

فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۱۲۰-۱۱۴ (۱۳۸۹)

استخراج لاپاکول از پوست داخلی ساقه گیاه انار شیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.)

ساسان محسن‌زاده^{۱*}، علی‌اصغر امیری^۲ و نعمت صیادنیا طیبی^۳

۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی گیاهی، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، پست الکترونیک: mohsenzadeh@susc.ac.ir

۲- دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، بخش شیمی، دانشگاه شیراز

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، بخش زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۷

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۸۸

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۸

چکیده

لاپاکول یک نفتوکوئینون با فعالیت ضد سرطان، ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس می‌باشد. لاپاکول و برخی از مشتقات آن نتایج خوبی در آزمایش بر روی تومورها داشته‌اند. پوست ساقه برخی گیاهان خانواده پیچ اناری (Bignoniaceae) دارای درصدی لاپاکول و مقدراری از ترکیب‌های وابسته می‌باشد. گیاه انار شیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.) تنها گونه بومی این خانواده در مناطق خشک و نیمه‌خشک جنوب ایران می‌باشد. در این پژوهش لاپاکول از پوست داخلی ساقه گیاه انار شیطان جمع‌آوری شده از شهرستان داراب واقع در جنوب استان فارس به سه روش استخراج شد. روشها شامل متانول گرم شده در مایکروویو برای شش دقیقه، متانول سرد و آب داغ در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بودند. براساس نتایج بدست آمده، مؤثرترین روش استخراج متانول گرم شده در مایکروویو بود. در این روش از پوست داخلی ساقه گیاه انار شیطان ۳/۶ درصد لاپاکول در وزن خشک استخراج شد که مقدار آن توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.، پوست داخلی ساقه، لاپاکول، کروماتوگرافی با کارایی بالا.

مقدمه

انار شیطان (*Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.) گیاهی با ارتفاع ۳ تا ۱۵ متر و از خانواده پیچ اناری (Bignoniaceae) است و تنها گونه بومی این خانواده در جنوب ایران در استانهای فارس، هرمزگان، بوشهر، خوزستان و سیستان و بلوچستان می‌باشد که با نامهای سمینگ، سمیل (فارس)، حمید (بوشهر)، پرپوک (بلوچستان) و نیز گاهی ساج بیابان خوانده می‌شود. پراکنش جهانی این گیاه در جنوب آسیا در محدوده

صحرای سندی شامل شمال غرب هندوستان، ایالت بلوچستان پاکستان، جنوب ایران، کشورهای حوزه خلیج فارس و شمال آفریقا تا ارتفاع ۱۲۰۰ متر می‌باشد (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bignoniaceae>, 2007). خانواده پیچ اناری دارای ۱۰۰ جنس و ۸۰۰ گونه است که از ۴ جنس موجود آن در ایران فقط گونه *T. undulata* بومی ایران است (قهرمان، ۱۳۷۴). انار شیطان از گیاهان چوبی مناطق نیمه‌خشک بوده و معمولاً به صورت توده‌های کوچک خالص در حاشیه رودخانه‌ها

جداسازی و توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شده است (Steinert, et al., 1995). پوست داخلی ساقه دو جنس مذکور در کشور برزیل در طب سنتی استفاده و به سایر نقاط جهان نیز صادر می‌شود. البته وجود لاپاکول در برخی خانواده‌های گیاهی دیگر نیز گزارش شده است (Joshi & Singh, 1977).

هدف از این پژوهش استخراج و تعیین مقدار لاپاکول پوست داخلی ساقه گیاه انار شیطان به سه روش مختلف و مقایسه این روشها با یکدیگر بود که برای اولین بار در کشور انجام شد.

مواد و روشها

پوست ساقه انار شیطان از اطراف شهرستان داراب واقع در ۲۴۰ کیلومتری جنوب شرقی شیراز با ارتفاع ۱۱۸۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری شد و بعد پوست داخلی ساقه جداسازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد توسط آون خشک و بعد پودر شد.

عصاره‌گیری با مقدار ۲ گرم پودر پوست داخلی ساقه در ۱۰ میلی‌لیتر حلال با ۳ روش انجام شد؛ متانول با دمای معمولی، آب داغ ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر و متانول گرم توسط میکروویو به مدت ۶ دقیقه. روش آب داغ برای شباهت با روش استفاده در طب سنتی به کار برده شد. بعد عصاره‌های تهیه شده از فیلتر مخصوص کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) به ضخامت ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و به مقدار ۵ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد تا لاپاکول جداسازی و تعیین مقدار شود. بدین منظور از لاپاکول خالص شرکت Aldrich، آب بدون یون و متانول ویژه HPLC شرکت Merck آلمان استفاده شد. لاپاکول خالص در متانول حل شد تا به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسید و بعد نمونه‌های استاندارد به

و زمینهای نسبتاً هموار رویش دارد و دارای گل‌های زیبا و اناری شکل در رنگهای زرد آتشی، قرمز و نارنجی در فصل بهار است. این گیاه به خاکهای لومی با pH ۶/۵ تا ۸ و با دمای بالای تابستان و سرمای زمستان و بارندگی کم سازگار می‌باشد. اما رویشگاههای آن به لحاظ بی‌اطلاعی مردم بومی از فواید دارویی و زیست‌محیطی این گیاه و نیز مرغوب بودن برخی زمینهای مورد رویش برای کشاورزی، در حال تخریب و انقراض است. این گیاه در برابر آتش مقاوم بوده و در مناطق بادخیز جنوبی به‌عنوان بادشکن می‌تواند استفاده شود. چوب زیبا و بادوام آن در ساخت برخی لوازم چوبی ظریف کاربرد دارد. تاکنون تکثیر رویشی این گیاه تنها از طریق کشت بافت امکان‌پذیر شده و ازدیاد قلمه‌ای آن موفقیت‌آمیز نبوده است (http://en.wikipedia.org/wiki/Tecomella, 2007). لاپاکول برای اولین بار در سال ۱۸۸۲ از درخت *Tabebuia* توسط Paterno جداسازی شد. به علاوه با حضور ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی که اغلب در ترکیب عصاره‌های گیاهی یافت می‌شوند، این عصاره گیاهی تقویت می‌شود (Viana et al., 2003) و بنابراین عصاره‌های آبی و الکلی این گونه برزیلی دارای اثرهای دارویی می‌باشند (Miranda et al., 2001؛ Cavalcante et al., 2008).

لاپاکول یک نفتوکوئینون با فرمول ملکولی $C_{15}H_{14}O_3$ و وزن ملکولی ۲۴۲/۲۶ گرم در مول و محلول در حلالهای آلی است (شکل ۱) و دارای خواص ضد سرطان، ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس، ضد مالاریا و ضد یرقان می‌باشد (Giuraud et al., 1975؛ Consolacao, et al., 1975). (Hussain, et al., 2007؛ 1994) که با استفاده از عصاره الکلی از پوست داخلی ساقه جنس‌های *Tecoma* و *Tabebuia* از خانواده پیچ اناری (Bignoniaceae)

استخراج لاپاکول از پوست داخلی ساقه گیاه انار...

شده است. کروماتوگرام تزریق لاپاکول خالص به ستون C18 و نمودارهای عصاره پوست داخلی ساقه انار شیطان به روشهای استخراج متانول داغ، متانول سرد و آب داغ ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در شکل‌های ۳ تا ۶ نشان داده شده‌اند.

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است لاپاکول موجود در نمونه در ۱۰/۸ دقیقه بعد از تزریق آشکار شده است. همان طوری که انتظار می‌رود افزایش مولی استونیتریل در فاز متحرک موجب کاهش زمان ظهور لاپاکول شده و در نتیجه زمان آزمایش را کاهش داده است. در تمامی آزمایش‌ها از استونیتریل با نسبت ۵۰ درصد در فاز متحرک استفاده شد، زیرا قبلاً به‌عنوان حلال مناسبی شناخته شده بود. با مقدار زیاد استونیتریل قله نمودار مربوط به لاپاکول با قله نمودار سایر ترکیب‌ها همپوشانی پیدا می‌کرد.

مقایسه سه روش عصاره‌گیری از طریق سطح زیر منحنی و غلظت لاپاکول نشان داد که بهترین روش استخراج توسط متانول گرم شده در میکروویو به مدت ۶ دقیقه می‌باشد که به ترتیب ۱/۸ و ۲/۶ مرتبه میزان لاپاکول آن بیشتر از روش عصاره‌گیری با متانول سرد و آب داغ است (جدول ۱ و شکل‌های ۳ تا ۶).

غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای تزریق به دستگاه آماده شدند. مقدار لاپاکول از طریق مقایسه سطح زیر منحنی نمونه استاندارد با سطح زیر منحنی نمونه‌های تزریق شده و توسط نرم‌افزار Borwin (شماره ۱/۵) تعیین شد.

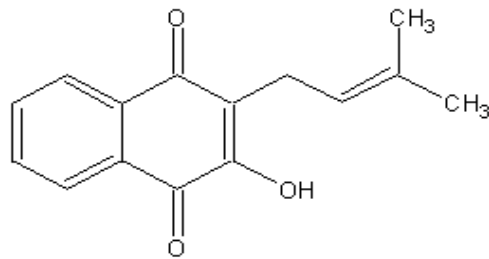
تجهیزات HPLC استفاده شده شامل دو پمپ ۲۰۸۰ PU شرکت Jasco ژاپن و شیر تزریقی رئودین آمریکایی به شماره ۷۷۲۵i با لوپ ۵ میکرولیتری و دستگاه آشکارساز با طول موج متغیر با لامپ UV-2070 شرکت Jasco بود که در طول موج ۳۴۰ نانومتر کار می‌کرد. دستگاه کروماتوگرافی توسط برنامه HSS-2000 شرکت Jasco و کروماتوگرافی توسط برنامه LC-NET II/ADC Interface کنترل می‌شد. جداسازی ایزوکراتیک در دمای اتاق توسط ستون سیلکاژل C18 دارای منافذ به قطر ۱۰۰ آنگستروم و با ذرات به اندازه ۱۰ میکرومتر با شناسه ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر انجام شد. فاز متحرک ترکیب استونیتریل و آب به نسبت ۵۰-۵۰ (w/w) و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. تعادل مکانیکی سارتوریوس با ۱۰ میکروگرم حلال برای وزن‌دهی نمونه‌ها استفاده شد (Viana, et al., 2003).

نتایج

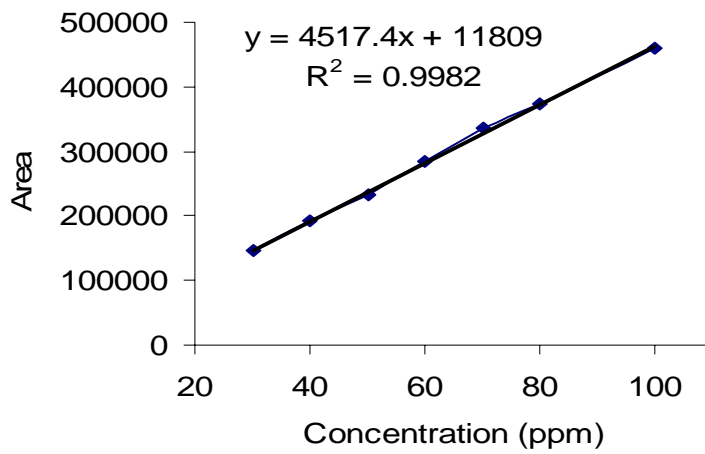
در شکل ۲ سطح زیر منحنی غلظت‌های متفاوت لاپاکول خالص و همبستگی خطی بین آنها نشان داده

جدول ۱- نتایج HPLC برای سطح زیر منحنی و غلظت لاپاکول با سه روش استخراج

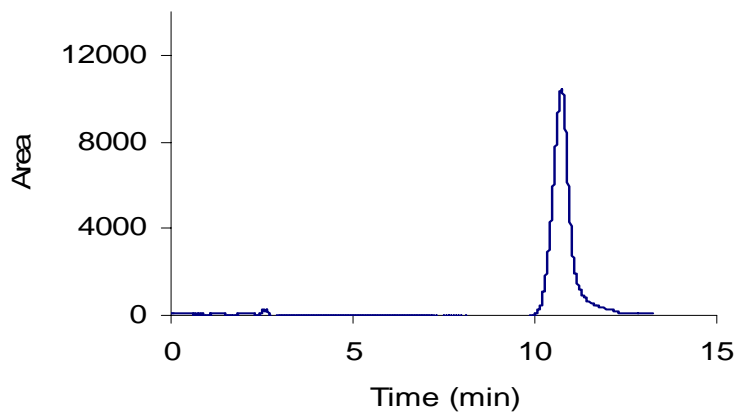
روش استخراج	سطح زیر منحنی	غلظت لاپاکول بر حسب قسمت در میلیون
متانول گرم شده در میکروویو برای شش دقیقه	۳۳۹۷۹۵/۸	۷۲/۶۱
متانول سرد	۱۹۰۸۴۳/۵	۳۹/۶۳
آب داغ در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد	۱۳۵۶۱۳/۷	۲۷/۴۱



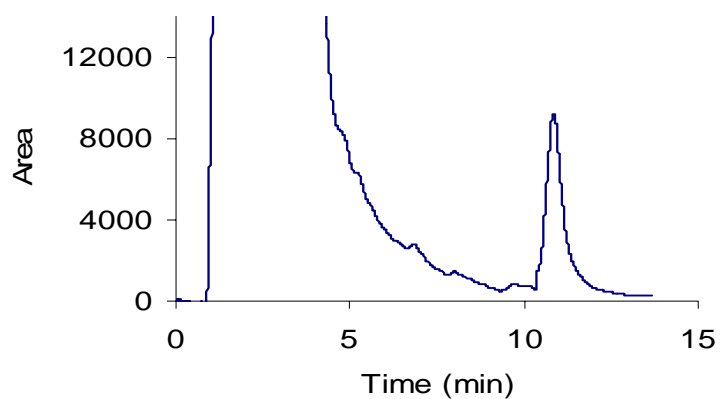
شکل ۱- ساختمان شیمیایی لاپاکول



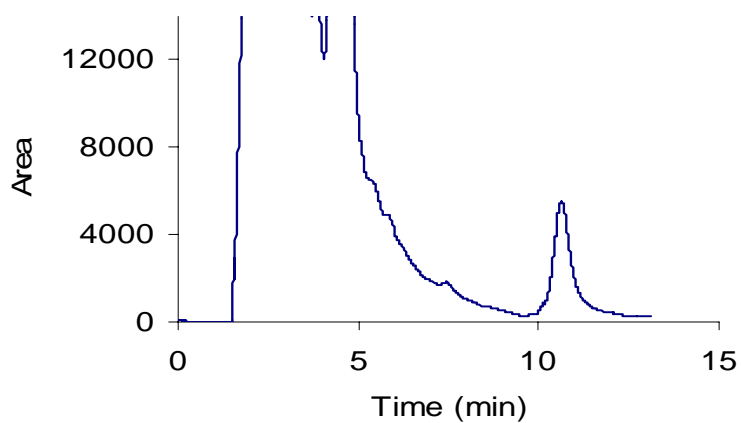
شکل ۲- منحنی کالیبراسیون



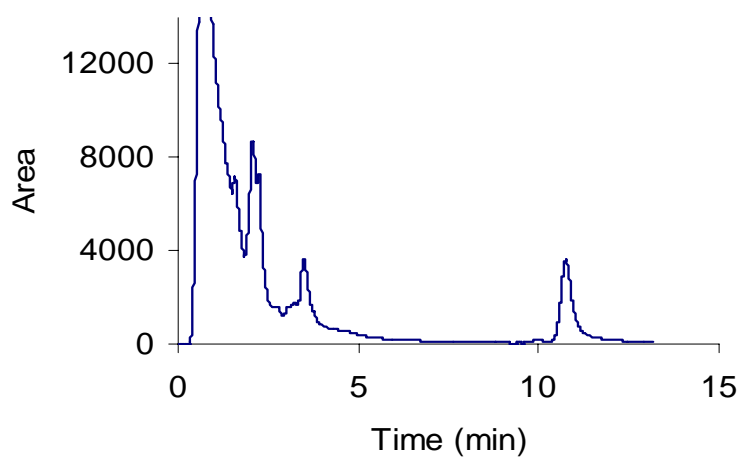
شکل ۳- کروماتوگرام محلول خالص لاپاکول با غلظت ۸۰ ppm



شکل ۴- کروماتوگرام لپاکول استخراج شده با روش متانول گرم شده در مایکروویو



شکل ۵- کروماتوگرام لپاکول استخراج شده با روش متانول سرد



شکل ۶- کروماتوگرام لپاکول استخراج شده با روش آب داغ

بحث

باغهای دارویی و ترویج در پارکها و فضاها سبز و نیز به عنوان بادشکن در اطراف مزارع مناسب است و امکان احیای منابع طبیعی در زمین های غیر قابل کشاورزی با این گیاه فراهم می باشد.

منابع مورد استفاده

- قهرمان، ا.، ۱۳۷۴. کروموفیت های ایران. جلد سوم، انتشارات مرکز

نشر دانشگاهی، تهران، ۷۶۸ صفحه.

- Cavalcante, F.A., Silva, J.L.V., Carvalho, V.M.N., Camara, C.A., Silva, T.M.S., Pinto, A.C., Vargas, M.D. and Silva, B.A., 2008. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, α and β -lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 695-706.
- Consolacao, M., Linardi, F., Oliveira M.M. and Sampaio, M.R., 1975. A Lapachol derivative active against mouse lymphocyte leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(11): 1159-1161.
- Guiraud, P., Steiman, R. and Campos-Takaki, G.M., 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of Lapachol and beta-Lapachol. *Planta Medica*, 60: 373-374.
- <http://www.rain-tree.com/paudarco.htm>, [On line]. 14 Dec 2007. Pau d'arco.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Tecomella>. [On line]. 20 Oct 2007. *Tecomella*.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Bignoniaceae>. [On line]. 7 Nov. 2007. Bignoniaceae.
- Hussain, H., Krohn, K., Ahmad, V.U., Miana, G.A. and Green, I.R., 2007. Lapachol: an overview. *Arkivoc*, 2: 145-171.
- Joshi, K.C. and Singh, L.B., 1977. Chemical examination of *Tecomella undulata* (G. Don) Seem. *Current Science*, 46: 145-146.
- Miranda, F.G.G., Vilar, J.C., Alves, I.A.N., Cavalcanti, S.C.H. and Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*, 1: 6-12.
- Steinert, J., Khalaf, H. and Rimpler, M., 1995. HPLC separation and determination of naphtha [2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography A*, 693: 281-287.
- Viana, L.M., Freitas, M.R., Rodrigues, S.V. and Baumann, W., 2003. Extraction of lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical CO₂: an alternative to soxhlet extraction? *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20(3): 317-325.

روش متانول گرم شده در میکروویو سریع، مؤثر و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد، زیرا انرژی میکروویو جایگزین پر قدرت مناسبی برای سایر روش های گرم کردن می باشد. براساس این روش میزان لاپاکول پوست داخلی ساقه انار شیطان ۳/۶ درصد در وزن خشک تعیین شد که قابل مقایسه با میزان لاپاکول گونه برزیلی این خانواده یعنی *Tabebuia avellanedae* است که به میزان ۲ تا ۷ گزارش شده است (<http://www.rain-tree.com/paudarco.htm>, 2007). پوست این گونه برزیلی به نام پائودارکو به عنوان دارو در طب سنتی چین استفاده می شود. همچنین عصاره گیری به روش سوکسله از چوب گونه برزیلی نشان داده است که دارای ۲/۵ درصد لاپاکول است (Viana et al., 2003).

استفاده از انرژی مایکروویو علاوه بر آنکه باعث کاهش مدت زمان عصاره گیری می شود، می تواند روش استخراج مؤثری برای لاپاکول باشد، اما تأثیر احتمالی مایکروویو بر ساختار شیمیایی لاپاکول بایستی روشن شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که گونه انار شیطان بومی جنوب ایران با داشتن لاپاکول با کمیت بالا می تواند کاندیدای مناسبی در طب سنتی گیاهان دارویی باشد. بنابراین حفاظت، تکثیر و زراعت این گیاه توصیه می شود. پیشنهاد می شود که مطالعات بیشتری بر روی میزان لاپاکول این گیاه در مناطق مختلف جنوب ایران انجام شود. در تحقیقات محلی صورت گرفته بیشتر مردم از خواص دارویی این گیاه بی اطلاع بودند و فقط در چند منطقه از حمام جوشانده پوست ساقه آن جهت درمان یرقان (زردی) استفاده می کردند و چون این مورد استفاده در منابع خارجی دیده نشده است، بنابراین زمینه مناسبی برای پژوهش می باشد. کشت و توسعه این گیاه به صورت

Lapachol extraction from inner bark stem of *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem.

S. Mohsenzadeh^{1*}, A.A. Amiri², N. Sayyadnia tayyebi³

1*- Corresponding author, Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran, E-mail: mohsenzadeh@susc.ac.ir

2- Department of Chemistry, Shiraz University, Shiraz, Iran

3- Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: March 2009

Revised: December 2009

Accepted: October 2009

Abstract

Lapachol is a naphthoquinone with anticancer, antibacterial, antifungal and antiviral activities. Lapachol and some of its derivatives tested with good experimental results in tumors. The bark of some trees belonging to the Bignoniaceae family contain up to a few percent of lapachol and often a considerable amount of related compounds. *Tecomella undulata* (Roxb.) Seem. is the only native species of the family in arid and semi-arid of southern parts of Iran. In this research lapachol have been extracted from *T. undulata* inner bark stem that collected from near Darab in Fars province by three methods. The methods were heated methanol in microwave for 6 minutes, non-heated methanol and hot water at 90°C temperature. The most effective extraction method was the heated methanol in microwave. According to this method, stem inner bark of *T. undulata* has 3.6% Lapachol in dry weight which is determined by high performance liquid chromatography.

Key words: *Tecomella undulate* (Roxb.) Seem., stem inner bark, lapachol, HPLC.