

جداسازی و شناسایی β -استیگماسترون از گیاه مریم نخودی خزری.¹

رویش یافته در استان گیلان

زهراء کاظمیزاده^{*}, زهره حبیبی², ایوب مرادی³

- 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: ۰۲۱ - ۲۲۴۳۱۹۳۳ - ۳۴، نمبر: ۰۲۱ - ۲۲۴۳۱۹۳۸
پست الکترونیک: kazemizadeh@acecr.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۹

چکیده

مقدمه: جنس مریم نخودی¹ شامل بیش از ۳۴۰ 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 رستم آباد 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 -استیگماسترون جدا شد و با استفاده از روش‌های طیف‌سنجدی رزونانس مغناطیس هسته و طیف‌سنجدی جرمی و طیف‌سنجدی مادون قرمز شناسایی شدند.

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

گل واژگان: مریم نخودی خزری، *Teucrium hyrcanicum* L. - β -استیگماسترون

¹ *Teucrium*



مقدمه

T. hyrcanicum در ایران صورت نگرفته است، بر آن شدیدم که ترکیب‌های طبیعی را در عصاره کلروفرمی- استنی گیاه مذکور جستجو نماییم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

سرشاخه‌های گل دار 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 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 ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغليظ شد. عصاره حاصل در حمام آب گرم در حداقل مثانول 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، مثانول عصاره تبخیر و به این ترتیب جهت کروماتوگرافی ستونی آماده شد.

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

گیاهان تیره نعناع و برخی جنس‌های آن از جمله جنس مریم نخدودی، از نظر شناسایی ترکیب‌های اسانس مورد توجه محققان داخلی و خارجی بوده‌اند. جنس مریم نخدودی از خانواده نعناعیان 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 می‌باشدند [۱] .

گونه‌های دارویی مریم نخدودی همانند *Teucrium polium* و *Teucrium chamaedrys* دوهزار سال است که به عنوان مدر، تبیر، برطرف‌کننده اختلالات 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 نخدودی، انواع نئوکلورودان دی‌ترپنoid، تری‌ترپنoid و نیز فلاونوئید جداسازی و شناسایی شده‌اند [۸ - ۱۳]. انتشار گونه در فلورایرانیک، منطقه تالش، ماورای قفقاز و شمال ایران ذکر شده است، اما نمونه تیپ آن از ناحیه هیرکانی می‌باشد.

مریم نخدودی 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 $1/۵ \times ۵ - ۲/۵ \times ۵$ سانتی‌متر، در حاشیه دارای دندانه‌های ارهای یا کنگره‌های کوچک فراوان، گل آذین 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 آستانه می‌باشد. این گیاه در مناطق جنگلی هم سطح دریا تا ارتفاع ۱۹۰۰ متری پراکنش دارد [۱۴] .

با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف جنس مریم نخدودی و اینکه تاکنون هیچ گونه بررسی فیتوشیمیایی بر روی گیاه

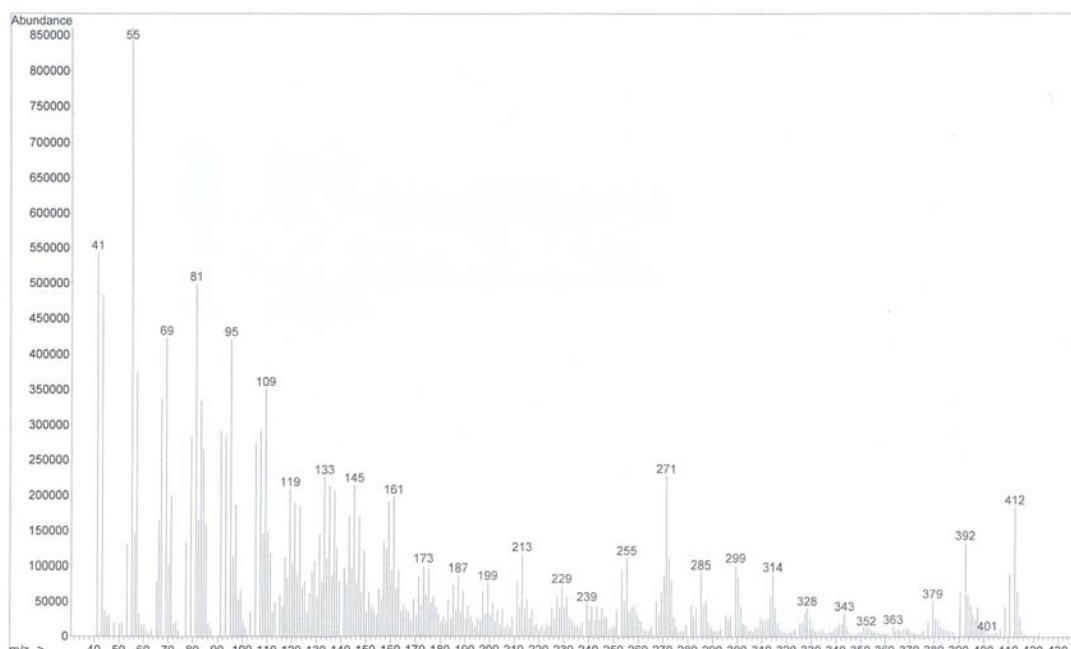
¹ Thin Layer Chromatography

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

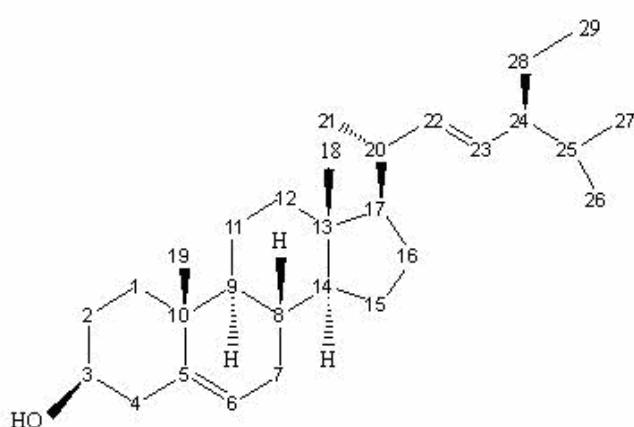
اتیل استات ۵ درصد، کریستال‌های سفید رنگ سوزنی شکل جداسازی و شناسایی شد. نقطه ذوب این ترکیب ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. جهت شناسایی نمونه‌های خالص شده، از طیف‌سنگی رزونانس مغناطیس هسته، طیف‌سنگی جرمی و طیف‌سنگی مادون قرمز استفاده شد. این در حالی است که از سایر اجزاء ترکیب خالص و قابل شناسایی به دست نیامد.

نتایج

پس از گرفتن طیف MS، پیشنهاد کتابخانه دستگاه



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



شکل شماره ۲ - β -استیگماسترون

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

¹³C NMR تفسیر طیف

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 -استیگماسترون 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 $\delta = 58$ ppm - ۱۲ واقع شده است، به کربن‌های متیلن، متیلن و متین تعلق دارند (شکل شماره ۴). در طیف FT-IR، پیک در طیف‌های ۱۳۵ DEPT ۹۰ و ۲۹۳۵/۱۲ cm⁻¹ حضور OH را در ساختار نشان می‌دهد. طیف‌های ۱۳۵ DEPT ۹۰ و طیف‌های دوبعدی H-C-COSY و H-H-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 ¹³C NMR و سایر طیف‌های دوبعدی با استفاده از اسپکترومتر Bruker AQS Avance-300 MHz 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. ۵۹۷۳ Network Mass Selective Detector طیف‌های جرمی نیز با استفاده از طیف نگار جرمی دانشگاه تهران ثبت شده است.

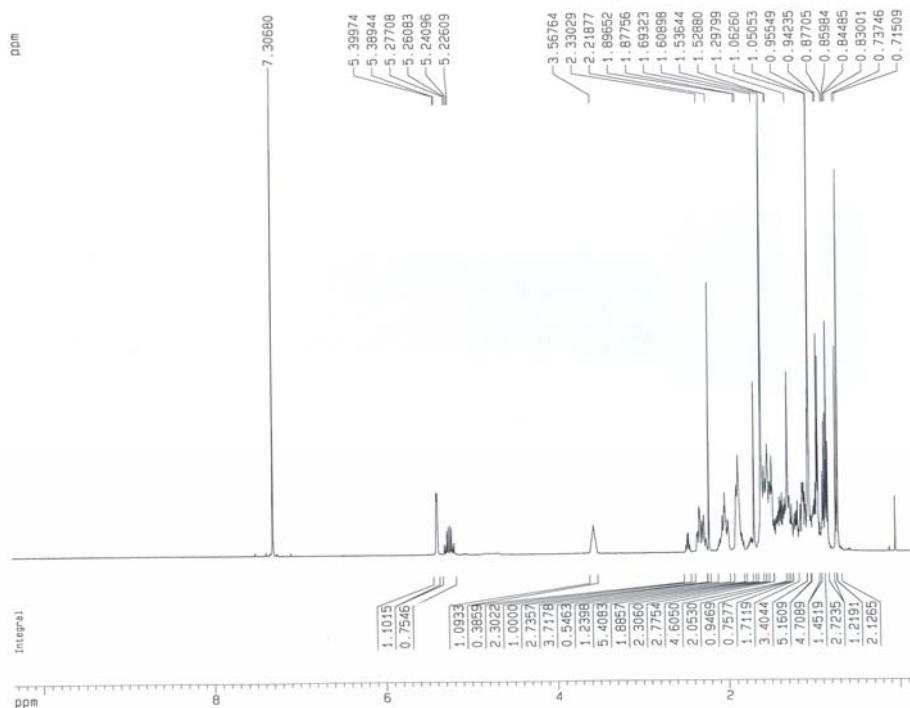
¹HNMR تفسیر طیف

در $\delta = 5/15$ ppm یک سیگنال دوتایی با J=۵ ppm مربوط به H-۶ =CH گروه است، 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 -استیگماسترون که با هم و با یک پروتون مجاورشان جفت شده و به صورت dd با J=۱۵ Hz معادل ۷/۵ Hz می‌باشد. مربوط به کوپل ترانس آن دو با یکدیگر و $\delta = 7/5$ ppm 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 $\delta = 4/5$ ppm (۱۱/۶، ۱۱/۶) نشان‌دهنده آن است که Hax داریم و با دو Hax مجاور خود با J=۱۱/۲ ppm شکافته شده و با دو Heq مجاور دیگر نیز با J=۱۱/۲ Hz حدوداً ۴/۶ Hz و ۶/۶ Hz شکافته شده است، پس نتیجه می‌گیریم OH به صورت $\delta = 2/03$ ppm نیز یک سیگنال دوتایی 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.

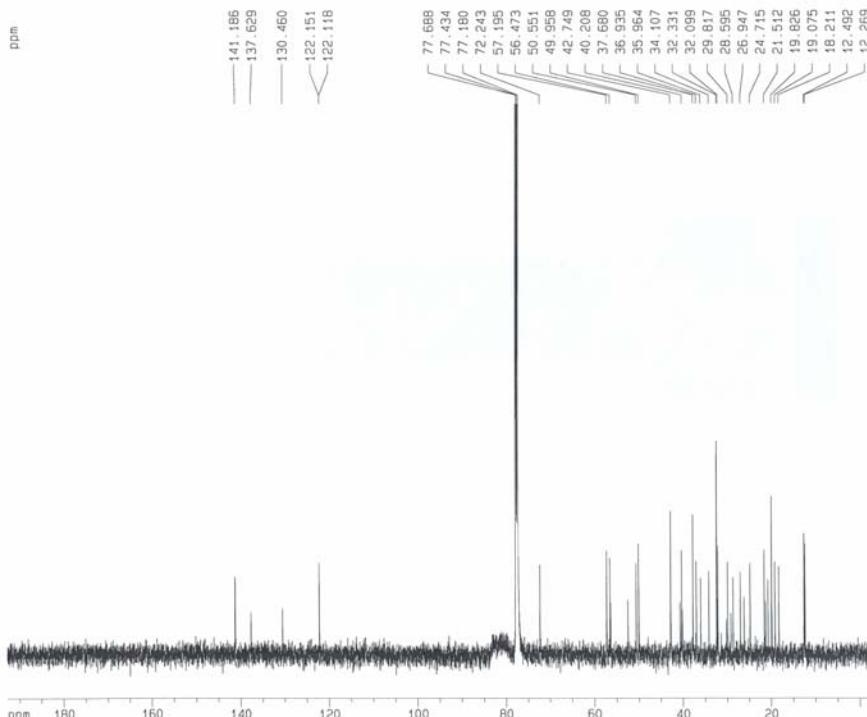
پروتون‌های Me-۱۸ و Me-۱۹ بدون شکافتنگی و به صورت یکتایی به ترتیب در ناحیه $\delta = 0/715$ ppm و $\delta = 1/05$ ppm مشاهده می‌شود. پروتون‌های H-۲۵ به صورت دوتایی d-TMS توسط پروتون‌های H-۲۵ به صورت دوتایی Me-۲۷ شکافته شده است و در $\delta = 0/95$ ppm به $\delta = 0/88$ ppm می‌باشد. مشاهده می‌شوند. پروتون H-۲۱ هم در $\delta = 1/06$ ppm به $\delta = 1/20$ ppm می‌باشد. 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 $\delta = 1/88$ ppm می‌باشد. صورت یک دوتایی دوتایی پهن ظاهر شده است که مربوط به



F10 ^1H NMR in CDCl_3 At 298K 86/03/31



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



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



بحث

cirsimarinin استخراج و شناسایی شدند [۱۰]. در سال ۲۰۰۵ از *T. fruticans* نیز سه دی ترپن نئوکلوردان 3β -hydroxy deacetyl fruticolone، fruticolone و ۶-acetyl-10- hydroxyteujaponin استخراج و شناسایی شدند [۱۱]. همچنین یک تری ترپنولید از نوع fernane توسط محققان چینی از *T. integrifolium* جدازی شد [۱۲]. در سال ۲۰۰۰ ترکیب‌های با نام‌های teucrol و $4'$ -triglycoside decarboxyrosmarinic acid از گونه *Teucrium pilosum* شناسایی شده‌اند [۱۳]. در سال ۱۹۹۶ نیز استروول‌های دو گونه *Teucrium betonicum* و *Teucrium abutiloides* شده‌اند [۱۴]. در خصوص گونه *Teucrium hyrcanicum* پیشتر دی ترپنولیدهای نئوکلوردان‌های teocrin H1-H4 و teucrin است [۱۵].

این مقاله اولین گزارش از استخراج β -استیگماسترون از گونه *Teucrium hyrcanicum* در جهان می‌باشد.

β -استیگماسترون یک فیتوسترون 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 -استیگماسترون از برخی گیاهان نظری گزارش شده است *Typha latifolia* و *Ambroma augusta* [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 3β -hydroxyteubutiline A دی ترپنولیدهای نئوکلوردان‌های ۲0-epi-3,20-di-o- ۱2-epi-montanin G *teuscordinon* و *deacetylteupyreinidin* شناسایی شده‌اند [۸]. در طی پژوهشی دیگر روی گونه *T. maghrbinum* دی ترپنولیدهای نئوکلوردان *teughrebin* و *teukotschyn* از گونه *T. fruticans* آن شناسایی شدند [۹]. در سال ۲۰۰۱ *cirsilineol* و *5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone*

منابع

- Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Press. Iran. 1996, p: 542.
- Zargari A. Medicinal Plant. Tehran University Press. Iran, 1997, pp: 130 - 6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ricci D, Fraternale D, Giampieri L, Buccini 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.
- Puntero BF, Peinado, Defresno AMV. Anti-inflammatory antiulser activity of *Teucrium Boxifolium*. *Ethnopharmacol. J.* 1997; 55: 93 - 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.
- 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 und 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. Oganesyan GB. Minor Phenolic Compounds from *Teucrium hyrcanicum*. *Chem. Nat. Comp.* 2005; 41: 228 - 9.

