

## خالص‌سازی و تعیین ساختمان ترکیبات موجود در عصاره کلروفرمی قسمت‌های هوایی گیاه *Ferula hirtella*

زهره حبیبی<sup>۱</sup>، احسان روستایی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران  
۲- کارشناس ارشد شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

\*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم، گروه شیمی  
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۱۹۳۳ (۰۲۱)، نماپر: ۰۲۱-۲۲۴۳۱۹۳۸  
پست الکترونیک: ehsan\_rosta.chem@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۲/۵/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۹

### چکیده

**مقدمه:** جنس کما (*Ferula*) از جمله جنس‌های پر جمعیت خانواده چتریان است که بیش از ۱۳۰ گونه در جهان دارد و از این بین، ۳۰ گونه در ایران یافت می‌شود. گیاهان متعلق به این جنس دارای خواص دارویی بوده و در طب سنتی مورداستفاده قرار می‌گرفت. هدف: این پژوهش به منظور خالص‌سازی و تعیین ساختمان ترکیبات موجود در عصاره کلروفرمی قسمت‌های هوایی گیاه *Ferula hirtella* انجام گرفت.

**روش بررسی:** در این تحقیق گونه *F. hirtella* از رویشگاه طبیعی خود واقع در آباده فارس جمع‌آوری شد. عصاره کلروفرمی قسمت‌های هوایی این گیاه استخراج شد و سپس خالص‌سازی با ستون کروماتوگرافی انجام گرفت.

**نتایج:** با انجام کروماتوگرافی ستونی برای اولین بار از عصاره کلروفرمی *F. hirtella* دو کومارین به نام فارنسیفرول (Farneциferol C) و آملیپرین (Umbelliprenin) و یک استروئید به نام  $\beta$ -استیگماسترول ( $\beta$ -stigmasterol) جداسازی شد و شناسایی آنها با استفاده از داده‌های طیفی  $^1\text{H}$  NMR و  $^{13}\text{C}$  NMR انجام گرفت.

**نتیجه‌گیری:** عده ترکیبات عصاره کلروفرمی قسمت‌های هوایی گیاه *F. hirtella* از دسته کومارین‌ها می‌باشند و  $\beta$ -استیگماسترول برای اولین بار در عصاره کلروفرمی این گونه به دست آمد.

**گل واژگان:** *Ferula hirtella*، آملیپرین، استیگماسترول، چتریان، فارنسیفرول C، کومارین

## مقدمه

### مواد و دستگاه‌های مورد استفاده

دمای ذوب محصولات با استفاده از دستگاه الکتروترمال ۹۱۰ در لوله موئین گرفته شده و به صورت تصحیح نشده، گزارش شده است. طیف‌های  $^1\text{H}$  NMR با استفاده از اسپکترومتر Bruker AQ-S AVANCE (300 MHz) از دستگاه UV استفاده شده است. برای مشاهده لکه TLC از دستگاه UV استفاده شده است. حلال مورد استفاده در طیف‌های NMR کلروفرم دوتره با درصد خلوص ۹۹/۵ درصد بوده و جابه‌جایی‌های شیمیایی بر حسب ppm می‌باشد. حلال‌های مورد استفاده همگی از شرکت مجللی تهیه شده است و بعد از تقطیر مورد استفاده قرار می‌گرفت. سیلیکاژل مورد استفاده در جداسازی با استفاده از سیلیکای ۶۰ و سیلیکاژل مورد استفاده در جداسازی با استفاده از صفحات TLC مخصوص کروماتوگرافی لایه نازک با معرف GF<sub>254</sub> بود.

### عصاره‌گیری و جداسازی مواد

به منظور عصاره‌گیری ۶۰۰ گرم از قسمت‌های هوایی گیاه *Ferula hirtella* خرد و به مدت ۴۸ ساعت در حلال کلروفرم خیسانده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت عصاره‌ی حاصل صاف شد و توسط تبخیر کننده دوار در فشار کاهش یافته در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغییض شد. این عمل سه مرتبه تکرار شد تا بتوان بیشترین عصاره ممکن را از گیاه به دست آورد. عصاره‌ی حاصل در حمام آب گرم در حداقل متابول حل شد و به مدت ۴۸ ساعت به منظور چربی‌زدایی در فریزر قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت عصاره‌ی حاصل صاف شد و چربی‌ها از آن جدا شد. مجدداً توسط تبخیر کننده دوار در فشار کاهش یافته، متابول عصاره تبخیر و به این ترتیب عصاره جهت کروماتوگرافی ستونی آماده شد.

پس از اتمام مراحل عصاره‌گیری و چربی‌زدایی، عصاره‌ی باقیمانده (۲۲/۷ گرم) به صورت مخلوط‌های غلیظ قهقهه‌ای رنگ به دست آمد. جداسازی اولیه اجزای تشکیل دهنده عصاره با استفاده از کروماتوگرافی ستونی انجام شد. ستون‌های مورد استفاده در این مرحله و مراحل بعدی از لحظه اندازه و

در فارسی به این گیاه کما، باریجه یا آنقوزه می‌گویند. جنس کما از جمله جنس‌های پر جمعیت خانواده چتریان است که بیش از ۱۳۰ گونه در جهان دارد و از میان آنها ۳۰ گونه در ایران یافت می‌شود [۱،۲]. این گونه‌ها، گیاهانی چندساله و دائمی هستند که غالباً در مناطق کوهستانی و گاهی بیابانی در آسیای میانه، شوروی سابق، ایران، افغانستان، ترکیه و چین پراکنده‌اند. تاکنون بر روی ترکیبات این جنس کارهای مختلفی انجام گرفته است و ترکیباتی از دسته‌های مختلف از جمله سزکویی ترپن‌ها [۳،۴،۵،۶]، کومارین‌ها [۷،۸،۹،۱۰،۱۱]، ترکیبات گوگردی [۱۲،۱۳] و اخیراً کومارین گلیکوزیدها [۱۴] شناسایی شده‌اند.

در تحقیقات انجام گرفته بر روی ترکیبات به دست آمده از این گیاهان، مواد بیولوژیک با اثرات مختلف از جمله مهار تشکیل رنگدانه‌های میکروبی، ضدسالک، ضدویروس، ضدمايكو باکتریوم، القاکننده آپوپتوز سلول‌های سرطانی ملانوما، مهارکننده ماتریکس متالوپروتئیناز، پیشگیری از سرطان و غیره شناسایی شده است [۱۵].

مهم‌ترین گیاهان این جنس که در طب گذشته سابقه مصرف دارند عبارتند از: *F. assa-foetida* و *F. gumosa* که گونه آخری تولید اولنوگم رزینی می‌کند و خواص دارویی دارد [۱۶ - ۱۹]. طبق تحقیقی که در بانک‌های اطلاعاتی و چکیده نامه‌های شیمی انجام گرفت، هیچ گونه گزارشی از تحقیق بر روی عصاره‌ی قسمت‌های هوایی این گونه یافت نشد، لذا عصاره‌ی قسمت‌های هوایی این گیاه برای تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری و تعیین نام علمی گیاه

قسمت‌های هوایی گیاه *F. hirtella* به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات عصاره، از رویشگاه طبیعی آن در اطراف شهر آباده در استان فارس جمع‌آوری و در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران تعیین نام علمی شد.



شماره‌های ۱-۴ قطبیت افزایش یافت. حجم حلال‌هایی که در هر نوبت اضافه شد، ۱۰۰ میلی‌لیتر و حجم فرکشن‌های جمع‌آوری شده در هر ارلن، ۷۵ میلی‌لیتر بود. در نهایت ستون با متابول شسته شد تا تمامی اجزای باقیمانده از ستون خارج شود. از فرکشن‌های به دست آمده (۴۷ عدد)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با استفاده از ورقه‌های سیلیکاژل روش آلمینیوم انجام شد. با توجه به داده‌های حاصل از TLC فرکشن‌های مشابه به یکدیگر اضافه شدند. در ادامه نیز جهت خالص‌سازی بیشتر فرکشن‌ها از کروماتوگرافی ستونی مجدد (با ستون‌های کوچک‌تر)، کروماتوگرافی لایه‌ی نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای) و نوبلور کردن استفاده شد.

ابعاد متناسب با مقدار نمونه تزریقی به ستون انتخاب شدند. به منظور وارد کردن نمونه به ستون، عصاره‌ی موردنظر در کلروفرم حل شد. سپس سیلیکاژل (۰/۲-۰/۶۳ میلی‌متر) به تدریج به آن اضافه شد و حلال آن توسط تبخیر کننده‌ی دوار تبخیر شد تا زمانی که یک پودر یکنواخت از عصاره‌ی تثبیت شده روی سیلیکاژل به دست آید. در حالی که شیر ستون کروماتوگرافی بسته بود و حلال کمی روی سطح سیلیکاژل وجود داشت، پودر یکنواخت سیلیکاژل و عصاره اضافه شد. پس از آن با افزایش حلال‌هایی با قطبیت متفاوت جداسازی انجام شد به این ترتیب که از حلال کاملاً غیرقطبی *n*-هگزان شروع شد و سپس با افزایش اتیل استات طبق جدول

جدول شماره ۱- جابجایی شیمیایی پروتون‌ها و کربن‌های فارنسیفرون C در حلال کلروفرم دوتره

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	$\delta_H$ (ppm)
۱	-		-
۲	۱۶۱/۷		-
۳	۱۱۲/۶		۷/۲۶ d
۴	۱۴۳/۲		۷/۶۶ d
۵	۱۲۸/۵		۷/۳۸ d
۶	۱۱۲/۸		۷/۸۷ dd
۷	۱۶۰/۹		-
۸	۱۰۱/۳		-
۹	۱۰۵/۵		-
۱۰	۱۱۲/۱		-
۱'	۶۵/۱		۴/۶ d
۲'	۱۱۸/۳		۵/۴ br t
۳'	۱۴۲/۲		-
۴'	۳۹/۳		۴/۰۶ m
۵'	۲۵/۵		۱/۲ m
۶'	۵۴/۹		۱/۹۵ m



ادامه جدول شماره ۱

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	جابجایی شیمیایی
		$\delta_H$ (ppm)	
۷'	۸۵/۷	-	-
۸'	۳۸/۲	۱/۴۵ m	
۹'	۲۵/۴	۱/۵ m	
۱۰'	۸۶/۳	۳/vbr t	
۱۱'	۴۴/۹	-	
۱۲'	۲۵/۸	۱/۰۵ s	
۱۳'	۲۳/۱	۱/۰۳ s	
۱۴'	۱۸/۶	۱/۳۴ s	
۱۵'	۱۶/۵	۱/۷۷ s	

جدول شماره ۲ - جابجایی شیمیایی پروتونها و کربن‌های آمبلی‌پرنین در حلال کلروفرم دوتره

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	جابجایی شیمیایی
		$\delta_H$ (ppm)	
۱	-	-	-
۲	۱۶۱/۷	-	-
۳	۱۱۲/۸	۷/۲۶ d	
۴	۱۴۳/۳	v/۶۴ d	
۵	۱۲۸/۶	v/۳۷ d	
۶	۱۱۸/۶	۷/۵br d	
۷	۱۶۲	-	
۸	۱۰۱/۵	۷/۸br d	
۹	۱۵۵/۷	-	
۱۰	۱۱۲/۳	-	
۱۱'	۶۵/۱	۴/۶ d	
۱۲'	۱۱۳	۵/۴۸br t	
۱۳'	۱۴۲/۱	-	
۱۴'	۳۹/۴	۲/۱ m	
۱۵'	۲۶	۲/۱۵ m	
۱۶'	۱۲۴/۲	۵/۰۹br t	



## ادامه جدول شماره ۲

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	$\delta_H$ (ppm)	جابجایی شیمیایی
۷'	۱۳۵/۱		-	
۸'	۳۹/۵		۱/۹۸ m	
۹'	۲۶/۶		۲/۰۵ m	
۱۰'	۱۲۳/۵		۵/۱ br d	
۱۱'	۱۳۱/۱		-	
۱۲'	۱۶/۶		۱/۷۸ s	
۱۳'	۱۵/۹		۱/۶۱ s	
۱۴'	۲۵/۷		۱/۶۹ s	
۱۵'	۱۷/۵		۱/۶۱ s	

جدول شماره ۳ - جابجایی شیمیایی پروتون‌ها و کربن‌های  $\beta$ -استیگماسترول در حلال کلروفرم دوتره

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	$\delta_H$ (ppm)	جابجایی شیمیایی
۱	۳۷/۳		-	
۲	۳۱/۶		-	
۳	۷۱/۸		۳/۵۲ m	
۴	۴۲/۳		-	
۵	۱۴۰/۸		-	
۶	۱۲۱/۷		۵/۳۷ br d	
۷	۳۱/۹		-	
۸	۳۱/۹		۱/۴۴ m	
۹	۵۱/۲		۰/۹۷ m	
۱۰	۳۶/۵		-	
۱۱	۲۱/۱		-	
۱۲	۳۹/۸		-	
۱۳	۴۲/۳		-	
۱۴	۵۶/۹		۰/۹۷ m	



## ادامه جدول شماره -۳

شماره کربن/پروتون	$\delta_C$ (ppm)	جابجایی شیمیایی	جابجایی شیمیایی $\delta_H$ (ppm)
۱۵	۲۴/۵		-
۱۶	۲۸/۹		-
۱۷	۵۵/۹		۱/۱۳ m
۱۸	۱۲/۳		۱/۰۴ m
۱۹	۱۹/۴		۱/۰۲ m
۲۰	۴۰/۵		۱/۳۸ m
۲۱	۲۱/۱		۰/۷۹ d
۲۲	۱۳۸/۳		۵/۲۰ dd
۲۳	۱۲۹/۳		۵/۱۵ dd
۲۴	۵۱/۲		۰/۹۰ m
۲۵	۳۱/۹		۱/۵۷ m
۲۶	۱۹		۰/۸۵ d
۲۷	۲۱/۲		۰/۸۴ d
۲۸	۲۵/۵		-
۲۹	۱۱/۹		۰/۸۱ t

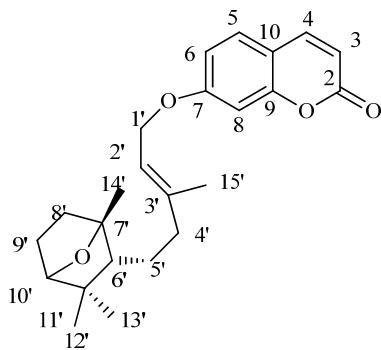
یک پیام دوتایی با ثابت جفت شدگی ۸ و ۲/۴ هرتز مشاهده می‌شود که مربوط به پروتون‌های H-۶ می‌باشد. پیام دوتایی پهن با ثابت شکافتگی ۵/۳ هرتز در ۳/۷۳ ppm مربوط به پروتون‌های H-۱۰ است. پیام دوتایی با جابجایی شیمیایی ۴/۶۱ ppm و ثابت شکافتگی ۶/۵ هرتز نیز مربوط به پروتون H-۱ است. در طیف کربن این ترکیب پیام مشاهده شده در ۱۶۱/۷ ppm مربوط به گروه کربونیل است و به ۲-۶ نسبت داده می‌شود. پیام مربوط به ۷-۸ ppm نیز در ۱۶۰/۹ ppm مشاهده می‌شود. جابجایی شیمیایی سایر پروتون‌ها و کربن‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

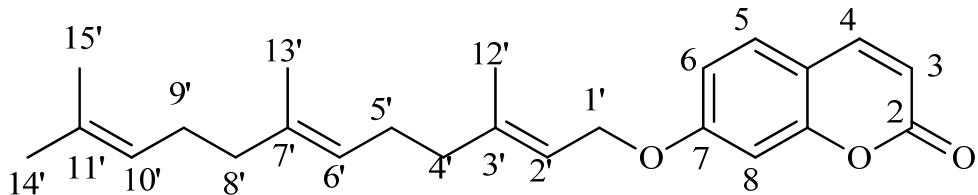
## نتایج

اولین ترکیب جدادشده از این گیاه فارنسیفروول C (۱) بود. این ترکیب دارای فرمول مولکولی  $C_{24}H_{30}O_4$  و جرم مولکولی  $g.mol^{-1}$  ۳۸۲/۴۹ می‌باشد و در دمای تقریباً ۸۵ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌شود. این ترکیب یکی از ترکیبات اصلی جدا شده از گیاه *F. assa-foetida* است [۲۰] و ساختمان آن قبلاً تعیین شده بود. ساختار این ترکیب در شکل شماره ۱ آمده است.

پیام مربوط به پروتون‌های H-۳ و H-۴ به صورت دو پیام دوتایی به ترتیب در ۷/۲۶ و ۷/۶۶ ppm با ثابت جفت شدگی ۶/۸۷ ppm  $^1H$  NMR ظاهر شده‌اند. در ۹/۵ هرتز در طیف  $^1H$  NMR

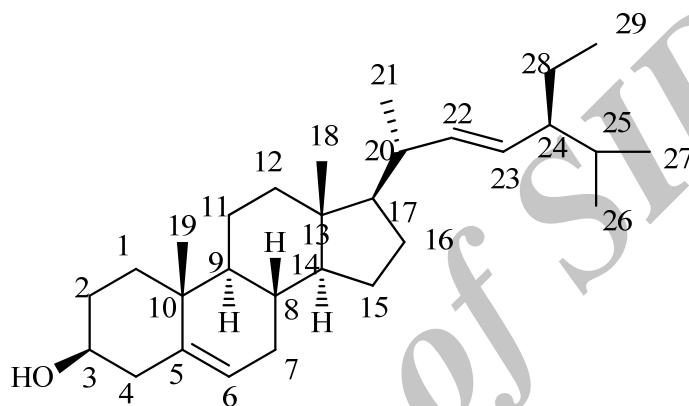






7-(((2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl)oxy)-2H-chromen-2-one

شکل شماره ۲ - آملی‌پرنین



(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5S,E)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol

شکل شماره ۳ - β-استیگماسترول

در این تحقیق آملی‌پرنین در نسبت حلال  $n$ -هگزان: اتیل استات (۱:۴) جداسازی شده است. گزارش شده است که آملی‌پرنین از تولید رنگدانه‌های قرمز در برخی از گیاهان جلوگیری می‌کند [۲۱]، به عنوان عامل ضد تومور در برخی سلطانها عمل می‌کند [۲۲] و همچنین به عنوان عامل ضد التهاب به شمار می‌رود [۲۳].  $\beta$ -استیگماسترول (۳) یک فیتوستروول غیراشباع است که به صورت تجاری از دانه‌های سویا به دست می‌آید و به عنوان ماده‌ی اولیه در ستز استروئیدهای دارویی کاربرد دارد. طبق اطلاعات موجود،  $\beta$ -استیگماسترول از گیاهانی چون *Typha latifolia* و *Ambrosia augusta* استخراج و جداسازی شده است [۲۴، ۲۵]. این ترکیب نیز در نسبت حلال  $n$ -هگزان: اتیل استات (۱:۳) به دست آمده است. ساختار این ترکیبات با

## بحث

پس از انجام کروماتوگرافی ستونی دو کومارین به نام فارنسیفروول C و آملی‌پرنین و یک استروئید به نام  $\beta$ -استیگماسترول جداسازی و شناسایی شد. این ترکیبات در تحقیقات قبلی بر روی گیاهان دیگر جداسازی و شناسایی شده بود، اما در این تحقیق موفق شدیم این ترکیبات را برای اولین بار از عصاره کلروفرمی *F. hirtella* جداسازی و شناسایی کنیم. فارنسیفروول C (۱)، یکی از ترکیبات اصلی جدنشده از گیاه *F. assa-foetida* است و برای پیشگیری از سرطان استفاده می‌شد. این ترکیب در نسبت حلال  $n$ -هگزان: اتیل استات (۲:۳) جداسازی شد. آملی‌پرنین (۲)، یک کومارین پرینیل دار شده است که به دسته‌ی سزکوبی ترپن کومارین‌ها تعلق دارد و در بسیاری از گیاهان جنس *Ferula* یافت می‌شود.



آملی پرنین و  $\beta$ -استیگماسترول از گونه *Ferula hirtella* در جهان می‌باشد.

استفاده از داده‌های طیفی  $^1\text{H}$  NMR و  $^{13}\text{C}$  NMR و گرفتن نقطه ذوب آنها شناسایی شد.

این مقاله اولین گزارش از استخراج فارنسیفرول C و

## منابع

- Mozaffarian V. The Family of Umbelliferae in Iran, Keys and Distribution. Research Institute of Forests and Rangelands Press. Tehran. 1983, p: 114.
- Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Press. Iran. 1996, p: 228.
- Miski M, Jakupovic J. Daucane esters from *Ferula rigidula*. *Phytochemistry* 1990; 29: 173-8.
- Garg SN, Agarwal SK. New sesquiterpenes from *Ferula jaeschkeana*. *Planta Med.* 1987; 53: 341 - 2.
- Iranshahi M, Amin G, Jalalizadeh H and Shafiee A. New germacrane derivative from *Ferula persica*. *Pharm. Biol.* 2003; 41: 431 - 3.
- Shikishima Y, Takaisha Y, Honda G, Ito M, Takeda Y, Tori M, Takaoda S, Kodzhimatov O K and Ashurmetov O. Sesquiterpenes from *Ferula penninervis*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 1897 - 903.
- Nabiev AA, Khasanov TK and Malikov VM. A new terpenoidcoumarin from *Ferula kopetdaghenensis*. *Khim. Prir. Sodein.* 1982; 1: 48 - 51.
- Nabiev AA and Malikov VM. Microlobin - a new coumarin from *Ferula microloba*. *Khim. Prir. Soedin.* 1983; 19: 700 - 4.
- Iranshahi M, Amin G and Shafiee A. A new coumarin from *Ferula persica*. *Pharm. Biol.* 2004; 42: 440 - 2.
- Iranshahi M, Arfa P, Ramezani M, Jaafari MR, Sadeghian H, Bassarello C, Piacente S and Pizza C. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochem.* 2007; 68: 554 - 61.
- Abd El-Razek MH, Ohta S and Hirata T. Terpenoidcoumarins of the genus *Ferula*. *Heterocycles* 2003; 60: 689 - 716.
- Iranshahi M, Amin G, Amini M and Shafiee A. Sulfur containing derivatives from *Ferula persica var. latisecta*. *Phytochem* 2003; 63: 965 - 6.
- Al-said MS, Abdel Sattar E, El-Ferally F, Nahrstedt A and Coen M. New sulphides from *Ferula rutabensis*. *Int. J. Pharmacog.* 1996; 43: 189 - 93.
- Iranshahi M, Mojtabab M, Sadeghian H, Hanafi-Bojd MY and Schneider B. Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochem.* 2008; 69: 473 - 8.
- Nazari ZE and Iranshahi M. Biologically active sesquiterpenecoumarins from *Ferula* species, *Phytotherapy Res.* 2010; 25: 315 - 23.
- Zargari A. Medicinal Plants. Tehran University Publication. Tehran. 1996, p: 592.
- Eigner D, Scholz D. Das Zauberbüchlein der Gyani Dolma. *Pharm. Unserer Zeit.* 1990; 19: 141.
- Afifi FU and Abu-Irmaileh B. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 101.
- Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, Phytochemistry and Pharmacology os asafetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin)- A review. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 134: 1 - 10.
- Lee JH, Choi S, Lee Y, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Bae H, Lee HJ, Lee EO, Ahn KS, Ryu SY, Lü J and Kim SH. *Mol. Cancer. Ther.* 2010; 9: 389.
- Iranshahi M, Shahverdi AR, Mirjani R, Amin



GR and Shafiee A. Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratiamarcescens*. *Z. Naturforsch.* 2004; 59: 506 - 8.

**22.** Iranshahi M, Kalategi F, Rezaee R, Shahverdi AR, Ito C, Furukawa H, Tokuda H and Itoigawa M. Cancer chemopreventive activity of terpenoidcoumarins from *Ferula* species. *Planta Med.* 2008; 74: 147 - 50.

**23.** Curini M, Epifano F, Maltese F, Marcotullio MC, Tubaro A, Altinier G, et al. Synthesis and

anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxcoumarins. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 2241 - 3.

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

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

