

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

زهرا کاظمی زاده^{۱*}، زهره حبیبی^۲، ایوب مرادی^۳

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

صندوق پستی: ۱۱۷۱ - ۱۹۶۱۵، تلفن: ۳۴ - ۲۲۴۳۱۹۳۳ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۴۳۱۹۳۸ (۰۲۱)

پست الکترونیک: kazemizadeh@acecr.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۹

چکیده

مقدمه: جنس مریم نخودی^۱ شامل بیش از ۳۴۰ گونه در سراسر جهان می باشد 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 می شوند.

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 رستم آباد گیلان جمع آوری شد، عصاره کلروفرمی - استنی اندامهای هوایی آن استخراج شد و سپس خالص سازی با ستون کروماتوگرافی صورت گرفت. نتایج: کریستال های سفید رنگ با نام β -استیگماستروئول جدا شد و با استفاده از روش های طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته و طیف سنجی جرمی و طیف سنجی مادون قرمز شناسایی شدند.

نتیجه گیری: β -استیگماستروئول برای اولین بار در عصاره کلروفرمی - استنی این گونه شناسایی شد.

کل واژگان: مریم نخودی خزری، *Teucrium hyrcanicum* L.، β -استیگماستروئول

¹ *Teucrium*



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 نعنائیان با حدود ۳۴۰ 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 اختلالات عصبی، سردردهای مقاوم و صرع، ضد درد، ضد التهاب و نیز برای درمان روماتیسم، استفاده می‌شوند. امروزه نیز خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی برخی از گونه‌های این جنس به اثبات رسیده است [۷ - ۲]. تاکنون از گونه‌های مختلف مریم نخودی، انواع نئوکلرودان دی‌ترپنویید، تری‌ترپنویید و نیز فلاونویید 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 ۷۰ - ۳۰ سانتی‌متر پوشیده از کرک‌های برهم خوابیده، برگ سبز علفی، غشائی، دارای دم‌برگ کوتاه، تخم‌مرغی، در قاعده نیمه قلبی، پهنک آن به ابعاد $1/5 - 2/5 \times 8$ 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. میوه گیاه فندقه به طول یک میلی‌متر، تقریباً کروی، زاویه‌دار و غده پوش است. انتشار جغرافیایی آن در ایران، گرگان، آمل، محمودآباد، قائمشهر، بابل، تنکابن، کجور، کلاردشت، رستم‌آباد و آستارا می‌باشد. این گیاه در مناطق جنگلی هم سطح دریا تا ارتفاع ۱۹۰۰ متری پراکنش دارد [۱۴].

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 ۱۳۸۶ از منطقه رستم‌آباد واقع در استان گیلان، جمع‌آوری شد و نمونه‌های هرباریومی مربوط به آن نیز با شماره‌های ۳۴ و ۶۴۵ 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 TLC^۱ 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 ۴۰ 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

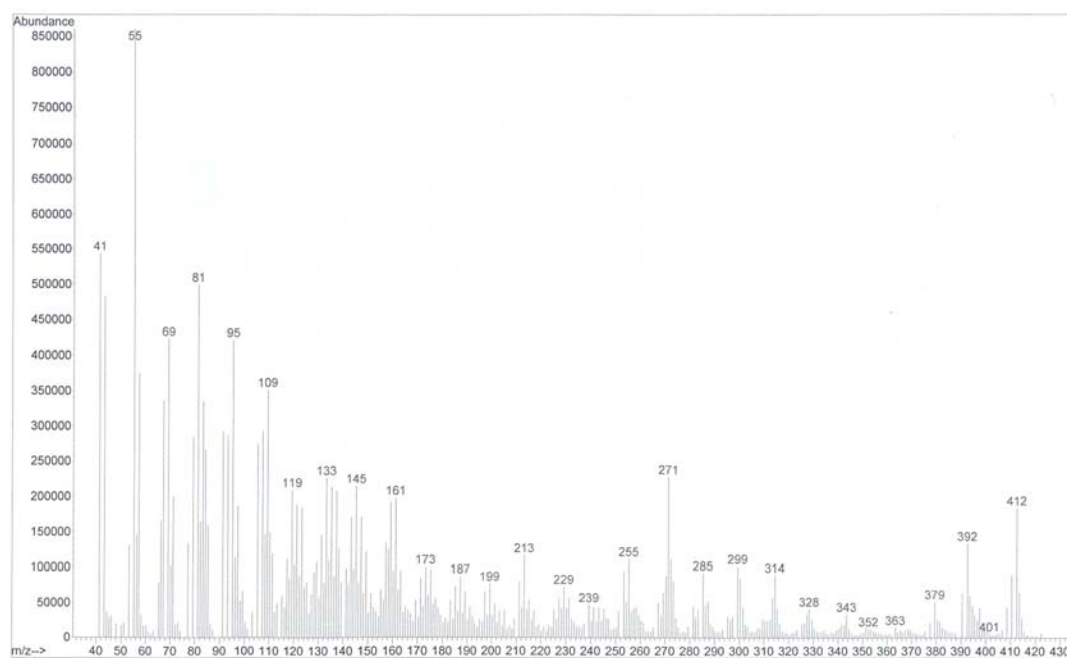


طیف‌سنجی جرمی مبتنی بر وجود فیتوسترول با نام β -استیگماسترول با فرمول بسته $C_{29}H_{48}O$ معادل با جرم مولکولی ۴۱۲ و نام استیگماستا-۵، ۲۲-دی ان-۳-آل بود (شکل شماره ۱). طیف‌های 1H NMR، ^{13}C NMR، DEPT135° و DEPT90°، H-C-COSY، H-H-COSY ترکیب ارزیابی شد. با مقایسه آنها با طیف‌های حاصل از ترکیب‌های هم‌خانواده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

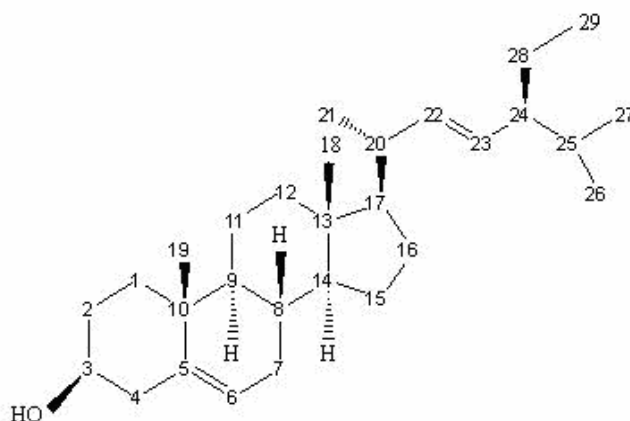
اتیل استات ۵ درصد، کریستال‌های سفید رنگ سوزنی شکل جداسازی و شناسایی شد. نقطه ذوب این ترکیب ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. جهت شناسایی نمونه‌های خالص شده، از طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته، طیف‌سنجی جرمی و طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد. این در حالی است که از سایر اجزاء ترکیب خالص و قابل شناسایی به دست نیامد.

نتایج

پس از گرفتن طیف MS، پیشنهاد کتابخانه دستگاه



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



شکل شماره ۲ - β -استیگماسترول



شکافته شدن با پروتون‌های H-۸ و H-۱۱ می‌باشد (شکل شماره ۳).

تفسیر طیف ^{13}C NMR

در این طیف، سیگنال موجود در $\delta = 141/18$ ppm مربوط است به کربن اولفینی فاقد هیدروژن C-۵ و سه سیگنال $\delta = 137/26$ ppm، $\delta = 130/46$ ppm و $\delta = 122/15$ ppm به ترتیب مربوط به کربن‌های اولفینی شماره ۶، ۲۲ و ۲۳ در β -استیگماسترول می‌باشند. سیگنال موجود در $\delta = 72/24$ ppm 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 ۵۸ - ۱۲ ppm واقع شده است، به کربن‌های متیل، متیلن و متین تعلق دارند (شکل شماره ۴). در طیف FT-IR، پیک در $2935/12$ cm $^{-1}$ 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 ^1H 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 مورد استفاده در طیف‌های NMR کلروفرم دوتره می‌باشد و جابه‌جایی‌های شیمیایی برحسب ppm گزارش شده‌اند.

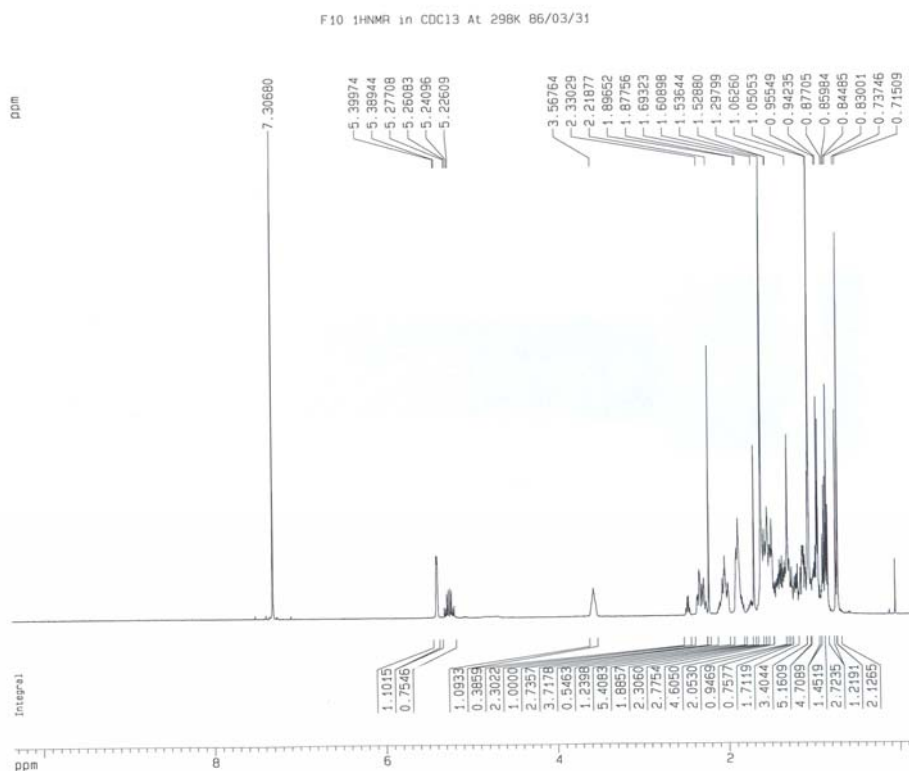
5973 Network Mass Selective Detector
طیف‌های جرمی نیز با استفاده از طیف نگار جرمی دانشگاه تهران ثبت شده است.

تفسیر طیف ^1H NMR

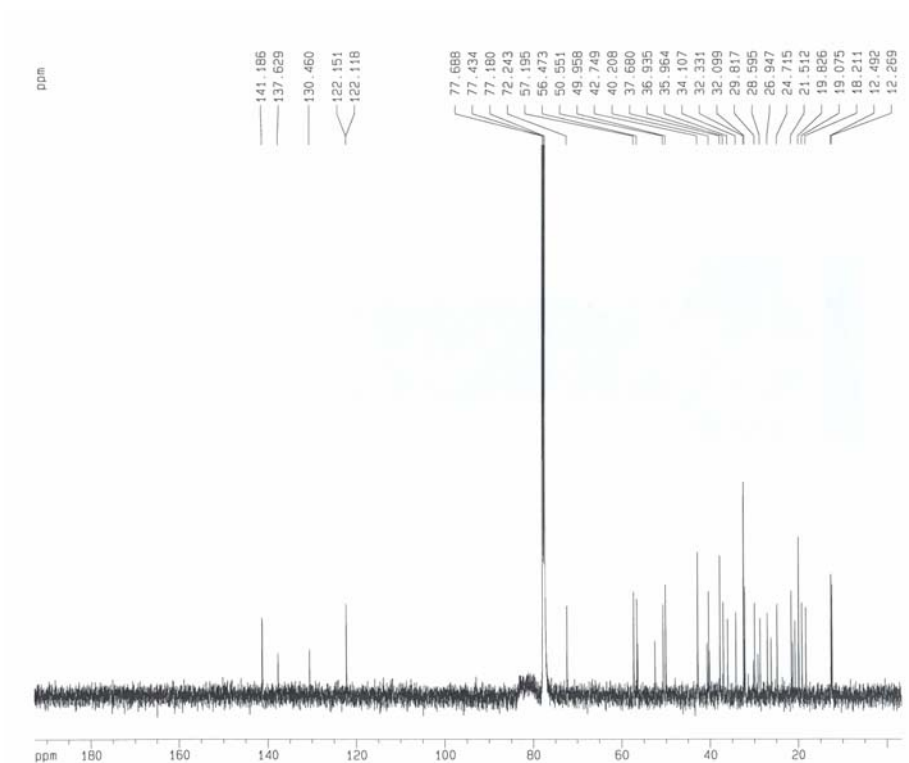
در $\delta = 5/39$ ppm یک سیگنال دوتایی با $J = 5/15$ Hz مربوط به ۶ - H گروه CH= که توسط H-۷ شکافته شده است، مشاهده می‌شود. پیام دوتایی موجود در $\delta = 5/25$ ppm نیز متعلق است به H-۲۲ و H-۲۳ در ساختار β -استیگماسترول که با هم و با یک پروتون مجاورشان جفت شده و به صورت dd با J معادل ۱۵ Hz و ۷/۵ Hz مشاهده 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-۲۴ می‌باشد. پروتون H-۳ به دلیل اتصال به اکسیژن در ناحیه $\delta = 3/56$ ppm به صورت (۱۱، ۱۱/۶، ۴/۵) dddd ظاهر شده است. میزان $J = 11/2$ نشان‌دهنده آن است که Hax داریم و با دو Hax مجاور خود با $J = 11/2$ شکافته شده و با دو Heq مجاور دیگر نیز با J حدوداً ۴/۶ Hz و ۶/۶ Hz شکافته شده است، پس نتیجه می‌گیریم OH به صورت β و در ناحیه استوایی قرار گرفته است. در $\delta = 2/03$ ppm نیز یک سیگنال دوتایی پهن مشاهده می‌شود که مربوط به H-۷ متیلن بوده و توسط پروتون اولفینی H-۶ به دوتایی و سپس توسط H-۸ به یک دوتایی دیگر شکافته می‌شود. سیگنال مربوط به پروتون OH هم در $\delta = 2/21$ ppm به صورت یکتایی ظاهر شده است.

پروتون‌های Me-۱۸ و Me-۱۹ بدون شکافتگی و به صورت یکتایی به ترتیب در ناحیه $\delta = 0/715$ ppm و $\delta = 1/05$ ppm مشاهده می‌شود. پروتون‌های Me-۲۶ و Me-۲۷ توسط پروتون‌های H-۲۵ به صورت دوتایی شکافته شده است و در $\delta = 0/88$ ppm و $\delta = 0/95$ ppm مشاهده می‌شوند. پروتون H-۲۱ هم در $\delta = 1/06$ ppm به صورت دوتایی ظاهر شده و یک کوپلاژ با $J = 7/5$ Hz با H-۲۰ نشان می‌دهد. سیگنال چندتایی در $\delta = 1/41$ ppm مربوط به H-۲۰ است که توسط پروتون‌های H-۲۱، H-۲۲ و H-۱۷ شکافته شده است. سیگنال مربوط به H-۹ در $\delta = 1/87$ ppm به صورت یک دوتایی دوتایی پهن ظاهر شده است که مربوط به





شکل شماره ۳- طیف ^1H NMR ترکیب β -استیگماسترول



شکل شماره ۴- طیف ^{13}C NMR ترکیب β -استیگماسترول



بحث

cirsimaritin استخراج و شناسایی شدند [۱۰]. در سال ۲۰۰۵ از *T. fruticans* نیز سه دی ترپن نوکلوردان 3 β -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 از گونه *Teucrium pilosum* جداسازی و شناسایی شده‌اند [۱۸]. در سال ۱۹۹۶ نیز استرول‌های دو گونه *Teucrium betonicum* و *Teucrium abutiloides* استخراج شده‌اند [۱۹]. در خصوص گونه *Teucrium hyrcanicum* پیش‌تر دی‌ترپنوییدهای نوکلوردان‌های H1-H4 و teucrin 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.

β - استیگماسترول یک فیتوسترول اشباع است که به صورت تجاری از دانه‌های سویا به دست می‌آید و به عنوان ماده اولیه در سنتز استروئیدهای 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 دی‌ترپنوییدهای نوکلوردان‌های 3 β -hydroxyteubutiline A، 12-epi-montanin G و 20-epi-3,20-di-o-teuscordinon و deacetylteupyreinidin جداسازی و شناسایی شده‌اند [۸]. در طی پژوهشی دیگر روی گونه *T. maghrbinium*، دی‌ترپنوییدهای نوکلوردان teughrebin و teukotschyn آن شناسایی شدند [۹]. در سال ۲۰۰۱ از گونه *T. fruticans* فلاونوئیدهای 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone و cirsilineol

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 variation 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, Fraternali 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



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

