



فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

مقاله تحقیقاتی

بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)

عماد نظریان پور، صمد نژاد ابراهیمی*

گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
گل‌واژگان: آویشن شیرازی بررسی فیتوشیمیایی فلاونوئید رزمارینیک اسید	مقدمه: آویشن شیرازی با نام علمی <i>Zataria multiflora</i> Boiss. گیاهی متعلق به خانواده ی نعناعیان است. این گیاه تنها در مناطق مرکزی و جنوبی ایران، قسمت‌هایی از پاکستان و افغانستان می‌روید. از این گیاه دارویی به عنوان چاشنی در بسیاری از غذاها در ایران استفاده می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است. گیاه <i>Zataria multiflora</i> دارای اثرات افزایش قدرت ایمنی، ضد درد، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضد ویروسی، ضد عفونی کننده و ضد قارچی است و نیز به طور گسترده‌ای در طب سنتی به عنوان داروی ضد درد، ضد اسهال، برای درمان بیماری‌های عفونی و مشکلات گوارشی استفاده می‌شود. هدف: بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی آویشن شیرازی به کمک تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی و اسپکتروسکوپی می‌باشد. روش بررسی: در این تحقیق اجزای اصلی تشکیل دهنده عصاره متانولی آویشن شیرازی به روش کروماتوگرافی ستونی فاز نرمال و کروماتوگرافی نیمه تهیه‌ای فاز معکوس C18 به روش HPLC جداسازی، خالص سازی و شناسایی شد. نتایج: سه فلاونوئید گلیکوزید به نام‌های آپی ژنین-O-7-گلیکوزاید (۱)، لوتولین-O-7-گلیکوپیروناید (۲) و لوتولین-O-7-روتینوزاید (۳) شناسایی شد ساختار آنها توسط مطالعات اسپکتروسکوپی NMR یک بعدی و دوبعدی نظیر ^1H-^1H-COSY، HSQC و HMBC تعیین شده است. همچنین سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولتانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶) با بررسی طیف جرمی و الگوی شکست آنها شناسایی شدند. نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که گیاه آویشن شیرازی منبع غنی از اجزا پلی فنولی و ترپنوئیدی می‌باشد.

۱. مقدمه

Zataria multiflora Boiss. با نام آویشن شیرازی بیماری‌های عفونی است [۱]. تاکنون مطالعات زیادی بر روی گیاهی متعلق به خانواده ی نعناعیان است. در طب سنتی ایران گیاه آویشن شیرازی با نام ساتار یا زاتار شناخته شده است و خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس این گیاه صورت گرفته است که نتایج این مطالعات نشان داد که خاصیت

مخفف‌ها: ELSD، دکتور پراکندگی نور تبخیری؛ HMBC، همبستگی چند باند ناجور هسته؛ HSQC، انسجام تک کوانتومی ناجور هسته
* نویسنده مسئول: s_ebrahimi@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴ مرداد ۱۳۹۸؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۲۹ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱ شهریور ۱۳۹۹

doi: 10.29252/jmp.19.75.239

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه‌ی نمونه

اندام هوایی گیاه آویشن شیرازی از رویشگاه طبیعی آن در یزد جمع‌آوری شد. گیاه جمع‌آوری شده توسط دکتر علی سنبل (عضو هیأت علمی دانشگاه شهید بهشتی) شناسایی و نمونه‌ی هرباریومی آن در هرباریوم پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی ثبت شد. گیاه در معرض هوا و سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر شد.

۲.۲. مواد شیمیایی

حلال‌های آلی مانند: هگزان، متانول، اتیل استات، دی‌کلرومتان و همچنین اقلام مصرفی نظیر سیلیکاژل ستون کروماتوگرافی (Silica gel 60 ۰/۲۰۰-۰/۰۶۳ میلی متر) و صفحات کروماتوگرافی لایه نازک سیلیکاژل 60F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) و متانول خالص با درجه HPLC از شرکت مرک خریداری شدند. رزین Diaion-HP20 مخصوص کروماتوگرافی از شرکت ساپلکو آمریکا تهیه شد. حلال‌های دوتره ساخت شرکت Armar سوئیس بودند.

۳.۲. وسایل و دستگاه‌ها

به منظور تغلیظ عصاره، از دستگاه تبخیرکننده‌ی دوار در خلاء شرکت Heidolph آلمان استفاده شد. جهت جداسازی مواد، از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل فاز نرمال و تکنیک semi preparative-HPLC توسط دستگاه HPLC مدل K-1001 به همراه شیر تزریق با لوپ ۱۰۰ µl مدل D-14163، مجهز به آشکارساز PDA مدل K-2800، همگی ساخت شرکت Knauer آلمان و ستون‌های SunFire™ C18 (5µm, 19×50mm) و SunFire™ C18 (3.5µm, 3×150 mm) از شرکت Waters آمریکا مورد استفاده قرار شد. برای جداسازی ترکیبات به روش

ضدقارچی آن تنها محدود به گونه‌های قارچ کاندیدا و *Malassezia* بوده است. در طب سنتی ایران از جوشاندن این گیاه به عنوان ضد درد، ضد عفونی‌کننده [۲]، ضد نفخ، ضد انگل و ضد اسهال یاد شده است [۳]. مطالعات فارماکولوژیک نشان داده که عصاره‌ی آویشن شیرازی قادر است تا سرفه‌های ناشی از سرما خوردگی برونشیت را درمان و به عنوان ضد باکتری در بهداشت دهان و دندان توسط پزشکان طب سنتی تجویز می‌شود [۴]. این گیاه با رایحه‌ی مطبوع و به عنوان طعم‌دهنده و چاشنی برای ماست و بسیاری از غذای فوری و در تهیه بسیاری از غذاهای محلی ایرانی کاربرد فراوانی دارد [۵]. مطالعات صورت گرفته بروی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی نشان داد که اسانس آن حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات مونوترپنی مانند تیمول، کارواکرول، لینالول، گاما ترپنین و پاراسایمن بوده است [۶]. گزارش‌های اخیر بر روی این گیاه ثابت کرد که اسانس آن دارای خواص ضدانگلی و ضدقارچی بوده است و داروی ارزشمندی برای درمان کیست به شمار می‌رود. اخیراً در سال ۲۰۱۸ بوسکابادی و همکارانش اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانت اسانس این گیاه را گزارش و مؤثر بودن اسانس این گیاه در بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن را به اثبات رسانیده‌اند [۷]. با توجه به کاربرد گسترده‌ی این گیاه در طب سنتی ایران ضرورت مطالعات بیشتر فیتوشیمیایی بر روی آن به شدت احساس می‌شود. در ادامه تحقیقات ما با هدف جداسازی و خالص‌سازی و تعیین ساختار متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهان دارویی در این پژوهش به بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی پرداخته شد. این تحقیقات منجر به جداسازی و تعیین ساختار سه فلاونوئید گلیکوزید از عصاره‌ی متانولی این گیاه شد.

متانولی به دست آمد.

۵.۲. پروفایل فیتوشیمیایی عصاره متانولی توسط HPLC-

PDA-MS-ELSD

پروفایل فیتوشیمیایی مواد تشکیل دهنده عصاره متانولی آویشن شیرازی به کمک HPLC مجهز به دکتور ماورابنفش PDA (Photodiode Array Detector) و طیف سنجی جرمی (MS) و آشکارساز پراکندگی نور تبخیری (ELSD) Evaporative Light Scattering Detector ثبت شد. شرایط دستگاه اسپکترومتری جرمی به صورت مثبت-منفی همزمان، ولتاژ موئینه 4.5 V، دمای موئینه ۵۰.۰°C، گاز اسپری (نیترژن) ۳ Lmin-1 و گاز خشک کننده (نیترژن) ۱۵ Lmin-1 بوده است. ثبت طیف‌های جرمی در هر دو مد مثبت و منفی در محدوده ۱۵۰۰-۱۶۰ دالتون با تعداد اسکن ۶۰۰۰ u/sec و سرعت تغییر مد مثبت-منفی ۰/۱۵۰ sec انجام شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه و سیستم حلالی آب استونیتریل داری ۰/۱ درصد فرمیک اسید و گرادیانت حلالی شامل ۵ درصد حلال استونیتریل به عنوان شروع آنالیز، و در ۳۰ دقیقه به ۱۰۰ درصد استونیتریل رسید و به مدت ۵ دقیقه به صورت ایزوکراتیک شویش شد. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود.

۶.۲. استخراج مایع - مایع

۱۴ گرم عصاره‌ی متانولی با استخراج مایع - مایع توسط دو حلال آب و دی‌کلرومتان به دو بخش آبی و دی‌کلرومتانی تقسیم شد. برای این کار حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به یک دکانتور ۲ لیتری اضافه شد و بعد عصاره‌ی حاصل با میزان بسیار کمی از متانول حل و به دکانتور منتقل شد. سپس بر روی آن حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان ریخته شد. پس از هم خوردن کامل دکانتور در جای ساکن مستقر تا جداسازی مراحل به طور کامل انجام شود. پس از

کروماتوگرافی لایه نازک تهیه‌ای (Preparative Thin Layer Chromatography) از صفحه‌های کروماتوگرافی لایه نازک به ابعاد ۲۰ × ۲۰ سانتی‌متر و ضخامت ۱۰۰۰ میکرومتر و دارای جاذب F-254 استفاده شد. برای طیف‌گیری NMR ترکیبات، از دستگاه ۵۰۰ MHz بروکر آوانس III (Bruker Avance III 500 MHz spectrometer) با میکروپروب ۱ mm TXI در میدان مغناطیسی ۵۰۰/۱۳ MHz برای ^1H و در میدان مغناطیسی ۱۲۵/۷ MHz برای ^{13}C سازماندهی شده بود، استفاده شد. آنالیزهای کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا متصل به اسپکترومتری جرمی توسط دستگاه LC-MS (8030) شامل پمپ دوتایی (ADLC-20) تنظیم‌کننده گرمایی ستون (CT0-20AC)، آشکارساز فوتودیود (SDP-M20A) و سیستم کنترلر (CBM-20A) متصل به منفذ یونیزاسیون (Electrospray) مجهز به تفکیک‌کننده‌های یون چهارقطبی سه تایی متوالی (Triple Quadrupole) ساخت شرکت Shimadzu انجام گرفت. برای به دست آوردن طیف‌ها و آنالیز آنها پردازشگر LabSolution (Shimadzu) مورد استفاده قرار گرفت.

۴.۲. عصاره‌گیری

مقدار ۵۰۰ گرم اندام هوایی گیاه آویشن شیرازی خشک شده، توسط دستگاه خردکن خانگی آسیاب و برای عصاره‌گیری آماده شد. عصاره‌گیری توسط حلال هگزان در ابتدا سپس توسط حلال اتیل استات و در نهایت توسط حلال متانول صورت گرفت. عصاره‌گیری با استفاده از هر حلال در هفت مرحله و هر بار با استفاده از ۲ لیتر حلال انجام گرفت. سپس حلال آن بوسیله دستگاه تبخیرکننده دوار تحت شرایط خلأ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و عصاره حاصل برای مراحل بعدی جمع‌آوری شد. طی این مراحل ۲۱ گرم عصاره هگزانی، ۶ گرم عصاره اتیل استاتی، ۱۴ گرم عصاره

جداسازی کامل فاز پایینی که شامل فاز دی کلرومتانی بود جدا و دوباره به محلول موجود در دکانتور، ۲۰۰ میلی لیتر دی کلرومتان اضافه شد و آنقدر این عمل تکرار شد تا جایی که کل عصاره ی ۶۰۰ میلی لیتر دی کلرومتان شسته شد در این مرحله فاز دی کلرومتانی کنار گذاشته شد و توسط دستگاه روتاری خشک شد که شامل ۵ گرم عصاره دی کلرومتانی شد. عصاره دی کلرومتانی روی رزین DIAION HP20 بارگذاری شد. رزین توسط آب گاززدایی شده شسته شد تا جایی که محلول زیرین بی رنگ شد در نهایت رزین توسط متانول شسته و فاز متانولی برای خالص سازی بیشتر خشک و نگهداری شد. در نهایت مقدار ۳ گرم عصاره به دست آمد.

فراکسیون های شماره ۳۸ و ۲۰ و ۲۴ توسط کروماتوگرافی نیمه تهیه ای مایع با کارایی بالا که با گرادینت شویی متانول و آب (۶۰:۴۰) آغاز شد و در دقیقه ۵ به (۴۸:۵۲) متانول و آب رسید در دقیقه ۶ به (۴۷:۵۳) متانول و آب و تا دقیقه ۲۵ به صورت ایزوکراتیک شویش ستون ادامه پیدا کرد و در نهایت در دقیقه ۳۰ به ۱۰۰ درصد متانول رسید حجم تزریق ۴۰ میکرولیتر و غلظت محلول تزریق ppm ۲۰۰۰۰۰ و طول موج مورد استفاده برای مانیتور کردن پیک ها nm ۲۵۴ بود که در نهایت از فرکشن شماره ۳۸ ترکیب ۱ به میزان ۵ میلی گرم از فرکشن شماره ۲۰ ترکیب ۲ به میزان ۷ میلی گرم و از فرکشن شماره ۲۴ ترکیب ۳ به میزان ۵ میلی گرم خالص شد.

۳. نتایج

۷.۲. ستون کروماتوگرافی

پس از آماده سازی ستون کروماتوگرافی (قطر ۲/۵ سانتی متر و طول ۷۰ سانتی متر)، ۳ گرم عصاره حاصل شده از مرحله قبل را با سیلیکاژل به نسبت یک به یک مخلوط و به ستون افزوده شد. از دو حلال، کلروفرم به عنوان حلال با قطبیت متوسط و متانول به عنوان حلال با قطبیت بالا برای شست و شوی ستون استفاده شد. محدوده تغییر قطبیت از متانول: کلروفرم ۱۰:۹۰ تا متانول: کلروفرم ۹۰:۱۰ بود. حجم حلال مصرفی برای هر فراکسیون ۱۰۰ میلی لیتر بود و در مجموع ۳۸ فراکسیون حاصل شد.

با استفاده کروماتوگرافی نیمه تهیه ای مایع با کارایی بالا ترکیب های آپی ژنین -۷-O- گلیکوزاید (۱)، لوتولین -۷-O- گلیکوپیروناید (۲) و لوتولین -۷-O- روتینوزاید (۳) خالص سازی شدند. سپس در مرحله بعد برای شناسایی و تعیین ساختار از نمونه های خالص سازی شده با استفاده از تکنیک های اسپکتروسکوپی یک و دو بعدی طیف گیری شد. سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولئانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶) با استفاده از طیف های جرمی در مد مثبت و منفی و بررسی الگوی شکست شناسایی شدند (شکل ۱).

۸.۲. کروماتوگرافی لایه نازک

فراکسیون های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی توسط کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفتند و فراکسیون های مشابه مخلوط شدند. در مجموع ۱۲ فراکسیون به دست آمد. برای مشاهده لکه ها از لامپ UV و معرف فسفومولیدات استفاده شد.

۹.۲. کروماتوگرافی نیمه تهیه ای مایع با کارایی بالا

۱.۳. مشخصات طیف فلاونوئید *Luteolin 7-O-rutinoside*

در طیف پروتون (شکل ۲) این ترکیب در ناحیه ppm ۶/۹۳ و ۷/۴۲ دو سیگنال دوتایی با انتگرال یک و ثابت شکافتگی ۸/۱۷ Hz و ۹/۴۴ قابل مشاهده است که به ترتیب مربوط به پروتون های ۵' و ۶' (شکل ۳) هستند. یک سیگنال یکتایی در ppm ۷/۴۱ قابل مشاهده است که با توجه به ارتباط در طیف HMBC با کربن های ppm ۱۱۹/۱۸ و ۱۵۰/۲۴

است. پیک یون مولکولی $[M+H]^+$ در m/z ۵۹۵ تاییدکننده ساختار شناسایی شده می‌باشد (شکل ۶). این ترکیب قبلاً از گیاه *Campanula persicifolia* گزارش شده است [۸].

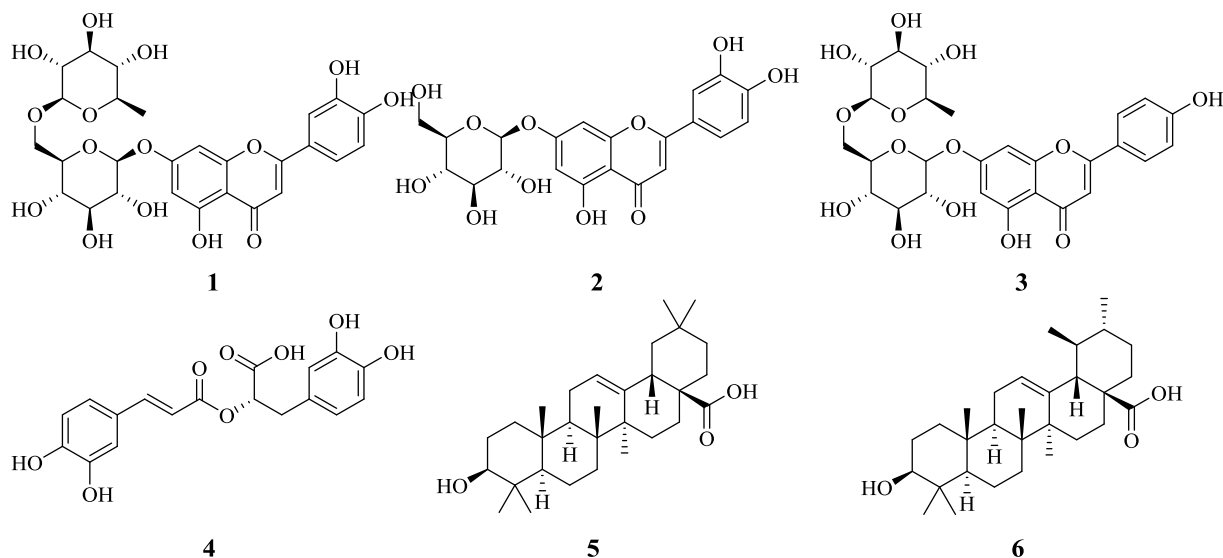
۲.۳. مشخصات طیف فلاونوئید - Luteolin 7-O-glucopyranoside (Cynaroside)

در طیف پروتون این ترکیب یک سیگنال یکتایی در ۶/۶۸ ppm دیده می‌شود که در طیف HSQC با کربن ۱۰۳/۴۵ ppm در ارتباط است. این سیگنال احتمالاً مربوط به پروتون شماره ۳ ترکیب است. همچنین در ناحیه ۶/۷۷ ppm سیگنالی به صورت یکتایی مشاهده می‌شود که در طیف HSQC با کربن ۹۵/۲۹ ppm در ارتباط است. این سیگنال نیز احتمالاً مربوط به پروتون شماره ۶ می‌باشد. همچنین در طیف HSQC این ترکیب پروتون‌های موجود در جابجایی شیمیایی ۶/۹۳ ppm و ۷/۸۸ به ترتیب با کربن‌های موجود در جابجایی شیمیایی ۱۱۶/۱۹ ppm و ۱۲۹/۳۱ ppm ارتباط نشان می‌دهند که مربوط به پروتون‌های ۶' و ۵' هستند. در طیف HMBC این ترکیب ارتباط پروتون ۶/۴۴ ppm با کربن ۱۶۲/۶۸ ppm یا کربن شماره ۷ که متصل به گروه OH است و همچنین ارتباط پروتون ۶/۷۷ ppm با کربن ۱۵۷/۵۷ که مربوط به کربن شماره ۵ که این کربن نیز یک کربن درجه ۴ متصل به گروه OH است، قابل رویت است. ارتباط پروتون ۷/۴۲ ppm با کربن ۱۵۰/۸۵ ppm مربوط به کربن شماره ۳' و همچنین سیگنال کربن ۱۶۵/۶۳ ppm مربوط به کربن ۴' نیز قابل مشاهده است. با توجه به این ارتباطات و همچنین سایر ارتباط‌های قابل مشاهده ساختار این ترکیب به صورت آورده شده در ساختار (۲) مشخص می‌شود. این ساختار با نام Luteolin 7-O-glucopyranoside که یک ساختار فلاونوئید گلیکوزیدی است که قبلاً از عصاره گیاه *Reseda luteola* جداسازی و

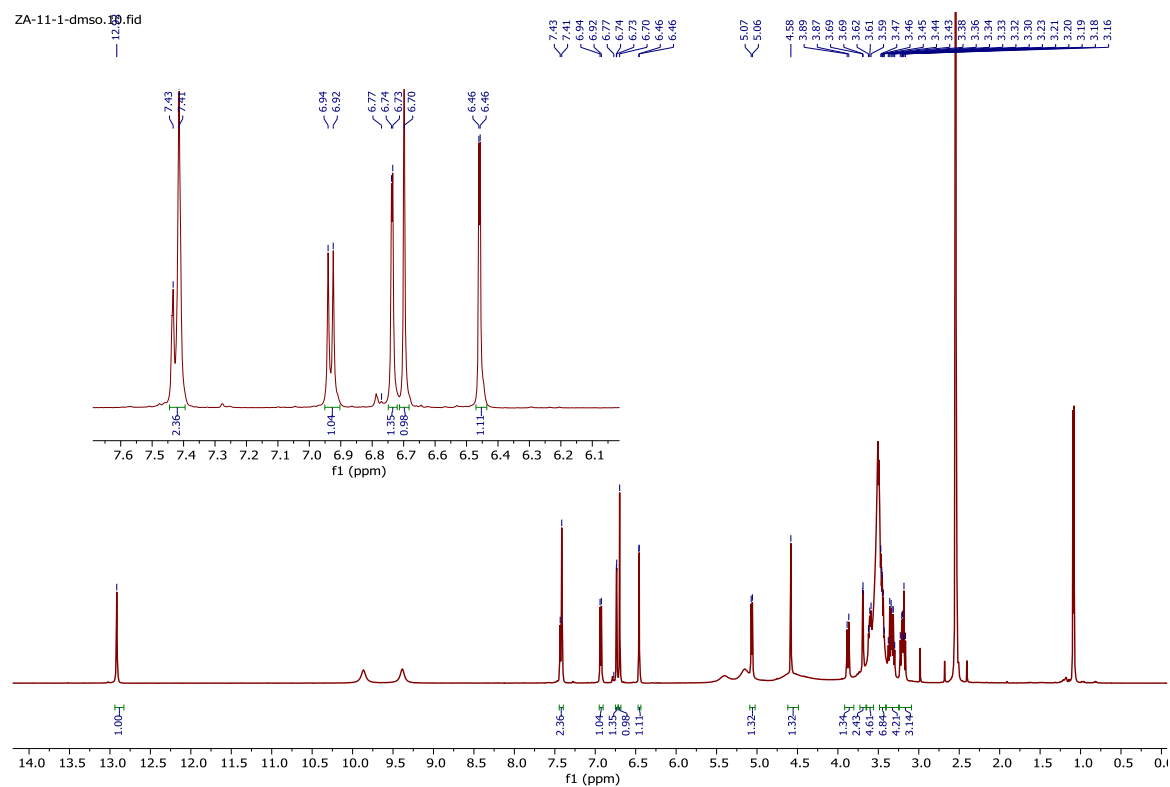
نشان می‌دهد که مربوط به پروتون ۲' است. یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک در ۶/۶۹ ppm قابل مشاهده است، که در طیف HMBC نیز با کربن ۱۸۱/۳۴ ppm ارتباط نشان می‌دهد که این سیگنال نیز احتمالاً مربوط به پروتون ۳ است که با کربونیل شماره ۴ در ارتباط است. در ۶/۴۶ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک قابل رویت است که این پروتون با کربن ۱۶۱/۵۲ ppm در طیف HMBC ارتباط نشان می‌دهد که مربوط به پروتون شماره ۸ است که با کربن شماره هفت که متصل به اکسیژن (OH) در ارتباط است. این کربن همچنین با پروتون ۶/۷۴ ppm در طیف HMBC ارتباط نشان می‌دهد (شکل ۵) که این ارتباط نشان‌دهنده این است که این پروتون احتمالاً پروتون ۶ ساختار می‌باشد. در طیف پروتون در ناحیه ۱۲/۹۱ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک نشان دهنده OH موجود در موقعیت ۵ ترکیب است. سیگنال پروتون این گروه OH به علت پیوند هیدروژنی درون مولکولی با گروه کربونیل ظاهر می‌شود. ارتباط همه پروتون‌ها و کربن‌های متصل نیز در طیف HSQC قابل مشاهده است (شکل ۴) برای مثال ارتباط پروتون ۶/۶۹ ppm و کربن ۱۰۲/۸۰ ppm و همچنین پروتون ۶/۷۴ ppm و کربن ۹۴/۵۲ ppm و تمام کربن‌های متصل به هیدروژن در طیف پروتون این ترکیب در ناحیه ۳ تا ۵/۰۳ ppm یک سری سیگنال که مربوط به گروه قندی است مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه در طیف HMBC ارتباطی بین پروتون آنومری قند (۵/۰۵ ppm) با ثابت کوپلاژ ۷/۳۸ و کربن ۱۶۱/۵۲ مشاهده می‌شود پس گروه قندی بر روی کربن شماره ۷ قرار می‌گیرد. قرارگیری سیگنال با انتگرال یک در جابجایی شیمیایی ۱ ppm وجود قند رامنوز را نشان می‌دهد. با توجه به ارتباط‌های گفته شده و همچنین سایر ارتباطات موجود، ساختار (۱) برای این ترکیب پیشنهاد می‌شود که مربوط به ترکیب فلاونوئیدی Luteolin 7-Rutinoside

شناسایی شده است [۹]. پیک یون مولکولی $[M+H]^+$ در ۴۴۹

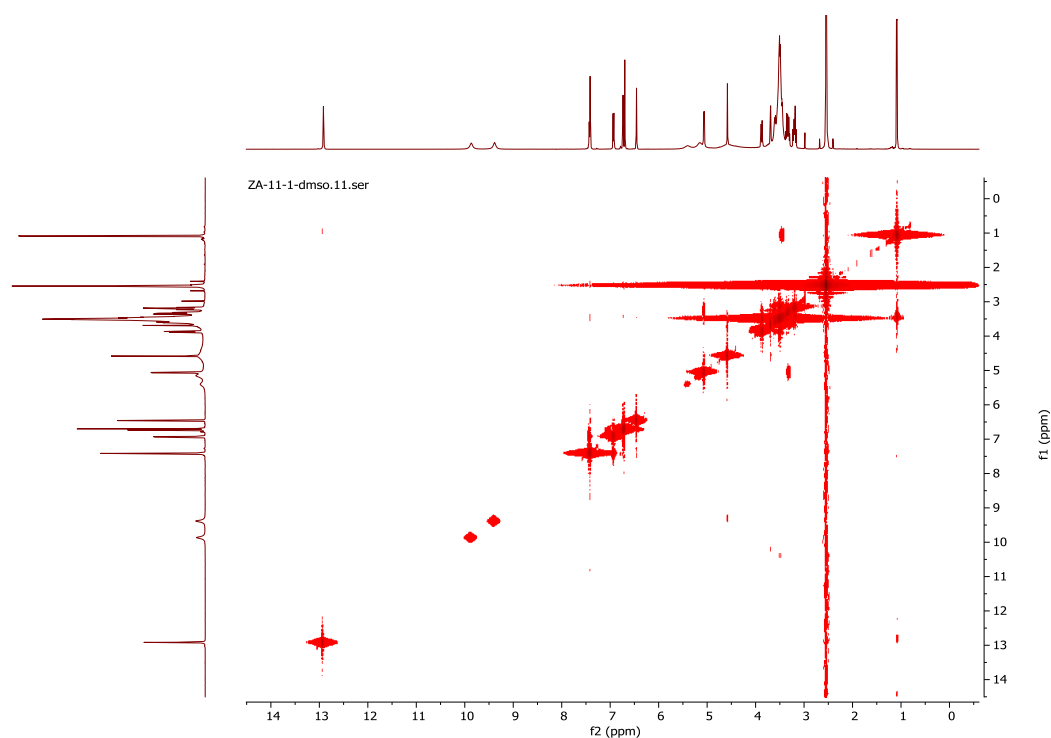
m/z تأیید کننده ساختار شناسایی شده می باشد.



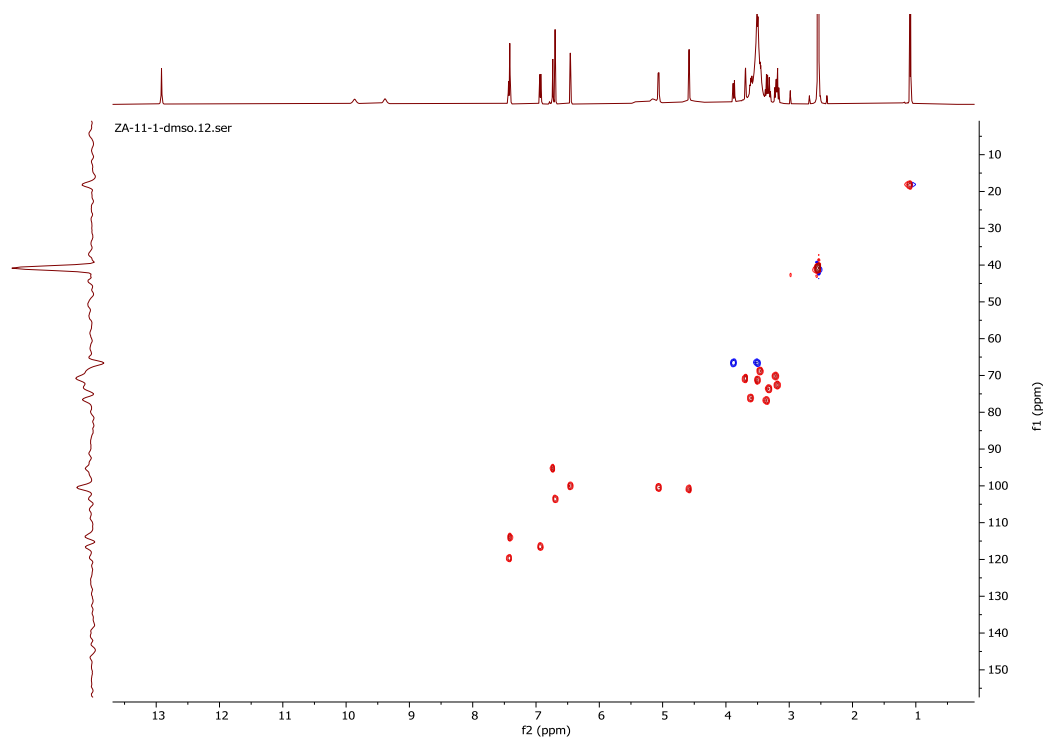
شکل ۱. ساختار اجزای شناسایی شده در عصاره متانولی آویشن شیرازی



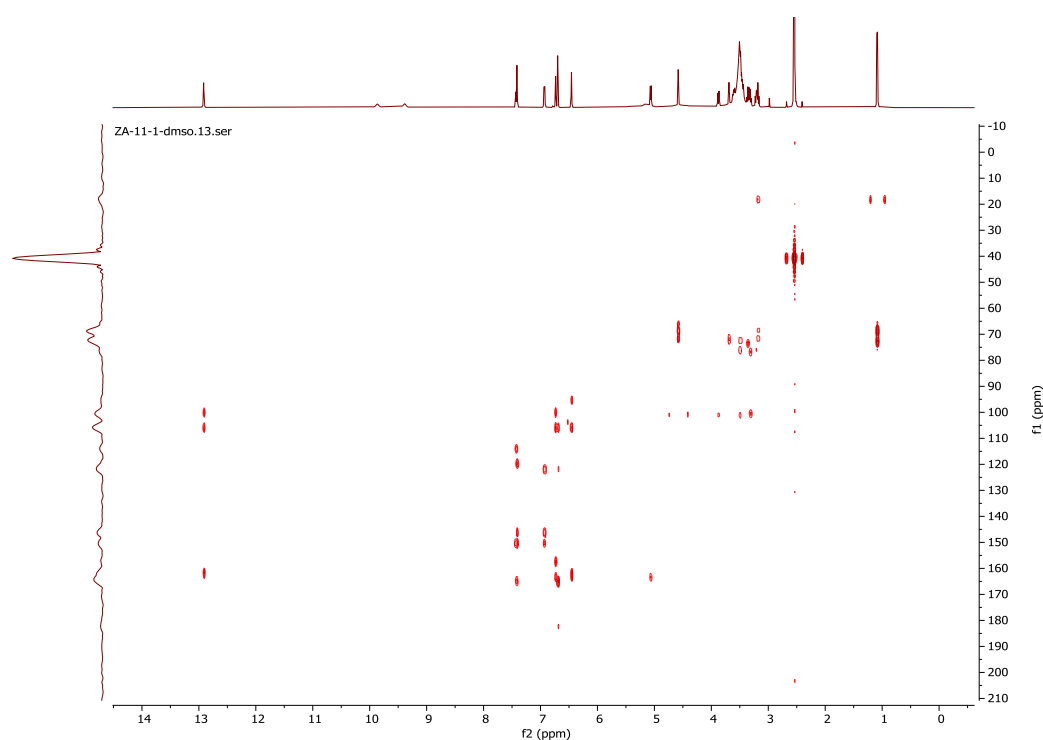
شکل ۲. طیف 1H NMR ترکیب شماره ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)



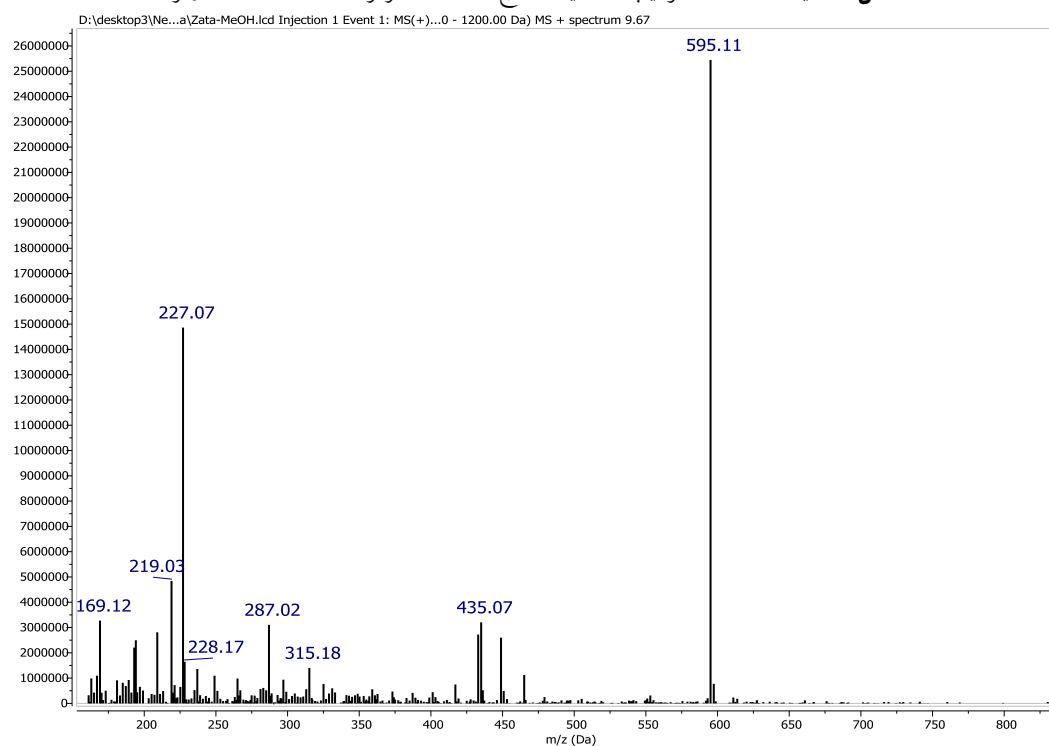
شکل ۳. طیف H-H COSY ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)



شکل ۴. طیف HSQC ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)



شکل ۵. طیف HMBC ترکیب ۱ (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره



شکل ۶. طیف جرمی ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside

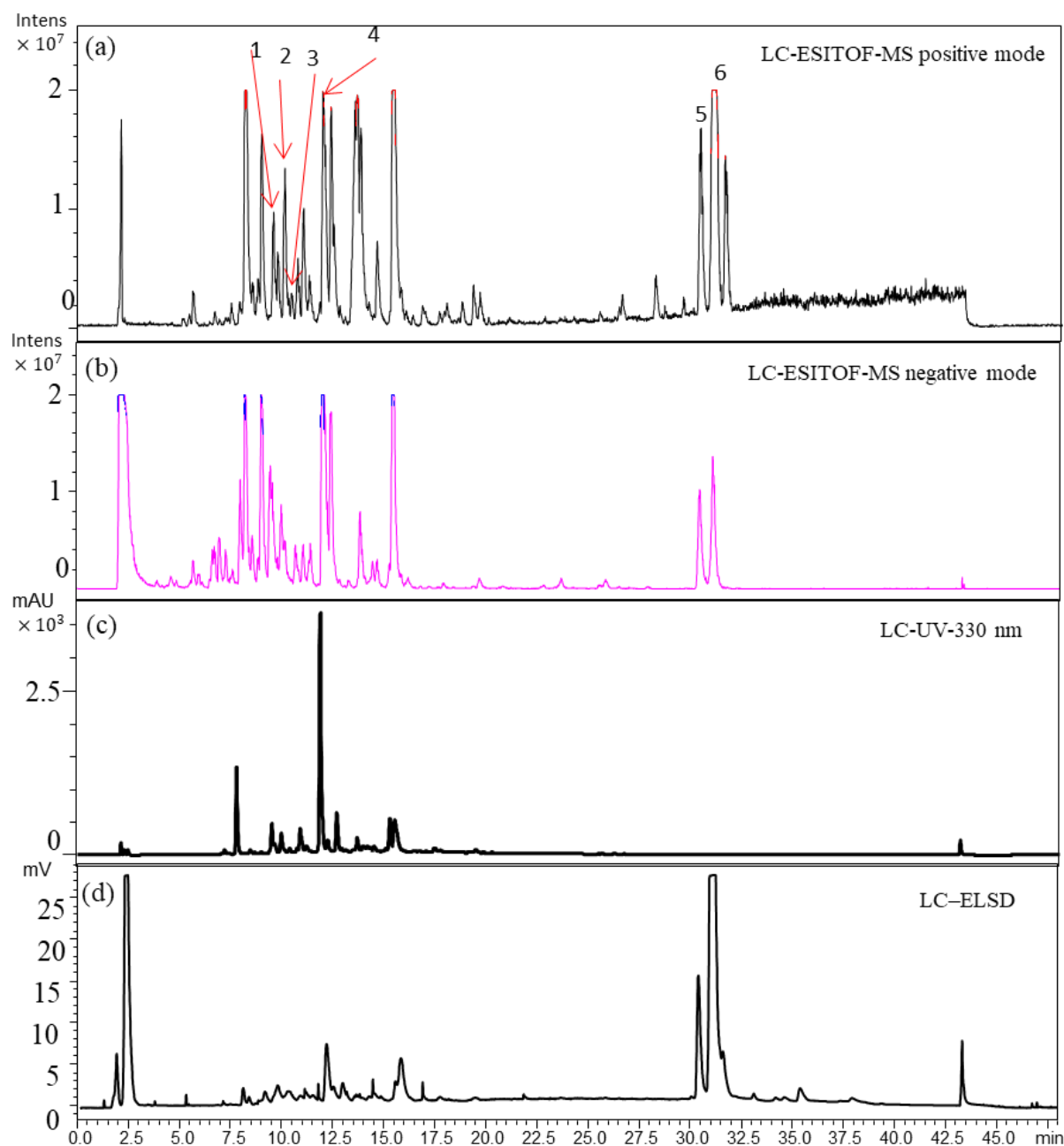
۳.۳. مشخصات طیف فلاونوئید *Apigenin 7-O-rutinoside*

در طیف پروتون این ترکیب سیگنال دوتایی با انتگرال دو یکی در ۶/۹۶ ppm و دیگری در ۷/۹۲ ppm با ثابت کوپلاژ برابر با ۸/۴۶ قابل مشاهده است که مربوط به پروتون‌های حلقه دارای استخلاف پاراست که هیدروژن‌ها به صورت قرینه ظاهر شده‌اند (۵'، ۳' و ۶'، ۲'). همچنین یک سیگنال دوتایی با انتگرال یک در ۶/۷۶ ppm و یک سیگنال دوتایی دیگر نیز در ۶/۴۵ ppm قابل مشاهده هستند که با ثابت کوپلاژ ۲/۰۴ همدیگر را شکافته‌اند مربوط به پروتون‌های ۶ و ۸ می‌باشند. در ۶/۷۹ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک وجود دارد که مربوط به پروتون ۳ بوده و همچنین یک سیگنال پهن در ۱۲/۹۴ ppm نیز مربوط به پروتون ۵ این ترکیب می‌باشد. همچنین پروتون‌های گروه قندی از ناحیه ۳ ppm تا ۵/۰۷ قابل رویت هستند. همچنین ارتباطی در طیف HMBC بین پروتون آنومری ۵/۰۶ با ثابت کوپلاژ ۷/۳۵ و کربن شماره ۷ در ۱۶۲/۱۰ قابل مشاهده است که بدین ترتیب گروه قندی در موقعیت ۷ ترکیب قرار می‌گیرد. در طیف HSQC این ترکیب ارتباط هر کربن و پروتون مربوطه‌اش (¹J) قابل مشاهده است. برای مثال پروتون ۶/۷۹ ارتباطی با کربن ۱۰۳/۲۲ ppm نشان می‌دهد. همچنین پروتون ۶/۹۶ ppm با کربن ۱۱۶/۵۲ ppm و همچنین پروتون ۷/۹۲ ppm با کربن ۱۲۸/۹۱ ppm دارای ارتباط است. ارتباط سایر پروتون‌ها و کربن‌ها در طیف HSQC این ترکیب قابل مشاهده است. در طیف HMBC این ترکیب ارتباطی بین پروتون ۷/۹۲ ppm و کربن ۱۶۲/۳۹ ppm که احتمالاً مربوط به کربن ۴' است قابل مشاهده می‌باشد

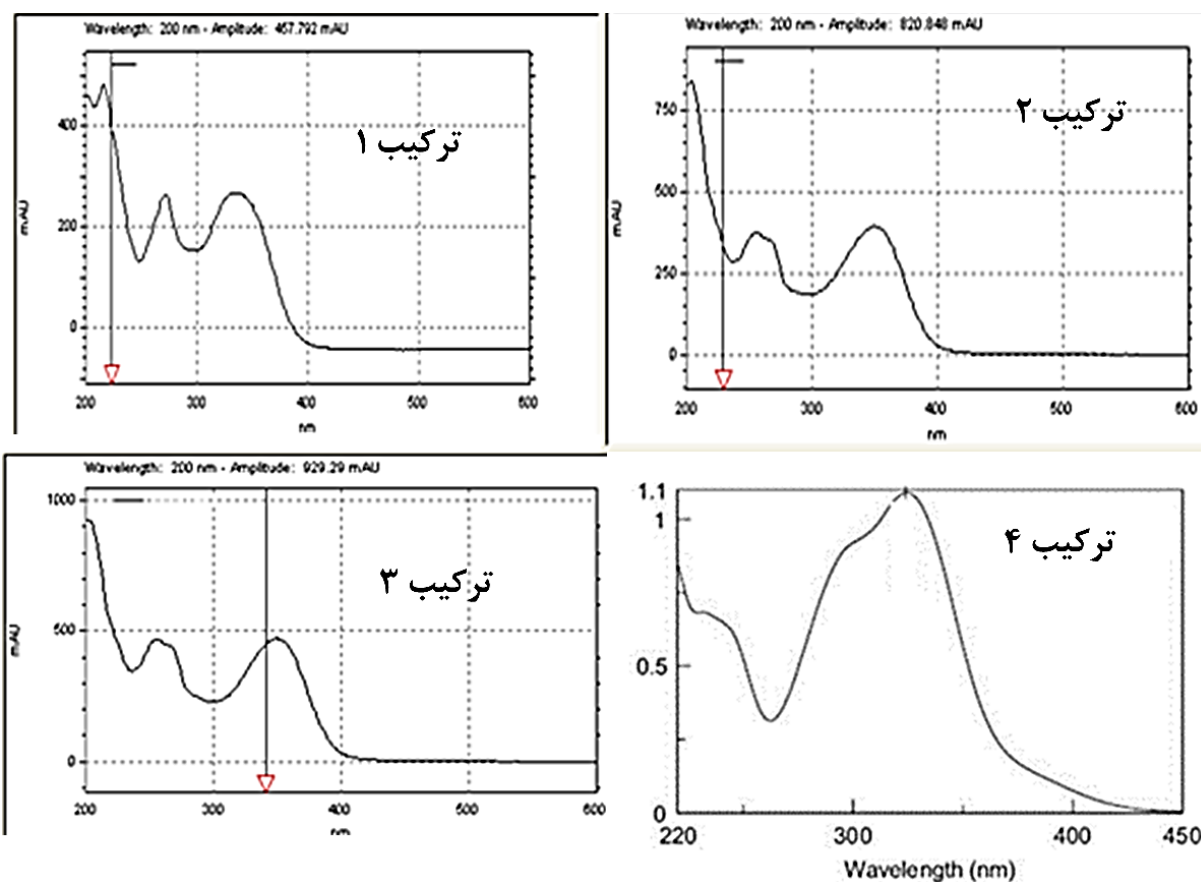
همچنین ارتباط پروتون ۶/۹۶ ppm یعنی پروتون ۳' و کربن ۱۲۱ ppm مربوط به کربن ۱' نیز قابل مشاهده است. ارتباط بین پروتون ۶/۷۹ ppm (پروتون ۳) و کربن ۱۸۳/۵۶ ppm که مربوط به کربن ۴ یا کربونیل است نیز در این طیف قابل مشاهده است. ارتباط پروتون ۶/۴۵ ppm (پروتون ۸) و کربن ۱۶۲/۱۰ ppm یعنی کربن شماره ۷ نیز در این طیف قابل مشاهده است. با توجه به این ارتباطات بیان شده و سایر ارتباطات موجود در نهایت ساختار به صورت ساختار فلاونوئید گلیکوزیدی، ترکیب (۳) تایید شد که اسم ایوپاک آن *Apigenin 7-O-rutinoside* است. طیف جرمی این ترکیب با جرم ۵۷۹ برای یون مولکولی $[M+H]^+$ نیز این ساختار را تأیید می‌کند. این ترکیب قبلاً از عصاره گیاه *Galium ruthenicum* نیز گزارش شده است [۱۰].

۴.۳. ترکیبات شناسایی شده با استفاده از طیف جرمی ترکیبات

سایر اجزا به کمک مقایسه طیف جرمی ثبت شده در حالت یونیزاسیون مثبت و منفی و مقایسه طیف UV با مقالات مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۱). کروماتوگرام HPLC-UV در طول موج ۳۳۰ نانومتر گرفته شد که در این طول موج پیک‌های اصلی دارای جذب UV حداکثری بودند. علاوه بر ترکیبات ۱-۳ که با کمک طیف‌های NMR و Mass ترکیبات شناسایی شدند. سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولئانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶)، با بررسی طیف جرمی ترکیبات و بررسی الگوی شکست آنها شناسایی شدند (شکل‌های ۷-۱۰).



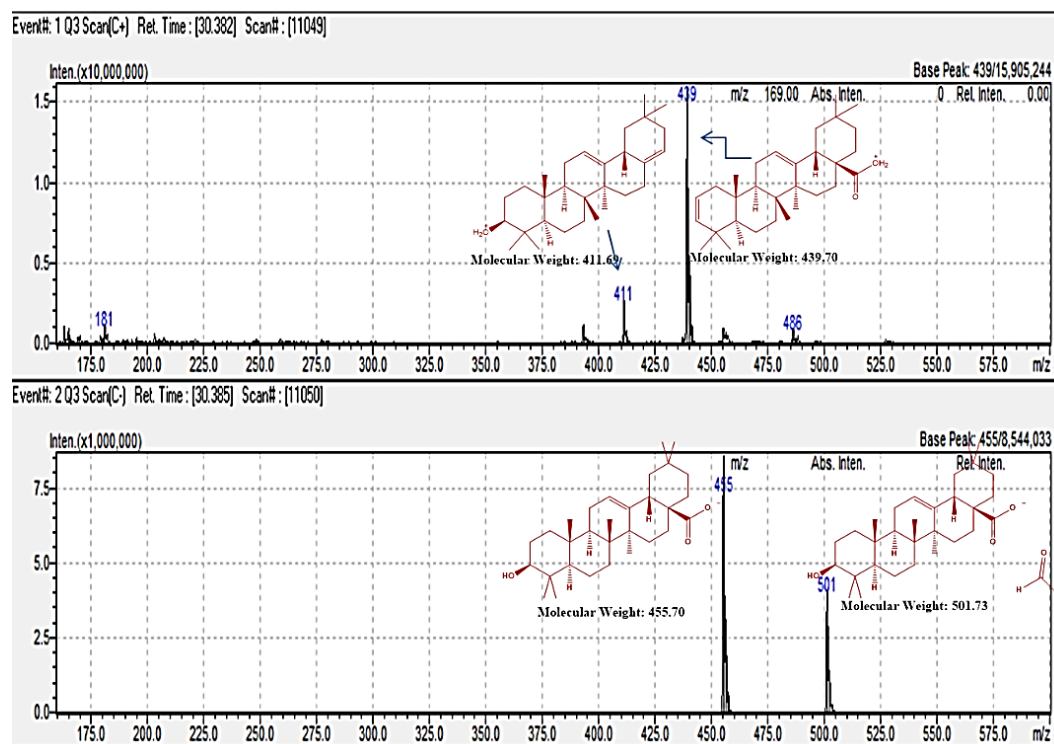
شکل ۷. طیف HPLC-UV-MASS-ELSD عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی و ترکیبات شناسایی شده که در طیف MASS شماره گذاری شده‌اند



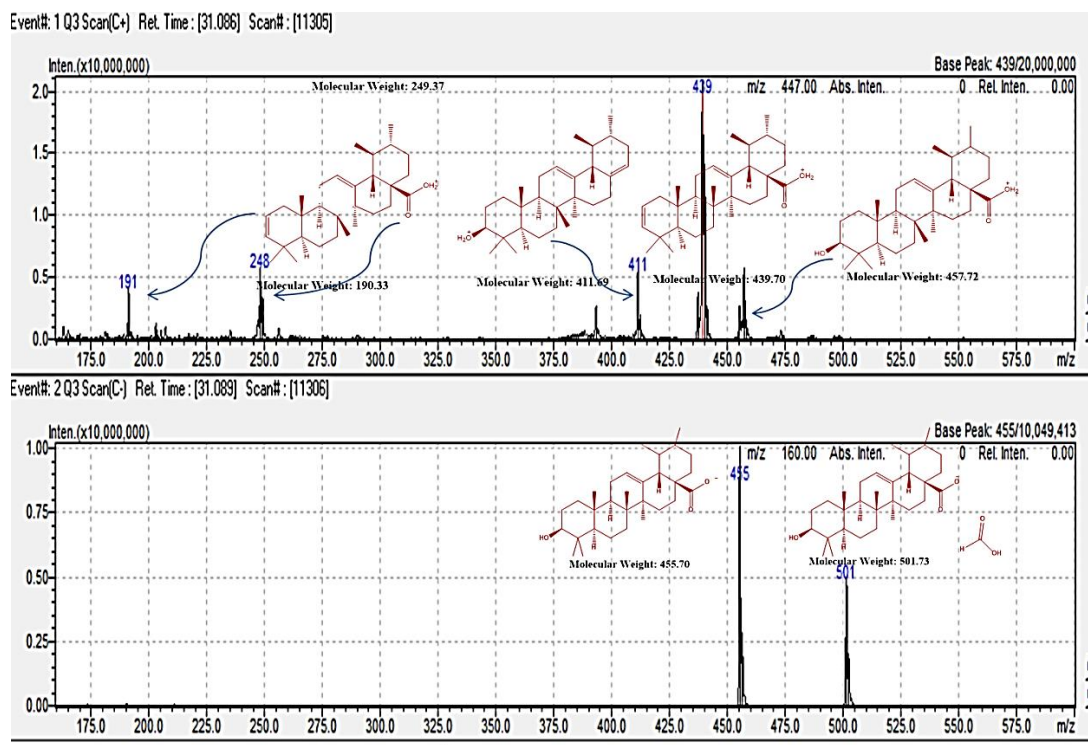
شکل ۸. الگوی جذب UV ترکیبات ۱ تا ۴

جدول ۱. زمان بازداری، UV_{max} و داده‌های طیف جرمی ترکیبات شناسایی شده

شماره ترکیبات	نام ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)	$m/z [M+H]^+$	$UV_{max} (nm)$
۱	لوتئولین-O-V-روتینوزاید	۸/۱۶	۵۹۵	۲۴۲، ۳۵۰
۲	لوتئولین-O-V-گلیکوپیروناید	۸/۳۶	۴۴۹	۲۳۸، ۳۵۰
۳	آپیژنین-O-V-گلیکوزاید	۹/۶۷	۵۷۹	۲۴۳، ۳۵۰
۴	رزمارینیک اسید	۱۰/۱۰	۳۶۱	۲۴۸، ۳۳۴
۵	اولئانولیک اسید	۳۰/۵۱	۴۵۷	۲۱۰
۶	اورسولیک اسید	۳۱/۰۰	۴۵۷	۲۱۰



شکل ۹. طیف جرمی اولئانولیک اسید و الگوی شکست آن در حالت یونیزاسیون مثبت (بالا) و منفی (پایین)



شکل ۱۰. طیف جرمی اورسولیک اسید و نحوه شکست آن در حالت یونیزاسیون مثبت (بالا) و منفی (پایین)

۴. بحث

تاکنون خواص بیولوژیکی زیادی از این گیاه گزارش شده است از جمله تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر سندروم روده‌ی تحریک‌پذیر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس این گیاه با توجه به این که دارای مقادیر زیادی از تیمول و کارواکرول است. علایم این بیماری را بدون هیچ گونه عارضه جانبی تسکین می‌دهد [۲]. مطالعات فارماکولوژیک خاصیت ضد درد، ضد التهاب و ضد اسپاسم اسانس و ترکیبات عمده اسانس این گیاه را تأیید کرده است. در تحقیقی بر روی اسانس گیاه آویشن شیرازی مکانیسم اثر ضد میکروبی این اسانس بر روی باکتری *Lactobacillus curvatus* بررسی شد [۶]. بررسی اثر اسانس توسط میکروسکوپ TEM صورت گرفت. تغییرات مورفولوژیکی زیادی را بر روی دیواره‌ی سلولی باکتری نشان داد که حاکی از تأثیرات آنتی‌باکتریال اسانس بر روی باکتری بود.

تأثیر ضد التهاب، آنتی‌اکسیدانت و تقویت سیستم ایمنی این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات ضد التهابی گیاه مانند: کاهش کل گلبول‌های سفید خون تعداد نوتروفیل‌ها و تعداد ائوزینوفیل‌ها اثبات شد. اثرات محافظتی این گیاه در سطح سرمی فسفولیپاز A₂ و پرتئین کل نشان داده شد علاوه بر این ترکیبات گیاهی مانند فلاونوئیدها و کارواکرول اثرات ضد التهابی از خود نشان دادند. این گیاه همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو با از بین بردن رادیکال‌های آزاد شده و می‌تواند در درمان آسیب‌های اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد [۷]. در تحقیقی دیگر تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی به عنوان محافظ کبد برای درمان آسیب حاد کبدی بر روی موش‌های مسموم شده با تتراکلرید کربن مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی *Zataria multiflora* اثر محافظتی بر روی سمیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن دارد [۱۱]. همچنین

تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه *Leshmania tropia* و اثرات سمیت سلولی و فعالیت ضد مالاریا در یک مدل زیست سنجش برون‌تنی ارزیابی شده است. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ترکیبات شیمیایی گیاه آویشن شیرازی که منبع طبیعی مناسب از لیشمانیا علیه *Cutaneous leishmaniasis* است [۱۲]. همچنین اثرات ضد جهش‌زایی این گیاه به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانت بسیار بالا و غنی بودن این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی به اثبات رسید. نتایج این تحقیق ثابت کرد که همه فراکسیون‌ها خصوصاً فرکشن متانولی بالاترین خاصیت ضد جهش‌زایی را از خود نشان داد [۱۳]. بررسی فیتوشیمیایی عصاره هگزانی گیاه آویشن شیرازی منجر به جداسازی زاتاریول که یک مشتق جدید ایزوپروپیل بنزن بود شد. همچنین ترکیبات شناخته شده‌ی پارا-سایمن، تیمول، تیمول متیل اتر، بتا سیتسترو، استیگماسترو، اولئانولیک اسید، بتولنیک اسید، و هگزادکانولک اسید نیز از این عصاره جداسازی و شناسایی شد [۱۴].

در گزارشی دیگر دو مشتق جدید پاراسایمن با نام‌های زاتاروزید A و زاتاروزید B و یک مشتق جدید تری استوکسی به همراه پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید از عصاره‌ی هگزانی گیاه آویشن شیرازی جداسازی و شناسایی شدند. بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌ی هگزانی آویشن شیرازی منجر به جداسازی و شناسایی سه ترکیب آروماتیک جدید، که دو تا از آنها مشتقات پاراسایمن بودند شد. علاوه بر این سه ترکیب جدید سه ترکیب دی‌هیدروکسی آروماندران، لوتولین و آلفاتوکوفرول کوئینون نیز از این گیاه خالص سازی و شناسایی شده است [۱۵]. در پژوهشی دیگر بر روی عصاره‌ی متانولی گیاه آویشن شیرازی انجام شد، ترکیب رزمارینیک اسید از این عصاره جداسازی و خالص سازی شد [۱۶]. بررسی آنالیز شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی منجر به شناسایی تعداد ۲۵ ترکیب شد که ترکیبات عمده آن کارواکرول، تیمول و

است. صمد نژاد ابراهیمی استاد راهنما و هدایت کار تجربی و تکمیل نوشتن مقاله را برعهده داشته است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره طرح ۹۶۰۱۶۶۶۳ و معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی به دلیل حمایت های مالی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

پاراسایمن بود همچنین اثرات آنتی باکتریال این اسانس نیز مورد بررسی قرار گرفت که خاصیت ضد *E. coli* و *K. pneumoniae* را از خود نشان داد [۱۷]. با توجه به گزارش های متعدد ذکر شده از این گیاه مبنی بر داشتن خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهاب، فلاونوئید های خالص شده در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهاب ذکر شده برای این گیاه را مورد تأیید قرار می دهد.

مشارکت نویسندگان

این مقاله بخشی از نتایج رساله دکتری عماد نظریان پور می باشد که انجام بخش تجربی و نوشتن اولیه مقاله را انجام داده

منابع

1. Fazeli M R. Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan-e Shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 2007; 18(6): 646-649.
2. Mahboubi M. Systematic review: The potency of *Zataria multiflora* Boiss in treatment of vaginal infections. *Infectio*. 2018; 22(2): 76-83.
3. Ramezani M, Hosseinzadeh H and Samizadeh S. Antinociceptive effects of *Zataria multiflora* Boiss fractions in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2004; 91(1): 167-170.
4. Ariaee N, Ghorbani J, Panahi M, Mohamadi M, Asili J, Ranjbar A, Farid Hoseini R and Jabbari F. Oral administration of *Zataria multiflora* extract decreases IL-17 expression in perennial allergic rhinitis. *Reports of Biochemistry & Molecular Biol*. 2018; 6(2): 203-207.
5. Khatibi S A, Misaghi A, Moosavy M H, Akhondzadeh Basti A, Mohamadian S and Khanjari A. Effect of nanoliposomes containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on gene expression of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol*. 2018; 124(2): 389-397.
6. Ziaee E, Razmjooei M, Shad E and Eskandari M H. Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against *Lactobacillus curvatus*. *LWT*. 2018; 87: 406-412.
7. Khazdair M R, Ghorani V, Alavinezhad A and Boskabady M H. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fund. Clin. Pharmacol*. 2018; 32(1): 26-50.
8. Teslov L S and Koretskaya L N. Flavonoids of *Campanula persicifolia*. I. *Chem. Nat. Compd*. 1983; 19(6): 749-750.
9. Svendsen A B. [Isolation of luteolin-7-glycoside from the flowers of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm]. *Pharm Acta Helv*. 1959; 34(1): 29-32.

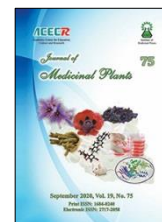
10. Borisov M I. Flavonoids of *Galium ruthenicum*. *Chem. Nat. Compd.* 1974; 10(5): 677-677.
11. Shokrzadeh M, Mirzajani F, Javadi I and Modanloo M. Hepatoprotective effect of hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss to acute liver damage in mice exposed to carbon tetrachloride-induced toxicity. *Adv. Biores.* 2017; 8(5): 386-395.
12. Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Sharififar F, Fallahi S, Monzote L and Ezatkah F. Chemical composition along with anti-leishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora*. *Pharm Biol.* 2016; 54(5): 752-758.
13. Sharififar F, Dehghan-Noudeh G, Moshafi M, Ohadi M, Zaman-Basir M, Yazdanpanah E and Yusefian S. Antimutagenic activity of major fractions of *Zataria multiflora* Boiss by Ames method. *Asian J. Pharm.* 2015; 9: 195.
14. Ali M S, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M and Ahmad V U. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochemistry* 1999; 52(4): 685-688.
15. Ali M S, Saleem M, Ali Z and Ahmad V U. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 2000; 55(8): 933-936.
16. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A and Minaeian M. Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and in vitro cultures. *Fitoterapia* 2004; 75(3-4): 315-321.
17. Eftekhar F, Zamani S, Yusefzadi M, Hadian J and Nejad Ebrahimi S. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against extended spectrum β lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella pneumonia*. *Jundishapur J Microbiol.* 4(Suppl): 43-49.

How to cite this article: Nazaryanpour E, Nejad Ebrahimi S. Phytochemical investigation of methanolic extract of *Zataria multiflora* Boiss. **Journal of Medicinal Plants** 2020; 19(75): 239-253.
doi: 10.29252/jmp.19.75.239



Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Phytochemical investigation of methanolic extract of *Zataria multiflora* Boiss.

Emad Nazaryanpour, Samad Nejad Ebrahimi*

Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Avishane Shirazi
Phytochemical investigation
Flavonoid
Rosmarinic acid

ABSTRACT

Background: *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae) has been found in Iran, Afghanistan, and Pakistan. *Z. multiflora* called 'Avishane Shirazi' in Persian is used as a seasoned in many foods in Iran. The literature survey demonstrated that *Z. multiflora* has immunostimulant, pain-relieving, antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antiviral, antiparasitic, antifungal effects and also widely used in traditional medicine for analgesia, diarrhea, infectious diseases, and gastrointestinal problems. **Objective:** The subject of this study is performing phytochemical constituents of methanolic extract of *Z. multiflora*. **Methods:** The application of various chromatographic techniques such as normal and reverse C18 chromatography led to isolation, purification and identification of several flavonoids. **Results:** In this investigation, the fractionation of methanol extract of the aerial parts of *Z. multiflora* led to the isolation and purification of three known flavonoid glycosides namely Luteolin 7-O-glucopyranoside, Apigenin 7-O-rutinoside and Luteolin 7-O-rutinoside whose structures were determined by 1D and 2D-NMR spectroscopic studies, in particular, homo-COSY and hetero (HSQC and HMBC). **Conclusion:** The results show a methanolic extract of *Z. multiflora* is a rich source of flavonoids and triterpenoids.

Abbreviations: ELSD, Evaporative light scattering detector; HSQC, Heteronuclear single quantum coherence; HMBC, Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

* Corresponding author: s_ebrahimi@sbu.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.239](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.239)

Received 5 August 2019; Received in revised form 19 August 2020; Accepted 22 August 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)