروان و همکارانش انجام شد، تأثیر عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* در جیرهٔ ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* بر عملکرد رشد، پارامترهای خونی و بقای این ماهیان در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان مرگ ومیر به‌طور معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با جیرهٔ حاوی عصارهٔ گیاهی در مقایسه با تیمار

شاهد کمتر بود و کمترین میزان مرگ و میر در تیمار تغذیه شده با جیرهٔ حاوی ۳ درصد عصاره گیاهی مشاهده شد. همچنین بررسی پارامترهای خونی نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان آلوده شده به باکتری و ماهیان آلوده نشده در مقایسه با تیمار شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است، در حالی که مقادیر گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان آلوده شده به باکتری و ماهیان آلوده نشده در مقایسه با تیمار شاهد، اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین به طور کلی اثبات شد که عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* در رژیم غذایی ماهی کپور میزان مرگ و میر را به طور قابل توجهی کاهش می دهد (Pakravan et al., 2012). مطالعات قبلی نشان داده که گیاه *E. hirsutum* دارای ترکیبات تاننی، الاجیک اسید، ساپونین، آلکالویید و فلاونوئیدها می‌باشد (Pakravan et al., 2012; Granica et al., 2014; Tóth et al., 2009; Jürgenson et al., 2012). همچنین در روغن اسانسی گیاه *E. hirsutum* ترکیبات مونوترپن اکسیژن دار با غلظت بالا شناسایی شده است (Eghmazi et al., 2015).تحقیقات دیگری نشان دادند که گیاه *E. hirsutum* سرشار از متابولیت‌های ثانویه با خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی نظیر تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدهاست (Cando et al., 2014; Eghmazi et al., 2015; Pakravan et al., 2012; Granica et al., 2014; Tóth et al., 2009; Jürgenson et al., 2012). از سوی دیگر، وجود ترکیبات گالوتاننی، الاژی تانن و ۲۸ ترکیب پلی فنولی و همچنین فلاونوئیدها در عصارهٔ هیدروالکلی کل اندام هوایی گیاه *E. hirsutum* توسط تکنیک HPLC و ESI-MS اثبات شده است (Nawwar etal., 1998). همچنین در یک تحقیق در سال ۲۰۰۶، از طریق آنالیز فلاونوئیدآگلیکون‌ها و گلیکوزیدهای آزاد توسط تکنیک HPLC توانستند جهت کنترل کیفیت نمونه‌های تجاری و استاندارد سازی عصاره‌های گونه‌های مختلف *Epilobium* گام بردارند (Tóth et al., 2006).

نتیجه‌گیری نهایی

تحقیق حاضر نشان داد که عصارهٔ گیاه *E. hirsutum* سرشار از ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، آلکالوییدها، گلیکوزیدها و تانن‌ها می‌باشد. همچنین در این تحقیق یک ترکیب فلاونوئیدی به نام اِپی گالو کاتچین گالات از این گیاه استخراج و شناسایی شد. از آنجایی که ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نقش بسیار مهمی در خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی بر علیه میکروارگانیسم‌های مختلف در گیاهان بر عهده دارند، در آینده می‌توان فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی عصاره‌های مختلف گیاه مذکور را مورد پژوهش قرار داد. انتظار می‌رود در مطالعات بعدی اثرات رادیکال زدایی، ضدویروسی، ضد قارچی گیاه، اثرات جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی عصارهٔ گیاه فوق مورد بررسی قرار گیرد. همچنین می‌توان در تحقیق‌های آتی اثرات بیولوژیکی مثل سمیت سلولی ترکیب اِپی گالو کاتچین گالات استخراج شده از گیاه *E. hirsutum* و همچنین اثرات آنتی اکسیدانی و بیولوژیکی فرکشن‌های مختلف عصارهٔ این گیاه با روش‌های مختلف عصاره گیری و با حلال‌ها با قطبیت‌های متفاوت مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر مجید قربانی نهوجی استادیار پژوهش مرکز تحقیقات پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج بخاطر ارائه اطلاعات گیاه شناسی و کمک در امر تهیه و خریداری گیاه تشکر و قدردانی می گردد.

References

1.Auwal, M.S., Saka, S., Mairiga, I.A., Sanda, K.A., Shuaibu, A. and Ibrahim, A. 2014. Preliminary phytochemical and elemental analysis of aqueous and fractionated pod extracts of *Acacia nilotica* (*Thorn mimosa*), Veterinary Research Forum, 5(2): 95-100.

2.Azizian, D. 2005. Flora of Iran. Research Institute of forests and rangelands. Tehran. Iran.

3.Bartfay, W.J., Bartfay, E. and Johnson, J.G. 2012. Gram-negative and gram-positive antibacterial properties of the whole plant extract of Willow herb (*Epilobium angustifolium*). Biological Research for Nursing, 14(1): 85-89.

4.Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G. and Mazzanti, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. Il Farmaco, 56(5-7): 345-348.

5.Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., Kauppi, K.L., Fulcher, R.G., Ehlke, N.J., Biesboer, D.D. and Bey, R.F. 2008. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. Journal of Medicinal Plants Research, 2(5): 98-110.

6.Cando, D., Morcuende, D., Utrera, M. and Estévez, M. 2014. Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobium hirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein carbonylation and discoloration of beef patties. European Food Research and Technology, 238(5): 741-751.

7.Dzhafar, S.S., Dalar, A., Mukemre, M., Ekin, S., Yıldız, D. and Yunusoglu, O. 2020. Phytochemical profile and in vitro and in vivo anticonvulsant and antioxidant activities of *Epilobium hirsutum*, International Journal of Secondary Metabolite, 7(2): 63-76.

8.Eghmazi, E., Akhgar, M.R. and Kariminik, A. 2015. Chemical constituents and antibacterial activity of the essential oil from *Epilobium hirsutum*, Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 7(1): 338-344.

9.Granica, S., Piwowarski, J.P., Czerwińska, M.E. and Kiss, A.K. 2014. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): a review, Journal of Ethnopharmacology, 156: 316-346.

10.Hafez Ghoran, S., Mighani, H. and Ebrahimi, P. 2014. *InVitro* anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn. Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 16(1): 106-113.

11.Hevesi, B.T., Houghton, P.J., Habtemariam, S. and Kéry, Á. 2009. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. Phytotherapy Research, 23(5): 719-724.

12.Jürgenson, S., Matto, V. and Raal, A. 2012. Vegetational variation of phenolic compounds in *Epilobium angustifolium*. Natural Product Research, 26(20): 1951-1953.

13.Kiss, A.K., Bazylko, A., Filipek, A., Granica, S., Jaszewska, E., Kiarszys, U., Kośmider, A. and Piwowarski, J. 2011. Oenothein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. Phytomedicine, 18(7): 557-560.

14.Kosalec, I., Zovko, M., Sankovic, K., Kremer, D. and Pepeljnjak, S. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of willow herb (*Epilobium angustifolium* L.), Planta Medica, 74 - PA43.

16.Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Bono, A. 2007. Phytochemical antioxidants for health and medicine– A move towards nature. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 1(4): 97-104.

15.Kunduhoglu, B., Pilatin, S. and Caliskan, F. 2011. Antimicrobial screening of some medicinal plants collected from Eskisehir, Turkey. Fresenius Environmental Bulletin, 20(4): 945-952.

17.Mohammadi Bazargani, M. 24-26 Feb 2015, Investigation of antibacterial, antioxidant activity and production potential of extracts obtained from different solvents in *Epilobium hirsutum*, International conference on sustainable development, strategies and challenges With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism, Tabriz, Iran, Article COI: ICSDA01_0504.

18.Mohammadi Bazargani, M., Falahati-Anbaran, M. and Rohloff, J. 2021. Comparative analyses of phytochemical variation within and between congeneric species of willow herb, *Epilobium hirsutum*

and *E. parviflorum*: Contribution of Environmental Factors. Frontiers in Plant Science, 11: 595190.

19. Nawwar, MAM., Marzouk, M.S., Nigge W. and Linscheid, M. 1998. High-performance liquid chromatographic / electrospray ionization mass spectrometric screening for polyphenolic compounds of *Epilobium hirsutum* -the structure of the unique ellagitannin epilobamide-a . Journal of mass spectrometry, 32(6): 645-654.
20. Nurdiani, R., Firdaus, M. and Prihanto, A.A. 2012. Phytochemical screening and antibacterial activity of methanol extract of mangrove plant (*Rhyzophora mucronata*) from Porong River Estuary. Journal Basic Science and Technology, 1(2): 27-29.
21. Pakravan, S., Hajimoradloo, A. and Ghorbani, R. 2012. Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters and aeromonas hydrophila challenge on common carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture Research, 43(6): 861-869.
22. Pirvu, L., Albu,B., Niță, S., Sha'at, F., Pavaloiu, R., Bazdoaca, C., Staras, A., Tihăuan, B., Kamerzan, C.M. and Perisoara, A. 2019. *Epilobium hirsutum* L. and *Malva neglecta* L. propylene glycol extracts for cosmetic use; chemical composition, microbiological stability and diffusion aspects. Scholars Academic Journal of Pharmacy, 8(8): 424-432.
23. Pirvu, L., Nicorescu, V., Hlevca, C., Udeanu, D.I. and Nicorescu, I. 2015. Antimicrobial and synergistic activity of some whole and selective *Epilobium hirsutum* L. (great willowherb) extracts tested on standard and wild *Staphylococcus aureus* strains. Farmacia, 63: 690-695.
24. Padmaja, M., Sravanthi, M. and Hemalatha, K.P.J. 2011. Evaluation of antioxidant activity of two indian medicinal plants. Journal of Phytology, 3(3):86-91.
25. Pourmorad, F., Ebrahimzadeh, M.A., Mahmoudi, M. and Yasini, S. 2007. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Epilobium hirsutum*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(16): 2764-2767.
26. Safavi, F., Ebrahimi, P. and Mighani, H. 2013. In vitro antibacterial activity of root and aerial parts of *Scrophularia Striata* Bioss. on *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* and *Bacillus Cereus*. Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal, 1(8):603-614.
27. Steenkamp, V., Gouws, M.C., Gulumian, M., Elgorashi, E.E. and Van Standen, J. 2006. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. Journal of Ethnopharmacology, 103(1): 71-75.
28. Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G. and Saso, L. 2001. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Il Farmaco*, 56(5-7): 341-343.
29. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: A Review. Internationale Pharmaceutica Sciencia, 1(1): 98-106.
30. Tóth, B.H., Blazics, B. and Kéry, Á. 2009. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49(1): 26-31.
31. Tóth, B.H., Balázs, A., Vukics, V., Szőke, É. and Kéry, Á. 2006. Identification of *Epilobium* species and willow-herbs (*Onagraceae*) by HPLC analysis of flavonoids as chemotaxonomic markers. Chromatographia, 63(13), pp.S119-S123.
32. Vitali, F., Fonte, G., Saija, A. and Tita, B. 2006. Inhibition of intestinal motility and secretion by extracts of *Epilobium* spp. in mice. Journal of Ethnopharmacology, 107(3): 342-348.
33. Vitalone, A. and Allkanjari, O. 2018. *Epilobium* spp: Pharmacology and phytochemistry. phytotherapy research, 32(7): 1229-1240.
34. Vitalone, A., Bordi, F., Baldazzi, C., Mazzanti, G., Saso, L. and Tita, B. 2001. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L. Il Farmaco, 56(5-7): 483-489.

Phytochemical study and comparison of natural compounds in essential oil and extract of *Epilobium hirsutum* by chromatographic and spectroscopic methods

Tafrishi, F.[1], Taherkhani, M.[2,*]

[1]MSc student, Department of Phytochemistry and Essential Oils Technology, Faculty of Pharmaceutical Chemistry, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

[2]Assistant professor, Department of Chemistry, College of Science, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran

Received: 7-10-2021; Accepted: 14-11-2021

Abstract

Epilobium belonging to the Onagraceae family has many medicinal properties such as anti-inflammatory, anti-oxidant, antimicrobial, anti-tumor, analgesic and anti-androgenic in traditional medicine. In this study, the aerial parts of *Epilobium hirsutum* L.were collected at the flowering stage from the heights of central Alborz, Mazandaran province, between Siah Bisheh and Zangoleh Bridge on July 19, 2017 and phytochemically studied for effective volatile compounds in essential oils and natural products in the extract. The essential oil was extracted by hydrodistillation using celvenger apparatus and was analyzed qualitatively and quantitatively by GC-MS method. Based on the results, the main compounds in the essential oil were related to alpha-pinene with 21.65%, delta-cadinen (15.29%) and 1 -8-cineole (12.24%). Hydrocarbon terpenes had the highest concentration in the essential oil. The natural compound in *E. hirsutum* extract was purified by column chromatography (CC) and thin layer chromatography (TLC). As a result, a natural compound called epigallocatechin gallate was extracted and identified by ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR and DEPT spectrophotometric techniques and its molecular structure was determined. In addition, the plant extract was investigated for the presence of phytochemical content and the presence of flavonoids (Shinoda method), alkaloids (Mayer test), tannins (Ferric chloride method), saponins (Froth method) and glycosides (Keller-Kiliani test). The presence of flavonoids (red color), Alkaloids (yellow precipitate) saponins (foam layer), glycosides (bluish green layer) and tannins (dark green for Catechol tannin) in the extract was aproved.

***Keywords*:** *Epilobium hirsutum*, Epigallocatechin gallate, Essential oil, Flavonoid, Mazandaran, Phytochemistry

*Corresponding author; mahtaherkhani@yahoo.com