

استخراج و خالص سازی ماده موثره دارویی γ -Pyrone (خلین و ویسناژین) از گیاه *Ammi Visnaga L.*

محمد حاجی ابوالحسنی^{۱*}

چکیده

مقدمه: گیاه *Ammi Visnaga Lam.* (تیره جعفری)، از جمله گیاهان دارویی ارزشمند بومی کشور می باشد که حاوی ماده موثره دارویی γ -Pyrone (عمدتا محتوی خلین و ویسناژین) است. مهمترین اثرات درمانی آن بازکنندگی عروق محیطی و قلبی و مجاری تنفسی بوده و در معالجه آسم و آنژین دوپاترین استفاده می گردد. روش: در این تحقیق جداسازی و خالص سازی خلین و ویسناژین از عصاره حاصل از دانه گیاه با استفاده از ستون کروماتوگرافی و روش تبلور مجدد انجام شده، سپس با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، نقطه ذوب، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز شناسایی گردیده اند. تعیین مقدار و درجه خلوص آنها نیز با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شده است. **نتایج:** ترکیبات جدا شده از عصاره دانه گیاه (خلین و ویسناژین) با استفاده از تشابه نقطه ذوب به ترتیب $C_{155-153}$ و $C_{145-142}$ و داده های طیف سنجی FTIR آنها با نمونه های استاندارد و نیز تعیین R_f آنها $0/44$ و $0/37$ ، شناسایی و تایید گردیدند. کروماتوگرام HPLC عصاره (خلین و ویسناژین) با زمان بازداری $17/61$ دقیقه و $10/75$ دقیقه، مشابه با استاندارد های مربوطه، پیکهایی تیز، متقارن و با وضوح بالا نشان داده است. مقدار خلین و ویسناژین بطور میانگین در عصاره به ترتیب $1/114$ mg/g و $0/326$ mg/g، و درصد خلوص آنها $90/16$ ٪ و $79/62$ ٪ تعیین شده است. لذا با توجه به راندمان خوب و خلوص بالای ماده موثره دارویی γ -Pyrone (خلین و ویسناژین) در عصاره، می تواند مورد استفاده صنعت دارویی کشور قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *HPLC Ammi Visnaga Lam.*, γ -Pyrone, خلین، ویسناژین

مقدمه

از آنجایی که در بیشتر کشورهای جهان تحقیقات فارماکودینامیک وسیعی روی گیاهان دارویی انجام گرفته، لذا در دهه های اخیر کشفیات مهمی روی ترکیبات ناشناخته گیاهان دارویی حاصل شده و داروهایی همچون ترکیبات ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد میکروبی، ویتامینها و نیز هورمونها از آنها تهیه گردیده است (Miara *et al.*, 2019; Bishr *et al.*, 2017; Hashim *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2012; Marwat *et al.*, 2010; Anonymous, 2007). در ایران گیاهان دارویی به لحاظ موقعیت جغرافیایی، شرایط اقلیمی و تنوع آب و هوایی، انتشار و تنوع وسیعی دارد که ضرورت تحقیق بر روی آنها به عنوان منبعی ارزشمند حاوی طیف گسترده ای از مواد موثره دارویی، بیش از پیش اهمیت یافته و جایگاه ویژه ای پیدا کرده است.

گیاه *Ammi Visnaga Lam.* از خانواده جعفری (*Umbelliferae*)، گیاهی علفی، یکساله و دارای ساقه ای به ارتفاع ۱-۸/۰ متر است. برگهایی با بریدگیهای زیاد و منقسم به قطعات نازک و نخی شکل و گلهایی به رنگ سفید و مجتمع بصورت گل آذین چتر مرکب دارد (Travaini *et al.*, 2016; Hashim *et al.*, 2014; Abdul-Jalil *et al.*, 2010; Farnsworth *et al.*, 2008; Chevallier, 1996; Zargari, 1989). ماده موثره دارویی γ -Pyrones یا Furanochromones از اجزای اصلی ترکیبات این گیاه بوده که عمدتاً محتوی خلین (Khellin) با فرمول (4,9-dimethoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one) و ویسناژین (Visnagin) با فرمول (4methoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one) می باشد. مهمترین اثرات دارویی آن بازکنندگی عروق محیطی و قلبی (Peripheral and coronary vasodilator) بوده که در درمان بیماریهای قلبی- عروقی مورد استفاده قرار می گیرند و با اثر شل کنندگی بر روی عضلات صاف باعث باز شدن مجاری تنفسی گردیده و لذا در معالجه آسم (Asthma) و آنژین دوپاترین (Angina pectoris)، نیز مؤثر واقع می شوند (Tripathi & pandey, 2017; Al-Snafi, 2016; Kamal *et al.*, 2015; Algasoumi *et al.*, 2014; Shinde *et al.*, 2014; Rasooli *et al.*, 2000; Elgamal *et al.*, 1998 2007; Duarte *et al.*, 2000). همچنین با عملکرد ضد اسپاسمی (Antispasmodic) خود بر روی سیستم ادراری موجب تسهیل و کاهش زمان عبور سنگهای کلیوی (Urolithiasis) کوچک گردیده و با کاهش ایجاد اگزالات و کلسیم در کلیه ها اثر ارزنده ای نشان می دهند (Nirumand *et al.*, 2018; Jaradat *et al.*, 2017; Abdel-Aal *et al.*, 2016; Bhagavathula *et al.*, 2015; Badr *et al.*, 2015; Betalgy & Beltagy, 2015; Vanachayanbkul *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2001). البته اثرات متفاوت دیگری همچون ضد قارچ، ضد باکتری، ضد ویروس، ضد التهاب (Anti-inflammatory)، ضد دیابت (Antidiabetic) و محافظ اعصاب (Neuroprotective) به آن نسبت داده شده و اخیراً نیز اثر درمانی آن بر بیماریهایی همچون لک و پیس (Vitiligo) و پسوریازیس (Psoriasis) نیز مورد تایید قرار گرفته است (Bhagavathula *et al.*, 2015; Pavela, 2015; Dalila *et al.*, 2014; Feirouz & Salima, 2014; Ashour *et al.*, 2013; Ghareeb *et al.*, 2011; De Leeuw *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Satrani *et al.*, 2004; Jouad *et al.*, 2002; Abdel-Fattah *et al.*, 1983 & 1982). علاوه بر این بعلا سمیت کم و عدم تجمع γ -Pyrones در بدن، این ماده موثره دارویی می تواند در ردیف دارو های ارزشمند جهت درمان بیماریهای فوق الذکر قرار گیرد، که اهمیت تحقیق بر روی این گیاه بومی ایران را از جایگاه ویژه ای

برخوردار نموده است. هدف اصلی ما در این پژوهش استخراج و خالص سازی ماده موثره γ -Pyrones (عمدتاً محتوی خلین و ویسناژین) از گیاه Ammi Visnaga Lam. بومی ایران بعنوان ماده دارویی ارزشمند جهت استفاده صنعت دارویی کشور بوده که با استفاده از روشهای ارائه شده در فرانس 1998 & 2011 (World Health Organization) WHO آنالیز گردیده است. در این تحقیق خلین و ویسناژین با روشهای ستون کروماتوگرافی (Column chromatography)، تبلور مجدد (Re-crystalization) و کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography) خالص سازی شده، و با استفاده از نقطه ذوب و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) آنها و مقایسه با نمونه های استاندارد، مورد شناسایی قرار گرفته اند. راندمان و درجه خلوص هردو ماده خلین و ویسناژین نیز با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High performance liquid chromatography) محاسبه و با نمونه استاندارد آنها مقایسه گردیده است.

مواد و روشها

جمع آوری گیاه

گیاه Ammi Visnaga Lam.، از نواحی شمال ایران، گیلان، منطقه لوشان و رستم آباد (حاشیه رودخانه مشرف به سفید رود) در زمان برداشت (اواخر شهریور ماه) جمع آوری گردیده و جهت شناسایی و تایید به هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران ارائه شده است.

مواد شیمیایی

خلین استاندارد با خلوص ۹۸ درصد و ویسناژین استاندارد با خلوص ۹۷ درصد خریداری شده از Sigma-Aldrich، اتانول، اسید فسفریک ۸۵ درصد، اکسید آلومینیم، کلروفرم، متانول، اتیل استات، مولیبدات آمونیوم، نینهدرین، آلوکسان، انیدرید استیک، اسید نیتریک، تری کلرو آنتیموان، پتاسیم فروسیانات، اسید استیک گلاسیال، سدیم تنگستات، اسید سولفوریک ۹۸ درصد، اسید کلریدریک ۳۷ درصد، سرب، کادمیم که همگی از شرکت Merck خریداری شده است.

استخراج عصاره گیاهی

در این تحقیق از دو اندام ساقه و دانه گیاه برای استخراج استفاده شده و بطور جداگانه در آون با دمای $40-50^{\circ}\text{C}$ خشک و در محدوده $1\text{cm} < a < 10\text{cm}$ آسیاب گردیده است. ابتدا از ۳۰۰ mL اتانول بعنوان حلال برای استخراج عصاره از ۱۰۰ g نمونه آسیاب شده، استفاده گردید. سپس عصاره با استفاده از سیستم تبخیرکننده (Rotary evaporator system)، تغلیظ و پس از آن به دکانتور انتقال داده شد. معادل حجم عصاره، از اسیدهای معدنی (اسید فسفریک/ اسید سولفوریک ۵۰ درصد) استفاده کرده و پس از همزدن، فرصت داده تا کاملاً دو فاز گردد. این واکنش رنگی است، چون فورانوکرومونها در مجاورت اسیدهای قوی قادر به تشکیل نمکهای اکسونیوم (Oxonium salts) نارنجی/ زرد رنگ می باشند. فاز زیرین را برداشته هم

حجم آن با آب رقیق کرده، پس از تنظیم pH بین ۲ و ۳ آن را صاف نموده و رسوب محتوی کلین و ویسناژین را برداشته، در آن با دمای ۴۰-۵۰°C خشک گردید (Moubasher & Barakat, 1950).

خالص سازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی

در این مرحله ابتدا ستونی به ابعاد ۳۰×۱/۴ سانتیمتر انتخاب نموده و با اکسید آلومینیم پرگردید. ستون پر شده را با کلروفرم شستشو داده شد و سپس رسوب محتوی کلین و ویسناژین را که قبلا در کلروفرم حل و فیلتر شده بود، به داخل ستون اضافه گردید. با استفاده از مخلوط کلروفرم - متانول از نسبت ۱۰ تا ۱۰۰ درصد متانول ستون را مرحله به مرحله با دبی خروجی ۴۵ قطره در دقیقه شستشو داده و در هر مرحله فراکشنها با حجم تقریبی ۲ mL جمع آوری و برای آنالیز با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مورد استفاده قرار گرفت (El-Shibini *et al.*, 1969).

کروماتوگرافی لایه نازک

فراکشنها با لکه گذاری بر روی صفحات TLC با مشخصات Silica gel 60 F254 و قراردادن صفحات در فاز متحرک متشکل از مخلوط حلالهای تولوئن- اتر (۱:۱) اشباع شده با اسید استیک ۱۰ درصد تست گردید. فراکشنهای محتوی نمونه های خالص کلین و ویسناژین با استفاده از دتکتور UV-365nm شناسایی شدند (Wagner *et al.*, 1996 & 1984). پس از تهیه نمونه های خالص کلین و ویسناژین، حلال نمونه ها تبخیر و با استفاده از روش تبلور مجدد کریستالهای سفید تا تقریباً زرد رنگ کلین در متانول و بلورهای نخی شکل و سفید رنگ ویسناژین در آب تشکیل گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

از روش one-way ANOVA برای بررسی نوع اندامهای مختلف گیاه (بعنوان متغیر مستقل) بر میزان محصول γ -Pyrone، عمدتاً کلین و ویسناژین (بعنوان متغیر وابسته) استفاده شده و معناداری نتایج این آزمایشات نیز با $p\text{-value} < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین تمام آزمایشات با سه تکرار انجام شده و نتایج آنها با استفاده از Excel 2003 بصورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شده است.

تعیین نقطه ذوب (Melting point)

نقطه ذوب هر دو نمونه خالص شده کلین و ویسناژین با استفاده از دستگاه نقطه ذوب Büchi تعیین و با نمونه های استاندارد آنها مقایسه گردید.

آزمایشهای شناسایی کیفی کلین و ویسناژین

۱-آزمون آمونیوم مولیبدات: ۰/۱g از نمونه همراه با گرم کردن در ۵mL اتانول ۵۰ درصد حل کرده و به آن ۱mL

محلول آمونیوم مولیبدات ۸ درصد افزوده، بمدت ۲ دقیقه حرارت داده شد. سپس ۲mL اسید سولفوریک ۲۰ درصد به آن اضافه کرده و گرم گردید (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۲- **آزمون سدیم تنگستات:** ۰/۱g از نمونه همراه با گرم کردن در ۵mL اتانول ۵۰ درصد حل کرده و به آن ۱mL محلول سدیم تنگستات ۱۰ درصد افزوده، بمدت ۲ دقیقه حرارت داده شد. سپس ۲mL اسید سولفوریک ۲۰ درصد به آن اضافه کرده و گرم گردید (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۳- **آزمون پتاسیم فروسیانات:** ۰/۱g از نمونه همراه با گرم کردن در ۵mL اتانول ۵۰ درصد حل کرده و به آن ۲mL محلول پتاسیم فروسیانات ۵ درصد افزوده، بمدت ۲ دقیقه حرارت داده شد. سپس ۲mL اسید سولفوریک ۲۰ درصد به آن اضافه کرده و گرم گردید (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۴- **آزمون آنتیموان تری کلراید:** ۰/۱g از نمونه همراه با گرم کردن در ۵mL اتانول ۵۰ درصد حل کرده و به آن ۲mL معرف آنتیموان تری کلراید اضافه گردید. این معرف از حل کردن ۱۵g آنتیموان تری کلراید در ۴۰mL آب مقطر و ۲۰mL اسید کلریدریک غلیظ تهیه شده است (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۵- **آزمون انیدرید استیک:** ۰/۱g از نمونه را در یک لوله آزمایش خشک ریخته، به آن ۰/۵mL انیدرید استیک و ۲mL اسید سولفوریک غلیظ اضافه کرده و بمدت ۲ دقیقه حرارت داده شد (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۶- **آزمون نینهیدرین:** بمقدار خیلی کم (چند میلی گرم) نینهیدرین در یک لوله آزمایش خشک، ۲mL اسید سولفوریک غلیظ اضافه گردید. یک رنگ گل سرخی کمرنگ ظاهر می شود، سپس به آن مقداری از کریستالهای ماده مورد آزمایش اضافه شد (Barakat & Badran, 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

۷- **آزمون آلوکسان:** ۰/۱g از نمونه را در یک لوله آزمایش خشک ریخته، به آن ۰/۱g آلوکسان و ۲mL اسید سولفوریک غلیظ اضافه کرده و بمدت ۱ دقیقه حرارت داده شد (Barakat, & Badran 1951; Fahmy *et al.*, 1949).

اندازه گیری رطوبت به روش وزنی (Gravimetry method)

مقدار ۲-۵g از ماده گیاهی را در ظرفی که قبلا وزن آن تثبیت شده، قرار داده و آنرا در آونی با دمای $105-100^{\circ}\text{C}$ تنظیم شده، بمدت ۴ ساعت گذاشته شد تا وزن ثابتی بدست آید. سپس ظرف محتوی نمونه به دسیکاتور منتقل و پس از رسیدن به دمای محیط، توزین گردید. اختلاف وزن با ماده اولیه بر حسب میلی گرم در هر گرم ماده مورد آزمایش محاسبه می شود. میزان رطوبت برای هر فرآورده گیاهی نبایستی از ۵ درصد تجاوز نماید (World Health Organization, 2011 & 1998).

روش اندازه گیری خاکستر تام

مقدار ۲-۴g از ماده گیاهی را در یک بوته چینی که قبلا وزن آن تثبیت شده، قرار داده و بطور یکنواخت آنرا در سطح کروزه پخش کرده و در کوره گذاشته شد. دمای کوره را بتدریج تا $600-500^{\circ}\text{C}$ افزایش داده و در این دما بمدت ۲۰ تا ۳۵ دقیقه حرارت داده شد. این عمل باعث آزاد شدن کربن شده، تا احتراق کامل صورت گیرد (سفید شدن نمونه نشانگر عدم وجود کربن است). سپس بوته را در دسیکاتور گذاشته و پس از رسیدن به دمای محیط توزین گردید. اگر در این آزمایش کربن آزاد شده

خاکستر بدست نیاید، باقیمانده احتراق را با ۲mL آب یا نیترات آمونیوم اشباع مرطوب کرده، ابتدا روی حمام آب آنرا خشک و سپس با هات پلیت سوزانیده تا وزن ثابتی بدست آید. میزان خاکستر تام برحسب میلی گرم در یک گرم از ماده مورد آزمایش محاسبه می گردد (World Health Organization, 2011 & 1998).

روش اندازه گیری خاکستر غیر محلول در اسید

به کروزه محتوی خاکستر تام مقدار ۲۵ mL محلول اسید کلریدریک 7.0 g/L اضافه نموده و بوسیله شیشه ساعت روی آنرا پوشانده بمدت ۵ دقیقه جوشاندهیم، سپس شیشه ساعت را با ۵ mL آب گرم شستشو داده و محلول حاصل به کروزه اضافه گردید. ماده نامحلول را روی کاغذ صافی قرار داده با آب گرم شسته، تا کاغذ صافی خنثی گردد. سپس ماده نامحلول روی صافی را به کروزه دیگری انتقال داده و آنرا با هات پلیت سوزانیده تا وزن ثابتی بدست آید. میزان خاکستر غیر محلول در اسید بر حسب میلی گرم در یک گرم از ماده مورد آزمایش محاسبه می شود (World Health Organization, 2011 & 1998).

روش اندازه گیری خاکستر محلول در آب

تعیین میزان خاکستر محلول در آب، از نظر وزنی با خاکستر تام و باقیمانده آن مرتبط می باشد. به کروزه محتوی خاکستر تام مقدار ۲۵mL آب مقطر افزوده و بمدت ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس ماده نامحلول را به کروزه شیشه ای (Sintered-glass) انتقال داده و با آب گرم شستشو و بمدت ۱۵ دقیقه در کوره با دمای 450°C قرار داده شد تا وزن ثابتی بدست آید. وزن باقیمانده برحسب میلی گرم از وزن خاکستر تام کم گردیده و میزان خاکستر محلول در آب برحسب میلی گرم از ماده مورد آزمایش محاسبه می گردد (World Health Organization, 2011 & 1998).

روش اندازه گیری فلزات سنگین (سرب و کادمیم)

دستگاه مورد آزمایش Sp9 Atomic Absorption Spectrophotometer از شرکت Pyeunicam می باشد. در این آزمون جهت آماده سازی نمونه از روش هضم مرطوب در سیستم باز استفاده شده است. ابتدا $250\text{--}200 \text{ mg}$ ماده گیاهی مورد آزمایش را دقیق وزن کرده، در کروزه سیلیسی قرار داده و به آن ۱ mL از مخلوط هضم قبلا تهیه شده (محتوی ۲ قسمت محلول اسید نیتریک 1000 g/L و یک قسمت محلول اسید پرکلریک 1170 g/L) اضافه کرده و داخل آون قرار داده شد. در آون بترتیب در دمای 100°C بمدت ۳ ساعت، در دمای 120°C بمدت ۲ ساعت و در دمای 240°C بمدت ۴ ساعت نگهداشته شد. باقیمانده که محتوی ترکیبات معدنی می باشد، جهت تعیین فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب باقیمانده را در $2/5 \text{ mL}$ محلول اسید نیتریک (1000 g/L) حل کرده و سپس محلولهایی با رقت ۱۰ و ۵۰ بار تهیه گردید تا برای آنالیز با دستگاه جذب اتمی مورد استفاده قرارگیرد. در این مرحله محلولهای استاندارد سرب با غلظتهای 1 ppm ، 2 ppm ، 4 ppm و کادمیم با غلظتهای $0/2 \text{ ppm}$ ، $0/4 \text{ ppm}$ ، $0/6 \text{ ppm}$ ، نیز تهیه گردید تا برای آنالیز با دستگاه جذب اتمی استفاده شود. میزان سرب و کادمیم مجاز بترتیب 10 ppm و $0/3 \text{ ppm}$ می باشد. توضیح اینکه هر نمونه مورد آزمایش با نمونه شاهد مقایسه گردیده است (World Health Organization, 2011 & 1998).

روش تجزیه دستگاهی با FTIR

دستگاه مورد آزمایش Pu9624 FTIR Spectrometer از شرکت Philips می باشد. از این روش طیف سنجی برای تعیین گروههای عاملی که در خلین و ویسناژین حضور دارند، استفاده شده است. در این آزمون با تهیه قرص KBr از نمونه ها، طیف گیری انجام شده است. از ۱ mg نمونه های خلین و ویسناژین خالص سازی شده و نمونه های استاندارد آنها را هر کدام بطور جداگانه برای تهیه ۱۰۰mg قرص KBr بدون آب استفاده شد. طیف سنجی در دمای اتاق و در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰^۱ انجام گردید. در مجموع ۲۰ اسکن برای هر یک از نمونه ها با وضوح cm^{-1} ۴ در نظر گرفته شده است.

روش تجزیه دستگاهی با HPLC

بمنظور تعیین مقدار و درجه خلوص خلین و ویسناژین در عصاره استخراج شده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با مشخصات ذیل که شامل: سیستم (Waters HPLC (486)، مجهز به (Waters pumps (510)، Waters UV detector، و نرم افزار Millenium می باشد، استفاده شده است. ستون از نوع μ Bondapak C₁₈ با ابعاد 3.9×150 mm و اندازه ذرات پایه 4 μm بود. Flow rate برابر 1mL / min و ترکیب فاز متحرک متشکل از آب/ متانول / استونیتریل (2:49:49 v/v/v) بود. دتکتور مورد استفاده UV با طول موج 254nm و حجم هر بار تزریق برابر 5 μL و انجام آزمایش در دمای اتاق (۲۵°C) انجام شده است.

نمونه های مجهول را هر کدام جداگانه (خلین و ویسناژین) ۳mg توزین کرده، در ۱۰۰mL آب و متانول (۵۰:۵۰) حل و فیلتر (0.45 μm) نموده و برای تزریق به دستگاه آماده گردید. همچنین بطور جداگانه از هر دو ماده استاندارد خلین با خلوص ۹۸ درصد و ویسناژین با خلوص ۹۷ درصد (خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich)، محلولهایی به میزان ۵mg، ۳، ۱ و ۰.۶ در ۱۰۰mL آب و متانول (۵۰:۵۰) تهیه و فیلتر (0.45 μm) کرده و به دستگاه تزریق شد. توضیح اینکه هر تزریق با سه تکرار انجام شده است. سپس با استفاده از سطح زیر منحنی بدست آمده برای غلظت های فوق الذکر، منحنی کالیبراسیون (سطح - غلظت) هر کدام توسط نرم افزار Excel ترسیم و معادله خط رگرسیون آنها بدست آمد. با داشتن سطح زیرمنحنی نمونه مجهول و انطباق آن با منحنی های کالیبراسیون مربوطه، غلظت خلین و ویسناژین در آن مشخص گردید.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می گردد نتایج گرفته شده از آزمونهای شناسایی فورانوکرومونها (خلین و ویسناژین) جداسازی و خالص سازی شده از عصاره گیاه، منطبق با مشخصات مندرج در این جدول بوده و نقطه ذوب خلین و ویسناژین نیز در محدوده نمونه استاندارد آنها بدست آمده است.

جدول ۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی خلین و ویسناژین

Table 1. Physicochemical characteristics of Khalin and Visnagin

ردیف	نوع آزمایشها	ویژگیهای خلین	ویژگیهای ویسناژین
۱	شکل ظاهری	کریستالهای سفید تا تقریباً زرد رنگ	بلورهای نخی شکل و سفید رنگ
۲	میزان حلالیت	در کلروفرم و اسیداستیک گلاسیال	در کلروفرم نسبت خیلی زیاد و در الکل بمقدار کمتر حل می شود
۳	نقطه ذوب	C ۱۵۴-۱۵۵	C ۱۴۲-۱۴۵
۴	سدیم تنگستات	رسوب کریستالی نارنجی	محلول زرد رنگ
۵	آمونیم مولبیدات	رسوب کریستالی نارنجی	رنگ سبز مایل به زرد
۶	نیترویدرین	رنگ سبز درخشان	رنگ ارغوانی تیره
۷	آلوکسان	رنگ سبز تیره	رنگ قرمز تیره
۸	انیدرید استیک	رنگ قرمز تیره	رنگ سبز تیره
۹	آنتیموان تری کلراید	رسوب کریستالی نارنجی	رسوب زرد رنگ
۱۰	پتاسیم فروسیانات	رسوب کریستالی نارنجی	رسوب کریستالی زرد

نتایج مربوط به میزان رطوبت، خاکستر تام، خاکستر غیر محلول در اسید و خاکستر محلول در آب عصاره

نتایج گرفته شده از آزمایشات انجام شده بر روی عصاره (جدول ۲) نشان داده است که میزان رطوبت با میانگین ۳/۶ درصد (با حد مجاز حداکثر ۵ درصد) کمتر از حد مجاز آن بوده و خاکستر تام، خاکستر غیر محلول در اسید و خاکستر محلول در آب عصاره نیز بترتیب با میانگین ۲۱۵mg/g، ۲۵mg/g و ۳۵mg/g بدست آمده است. توضیح اینکه نتایج بصورت Mean±SD گزارش شده است.

جدول ۲- نتایج اندازه گیری میزان رطوبت، خاکستر تام، خاکستر غیر محلول در اسید

و خاکستر محلول در آب از ۱g نمونه

Table 2. Results of measuring moisture, total ash, insoluble ash in acid and soluble ash in water from 1g of sample

ردیف	نوع آزمایش	نتایج
۱	درصد رطوبت	۳/۶±۰/۱۴٪
۲	خاکستر تام	۲۱۵±۰/۱۳ mg/g
۳	خاکستر غیر محلول در اسید	۲۵±۰/۱۱ mg/g
۴	خاکستر محلول در آب	۳۵±۰/۱۷ mg/g

نتایج مربوط به میزان فلزات سنگین (سرب و کادمیم) عصاره

اندازه گیری فلزات سنگین از جمله دستورالعملهای الزام آور WHO برای مواد موثره دارویی موجود در عصاره های گیاهی می باشد که محدوده مجاز آن بترتیب برای سرب حداکثر ۱۰ ppm و برای کادمیم حداکثر ۰/۳ ppm تعیین شده است. همانطور که نتایج جدول ۳ نشان می دهد میزان سرب عصاره تهیه شده با میانگین ۲/۴۲ ppm و میزان کادمیم آن با میانگین ۰/۲۱۱ ppm کمتر از حد مجاز تعیین شده می باشند. توضیح اینکه نتایج بصورت $Mean \pm SD$ گزارش شده است.

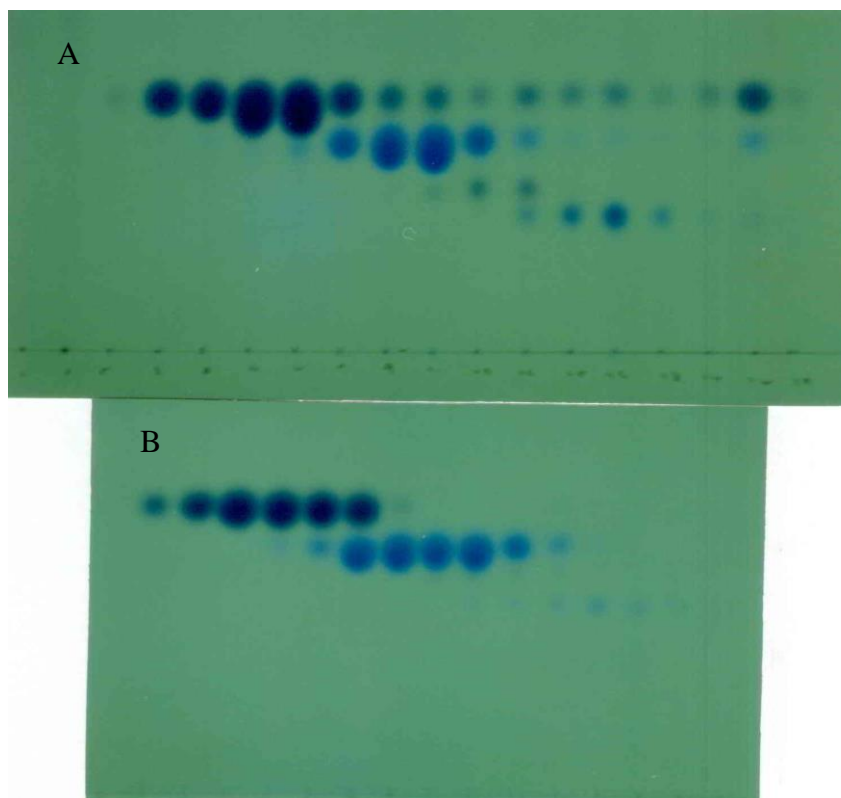
جدول ۳- نتایج اندازه گیری سرب و کادمیم از ۲۰۰mg نمونه

Table 3. Results of measuring lead and cadmium from 200 mg samples

نتایج	نوع آزمایش	ردیف
۲/۴۲ ± ۰/۱۵ ppm	میزان سرب	۱
۰/۲۱۱ ± ۰/۰۹ ppm	میزان کادمیم	۲

نتایج کروماتوگرافی لایه نازک TLC

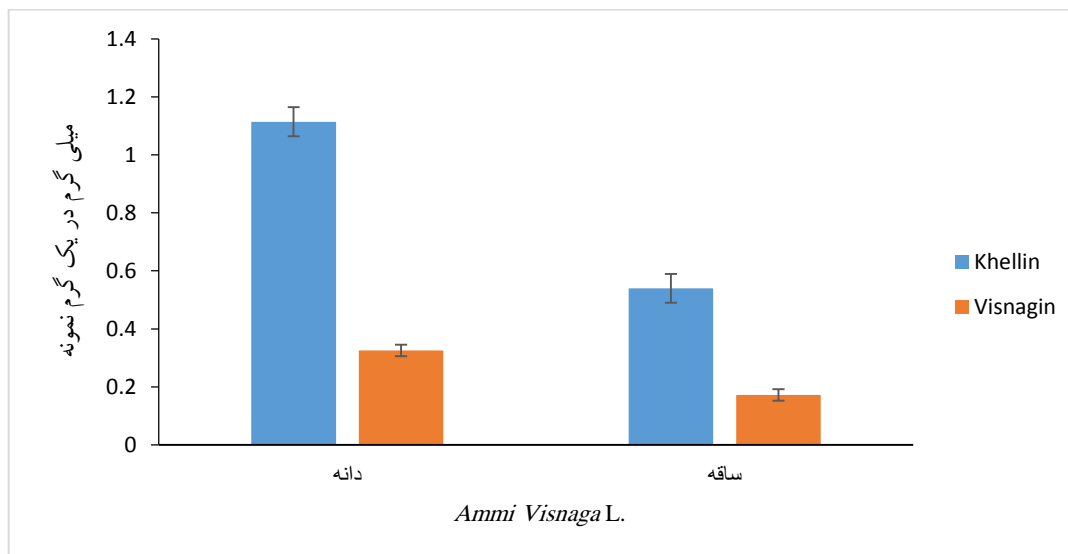
آنالیز با کروماتوگرافی لایه نازک (شکل ۱) نشان داد که فراکشنهای اول تا چهارم در هر دو شکل A و B با $R_f = ۰/۴۴$ نشاندهنده خلین خالص، فراکشنهای پنجم، ششم و هفتم در هر دو شکل A و B مخلوط خلین و ویسنازین بوده است. در حالیکه بقیه فراکشنها در شکل A (که در مراحل اولیه خالص سازی قرار دارد) علاوه بر مخلوط خلین و ویسنازین، ترکیبات دیگری نیز مشاهده می شود اما فراکشنهای هفتم تا دهم در شکل B (که در مراحل پایانی خالص سازی قرار دارد) با $R_f = ۰/۳۷$ نشاندهنده ویسنازین خالص می باشند.



شکل ۱- A: TLC مراحل اولیه خالص سازی و B: TLC مراحل پایانی خالص سازی عصاره تهیه شده به روش کروماتوگرافی ستونی می باشد. لکه های اول تا چهارم در هر دو شکل A و B خلین خالص، لکه های پنجم، ششم و هفتم در هر دو شکل A و B مخلوط خلین و ویسناژین و لکه های هفتم تا دهم در شکل B ویسناژین خالص هستند.

Figure 1. A: TLC is the initial stages of purification and B: TLC is the final stages of purification of the extract prepared by column chromatography. The first to fourth spots in both forms A and B are pure khellin, the fifth, sixth and seventh spots in both forms A and B are a mixture of khellin and visnagin, and the seventh to tenth spots in form B are pure visnagin.

بجهت اینکه نتایج گرفته شده از آزمایشات فیزیکوشیمیایی انجام شده بر روی فورانوکرومونها (خلین و ویسناژین) از عصاره گیاه *Ammi visnaga L.* و R_f های محاسبه شده از TLC آنها و نیز نتایج حاصل از تعیین نقطه ذوب این ترکیبات (جدول ۱)، انطباق قابل ملاحظه ای با نمونه های استاندارد آنها را نشان داده اند، لذا هویت خلین و ویسناژین در عصاره گیاه شناسایی و تایید گردیده است (O'Neil, 2013). نتایج این پژوهش با نتایجی که توسط بلتاژی (Beltagy, Beltagy & Shinde & Laddha, 2014) و کاراویا (Karawya *et al.*, 1970) گزارش شده، نیز مطابقت دارد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد مقادیر خلین و ویسناژین در دانه گیاه بطور میانگین بترتیب برابر با ۱/۱۱۴ و ۰/۳۲۶ میلی گرم در یک گرم نمونه، افزایش تقریباً دو برابری نسبت به مقادیر آنها در ساقه گیاه که بترتیب برابر با ۰/۱۷۲ و ۰/۱۷۲ میلی گرم در یک گرم نمونه بودند، را نشان داده است.



شکل ۲- مقدار خلین و ویسناژین در دانه و ساقه گیاه

(میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار و معناداری با $p\text{-value} < 0.05$)

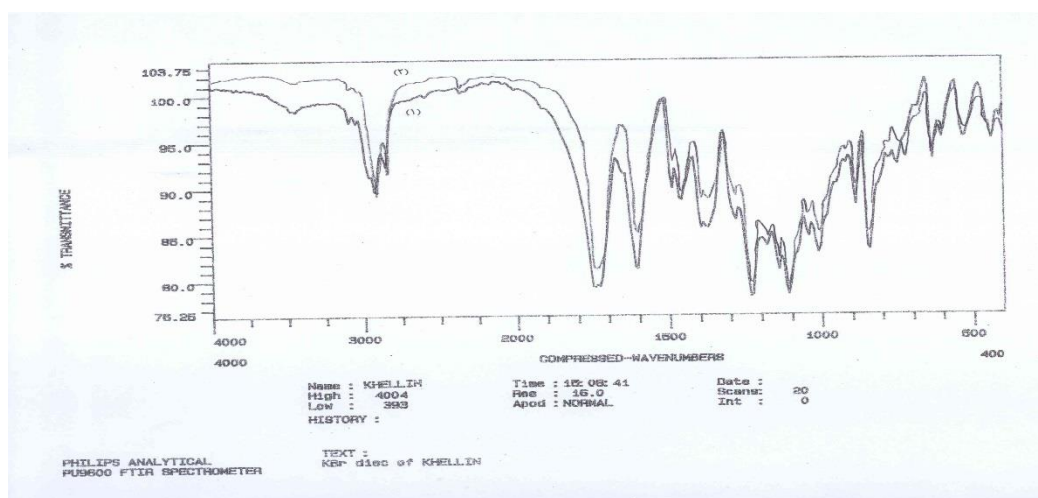
Figure 2. The amount of khellin and visnagin in the seeds and stems of the plant (mean of 3 repetitions \pm standard deviation and significance with $p\text{-value} < 0.05$)

در تحقیقات فرانچی (Franchi *et al.*, 1985) که با استفاده از آنالیز HPLC بر روی فورانوکرومونها (خلین و ویسناژین) در اندامها و در مراحل مختلف رشد گیاه *Ammi visnaga L.* بررسی گردیده، بالاترین میزان خلین و ویسناژین در میوه گیاه گزارش شده و نتایج حاصل از این پژوهش نیز (شکل ۲) همخوانی با این تحقیقات را نشان داده، بطوریکه مقادیر خلین و ویسناژین در دانه گیاه نسبت به ساقه آن افزایش تقریباً دو برابری داشته است. بنظر می رسد هنگام گل دادن و تولید دانه، γ -Pyrone

(عمدتا خلین و ویسناژین) اغلب در محلهای تولید گل در میوه ها یا دانه ها ی گیاه جای می گیرند و لذا افزایش مقدار آن می تواند بدلیل مرحله رشد گیاه باشد، که یکی از عوامل مهم و تاثیرگذار در تعیین مقدار γ -Pyrone در گیاه محسوب می گردد (Sellami *et al.*, 2013).

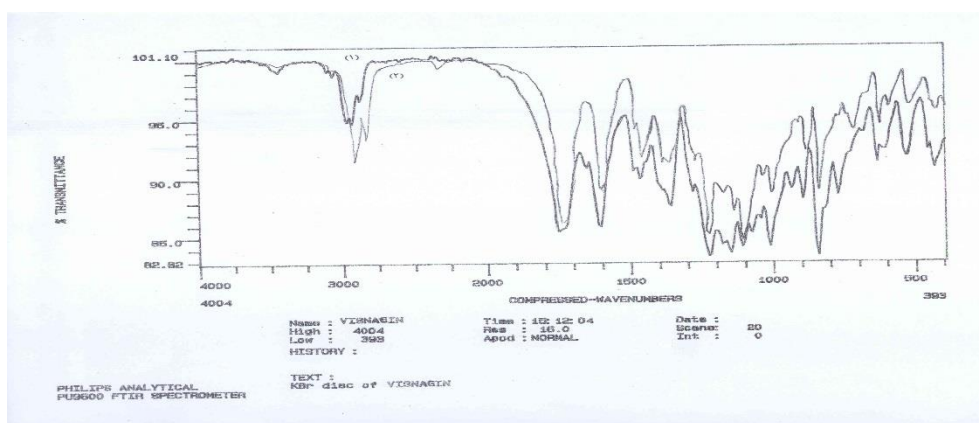
نتایج مربوط به طیف سنجی FTIR

نتایج طیف سنجی برای هر دو نمونه خلین و ویسناژین استخراج شده از گیاه *Ammi visnaga L.* بترتیب در شکل های ۳ و ۴ نشان داده شده و همانطور که مشاهده می گردد با نمونه های استاندارد انطباق قابل ملاحظه ای دارند. مشخصات باندها نیز در محدوده $3000-1100\text{ cm}^{-1}$ در جدول ۳ بصورت خلاصه آورده شده است.



شکل ۳- طیف FTIR: (۱) خلین تهیه شده (۲) خلین استاندارد

Figure 3. FTIR spectrum: (1) Prepared khellin (2) Standard khellin



شکل ۴- طیف FTIR: (۱) ویسناژین تهیه شده (۲) ویسناژین استاندارد

Figure 4. FTIR spectrum: (1) Prepared visnagin (2) Standard visnagin

جدول ۴- مشخصات باندهای اصلی خلین و ویسناژین گرفته شده از طیف FT-IR

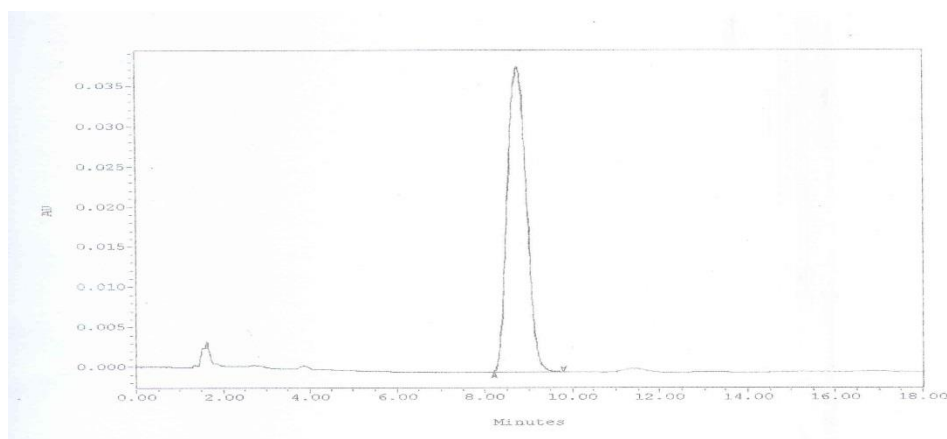
Table 4. Characteristics of the main bands of khellin and visnagin from the FT-IR spectrum

وظایف	باندها
ارتعاشات کششی CH_3	باند مهم در محدوده 3000 cm^{-1}
ارتعاشات کششی C=O کونژوگه	باند قوی در محدوده $1735-1650\text{ cm}^{-1}$
ارتعاشات کششی C=C-C=O کونژوگه	باند در محدوده $1625-1600\text{ cm}^{-1}$
ارتعاشات کششی Ar-O	باند در محدوده $1375-1350\text{ cm}^{-1}$
ارتعاشات کششی C-O	باند در محدوده 1125 cm^{-1}

در طیف سنجیهای بدست آمده (شکل‌های ۳ و ۴) و نیز داده های مندرج در جدول ۴، یک باند مهم در محدوده 3000 cm^{-1} وجود دارد که به ارتعاشات کششی CH_3 نسبت داده شده است. همچنین یک باند قوی در 1650 cm^{-1} برای خلین و در 1735 cm^{-1} برای ویسناژین وجود دارد که ممکن است به ارتعاشات کششی کربونیل دار کونژوگه نسبت داده شود. علاوه بر این، باندهای دیگری بترتیب در نواحی 1625 cm^{-1} برای خلین و در 1600 cm^{-1} برای ویسناژین مشاهده می شود که می تواند بواسطه C=C-C=O کونژوگه ساخته شده باشد. باندهای اندازه گیری شده بترتیب در نواحی 1375 cm^{-1} برای خلین و در 1350 cm^{-1} برای ویسناژین به ارتعاشات کششی Ar-O و در ناحیه 1125 cm^{-1} برای خلین و ویسناژین به ارتعاشات کششی C-O نسبت داده می شود (Beltagy & Beltagy, 2015; Shinde & Laddha, 2014; Buriak & Kurinna, 1971; Chen *et al.*, 1969; Ellenbogen, *et al.*, 1951; Bailey *et al.*, 1951).

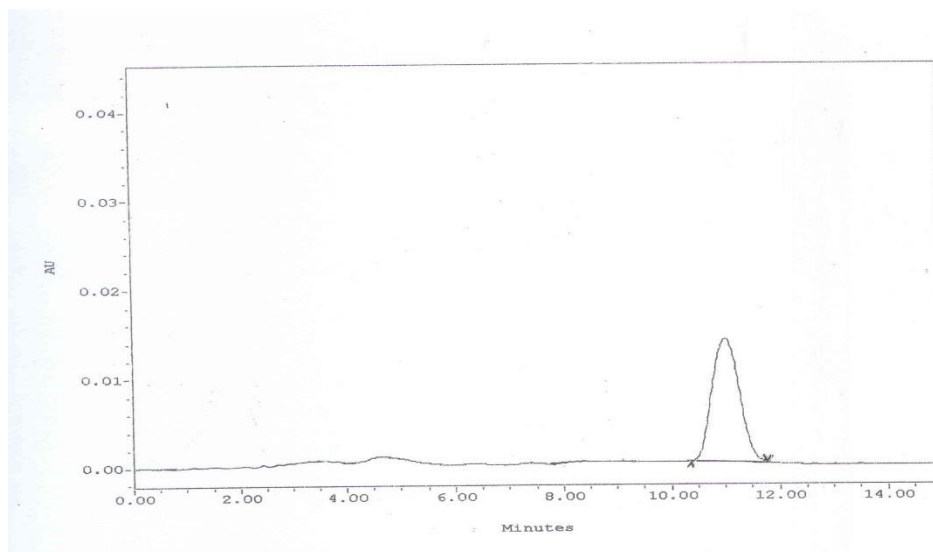
نتایج مربوط به آنالیز HPLC

پس از انجام تزریق نمونه های استاندارد خلین و ویسناژین استاندارد و بررسی داده های استخراج شده از آنالیز HPLC، خلین با زمان بازداری (Retention time) $8/617$ دقیقه (شکل ۵) و ویسناژین با زمان بازداری $10/750$ دقیقه (شکل ۶) بدست آمد.



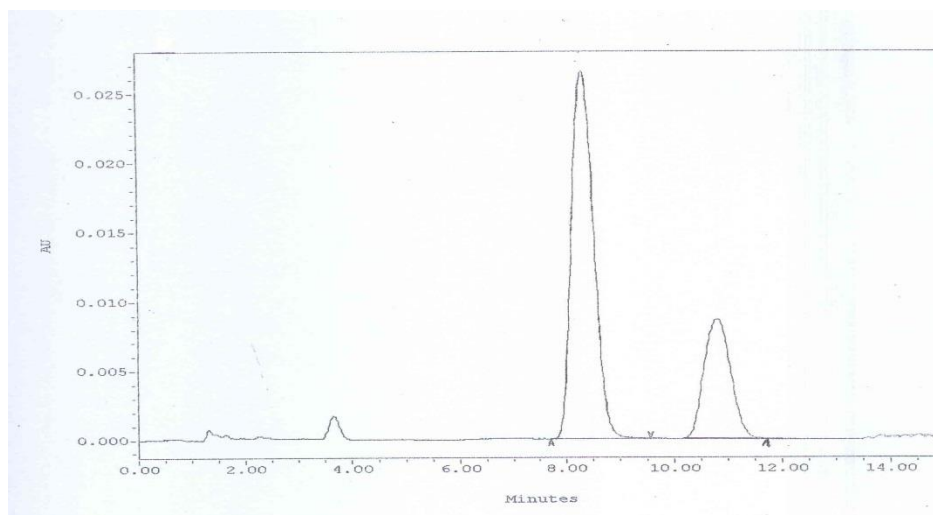
شکل ۵- کروماتوگرام HPLC از خلین استاندارد

Figure 5. HPLC chromatogram of khellin standard



شکل ۶- کروماتوگرام HPLC از ویسناژین استاندارد

Figure 6. HPLC chromatogram of visnagin standard



شکل ۷- کروماتوگرام HPLC از عصاره گیاه *Ammi visnaga*

Figure 7. HPLC chromatogram of *Ammi visnaga* plant extract

منحنی کالیبراسیون مربوط به خلین و ویسناژین در محدوده غلظتی $10-60 \mu\text{g/mL}$ خطی و معادلات رگرسیون آنها با ضریب همبستگی (R^2) (Correlation coefficient) $0/998$ برای خلین و $0/997$ برای ویسناژین، بترتیب ذیل بدست آمده است:

$$Y = 48523x - 48806$$

$$Y = 37876x - 289401$$

با توجه به معادلات رگرسیون فوق الذکر و نتایج حاصله از آنالیز HPLC، تعیین مقدار مواد موثره خلین و ویسناژین

در عصاره استخراج شده از ۱g دانه گیاه و درصد خلوص آنها نسبت به ماده استاندارد مربوطه محاسبه و در جدول ۵ منعکس گردیده است. بر این اساس بطور میانگین مقدار و درصد خلوص خلین به ترتیب برابر با ۱/۱۱۴mg، ۹۰/۱۶ درصد و ویسناژین به ترتیب برابر با ۰/۳۲۶mg، ۷۹/۶۲ درصد خواهد شد. توضیح اینکه نتایج بصورت Mean±SD گزارش شده است.

جدول ۵- تعیین مقدار و درصد خلوص مواد موثره خلین و ویسناژین موجود در عصاره استخراج شده از یک گرم دانه گیاه

Table 5. Quantitative determination and percentage of purity of the active ingredients of khellin and visnagin in the extract from 1g of plant seeds

وزن عصاره استخراج شده (mg)	مقدار خلین در عصاره استخراج شده (mg)	درصد خلوص خلین نسبت به استاندارد	مقدار ویسناژین در عصاره استخراج شده (mg)	درصد خلوص ویسناژین نسبت به استاندارد
۱/۵۳۱±۰/۱۲	۱/۱۱۴±۰/۰۸	۹۰/۱۶±۰/۱۳	۰/۳۲۶±۰/۱۱	۷۹/۶۲±۰/۱۵

شناسایی و ارزیابی کمی و کیفی فورانوکرومونها (خلین و ویسناژین) در عصاره استخراج شده از گیاه *Ammi visnaga L.* با استفاده از نتایج گرفته شده از آنالیز HPLC در این پژوهش با مطالعاتی که توسط بیشتر (Bishr *et al.*, 2016)، بدر (Badr *et al.*, 2015)، کمال (Kamal *et al.*, 2015)، آلكاسومی (Alqasoumi *et al.*, 2014)، شینده (Shinde & Laddha, 2014)، ال-دومیاتی (El-Domiaty, 1992)، مصباح (Mesbah, 1992) و مارتلی (Martelli & Bovalini, 1984) انجام شده، همخوانی خوبی را نشان داده است. همچنین مقایسه کروماتوگرام HPLC گرفته شده از عصاره استخراج شده (شکل ۷) با کروماتوگرامهای HPLC مربوط به نمونه های استاندارد خلین و ویسناژین (شکل های ۵ و ۶) کاملاً مطابقت داشته و زمان بازداری مشابهی را با نمونه های استاندارد (برای خلین ۸/۶۱۷ دقیقه و برای ویسناژین ۱۰/۷۵۰ دقیقه) نشان داده است که این مشابهت، خلوص خلین و ویسناژین جدا شده از عصاره استخراج شده را در مقایسه با نمونه های استاندارد آنها تایید می نماید.

از مهمترین ویژگی این روش تقارن شکل و وضوح بالای کروماتوگرامهای خلین و ویسناژین بدلیل استفاده از فاز متحرک (محتوی متانول، آب و استونیتریل به نسبت ۴۹:۴۹:۲، ۷:۷:۷) و جداسازی کامل آنها در کمتر از ۱۲ دقیقه و نیز تفکیک مناسب آنها از یکدیگر با توجه به تفاوت زمان بازداری شان، تعیین مقدار همزمان خلین و ویسناژین امکان پذیر شده است. بنظر می رسد افزودن ۲ درصد استونیتریل به فاز متحرک، هم شکل کروماتوگرامهای خلین و ویسناژین بهبود یافته و هم زمان جداسازی آنها تقریباً کاهش قابل ملاحظه ای نسبت به نتایج آنالیز HPLC گزارش شده توسط فرانچی (Franchi *et al.*, 1985) و مارتلی (Martelli & Bovalini, 1984) پیدا کرده، و با نتایج آنالیز HPLC که توسط ال-دومیاتی (El-Domiaty, 1992) گزارش شده، همخوانی خوبی نشان داده است.

نتیجه گیری

نتایج حاکی از آن است که استفاده از روشهای کروماتوگرافی (TLC & CC) و تبلور مجدد، منجر به جداسازی و خالص سازی کامل مواد موثره خلین و ویسناژین (γ -Pyrone) از یکدیگر (بدلیل تشابه ساختاری) و از سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاه گردیده است. مشابهت نقطه ذوب و داده های طیف سنجی FTIR آنها و نیز نتایج گرفته شده از آنالیز HPLC در مقایسه با نمونه های استاندارد آنها، راندمان و خلوص بالایی را نشان داده است. همچنین نتایج گرفته شده از سایر آنالیزها در محدوده مجاز مندرج در WHO می باشد، لذا بعنوان ماده دارویی ارزشمند، قابل استفاده در صنعت دارویی کشور بوده و امکان جایگزینی آن با داروهای شیمیایی با اثرات درمانی مشابه وجود دارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده فناوریهای شیمیایی بدلیل حمایت در انجام این پژوهش اعلام می نمایم.

اعلام تعارض منافع

نگارندگان مقاله اعلام می دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Abdel-Fattah, A., Aboul-Enein, M. N., Wassel, G., El-Menshaw, B. S. 1983. Preliminary report on the therapeutic effect of khellin in psoriasis. *Dermatologica*. 167, 109–110.
- Abdel-Fattah, A., Aboul-Enein, M. N., Wassel, G. M., El-Menshaw, B. S. 1982. An approach to the treatment of vitiligo by khellin. *Dermatologica*. 165, 136–140.
- Abdul-Jalil, T. Z., Saour, K. and Nasser, A. A. 2010. Phytochemical Study of some Flavonoids Present in the Fruits of Two *Ammi L.* Species Wildly Grown in Iraq, *Iragi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(1): 48-57.
- Ali, H., Ahmad, H., Marwat, K.B., Yousaf, M., Gul, B. and Khan, I. 2012. Trade potential and conservation issues of medicinal plants in District Swat, Pakistan. *Pakistan Journal Botanical*, 44: 1905-1912.
- Alqasoumi, S. I., Alam, P., Anwer, M. K. and Abdel-Kader, M. S. 2014. Qualitative and quantitative analysis of khellin in *Ammi visnaga* fruits and pharmaceutical preparations using HPTLC and HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37: 61-72.
- Al-Snafi, A.E. 2016. A Review of Medicinal Plants with Broncho-Dilatory Effect-Part 1. *Scholars Academic Journal Pharmacy*, 5: 297–304.
- Anonymous. 2007. WHO monographs on selected medicinal plants, 3: 23-32.
- Ashour, A., El Sharkawy, S., Amer, M., Abdelbar, F., Kondo, R. 2013. Melanin Biosynthesis Inhibitory Activity of Compounds Isolated from Unused Parts of *Ammi visnaga*. *Journal Cosmetic Dermatology Scientific Application*, 3: 40–43.
- Badr, J. M., Hadad, G. M., Nahriry, K. and Hassanean, H. A. 2015. Validated HPLC method for simultaneous estimation of khellol glucoside, khellin and visnagin in *Ammi visnaga L.* fruits and pharmaceutical preparations. *Natural Product Research*, 29(7): 593-601.
- Bailey, S. D., Geary, P. A., De-Wald, A. E. 1951. Khellin. Part I. Ultraviolet, Infrared, and Polarographic Studies on Three Principles Isolated from *Ammi visnaga Lam.* *Journal of The American Pharmaceutical Association*. XL 6: 280-286.

- Barakat, M. Z., Badran, N. 1951. New tests for the identification of khellin, visnagin and khellol-glucoside. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3: 576-580.
- Beltagy, A. M. and Beltagy, D. M. 2015. Chemical composition of *Ammi visnaga* L. and New Cytotoxic Activity of its Constituents Khellin and Visnagin. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6): 285-291.
- Bhagavathula, A. S., Al-Khatib, A. J. M., Elnour, A. A., Al-Kalbani, N. M. S. and Shehab, A. 2015. *Ammi Visnaga* in treatment of urolithiasis and hypertriglyceridemia. *Pharmacognosy Research*, 7(4): 397-400.
- Bishr, M., El Degwy, M., Amin, M., Salama, O. 2016. HPLC Simultaneous Determination of Khellin and Visnagin in *Ammi visnaga* L. Fruits. *Journal Pharmaceutical and Biological Sciences*, 11: 110-115.
- Buriak, V.P., Kurinna, N.V. 1971. Spectrophotometric determination of kelling and santonin. *Farmatsevtichnyi Zhurnal*, 26: 39-42.
- Chen, M., Stohs S. J., Staba, E. J. 1969. The biosynthesis of radioactive khellin and visnagin from C¹⁴-acetate by *Ammi visnaga* plants. *Planta Medicine*, 17(4): 319-327.
- Chevallier, A. 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*; Dorling Kindersley: London, UK.
- Dalila, B., Smahane, B., Abderrahman, A., Mohamed, G., Latifa, E. 2014. Ethnopharmacological Study of Antidiabetic medicinal plants used in the Middle-Atlas region of Morocco (Sefrou region). *International Journal Pharmaceutical Research and Health Sciences*, 2: 75-79.
- De Leeuw, J. d., Assen, Y.J., Beek, N. V., Bjerring, P. and Neumann H. A. M. 2011. Treatment of vitiligo with khellin liposomes, ultraviolet light and blister roof transplantation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25: 74-81.
- Duarte, J., Torres, A.I., Zarzuelo, A. 2000. Cardiovascular effects of visnagin on rats, *Planta Medica*, 66(1): 35-39.
- El-Domiaty M., M. 1992. Improved high-performance liquid chromatographic determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits and pharmaceutical formulations. *Journal Pharmaceutical Sciences*, 81(5): 475-478.
- Elgamal, M.H.A., Shalaby, N.M.M., El-Hagrassy, A.M., Toth, G., Simon, A., Duddeck, H. 1998. A further contribution to some gamma-pyrone constituents of *Ammi visnaga*. *Fitoterapia*, 69: 549-550.
- Ellenbogen, w. C., Rump, E. S., Geary, P. A., Burke, M. 1951. Kelling. Part II. Methods for the determination of two principles isolated from *Ammi visnaga* Lam. *Journal of The American Pharmaceutical Association*, XL (6): 287-290.
- El-Shibini, H. A. M., Saleh, A. M., Motawi, M. M. 1969. Stability of khellin. *Pharmazie*, 24(11): 687-691.
- Fahmy, I. R., Badran, N., Messeid, M. F. 1949. A photoelectric colorimetric method for the estimation of khellin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1: 529-534.
- Farnsworth, N.R., Krause, E.C., Bolton, J.L., Pauli, G.F., van Breemen, R.B., Graham, J.G. 2008. From plant to clinical use. The University of Illinois at Chicago/National Institutes of Health Center for Botanical Dietary Supplements Research for Women's Health. *American Journal Clinical Nutrition*, 87: 504S-508S.
- Feirouz, B., Salima, K. 2014. Antibacterial activity and chemical composition of *Ammi visnaga* l. Essential oil collected from Boumerdes (Algeria) during three periods of the plant growth. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17: 1317-1328.
- Franchi, G. G., Bovalini, L., Martelli, P., Ferri, S., Sbardellati, E. 1985. High performance liquid chromatography analysis of the furanochromones khellin and visnagin in various organs of *Ammi visnaga* (L.) Lam. At different developmental stages. *Journal of Ethnopharmacology*, 14: 203-212.
- Ghareeb, A.M., Zedan, T.H., Gharb, L.A. 2011. Antibacterial and antifungal activities of *Ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi Journal of Science*, 52: 30-36.
- Hashim, S., Jan, A., Marwat, K. B. and Khan, M. A. 2014. Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi Visnaga* (Apiaceae). *Pakistan Journal Botanical*, 46(3): 861-867.
- Jaradat, N.A., Zaid, A., Al-Ramahi, R., Alqub, M.A., Hussein, F., Hamdan, Z., Mustafa, M., Qneibi, M., Ali, I. 2017. Ethnopharmacological survey of medicinal plants practiced by traditional healers and herbalists for

- treatment of some urological diseases in the West Bank/Palestine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 255.
- Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M. 2002. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ammi visnaga* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2(4): 19-29.
- Kamal, A., Khan, W., Ahmad, S., Ahmad, F. J. and Saleem, K. 2015. Development and validation of high-performance liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography methods for the quantification of khellin in *Ammi visnaga* seed. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(4): 308-313.
- Karawya, M. S., EL-Kiey, M. A., Sina, A. and Nourf, G. 1970. Simultaneous TLC Separation of Khellin and Visnagin and Their Assay in *Ammi visnaga* Fruits, Extracts, and Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(7): 1025-1027.
- Khan, Z.A., Assiri, A.M., Al-Afghani, H.M., Maghrabi, T.M. 2001. Inhibition of oxalate nephrolithiasis with *Ammi visnaga* (AI-Khillah), *International Urology Nephrology*, 33(4): 605-608.
- Kwon, M.S., Lee, J.K., Park, S.H., Sim, Y.B., Jung, J.S and Won, M.H. 2010. Neuroprotective effect of visnagin on kainic acid-induced neuronal cell death in the mice Hippocampus, *Korean Journal Physiology Pharmacology*, 14: 257-263.
- Lee, J.K., Jung, J.S., Park, S.H., Sim, Y.B., Kim, S.M. and Ha, T.S. 2010. Anti-inflammatory effect of visnagin in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells, *Archives of Pharmacal Research*, 33: 1843-1850.
- Martelli, P., Bovalin, L. 1984. Rapid separation and quantitative determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* (L.) Lam. fruits by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 301: 297-302.
- Marwat, K.B., Hashim S. and Ali, H. 2010. Weed management: A case study from North West Pakistan. *Pakistan Journal Botanical*, 42: 341-353.
- Mesbah, M., K. 1992. Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits and in renal teas by high-performance liquid chromatography. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33: 897-904.
- Miara, M., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M., Maggi, F. 2019. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16: 100262.
- Moubasher, R., Barakat, M.Z. 1950. Oxonium salts of khelin. *Journal of American Chemical Society*, 72: 2870.
- Nirumand, M.C., Hajialyani, M., Rahimi, R., Farzaei, M.H., Zingue, S., Nabavi, S.M., Bishayee, A. 2018. Dietary Plants for the Prevention and Management of Kidney Stones: Preclinical and Clinical Evidence and Molecular Mechanisms. *International Journal Molecular Sciences*, 19: 765.
- O'Neil, M. J. 2013. Merck Index. 15th Edition. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ISBN 9781849736701; 5189 & 9916.
- Pavela, R. 2015. Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. *Industrial Crops and Products*, 67: 108-113.
- Rasooli, I., Taghizadeh, M., Astaneh, S.D.A., Rezaei, M.B., Jaimand, K. 2007. Phytochemical properties of *Ammi visnaga* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. essential oils. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1: 72-78.
- Satrani, B., A. Farah, M. Fechtal, M. Talbi and M.L. Boumari. 2004. Chemical composition and anti-microbial and antifungal activities of the essential oil of *Ammi visnaga* (L.) Lam. *Acta Botanica Gallica*, 151(1): 65-71.
- Sellami, H.K., Napolitano, A., Masullo, M., Smiti, S., Piacente, S., Pizza, C. 2013. Influence of growing conditions on metabolite profile of *Ammi visnaga* umbels with special reference to bioactive furanochromones and pyranocoumarins. *Phytochemistry*, 95: 197-206.
- Shinde, P. B. and Laddah, K. S. 2014. Development of new isolation technique and validated HPLC method development for khellin-A major constituent of *Ammi visnaga* Lam. fruits. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(1): 40-43.
- Travaini, M. L., Sosa, G. M., Ceccarelli, Eduardo A., Walter, H., Cantrell, C. L., Carrillo, N. J., Dayan, Franck E., Meepagala, K. M. and Duke, S. O. 2016. Khellin and Visnagin, Furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as Potential Bioherbicides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 9475-9487.

- Tripathi, Y., Pandey, A. 2017. Bioprospecting of Phytodiversity for New Therapeutic Products: Trends, Potential and Challenges. *Organic and Medical Chemistry*, 2: 1-7.
- Vanachayangkul, P., Chow, N., Khan, S.R., Butterweck, V. 2011. Prevention of renal crystal deposition by an extract of *Ammi visnaga* L. and its constituent khellin and visnagin in hyperoxaluric rats, *Urological. Research*. 39: 189-195.
- Wagner, H., Bladt. S. 1996. Coumarin drugs. *Plant drug analysis*. 125-147.
- Wagner, H., Bladt. S., Zgalmski, E. M. 1984. Coumarin drugs. *Plant drug analysis*. 145-161.
- World Health Organization. 2011. Quality control methods for herbal materials. Geneva, pp: 29, 35, 69-70.
- World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal Plant materials. Geneva, Switzerland. pp: 28-29, 33, 61-63.
- Zargari, A. 1989. *Medical plants*, Vol. 2, 4th ed. Tehran, Tehran University Publications, No. 181012.

Extraction and purification of γ -Pyrone (khellin and visnagin) from *Ammi visnaga* Lam. plant

M. Haji Abolhasani*¹

Received: 2020.11.10

Accepted: 2021.4.24

Abstract

Ammi visnaga Lam. (Umbelliferae family) is one of the valuable indigenous medicinal plants in the country, which contains an active medicinal substance γ -Pyrone (mainly khellin and visnagin) and their most important therapeutic effects are peripheral and coronary vasodilator and bronchodilator and is used in the therapy of asthma and angina pectoris.

In this research first, separation and purification khellin and visnagin from the extract sample were performed by column chromatography and recrystallization. Then they have been identified by thin layer chromatography, melting point and Fourier transform infrared spectroscopy. A high performance liquid chromatography has also been accomplished for their quantitative determination and degree of purity in the extract.

As the results, isolated compounds from the extract (khellin & visnagin) were identified and verified by the similarity of melting points in the range of 153-155 °C and 142-145 °C respectively, their FTIR spectroscopy data, compared with the standard samples and determination of their R_f values (0.44 and 0.37, respectively). HPLC chromatograms of the extract (khellin & visnagin) displayed sharp, symmetrical peaks with high resolution at retention times of 8.617 and 10.55 min respectively. The mean contents of khellin and visnagin in the extract were 1.114 mg/g and 0.326 mg/g and purity of 90.16% and 79.62% respectively.

Therefore, the produced γ -Pyrone (khellin and visnagin) had reasonable yield and high purity, therefore can be used for the pharmaceutical industry of Iran.

Keywords: *Ammi Visnaga Lam.*, HPLC, Khellin, γ -Pyrone, Visnagin

¹Department of Chemical technology, Iranian Research Organization for Science and Technology (*Corresponding Author Email : Abolhasani@irost.ir, haji_7368@yahoo.com.)