Archive OF SID

جداسازی و شناسایی β- استیگماسترول از گیاه مریم نخودی خزری *Teucrium hyrcanicum* L. رویش یافته در استان گیلان

زهرا کاظمی‌زاده[1]*، زهره حبیبی[2]، ایوب مرادی[3]

۱- عضو هیات علمی، جهاددانشگاهی واحد شهید بهشتی، تهران
۲- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳- عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، گیلان
*آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، جهاددانشگاهی واحد شهید بهشتی
صندوق‌پستی: ۱۱۷۱ - ۱۹۶۱۵، تلفن: ۳٤ - ۲۲٤۳۱۹۳۳ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲٤۳۱۹۳۸ (۰۲۱)
پست الکترونیک: kazemizadeh@acecr.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۹ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۸/۱۳

چکیده

مقدمه: جنس مریم نخودی[1] شامل بیش از ۳٤۰ گونه در سراسر جهان می‌باشد که در کشور ایران ۱۲ گونه از این جنس رویش دارد. گیاهان متعلق به این جنس دارای خواص دارویی بوده و در طب سنتی استفاده می‌شوند.

هدف: این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی استروئیدهای موجود در عصاره گیاه ***Teucrium hyrcanicum*** انجام شد.

روش بررسی: در این تحقیق گونه ***T. hyrcanicum*** از محل رویش خود، واقع در رستم‌آباد گیلان جمع‌آوری شد، عصاره کلروفرمی - استنی اندام‌های هوایی آن استخراج شد و سپس خالص‌سازی با ستون کروماتوگرافی صورت گرفت.

نتایج: کریستال‌های سفید رنگ با نام β- استیگماسترول جدا شد و با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته و طیف‌سنجی جرمی و طیف سنجی مادون قرمز شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: β- استیگماسترول برای اولین بار در عصاره‌ی کلروفرمی- استنی این گونه شناسایی شد.

گل‌واژگان: مریم نخودی خزری، ***Teucrium hyrcanicum*** L.، β- استیگماسترول

[1] *Teucrium*

www.SID.ir

Archive OF SID

مقدمه

گیاهان تیره نعناع و برخی جنس‌های آن از جمله جنس مریم نخودی، از نظر شناسایی ترکیب‌های اسانس مورد توجه محققان داخلی و خارجی بوده‌اند. جنس مریم نخودی از خانواده نعناعیان با حدود ۳٤۰ گونه در سراسر جهان رویشی نسبتاً وسیع دارد، این جنس در ایران ۱۲ گونه گیاه علفی یکساله و چند ساله دارد که در سراسر ایران پراکنده‌اند و ۳ گونه آن انحصاری ایران می‌باشند [۱]

گونه‌های دارویی مریم نخودی همانند *Teucrium chamaedrys* و *Teucrium polium* بیش از دوهزار سال است که به عنوان مدر، تب‌بر، برطرف‌کننده اختلالت عصبی، سردردهای مقاوم و صرع، ضددرد، ضدالتهاب و نیز برای درمان روماتیسم، استفاده می‌شوند. امروزه نیز خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانتی برخی از گونه‌های این جنس به اثبات رسیده است [۷ – ۲]. تاکنون از گونه‌های مختلف مریم نخودی، انواع نئوکلرودان دی‌ترپنوئید، تری‌ترپنوئید و نیز فلاونوئید جداسازی و شناسایی شده‌اند [۱۳ – ۸]. انتشار گونه در فلورایرانیک، منطقه تالش، ماورای قفقاز و شمال ایران ذکر شده است، اما نمونه تیپ آن از ناحیه هیرکانی می‌باشد.

مریم نخودی خزری گیاهی است پایا، ایستاده، به ارتفاع ۳۰ – ۷۰ سانتی‌متر پوشیده از کرک‌های بر هم خوابیده، برگ سبز علفی، غشائی، دارای دمبرگ کوتاه، تخم‌مرغی، در قاعده نیمه قلبی، پهنک آن به ابعاد ۱/۵ – ۵ × ۲/۵ – ۸ سانتی‌متر، در حاشیه دارای دندانه‌های اره‌ای یا کنگره‌های کوچک فراوان، گل‌آذین سنبله انتهایی طویل و متراکم به طول ۱۰ – ۲۵ سانتی‌متر، کاسه گل دارای دندانه‌های نا برابر، جام گل ارغوانی، میله پرچم‌ها خارج شده از جام می‌باشد. میوه‌ی گیاه فندقه به طول یک میلی‌متر، تقریباً کروی، زاویه‌دار و غده پوش است.

انتشار جغرافیایی آن در ایران، گرگان، آمل، محمودآباد، قائم‌شهر، بابلسر، تنکابن، کجور، کلاردشت، رستم‌آباد و آستارا می‌باشد. این گیاه در مناطق جنگلی هم سطح دریا تا ارتفاع ۱۹۰۰ متری پراکنش دارد [۱٤].

با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف جنس مریم نخودی و اینکه تاکنون هیچ‌گونه بررسی فیتوشیمیایی بر روی گیاه *T. hyrcanicum* در ایران صورت نگرفته است، بر آن شدیم که ترکیب‌های طبیعی را در عصاره کلروفرمی- استنی گیاه مذکور جستجو نماییم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

سرشاخه‌های گل‌دار گونه *Teucrium hyrcanicum* در خردادماه سال ۱۳۸٦ از منطقه رستم‌آباد واقع در استان گیلان، جمع‌آوری شد و نمونه‌های هرباریومی مربوط به آن نیز با شماره‌های ۳٤ و ٦٤٥ در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان نگهداری می‌شود.

عصاره‌گیری، جداسازی و خالص‌سازی

۹۰۰ گرم از اندام‌های هوایی گیاه در نسبت حلالی کلروفرم- استن (۱:۲) به مدت ۳۰ ساعت خیسانده و عصاره‌گیری شد. لازم به ذکر است که برای تعیین نسبت دو حلال جهت عصاره‌گیری، ابتدا مقادیر کم از گیاه خشک در نسبت‌های مختلف دو حلال استن و کلروفرم خیسانده شد و سپس TLC1 گرفته شد و با توجه به تعداد نقاط نمایان شده که میزان جداسازی اجزاء را نشان می‌داد، نسبت حلالی کلروفرم- استن (۱:۲) به عنوان مناسب‌ترین نسبت برای عصاره‌گیری انتخاب شد. حلال‌های مختلف عصاره‌های حاصل، توسط تبخیرکننده دوار در فشار کاهش یافته در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره حاصل در حمام آب گرم در حداقل متانول حل شد و به مدت ۷۲ ساعت به منظور چربی‌زدایی در فریزر قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت عصاره حاصل صاف شد و چربی‌ها از آن جدا شد. مجدداً توسط تبخیرکننده دوار در فشار کاهش یافته، متانول عصاره تبخیر و به این ترتیب جهت کروماتوگرافی ستونی آماده شد.

پس از انجام کروماتوگرافی ستونی، ۲۵ فرکشن حاصل شد. پس از تغلیظ شدن و رنگبری از فرکشن‌های ۱۱ – ۹ (از مجموع ۲۵ فرکشن) در قطبیت حلال پترولیوم اتر ۹۵ درصد-

[1] Thin Layer Chromatography

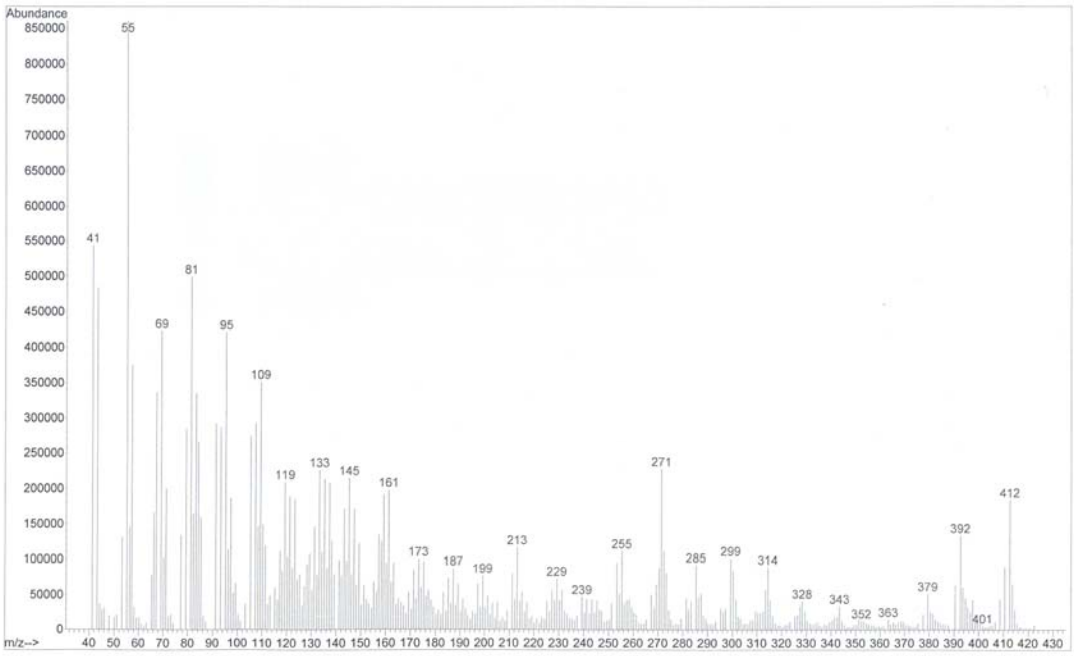
www.SID.ir

Archive OF SID

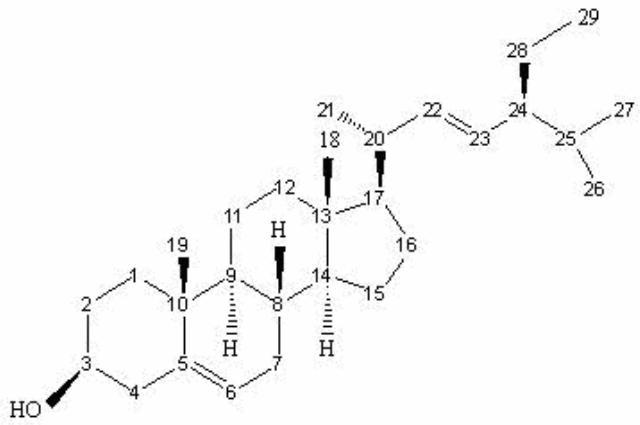
اتیل استات ۵ درصد، کریستال‌های سفید رنگ سوزنی شکل جداسازی و شناسایی شد. نقطه ذوب این ترکیب ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. جهت شناسایی نمونه‌های خالص شده، از طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته، طیف سنجی جرمی و طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد. این در حالی است که از سایر اجزاء ترکیب خالص و قابل شناسایی به دست نیامد.

نتایج

پس از گرفتن طیف MS، پیشنهاد کتابخانه دستگاه طیف‌سنجی جرمی مبتنی بر وجود فیتوسترول با نام β- استیگماسترول با فرمول بسته $C_{29}H_{48}O$ معادل با جرم مولکولی ۴۱۲ و نام استیگماستا-۵، ۲۲- دی ان-۳- آل بود (شکل شماره ۱). طیف‌های ^{1}HNMR، ^{13}CNMR، H-H-COSY، H-C-COSY، DEPT90° و DEPT135° ترکیب ارزیابی شد. با مقایسه آنها با طیف‌های حاصل از ترکیب‌های هم‌خانواده که قبلاً گزارش شده بودند، ساختار β- استیگماسترول تأیید شد (شکل شماره ۲) [۱۵،۱۶].



شکل شماره ۱- طیف EI-Mass ترکیب β- استیگماسترول



شکل شماره ۲ - β- استیگماسترول

www.SID.ir

Archive OF SID

تفسیر طیف ^{1}HNMR

در ppm δ=۵/۳۹ یک سیگنال دوتایی با HZ J=۵/۱۵ مربوط به ٦ – H گروه CH= که توسط H–۷ شکافته شده است، مشاهده می‌شود. پیام دوتایی موجود در ppm δ=۵/۲۵ نیز متعلق است به H–۲۲ و H–۲۳ در ساختار β– استیگماسترول که با هم و با یک پروتون مجاورشان جفت شده و به صورت dd با J معادل Hz ۱۵ وHz ۷/۵ مشاهده می‌شود، که ۱۵ مربوط به کوپل ترانس آن دو با یکدیگر و ۷/۵ مربوط به کوپل آنها با پروتون‌های مجاورشان یعنی H–۲۰ و H–۲٤ می‌باشد. پروتون H–۳ به دلیل اتصال به اکسیژن در ناحیه ppm δ=۳/۵٦ به صورت (٤/۵، ۱۱/٦، ۱۱) dddd ظاهر شده است. میزان J=۱۱/۲ نشان‌دهنده آن است که Hax داریم و با دو Hax مجاور خود با J=۱۱/۲ شکافته شده و با دو Heq مجاور دیگر نیز با J حدوداً Hz ٤/٦ و Hz ٦/٦ شکافته شده است، پس نتیجه می‌گیریم OH به صورت β و در ناحیه استوایی قرار گرفته است. در ppm δ =۲/۰۳ نیز یک سیگنال دوتایی دوتایی پهن مشاهده می‌شود که مربوط به H–۷ متیلن بوده و توسط پروتون اولفینی H–٦ به دوتایی و سپس توسط H–۸ به یک دوتایی دیگر شکافته می‌شود. سیگنال مربوط به پروتون OH هم در ppm δ =۲/۲۱ به صورت یکتایی ظاهر شده است.

پروتون‌های Me–۱۸ و Me–۱۹ بدون شکافتگی و به‌صورت یکتایی به ترتیب در ناحیه ppm δ =۰/۷۱۵ و ppm δ =۱/۰۵ مشاهده می‌شود. پروتون‌های Me–۲٦ و Me–۲۷ توسط پروتون‌های H–۲۵ به صورت دوتایی d شکافته شده است و در ppm δ =۰/۸۸ و ppm δ =۰/۹۵ مشاهده می‌شوند. پروتون H–۲۱ هم در ppm δ =۱/۰٦ به صورت دوتایی ظاهر شده و یک کوپلاژ با J= ۷/۵ Hz با H–۲۰ نشان می‌دهد. سیگنال چندتایی در ppm δ =۱/٤۱ مربوط به H–۲۰ است که توسط پروتون‌های H–۲۱، H–۲۲ و H–۱۷ شکافته شده است. سیگنال مربوط به H–۹ در ppm δ=۱/۸۷ به صورت یک دوتایی دوتایی پهن ظاهر شده است که مربوط به شکافته شدن باپروتون‌های H–۸ و H–۱۱ می‌باشد (شکل شماره ۳).

تفسیر طیف ^{13}C NMR

در این طیف، سیگنال موجود در ppm δ =۱٤۱/۱۸ مربوط است به کربن اولفینی فاقد هیدروژن C–۵ و سه سیگنال ppm δ =۱۳۷/۲٦، ppm δ =۱۳۰/٤٦ و ppm δ =۱۲۲/۱۵ به ترتیب مربوط به کربن‌های اولفینی شماره ٦، ۲۲ و ۲۳ در β– استیگماسترول می‌باشند. سیگنال موجود در ppm δ =۷۲/۲٤ نیز مربوط به C–۳ می‌باشد که به دلیل اتصال به اکسیژن گروه OH به میدان پایین جابجا شده است. باقی سیگنال‌ها که در ناحیه ppm ۵۸ – ۱۲ واقع شده است، به کربن‌های متیل، متیلن و متین تعلق دارند (شکل شماره ٤). در طیف FT-IR، پیک در cm-1 ۲۹۳۵/۱۲ حضور OH را در ساختار نشان می‌دهد. طیف‌های DEPT 135، DEPT 90 و طیف‌های دوبعدی H-H-COSY و H-C-COSY نیز ساختار پیشنهادی را تأیید نمودند.

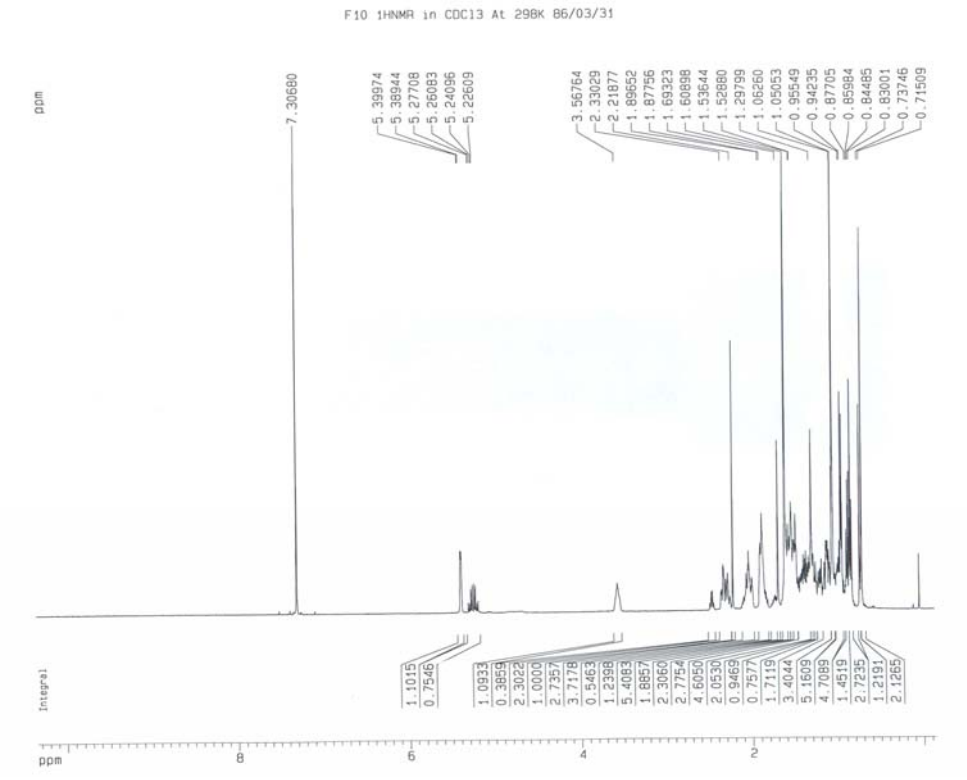
مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده

دمای ذوب محصولات با استفاده از دستگاه الکتروترمال ۹۱۰۰ در لولهی موئین گرفته شده و به صورت تصحیح نشده گزارش شده است. طیف‌های IR با استفاده از اسپکترومتر Shimadzu IR-740 ثبت شده است. طیف‌های ^{1}H NMR و ^{13}C NMR و سایر طیف‌های دوبعدی با استفاده از اسپکترومتر Bruker AQS Avance-300 MHz دانشگاه شهید بهشتی و اسپکترومتر Bruker Avance DRX-500 MHz دانشگاه صنعتی شریف ثبت شده است. حلال مورداستفاده در طیف‌های NMR کلروفرم دوتره می‌باشد و جابه‌جایی‌های شیمیایی برحسب ppm گزارش شده‌اند.

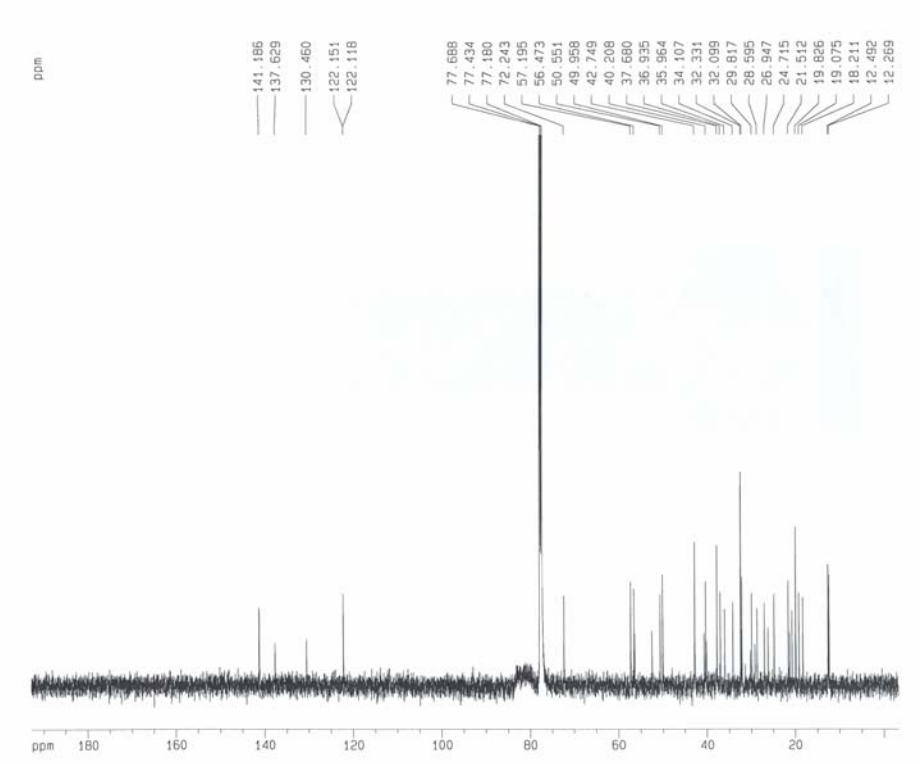
5973 Network Mass Selective Detector طیف‌های جرمی نیز با استفاده از طیف نگار جرمی دانشگاه تهران ثبت شده است.

www.SID.ir

Archive OF SID



شکل شماره ۳- طیف ^{1}HNMR ترکیب *β*- استیگماسترول



شکل شماره ٤- طیف ^{13}C NMR ترکیب *β*- استیگماسترول

www.SID.ir

Archive OF SID

بحث

β- استیگماسترول یک فیتوسترول اشباع است که به صورت تجاری از دانه‌های سویا به دست می‌آید و به عنوان ماده اولیه در سنتز استرویید‌های دارویی کاربرد دارند. طبق اطلاعات موجود، β- استیگماسترول از برخی گیاهان نظیر *Ambroma augusta* و *Typha latifolia* گزارش شده است [۱۵،۱۶]. در میان ترکیب‌های طبیعی گزارش شده از سایر گونه‌های جنس *Tecrium*، به موارد ذیل اشاره می‌شود. از گونه *Teucrium montbretii* Subsp. *libanoticum* نیز دی‌ترپنوئیدهای نئوکلوردان‌های 3β-hydroxyteubutiline A، 12-epi-montanin G، 20-epi-3,20-di-o-deacetylteupyreinidin و *teuscordinon* جداسازی و شناسایی شده‌اند [۸]. در طی پژوهشی دیگر روی گونه *T. maghrbinium*، دی‌ترپنوئیدهای نئوکلوردان teukotschyn و teughrebin آن شناسایی شدند [۹]. در سال ۲۰۰۱ از گونه *T. fruticans* فلاونوئیدهای 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone، cirsilineol و cirsimaritin استخراج و شناسایی شدند [۱۰]. در سال ۲۰۰۵ از *T. fruticans* نیز سه دی ترپن نئوکلوردان 3β-hydroxy fruticolone، deacetyl fruticolone و 6-acetyl-10-hydroxyteujaponin استخراج و شناسایی شدند [۱۱]. همچنین یک تری ترپنویید از نوع fernane توسط محققان چینی از *T. integrifolium* جداسازی شد [۱۲]. در سال ۲۰۰۰ ترکیب‌هایی با نام‌های teucrol، decarboxyrosmarinic acid و 4´-triglycoside و teucroside از گونه *Teucrium pilosum* جداسازی و شناسایی شده‌اند [۱۸]. در سال ۱۹۹۶ نیز استرول‌های دو گونه *Teucrium abutiloides* و *Teucrium betonicum* استخراج شده‌اند [۱۹]. در خصوص گونه *Teucrium hyrcanicum*، پیش‌تر دی‌ترپنوئیدهای نئوکلوردان‌های teucrin H1-H4 و ترکیب‌های فنولی، توسط محققان ارمنستانی گزارش داده شده است [۲۰].

این مقاله اولین گزارش از استخراج β – استیگماسترول از گونه *Teucrium hyrcanicum* در جهان می‌باشد.

منابع

1. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Press. Iran. 1996, p: 542.

2. Zargari A. Medicinal Plant. Tehran University Press. Iran, 1997, pp: 130 - 6.

3. Abdollahi M, Karimpour H, Monsef-Esfahani HR. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse withing test. *Pharmacol Res*. 2003; 48: 31 - 5.

4. Baluchnejadmojarad T, Roghani M and Roghani-Dehkordi F. Antinociceptive effect of *Teucrium polium* leaf extract in the diabetic rat formalin test. *Ethnopharmacol J.* 2005; 97: 207 - 10.

5. Yildirim A, Cakir A, Mavi A, Yalcin M, Fauler G and Taskesenligil Y. The variatation of antioxidant activities and chemical Composition of essential oilsof *Teucrium oriental* L. Var. *orientale* during harvesting stages. *Flavour Fragr. J.* 2004; 19: 367 - 72.

6. Ricci D, Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, Curini M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of the *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Ethnopharmacol J.* 2005; 98: 195 - 200.

7. Puntero BF, Peinado, Defresno AMV. Anti-inflammatory antiulser activity of *Teucrium Boxifolium*. *Ethnopharmacol. J.* 1997; 55: 93 - 8.

8. Bruno M, Bondi ML, Rosselli S, Maggio A, Piozzi F and Arnold NA. Neoclerodane Diterpenoids from *Teucrium montbretii* Subsp. *libanoticum* and Their Absolute Configuration. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 142 - 6.

9. Bruno M, Bondi ML, Rosselli S, Piozzi F, Al-Hillo MRY, Lamara K and Ladjel S. Neoclerodane

www.SID.ir

Archive OF SID

Diterpenoids from *Teucrium maghrebinum*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1029 - 31.

10. Kisiel W, Stojakowska A, Piozzi F and et al. Flavonoids from *Teucrium fruticans* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2001; 70: 199 - 210.

11. Coll J and Tandrón Y. Isolation and structure elucidation of three neo-clerodane diterpenes from *Teucrium fruticans* L. (Labiatae). *Phytochem.* 2005; 66: 2298 - 303.

12. Chen XL, Wang TE, Jiang B and et al. A fernane-type triterpenoid from *Teucrium integrifolium*. *Nat. Prod. Lett*. 2000; 14: 459 - 62.

13. Passannanti S, Paternostro M and Piozzi F. Triterpene acids from *Salvia* and *Teucrium* species. *Phytochem.* 1994; 36: 171 - 3.

14. Rechinger KH. *Flora Iranica*. Akademische Druck and Verlagsanstalt Press. Graz. Austria. 1982, pp: 36 - 7.

15. Alam MS, Chopra N, Ali M and Niwa M. Oleanen and stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochem.* 1996; 41: 1197 - 200.

16. Della Greca M, Monaco P and Previtera L. Stigmasteroles from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.* 1990; 53: 1430 - 5.

17. El-Mousallamy AMD, Hawas UW and Hussein SAM. Teucrol, a decarboxyrosmarinic acid and its 4 '-O-triglycoside, teucroside from *Teucrium pilosum*. *Phytochem.* 2000; 55: 927 - 31.

18. Gaspar H, Palma FMBC, Dela Torre MC and et al. Sterols from *Teucrim abutiloides* and *T. betonicum*. *Phytochem*. 1996; 43: 613 - 5.

19. Gács-Baitz E, Radics L, Oganessian GB and Mnatsakanian VA. Teucrins H1-H4, novel clerodane-type diterpenes from *Teucrium hyrcanicum*. *Phytochem.* 1978; 17: 1967 - 73.

20. Oganesyan GB. Minor Phenolic Compounds from *Teucrium hyrcanicum*. *Chem. Nat. Comp*. 2005; 41: 228 - 9.

www.SID.ir