

استخراج و شناسایی چهار ترکیب استرولی از گیاه عود

احمد رضا گوهری^{۱*}، سودابه سعیدنیا^۱، عباس حاجی آخوندی^۱، گیشو هوندا^۳

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۲-استاد، گروه فارماکونوزی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 ۳- استاد، گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه کیوتو، ژاپن
 *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، صندوق پستی: ۶۴۵۱ - ۱۴۱۵۵
 تلفن: ۶۶۹۵۹۰۹۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۶۶۱۱۷۸ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: goharii_a@sina.tums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۷/۷/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۲۷

چکیده

مقدمه: گیاه عود یا عودالهندی با نام علمی *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. IV. که در زبان انگلیسی به آن *Incense Tree* گفته می‌شود، گیاهی است که به صورت درختی می‌روید و بومی جنوب شرق آسیا است. این گیاه به تیره *Thymelaeaceae* تعلق دارد. این گونه گیاهی نخستین بار در هنگ کنگ روئیده و چوب آن به شرقی‌ترین مناطق در چین و یا حتی به سرزمین‌های دوری همچون عربستان صادر می‌شده است.

هدف: شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در چوب سالم و یا آسیب‌دیده گیاه منجر به یافتن اطلاعات ارزشمندی در زمینه پروسه‌های بیوسنتزی در تولید ترکیبات گیاه می‌شود.

روش بررسی: در این مطالعه از عصاره متانولی استفاده شده، که به روش پرکولاسیون از چوب سالم و زخمی نشده گیاه تهیه شده است. به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات استرولی از عصاره متانولی از روش‌های ستون کروماتوگرافی به روی فاز ثابت سیلیکاژل نرمال و نیز کروماتوگرافی نفوذی در ژل (GPC) استفاده شده است. برای تعیین ساختمان مولکولی ترکیبات جدا شده از تکنیک‌های ¹³C-NMR، DEPT، ¹H-H COSY، ¹HMQC، ¹H-NMR و H استفاده شد.

نتایج: تعداد چهار ترکیب استرولی جداسازی و خالص شد که ساختمان آن‌ها براساس داده‌های طیفی حاصل از تکنیک‌های پیشرفته رزونانس مغناطیسی به ترتیب استیگماست - ۴ - ان - ۳ و ۶- دی اون، استیگماست - ۴ - ان - ۳ - اون، بتا- سیتواسترول و بتا- دوکوسترول شناسایی شد. این ترکیبات برای نخستین بار از این گیاه گزارش می‌شود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی گیاه عود یا *Aquilaria sinensis* حاوی ترکیبات استرولی است که اصلی‌ترین آنها از گروه استیگماستان‌ها هستند و عبارتند از استیگماست-۴-ان-۳ و ۶- دی اون، استیگماست-۴-ان-۳-اون، بتا- سیتواسترول و بتا- دوکوسترول (شکل گلیکوزیده بتا- سیتواسترول). این ترکیبات برای نخستین بار از این گیاه گزارش می‌شود.

گل‌واژگان: عود، استرول، *Thymelaeaceae Aquilaria sinensis*

مقدمه

یافت نشده است. با توجه به اهمیت استروئیدها به عنوان ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی، آندروژنی، آنابولیزان، عوامل بلوک کننده عصبی - عضلانی و ترکیبات کاردیو تونیک، شناسایی ترکیبات استروئیدی گیاهی می‌تواند پژوهشگران را در یافتن ترکیبات موثرتر یاری نماید [۸]. بنابراین ما در این مطالعه برای اولین بار به جداسازی و تعیین ساختمان مولکولی تعدادی از ترکیبات استروئیدی از عصاره متانولی گیاه *Aquilaria sinensis* پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد استفاده: در این مطالعه از چوب زخمی نشده و سالم گیاه *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. IV. استفاده شد. این نمونه چوب از گیاهی که در باغ گیاه‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه کیوتو کاشته شده تهیه شده است.

عصاره‌گیری و جداسازی: میزان یک کیلوگرم از چوب تنه درخت *Aquilaria sinensis* پس از بریدن به قطعات کوچک‌تر، خشک شده و با روش پرکولاسیون با حلال متانول در دمای اتاق عصاره‌گیری شد. میزان ۲۵ گرم عصاره متانولی حاصل شد.

عصاره فوق به روی ستون سیلیکاژل فاز نرمال با مش ۲۰۰ برده شده و به ترتیب با سیستم‌های حلال کلروفرم: اتیل استات (۱:۱)، اتیل استات: متانول (۹:۱) و نهایتاً متانول جداسازی شد. در نتیجه تعداد شش فراکشن (A-F) به دست آمد. مونیتورینگ فراکشن‌ها با استفاده از صفحات TLC سیلیکاژل و معرف انیس آلدید - اسید سولفوریک انجام شد. فراکشن B (۵۳۰ mg) مجدداً بروی ستون سیلیکاژل برده شده و این بار به ترتیب با سیستم‌های حلال هگزان: استون (۹:۱) و هگزان: استون (۸:۲) جداسازی شد تا فراکشن‌های B1-B5 به دست آید. جداسازی فراکشن B1 (۸۲ mg) با استفاده از روش کروماتوگرافی نفوذی در ژل^۱ با حلال کلروفرم و پس از پنج بار تکرار، سه فراکشن B11-B13 حاصل شد. فراکشن B12 انتخاب و با استفاده از روش MPLC^۲ روی ستون سیلیکاژل فاز نرمال با سیستم حلال

گیاه عود یا عود الهندی با نام علمی *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. IV. صورت درختی روئیده و بومی جنوب شرق آسیا است. این گیاه به تیره Thymelaeaceae تعلق دارد. در زبان انگلیسی به آن Incense Tree گفته می‌شود که ترجمه مستقیم از نام چینی آن به معنای درختی است که در اثر سوختن تولید بوی خوش می‌کند [۱]. عود درختی است همیشه سبز به ارتفاع ۲۰-۶ متر که پوست آن به رنگ خاکستری تیره و چوب آن به رنگ سفید یا زرد دیده می‌شود. این گونه گیاهی نخستین بار در هنگ‌کنگ روئیده و چوب آن به شرقی‌ترین مناطق در چین و یا حتی به سرزمین‌های دوری هم‌چون عربستان صادر می‌شده است [۲]. با این‌که این گیاه در ایران نمی‌روید ولیکن از گذشته‌های دور در بازار گیاهان دارویی و سنتی کشورمان وجود داشته و چوب آن به عنوان خوشبوکننده هوا به کار می‌رفته است. رزینی که از چوب درخت تولید و انباشته می‌شود ترکیبی بسیار گرانبها است که به صورت طبیعی در اثر فعالیت پاتولوژیک قارچ‌ها روی چوب درخت و یا به طور مصنوعی با وارد کردن صدمه و خراش‌هایی به عمق ۵ سانتی‌متر در پوست درخت به وجود می‌آید. این رزین agarwood نامیده می‌شود و در شرق آسیا علاوه بر اثر خوشبوکننده هوا، به دلیل اثرات آنالژزیک و سداتیو نیز استفاده می‌شود [۳].

تاکنون ترکیبات جدیدی از گروه دی اپوکسی تتراهیدروکسی کرومون و نیز مشتقات فینیل اتیل کرومون از آگار وود جداسازی و شناسایی شده است [۳، ۴]. برخی از ترکیبات آنتی‌کanser با ساختمان‌های فوربول استات و فروریل گلیسراید نیز از گونه تایلندی عود^۱ شناسایی شده‌اند [۵]. هم‌چنین سزکویی‌ترین‌های معطر نظیر مشتقات مختلف آلدیدیدی و متیل استری سلینا دی ان و نیز مشتقات سزکویی‌ترینی گروه گویان^۲ از گیاه *Aquilaria agallocha* جداسازی شده است [۶، ۷]. مطالعات کتابخانه‌ای نشان می‌دهد که تاکنون گزارشی از وجود ترکیبات استروئیدی در گیاه عود

¹ GPC (Gel Permeation Chromatography)

² Moderate Pressure Liquid Chromatography

¹ *Aquilaria Malaccensis*

² Guaiane



EI-Mass استفاده شد. دستگاه NMR مورد استفاده Bruker-500 با قدرت ۵۰۰ مگاهرتز برای اندازه‌گیری پروتون و ۱۲۵ مگاهرتز برای کربن بود. تترا متیل سیلان به عنوان استاندارد داخلی به کار رفت.

نتایج

نتایج مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن و HMBC, HMQC, H-H COSY برای ترکیبات جداسازی شده در جداول شماره ۴ - ۱ در زیر خلاصه شده است.

هگزان: استون (۹:۱)، ترکیب ۱ به مقدار سه میلی‌گرم خالص شد. از فراکشن B13 نیز به روش فوق و با سیستم حلال مشابه ترکیب ۲ (۳ mg) خالص شد. از فراکشن B2 با سیستم حلال کلروفرم: اتیل استات (۹:۱) بروی ستون سیلیکاژل، چهار فراکشن B21-B24 به دست آمد که فراکشن B22 به مقدار ۶۷ میلی‌گرم، ترکیب ۳ بود. از فراکشن C (۲۱۰ mg) با استفاده از روش GPC با حلال کلروفرم، فراکشن‌های C1-C5 حاصل شد. ترکیب ۴ به مقدار ۸ میلی‌گرم از فراکشن C2 به روی ستون سیلیکاژل با سیستم حلال کلروفرم: اتیل استات (۱:۹) خالص شد.

به منظور شناسایی اجسام خالص از تکنیک‌های H-NMR، ¹³C-NMR، DEPT، H-H COSY، HMQC، HMBC و

جدول شماره ۱- داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن و HMBC، HMQC

برای ترکیب ۱ در کلروفرم دوتره

C	HMQC		HMBC
	δ_C	δ_H	
1	35.5	2.17 (m, 1H), 1.91 (m, 1H)	3H-19, H-2
2	33.9	2.52 (m, 2H)	H-4
3	199.7		
4	125.5	6.18 (s, 1H)	
5	161.2		3H-19
6	202.5		H-4, H-7b
7	46.8	2.69 (dd, J=15, 4.8 Hz, 1H) 2.04 (m, 1H)	
8	34.2	1.89 (m, 1H)	H-7b
9	50.9	1.37 (m, 1H)	3H-19, H-7b
10	39.7		3H-19, H-4, H-9
11	20.8	1.67 (m, 1H), 1.56 (m, 1H)	
12	39.0	2.13 (m, 2H)	3H-18
13	42.5		3H-18
14	55.8		3H-18
15	23.9	1.19 (m, 1H), 1.63 (m, 1H)	
16	28.0		
17	56.5		3H-18, H-21
18	11.8	0.72 (s, 3H)	
19	17.4	1.17 (s, 3H)	H-1a
20	36.0	1.37 (m, 1H)	H-21
21	18.6	0.93 (d, J=5.5 Hz, 3H)	



ادامه جدول شماره ۱- داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن و ^{13}C HMBC, ^{13}C HMQC برای ترکیب ۱ در کلروفورم دوتره

C	HMQC		HMBC
	δ_{C}	δ_{H}	
22	33.7		
23	25.9	1.18 (m, 2H)	
24	45.7	0.93 (m, 1H)	H-26, H-27
25	29.0	1.68 (m, 1H)	H-26, H-27, H-24
26	19.7	0.84 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	H-24, H-27
27	18.9	0.82 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	H-24, H-26
28	23.0	1.16 (m, 1H), 1.28 (m, 1H)	H-29
29	11.9	0.86 (t, $J=7.2$ Hz, 3H)	H-24

جدول شماره ۲- داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن ^{13}C DEPT, ^{13}C H-H COSY, ^{13}C HMQC برای ترکیب ۲ در کلروفورم دوتره

C	HMQC		H-H-COSY	DEPT
	δ_{C}	δ_{H}		
1	35.6	1.90 (m, 1H) 2.15 (m, 1H)	2H-2	CH ₂
2	33.8	2.50 (m, 2H)	H-1a	CH ₂
3	199.8			C
4	123.8	5.73 (brs, 1H)		CH
5	171.9			C
6	32.9			CH ₂
7	32.0			CH ₂
8	35.6	1.92 (m, 1H)	H-9	CH
9	53.8	1.39 (m, 1H)	H-8	CH
10	38.5			C
11	20.9	1.52 (m, 1H) 1.65 (m, 1H)	2H-12	CH ₂
12	39.6	2.11 (m, 2H)	H-11b	CH ₂
13	42.3			C
14	55.9			CH
15	24.1			CH ₂
16	28.1			CH ₂
17	55.8			CH
18	11.9	0.71 (s, 3H)		CH ₃
19	17.3	1.18 (s, 3H)		CH ₃
20	36.1	1.35 (m, 1H)	3H-21	CH
21	18.6	0.92 (d, $J=6.2$ Hz, 3H)	H-20	CH ₃



ادامه جدول شماره ۲ - داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن

برای ترکیب ۲ در کلروفورم دوتره

C	HMQC		H-H-COSY	DEPT
	δ_C	δ_H		
22	33.9			CH ₂
23	26.0			CH ₂
24	45.8			CH
25	29.0	1.66 (<i>m</i> , 1H)	3H-26, 3H-27	CH
26	19.8	0.84 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.5 Hz, 3H)	H-25	CH ₃
27	18.9	0.82 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.5 Hz, 3H)	H-25	CH ₃
28	23.0			CH ₂
29	11.8	0.85 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.2 Hz, 3H)		CH ₃

جدول شماره ۳ - داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون و کربن

HMQC			HMQC		
C	δ_C	δ_H	C	δ_C	δ_H
1	37.2		16	28.2	
2	31.5		17	56.0	
3	71.8	3.50 (<i>m</i> , 1H)	18	11.8	0.65 (<i>s</i> , 3H)
4	42.3	2.25 (<i>m</i> , 2H)	19	19.3	0.98 (<i>s</i> , 3H)
5	140.7		20	36.1	
6	121.7	5.32 (<i>t</i> , <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	21	18.7	0.90 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.4, 3H)
7	31.8		22	33.9	
8	31.8		23	26.0	
9	50.1		24	45.8	
10	36.4		25	29.1	
11	21.0		26	18.9	0.79 (<i>d</i> , <i>J</i> =7 Hz, 3H)
12	39.7		27	19.7	0.81 (<i>d</i> , <i>J</i> =7 Hz, 3H)
13	42.2		28	23.0	
14	56.7		29	11.9	0.81 (<i>t</i> , <i>J</i> =8.8, 3H)
15	24.2				



جدول شماره ۴- داده‌های مربوط به طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته پروتون، کربن

برای ترکیب ۴ در پیریدین دوتره

C	HMQC		HMBC	DEPT
	δ_C	δ_H		
1	37.4			CH ₂
2	30.2	2.12 (m, 1H), 1.85 (m, 1H)		CH ₂
3	78.5	3.95 (m, 1H)	H-1'	CH
4	39.2	2.48 (m, 1H), 2.73 (m, 1H)		CH ₂
5	140.9			C
6	121.9	5.34 (t, 1H)		CH
7	32.0	1.69 (m, 1H) 1.94(m, 1H)		CH ₂
8	31.9			CH
9	50.2		H-19	CH
10	36.8		H-6, 3H-19	C
11	21.1			CH ₂
12	39.8		3H-18	CH ₂
13	42.4		3H-18	C
14	56.7		3H-18	CH
15	24.4			CH ₂
16	28.4			CH ₂
17	56.1		3H-18, 3H-21	CH
18	11.8	0.64 (s, 3H)		CH ₃
19	19.3	0.92 (s, 3H)		CH ₃
20	36.3		3H-21	CH
21	18.9	0.97 (d, J=6.6 Hz, 3H)		CH ₃
22	34.1		3H-21	CH ₂
23	26.2			CH ₂
24	45.9		3H-26, 3H-27	CH
25	29.3		3H-26, 3H-27	CH
26	19.1	0.84 (d, J=6.8 Hz, 3H)	3H-27	CH ₃
27	19.8	0.86 (d, J=6.8 Hz, 3H)	3H-26	CH ₃
28	23.2		3H-29	CH ₂
29	12.0	0.89 (t, J=7.3 Hz, 3H)		CH ₃
1'	102.5	5.07 (d, J=7.6 Hz, 1H)	H-2'	CH
2'	75.3	4.07 (m, 1H)		CH
3'	78.6	4.30 (m, 1H)	H-2'	CH
4'	71.6	4.30 (m, 1H)		CH
5'	78.0	3.98 (m, 1H)		CH
6'	62.7	4.44 (dd, 1H), 4.58 (dd, 1H)		CH ₂

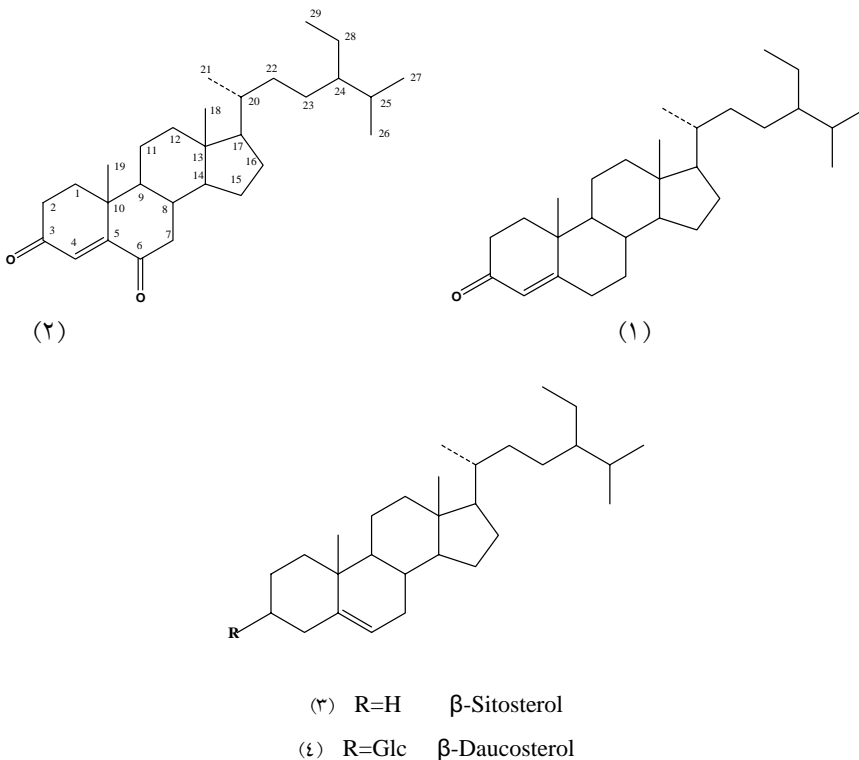


بحث

استیگماستان را تایید می‌کند. مطالعه طیف‌های HMBC و HMQC همان‌طور که در شکل شماره ۱ ارتباطات آن ملاحظه می‌شود ساختمان استیگماست-۴-ان-۳- و ۶-دی‌اون را برای ترکیب یک ثابت می‌نماید. مقایسه نتایج به دست آمده از طیف‌ها با منابع معتبر نیز تاییدکننده این ساختمان است [۹].

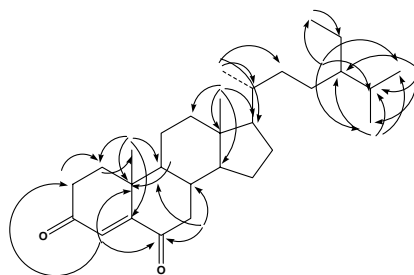
در مورد ترکیب ۲ طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون مربوطه مشابه ترکیب قبلی وجود ۶ گروه متیل و یک پیوند دوگانه را نشان می‌دهد. طیف کربن این ترکیب نیز شامل ۲۹ پیک بوده که گویای ساختمان استرولی آن است. در این طیف کربن‌های یک گروه کتون در دلتای ۱۹۹/۸ ppm و یک پیوند دوگانه در دلتای ۱۲۳/۸ ppm و ۱۷۱/۹ دیده می‌شوند. با توجه به نتایج فوق و روابط موجود در H-H COSY تاییدکننده زنجیر جانبی (شکل شماره ۲) است، ساختمان استیگماست-۴-ان-۳- اون برای این ترکیب پیشنهاد می‌شود. مقایسه نتایج به دست آمده از طیف‌ها با منابع معتبر نیز تاییدکننده این ساختمان است [۱۰].

نگاهی به نتایج حاصل از داده‌های طیف‌های رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون در مورد ترکیب شماره یک (جدول شماره ۱) نشان می‌دهد که ۶ گروه متیل در دلتای مابین ۰/۷۲ تا ۱/۱۷ ppm در این ترکیب موجود است. وجود دو پیک متیل تک شاخه و سه گروه متیل دو شاخه ساختمان استرولی را برای این ترکیب متصور می‌سازد. همچنین پیک موجود در ۶/۱۸ ppm با انتگرال یک پروتون نشانه حضور پیوند دوگانه با کربن‌های نوع سوم و چهارم است. بررسی طیف کربن وجود ۲۹ پیک را مشخص می‌سازد که تاییدکننده ساختمان استرولی ۲۹ کربنه است. حضور دوپیک در میدان بسیار پایین در دلتاهای ۱۹۹/۷ ppm و ۲۰۲/۵ نشان‌دهنده دو گروه کربونیل کتون در این مولکول است. علاوه بر آن کربن‌های ۱۲۵/۵ ppm و ۱۶۱/۲ بیانگر وجود پیوند دوگانه است. بررسی طیف‌های این ترکیب در DEPT-45، DEPT-90 و DEPT-135 نشان می‌دهد که شش گروه CH₃ در ساختمان آن وجود دارد که نهایتاً ساختار استرولی



شکل شماره ۱- ساختمان‌های استرولی جداسازی شده از گیاه عود





شکل شماره ۲- نمایش ارتباط پروتون‌ها با کربن‌های همسایه در HMBC ترکیب ۱ (C → H).

گلوکز نیز در دلتای بین ۶۲/۷ تا ۷۸/۶ ppm ظاهر می‌شوند. با مشاهده طیف HMBC این ترکیب محل اتصال قند به آگلیکون استرولی با توجه به ارتباط پروتون آنومریک قند با کربن موقعیت ۳ آگلیکون نشانه اتصال قند به این کربن است. مقایسه نتایج به دست آمده از طیف‌ها با منابع معتبر نیز تاییدکننده این ساختمان است [۱۲]. در مجموع هیچ یک از ترکیبات فوق تاکنون از چوب گیاه عود گزارش نشده است.

در مورد ترکیب ۳ با توجه به تشابه ساختمانی با دو ترکیب قبلی و مقایسه طیف‌های پروتون و کربن آن با منابع معتبر ساختمان بتا-سیتواسترول تایید می‌شود [۱۱]. ترکیب ۴ نیز شکل گلیکوزیده بتا-سیتواسترول بوده که پروتون‌های گلیکوزیدی آن در دلتای بین ۳/۹۸ تا ۵/۰۷ ppm ظاهر می‌شوند. پیک دو شاخه ppm ۵/۰۷ با ثابت اثر اسپین ۷/۶ هرتز مربوط به پروتون آنومریک گلوکز بوده که پیک کربن آن در دلتای ppm ۱۰۲/۵ قرار دارد. پنج کربن باقی‌مانده

منابع

- Iu, KC. The Cultivation of the Incense Tree (*Aquilaria sinensis*). *J. Hong Kong Branch Royal Asiatic Society*. 1983; 23: 247 - 9.
- Nakanishi T, Yamagata E, Yoneda K, Nagashima T, Kawasaki I, Yoshida T, Mori H and Miura I. Three fragrant sesquiterpenes of agarwood. *Phytochemistry*. 1984; 23: 2066 - 7.
- Yagura T, Ito M, Kiuchi F, Honda G and Shimada Y. Four new 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from withered wood of *Aquilaria sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2003; 51: 560 - 4.
- Yagura T, Shibayama N, Ito M, Honda G and Kiuchi F, Three novel diepoxy tetrahydrochromones from agarwood, artificially produced by intentional wounding. *Tetrahedron Lett.* 2005; 46: 4395 - 8.
- Gunacekera SP, Kinghorn AD, Cordell GA and Farnsworth NR. Plants anticancer agents XIX, constituents of *Aquilaria malaccensis*. *J. Nat. Prod.* 1981; 44: 569 - 72.
- Ishihara M, Tsuneya T and Uneyama K. Fragrant sesquiterpenes from agarwood. *Phytochemistry*. 1993; 33: 1147 - 55.
- Ishihara M, Tsuneya T and Uneyama K. Guaiane sesquiterpenes from agarwood. *Phytochemistry*. 1991; 30: 3343 - 7.
- Martin B, William LD. Molecular structure and biological activity of steroids. CRC Press, INC. Florida. 1992.
- Lim JC, Park JH, Budesinsky M, Kasal A, Han YH, Koo BS, Lee SI and Lee DU. Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: 561 - 4.
- Onocha PA, Okorie DA, Connolly JD and Roycroft DS. Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo- α -pyrone from *Anthocleista*



djalonensis. *Phytochemistry*. 1995; 40: 1183 - 9.

11. Goad LJ, Akihisa T. *Analysis of sterols*. Blackie Academic and Professional. London. 1997, pp: 375 - 6.

12. Faizi S, Ali M, Saleem R, Bibi I and Bibi S. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of stigma-5-en-3-O- β -glucoside and its acetyl derivative. *Magn. Reson. Chem.* 2001; 39: 399 - 405.

