

## استخراج و شناسایی بتا-سیتوسترول و دو دی‌ترپنوئید از قسمت‌های هوایی *Salvia verticillata* L. گیاه

زهره حبیبی<sup>۱\*</sup>، مهدیه قویدل<sup>۲</sup> و مریم یوسفی<sup>۳</sup>

\*۱- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم، گروه شیمی، دانشگاه شهید بهشتی، پست الکترونیک: z\_habibi@sbu.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

۳- استادیار، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۰

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

### چکیده

در این تحقیق، اندام‌های هوایی گیاه *Salvia verticillata* L. در فصل گلدهی از اصفهان- خور جمع‌آوری شد و عصاره کلروفرمی آن مورد بررسی قرار گرفت. برای جداسازی اجزای عصاره از کروماتوگرافی ستونی (فاز ساکن سیلیکاژل) استفاده شد. برای شستشوی ستون از حلال کاملاً غیرقطبی n-هگزان استفاده شد و بعد قطبیت حلال شوینده با اتیل‌استات افزایش یافت. در پایان، ستون با متانول شسته شد تا تمامی اجزای باقی‌مانده از ستون خارج شود و نهایتاً ۳۷ جزء بدست آمد. به‌منظور خالص‌سازی بیشتر از کروماتوگرافی ستونی (با ستون‌های کوچکتر) و کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای) استفاده گردید. برای شناسایی نمونه‌های خالص شده از تکنیک‌های مختلف طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) و در برخی موارد از طیف جرمی استفاده شد. بتا-سیتوسترول و دو دی‌ترپنوئید به نام‌های ماروبینون بی و پرگرینول از جمله ترکیب‌هایی بودند که از عصاره کلروفرمی جداسازی شده و پس از خالص‌سازی با استفاده از طیف‌بینی جرمی و طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته مورد شناسایی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: *Salvia verticillata* L.، Labiatae، دی‌ترپنوئید، بتا-سیتوسترول.

### مقدمه

#### تیره نعناعیان (Labiatae)

تیره نعناع به دلیل داشتن صفات و اختصاصات مهم دارویی و غذایی جزء اولین تیره‌هایی است که توسط گیاه‌شناسان شناسایی گردیده‌است (زرگری، ۱۳۷۶). این خانواده دارای ۲۰۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه است که از این تعداد ۴۹ جنس آن در ایران می‌رویند و معمولاً دارای اسانس می‌باشند (قهرمان، ۱۳۷۳). گیاهان این خانواده

عموماً ساده هستند. گل‌های آنها کامل، نامنظم، نر- ماده و مجتمع به صورت دسته‌هایی واقع در محور ساقه یا قسمت انتهایی آن است. این گیاهان قدرت سازش‌پذیری با انواع شرایط آب و هوایی خشک را دارند و این کار را با تغییر شکل خصوصیات برگ‌های خود انجام می‌دهند (آزادبخت، ۱۳۷۸).

در بین گیاهان این تیره، گونه‌های مفید فراوانی وجود دارد که تعداد زیادی از آنها مصارف دارویی و غذایی

آن ارائه نمود، اما به‌طور کلی می‌توان گفت ترپن‌ها به‌خصوص مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها و با درصد کمتری دی‌ترپنوئیدها از عمده ترکیب‌های تشکیل‌دهنده‌ی اسانس و عصاره‌ی سالویا هستند و در این جا به ذکر چند نمونه از جدیدترین تحقیقات انجام شده بر روی عصاره گونه‌های مختلف سالویا در نقاط مختلف دنیا پرداخته می‌شود.

جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره گیاه *S. hypoleuca* به‌وسیله محققان منجر به جداسازی ترپنوئیدهای متنوعی از جمله سزترترین لاکتون‌ها، ترکیب‌های هیدروپراکساید، اپوکساید و یک مونولاکتون گردید (Rustaiyan & Koussari, 1988). همچنین بررسی دیگری بر روی گیاه *S. syriaca* منجر به جداسازی یک سزترترین لاکتون گردید (Rustaiyan & Sadjadi, 1987). در تحقیقات انجام شده بر روی عصاره کلروفومی گیاه *S. leriaefolia* نیز یک دی‌ترین لاکتونی دارای خواص ضدباکتریایی جداسازی گردید (Habibi et al., 2000).

یک سزترترین، یک نور سزترترین و دو نور دی‌ترین جدید از قسمت‌های هوایی *S. sahendica* به همراه دوازده ترکیب شناخته شده حاوی یک سزترترین، یک سزکوئی‌ترین، یک دی‌ترین، دو تری‌ترین، دو ترکیب استروئیدی و پنج فلاونوئید در سال ۲۰۱۰ جدا گردید (Moghaddam et al., 2010). در سال ۲۰۰۸ در طی تحقیقاتی که بر روی قسمت‌های هوایی *S. palaestina* انجام شد، سه سزترترین، پنج دی‌ترین و یک تری‌ترین جدید به همراه دو سزکوئی‌ترین، ده دی‌ترین، سه تری‌ترین و رزمارینیک‌اسید شناخته شده جداسازی گردید (Cioffi et al., 2008). سالوینورین A یک دی‌ترپنوئید نوکلرودان است که در سال ۲۰۰۷ از گیاه *S. divinorum* جداسازی شده‌است. این ترکیب طبیعی روان‌گردان بوده و

دارند. تعداد زیادی از این گونه‌ها نیز به علت داشتن گل‌های زیبا و معطر، دارای ارزش زینتی هستند و در باغبانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (زرگری، ۱۳۷۶). بیشتر گیاهان این تیره معطرند و مورد چرای دام واقع نمی‌شوند، بنابراین ارزش علوفه‌ای بسیار کمی دارند و وجود برخی از گیاهان این تیره در مراتع بیانگر سیر قهقرایی و تخریب مراتع می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۵). از جنس‌های مهم این تیره *Teucrium* (۲۰۰ گونه)، *Ajuga* (۶۰ گونه)، *Scutellaria* (۲۰۰ گونه)، *Nepeta* (۲۰۰ گونه)، *Stachys* (۲۰۰ گونه)، *Thymus* (۷۰ گونه)، *Phlomis* (۷۰ گونه) و *Coleus* (۱۵۰ گونه) و *Salvia* (۹۰۰ گونه) که بزرگترین جنس خانواده نعناعیان می‌باشد را می‌توان نام برد (زرگری، ۱۳۷۶).

#### جنس *Salvia* (مریم‌گلی)

نام فارسی این جنس مریم‌گلی، مریمی و سالوی می‌باشد و در انگلیسی به آن *Salvia*، *Sage* و *Clary* می‌گویند. این جنس شامل ۹۰۰ گونه می‌باشد که در سرتاسر دنیا گسترده هستند. ۵۸ گونه آن در ایران یافت شده که ۱۷ گونه آن بومی ایران می‌باشند. دیگر گونه‌های آن علاوه بر ایران در آناتولی، عراق، فلسطین، سوریه، ارمنستان، ماورای قفقاز، افغانستان، پاکستان، جزایر دماغه سبز، شمال غرب آفریقا، مصر، لبنان و عربستان می‌رویند (مظفریان، ۱۳۷۵). شیمی جنس گیاهان مریم‌گلی بسیار جالب بوده و عصاره این گیاهان حاوی فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید و ... می‌باشند.

سالویا از دسته گیاهانی است که در زمینه اسانس و عصاره آن تحقیقات فراوانی انجام شده‌است. به علت تنوع ترکیب‌های موجود در آن نمی‌توان تقسیم‌بندی قطعی برای

این تحقیق بجز ترکیب بتا-سیتوسترول سایر ترکیب های جداسازی شده از این گیاه قبلاً گزارش نشده‌اند.

### مواد و روشها

#### عصاره‌گیری و جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره

۸۰۰-۷۰۰ گرم از اندام‌های هوایی و خشک شده گیاه به مدت ۲۴ ساعت در کلروفرم خیسانده شد. سپس حلال با استفاده از تبخیرکننده دوار تبخیر شد. برای چربی‌گیری، عصاره بدست آمده در حداقل متانول حل شده و در فریزر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از صاف کردن و تبخیر حلال به وسیله تبخیرکننده چرخان، عصاره باقی‌مانده به شکل یک عصاره غلیظ سبزرنگ (۶ گرم) بدست آمد و برای جداسازی اجزای آن از کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. برای پر کردن ستون از سیلیکاژل مرک ۶۰ (۰/۰۹mm-۰/۰۶mm) استفاده شد. برای شستشوی ستون از حلال کاملاً غیرقطبی  $n$ -هگزان استفاده گردید و بعد قطبیت حلال شوینده با اتیل استات افزایش یافت. حجم حلال‌هایی که در هر نوبت اضافه می‌گردید ۱۰۰ml و حجم اجزای جمع‌آوری شده در هر ارلن ۵۰ml بود. در پایان، ستون با متانول شسته شد تا تمامی اجزای باقی‌مانده از ستون خارج شود و نهایتاً ۳۷ جزء بدست آمد. کلیه اجزاء با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفتند. اجزای مشابه به هم اضافه شدند و برای خالص‌سازی بیشتر از کروماتوگرافی ستونی (با ستون‌های کوچکتر) و کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای) استفاده گردید. به منظور شناسایی نمونه‌های خالص شده از تکنیک‌های مختلف NMR و در برخی موارد از طیف جرمی استفاده شد.

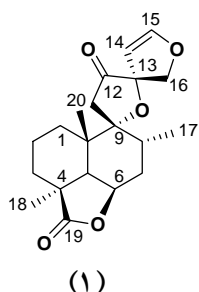
ایجاد توهم می‌کند (Kutrzeba et al., 2007). در سال ۲۰۰۶ طبق تحقیقاتی که روی عصاره قسمت‌های هوایی گیاه *S. dorrii* انجام شد، علاوه بر سالویدورول که یک نوع دی‌ترین غیرآبتانی است، دو دی‌ترین اپی‌مریک آبتان، جدا شد که این اولین گزارش از یک نور دی‌ترین با یک اسکلت نامنظم می‌باشد (Ahmed et al., 2006). در سال ۲۰۰۳ دی‌ترین‌های جدیدی با اسکلت‌های آبتان و ۳، ۴-سکوآبتان به همراه یک دی‌ترین شناخته شده از قسمت‌های هوایی *S. candelabrum* جدا شده‌است (Hohmann et al., 2003). استخراج عصاره‌ی استونی ریشه *S. cilicica* که در سال ۲۰۰۲ انجام شد، منتهی به جداسازی دو دی‌ترین‌های جدید به همراه سه ترکیب شناخته شده‌ی اولئانولیک اسید، اورسولیک اسید و کریپتانول شد (Tan et al., 2002). همچنین اثر ضددیابتی عصاره اتانولی *Salvia verticillata* L. در موش‌ها اندازه‌گیری شد و در مقایسه با داروهای استاندارد ضددیابت چنین دیده شد که پس از ۱۴ روز مقدار گلوکز، کلسترول کل، تری‌گلیسیرید، اوره، اوریک اسید و کراتینین سرم خون موش‌های دیابتی به مقدار قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت (Eidi et al., 2011).

عصاره قسمت‌های هوایی گیاه مورد نظر قبلاً توسط محققان ترکیه‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و از آن یک کومارین به نام اسکولتین، چهار فلاونوئید به نام‌های لوتولین ۷-۰-گلوکوزید، هیدروکسی لوتولین ۵-۰-گلوکوزید، سیرسیمارین، پنج تری‌پنوئیک اسید با نام‌های اورسولیک، اولئانولیک، کراتاگولیک، ورگیک، بتولینیک و دو استروئید به نام‌های بتا-سیتوسترول و سیتوستریل ۳-بتا-دی-گلوکوزید که همگی شناخته شده بودند، استخراج گردید (Ulubelen & Topcu, 1984). در

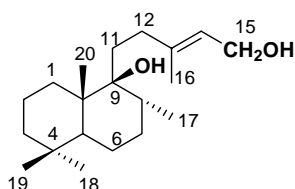
## نتایج

ماروبینون بی (۱) و پرگرینول (۲) و یک استروئید به نام بتا-سیتوسترول (۳) خالص سازی شدند.

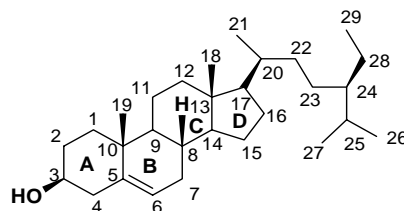
از گیاه *S. verticillata* دو دی ترپنوئید به نام‌های



(۱)



(۲)



(۳)

دارای نقطه‌ی ذوب  $130^{\circ}\text{C}$  می‌باشد و از جزء ۳ در قطبیت حلال *n*-هگزان: اتیل استات ۹:۱ جداسازی و شناسایی گردید. وزن مولکولی این ترکیب ۳۰۸ و فرمول مولکولی آن  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$  می‌باشد. در طیف جرمی این ترکیب، قطعه جرمی ۲۹۰ به جای ۳۰۸ به علت از دست دادن آب ظاهر شده‌است. چرخش ویژه اندازه‌گیری شده ( $C=1, \text{gr}$ )  $[\alpha]_{\text{D}} = +0.14/100\text{cc CHCl}_3$  می‌باشد (Salei *et al.*, 1967a; Salei *et al.*, 1967b; Salei *et al.*, 1966).

### ترکیب شماره ۳: بتا-سیتوسترول ( $\beta$ -Sitosterol)

فرمول بسته این ترکیب  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  است که معادل با جرم مولکولی ۴۱۴ است و در طیف جرمی پیک مربوط به یون مولکولی قابل مشاهده است. کتابخانه طیف‌سنج جرمی نیز این ترکیب را با احتمال ۹۹٪ پیشنهاد نموده‌است. این ترکیب به صورت رسوبی سفید رنگ دارای نقطه‌ی ذوب  $143^{\circ}\text{C}$  می‌باشد و از جزء ۵ در قطبیت حلال *n*-هگزان: اتیل استات ۴:۱ جداسازی و شناسایی گردید (Mishra *et al.*, 2010). داده‌های طیفی با داده‌های گزارش شده در منابع علمی مقایسه و ساختار پیشنهادی تأیید گردید (Jayaprakasha *et al.*, 2007).

### ترکیب شماره ۱: ماروبینون بی (Marrubinone B)

نام دیگر این ترکیب (9 $\alpha$ ,13R:15,16-diepoxy-12-) است که از جزء ۱۰ در قطبیت حلال *n*-هگزان: اتیل استات ۳:۱ به صورت کریستال سفید رنگ و با نقطه‌ی ذوب  $198^{\circ}\text{C}$  جداسازی گردید. این ترکیب دارای وزن مولکولی ۳۴۶، فرمول مولکولی  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$  و چرخش ویژه‌ی ( $C=0/8$ )  $[\alpha]_{\text{D}} = +0.16, \text{gr}/100\text{cc CHCl}_3$  می‌باشد. گمارش کامل کربن‌ها و هیدروژن‌ها توسط مقایسه با داده‌های گزارش شده در منابع علمی نیز تأیید می‌گردد (Iida *et al.*, 1995; Hatam *et al.*, 1995).

ماروبینون بی، سمیت قابل توجهی در برابر بسیاری از سلول‌های سرطانی شامل سلول‌های خونی، سینه و پشت گردن دارد و همچنین در غلظت‌های پایین توانایی تنظیم برنامه عملکردی سلول‌های دفاعی (Natural Killer) و سلول‌های هدف (Target) بدن را دارا می‌باشند (Karioti *et al.*, 2007).

### ترکیب شماره ۲: پرگرینول (Peregrinol)

نام دیگر این ترکیب، 13-labdene-9,15-diol است. این ترکیب به صورت کریستال‌های سوزنی سفید رنگ و

بدن کمک کند. علاوه بر آن در تبدیل امگا ۶ به پروستاگلاندین ها و لوکوترین ها و کاهش بی نظمی های ترومبو-امبولیک و کاهش مقدار متابولیت های التهابی نیز شرکت می کند (Bouic et al., 1999؛ Paniagua- Perez et al., 2008).

بتا- سیتوسترول یک فیتواسترول است که در روغن کنجد به مقدار فراوان یافت می شود. این استرول معمولاً در سویا، ریشه گندم، فندق و روغن ذرت هم یافت می شود. بتا- سیتوسترول ساختار مشابهی با کلسترول دارد و از همین رو می تواند به جلوگیری از جذب کلسترول در

جدول ۱- جابجایی شیمیایی مربوط به طیف های  $^1\text{H NMR}$  و  $^{13}\text{C NMR}$  ترکیب ماروبینونبی

شماره اتم	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
۱	۲۸/۳۹	$\alpha = ۱/۶۸-۱/۷۲$ $\beta = ۱/۲۹$
۲	۱۷/۸۵	$\alpha = ۱/۵۹$ $\beta = ۱/۸۲\text{m}$
۳	۲۸/۱۸	$\alpha = ۱/۵۱\text{m}$ $\beta = ۲/۱۳$
۴	۴۴/۰۹	-
۵	۴۴/۴۲	$\alpha = ۲/۲۹\text{d}(۴/۳\text{Hz})$
۶	۷۵/۷۸	$\alpha = ۴/۷۶\text{t-like}(۴/۷\text{Hz})$
۷	۳۱/۲۵	$\alpha = ۱/۷۳\text{m}$ $\beta = ۲/۲۵\text{m}$
۸	۳۲/۰۴	$\beta = ۲/۱۷\text{m}$
۹	۸۴/۷۱	-
۱۰	۳۸/۶۴	-
۱۱(Pro R)		$۲/۸۰\text{d}(۱۸/۵\text{Hz})$
۱۱(Pro S)	۴۰/۱۸	$۲/۳۷\text{d}(۱۸/۵\text{Hz})$
۱۲	۲۱۲/۷۳	-
۱۳	۹۲/۸۰	-
۱۴	۱۰۲/۷۷	$\delta\text{d}(۲/۳\text{Hz})$
۱۵	۱۵۱/۴۴	$۶/۶۳\text{d}(۲/۳\text{Hz})$
۱۶(Pro R)		$۴/۳۳\text{d}(۱۰/۶\text{Hz})$
۱۶(Pro S)	۷۸/۰۴	$۴/۴۸\text{d}(۱۰/۶\text{Hz})$
۱۷	۱۵/۷۶	$۰/۷۳\text{d}(۶/۴\text{Hz})$
۱۸	۲۲/۵۸	$۱/۳۳\text{s}$
۱۹	۱۸۳/۵۳	-
۲۰	۲۳/۸۹	$۱/۰۸\text{s}$

دیگر خواص قابل ذکر آن توانایی کاهش التهاب، ترمیم زخم، خاصیت ضد ویروس و ضد قارچ آن می باشد (Aguilar *et al.*, 2002؛ Keplinger *et al.*, 1999).

جابجایی شیمیایی مربوط به طیف های  $^1\text{H}$  NMR و  $^{13}\text{C}$  NMR سه ترکیب فوق در جداول ۱ تا ۳ نشان داده شده اند.

بتا- سیتوسترول علاوه بر این که اثر شایان توجهی در کاهش کلسترول دارد، در پیشگیری از سرطان به ویژه سرطان سینه، پروستات و کولون نیز تأثیر قابل ملاحظه ای دارد. بتا- سیتوسترول دارای خواص آنتی اکسیدانی نیز می باشد به همین دلیل توانایی از بین بردن رادیکال های آزاد را نیز دارد (Baskar *et al.*, 2010؛ Jayaprakasha *et al.*, 2007) از

جدول ۲- جابجایی شیمیایی مربوط به طیف های  $^{13}\text{C}$  NMR و  $^1\text{H}$  NMR ترکیب پیرگینول

شماره اتم	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
۱	۳۶/۰۹	$\alpha$ و $\beta = ۱/۸-۲/۱$
۲	۱۸/۶۴	$\alpha = ۱/۴۲-۱/۶۱$
		$\beta = ۱/۱۱-۱/۳۷$
۳	۴۱/۷۲	$\alpha = ۱/۴۲-۱/۶۱$
		$\beta = ۱/۱۱-۱/۳۷$
۴	۳۳/۳۱	-
۵	۴۶/۳۰	$۱/۴۲-۱/۶۱$
۶	۲۱/۶۲	$\alpha = ۱/۴۲-۱/۶۱$
		$\beta = ۱/۱۱-۱/۳۷$
۷	۳۱/۲۹	$\alpha = ۱/۴۲-۱/۶۱$
		$\beta = ۱/۱۱-۱/۳۷$
۸	۳۶/۵۹	$\beta = ۱/۷-۱/۷۳$
۹	۷۷/۴۵-۷۶/۶۰	-
۱۰	۴۳/۲۵	-
۱۱	۳۱/۸۸	$\alpha$ و $\beta = ۱-۱/۵$
۱۲	۳۲/۸۹	$۲/۰۷\text{m}$
۱۳	۱۴۰/۷۲	-
۱۴	۱۲۳/۰۹	$۵/۴۴\text{t}(۶/۷\text{Hz})$
۱۵	۵۹/۴۲	$۴/۱۶\text{d}(۶/۷\text{Hz})$
۱۶	۱۶/۳۶	$۱/۷۴\text{s}$
۱۷	۲۲/۰۱	$۰/۸۹$
۱۸	۳۳/۷۴	
۱۹	۱۶/۴۲	$۰/۸۴$ و $۰/۸۸$ و $۰/۹۴$
۲۰	۱۶/۱۸	

جدول ۳- جابه‌جایی شیمیایی مربوط به طیف‌های  $^{13}\text{C}$  NMR و  $^1\text{H}$  NMR ترکیب بتا- سیتوسترول

شماره اتم	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
۱	۳۷/۲۵	$\alpha = ۱/۸۴\text{m}$ $\beta = ۱/۰۹\text{m}$
۲	۲۹/۷۲	$\alpha = ۱/۴۹\text{m}$ $\beta = ۱/۸۴\text{m}$
۳	۷۱/۷۹	$\beta = ۳/۵۲\text{m}$
۴	۴۲/۲۹	$\alpha = ۲/۲۵\text{m}$ $\beta = ۲/۲۸\text{m}$
۵	۱۴۰/۷۵	-
۶	۱۲۱/۷۲	$\beta = ۵/۳۷\text{s}$
۷	۳۱/۶۵	$\alpha = ۱/۴۹$ $\beta = ۱/۹۶\text{m}$
۸	۳۱/۹	$\alpha = ۱/۴۳\text{m}$
۹	۵۰/۱۲	$\alpha = ۰/۹۷$
۱۰	۳۶/۵۰	-
۱۱	۲۱/۰۸	$\alpha$ و $\beta = ۱/۴۹$
۱۲	۳۹/۷۶	$\alpha = ۱/۱۶$ $\beta = ۲/۰۱\text{m}$
۱۳	۴۲/۲۹	-
۱۴	۵۶/۷۶	$\alpha = ۰/۹۷$
۱۵	۲۴/۳۱	$\alpha = ۱/۴۹-۱/۶۹\text{m}$ $\beta = ۱/۰۹$
۱۶	۲۸/۲۶	$\alpha = ۱/۸۷\text{m}$ $\beta = ۱/۲۵$
۱۷	۵۶/۰۴	$\alpha = ۱/۱۳$
۱۸	۱۱/۸۷	$۰/۶۹\text{s}$
۱۹	۱۹/۴۱	$۱/۰۲\text{s}$
۲۰	۳۶/۱۵	$\alpha$ و $\beta = ۱/۳۸$
۲۱	۱۸/۷۸	$۰/۹۳\text{d}$
۲۲	۳۳/۹۳	$\alpha = ۰/۹۷$ $\beta = ۱/۲۵$
۲۳	۲۶/۰۴	$\alpha$ و $\beta = ۱/۱۶\text{m}$
۲۴	۴۵/۸۱	$۰/۹۲\text{m}$
۲۵	۲۹/۱۲	$۱/۶۹\text{m}$
۲۶	۱۹/۰۴	$۰/۸۱\text{d}$
۲۷	۱۹/۸۴	$۰/۸۴\text{d}$
۲۸	۲۳/۰۵	$\alpha$ و $\beta = ۱/۲۵$
۲۹	۱۱/۹۹	$۰/۸۶$

## بحث

تفسیر طیف  $^1\text{H NMR}$  ترکیب شماره ۱

اکسیژن‌دار به صورت  $\text{CH}=\text{CH}-\text{O}$  است و شش کربن نوع چهارم شامل دو کربونیل و دو کربن اکسیژن‌دار وجود دارند. ترکیب براساس سه پیوند دوگانه و درجه غیراشباع یک دی‌ترپنوئید پنج حلقه‌ای می‌باشد. علاوه بر آن غیاب گروه‌های هیدروکسل در مولکول پنج حلقه‌ای نشان‌دهنده آن است که سه اتم اکسیژن باقی‌مانده، در تشکیل یک پیوند استری و دو پیوند اتری درگیر هستند. اطلاعات DEPT این ترکیب نشان می‌دهد که C-۶ یک کربن متاین اکسیژن‌دار است، در نتیجه می‌توان گفت که این کربن با C-۱۹ حلقه گاما-لاکتون را تشکیل داده‌است. همچنین از طیف DEPT می‌توان نتیجه گرفت که C-۹ و C-۱۳ هر دو کربن‌های نوع چهارم اکسیژن‌دار هستند. از این رو با در نظر گرفتن وجود یک حلقه پنج‌تایی کتونی می‌توان گفت که پیوند اتر میان C-۹ و C-۱۳ قرار دارد. بنابراین C-۱۵ و C-۱۶ که هر دو اکسیژن‌دار هستند با اتم اکسیژن باقی‌مانده به هم متصل شده و پیوند اتری دیگری تشکیل داده‌اند. با توجه به تعداد کربن‌ها، درجه غیراشباع و تحقیق در منابع شیمی، ساختار به صورت یک دی‌ترپنوئید با اسکلت لآبدان در نظر گرفته شد.

## H, H-COSY

در طیف  $^1\text{H}_2\text{H-COSY}$  از جمله ارتباطات قابل توجهی که می‌توان به آن اشاره نمود، ارتباط H-۱۴ با H-۱۵ و H-۵ $\alpha$  با H-۶ $\alpha$  و همچنین ارتباط H-۸ $\beta$  با هیدروژن‌های H-۷ $\alpha$  و H-۷ $\beta$  و H-۱۷ است. همچنین ارتباط هیدروژن‌های دیاستروتاپیک H-۱۶ با H-۱۶' و H-۱۱ با H-۱۱' نیز در طیف به وضوح قابل مشاهده است. H-۶ $\alpha$  با H-۷ $\alpha$  و H-۷ $\beta$  و همچنین با H-۵ ارتباط نشان می‌دهد که به دلیل ثابت جفت شدن یکسان به صورت سه‌تایی پهن ظاهر شده‌است. ارتباطات منطقه آلیفاتیک نیز نسبتاً پیچیده

در طیف  $^1\text{H NMR}$  این ترکیب در میدان پایین یک پیام دوتایی در ۶/۶ppm و با ثابت شکافتگی ۲/۳Hz دیده می‌شود که مربوط به هیدروژن اولفینی H-۱۵ می‌باشد و یک پیام دوتایی در ۵ppm و با همان ثابت شکافتگی که مربوط به هیدروژن اولفینی H-۱۴ می‌باشد نیز مشاهده می‌گردد. در ۴/۷ppm یک پیام سه‌تایی مربوط به H-۶ $\alpha$  با ثابت شکافتگی ۴/۷ Hz دیده می‌شود. ثابت جفت شدن ۴/۷Hz نشان‌دهنده وضعیت H-۶ به صورت آلفا است، در نتیجه حلقه لاکتون از این محل به صورت بتا متصل شده‌است. هیدروژن‌های دیاستروتاپیک متصل به C-۱۶ به دلیل اتصال کربن به اکسیژن به صورت دو پیام دوتایی با ثابت شکافتگی بزرگ ۱۰/۶Hz (کوپل ژمینال) در ۴/۳۳ppm و ۴/۴۸ppm دیده می‌شود. همین‌طور پیام‌های مربوط به متیل‌ها نیز در ۰/۷۳ppm به صورت یک پیام دوتایی مربوط به H-۱۷، یک پیام یکتایی در ۱/۳۳ppm مربوط به H-۱۸ و یک پیام یکتایی در ۱/۰۸ppm که مربوط به H-۲۰ می‌باشد، دیده می‌شود.

تفسیر طیف  $^{13}\text{C NMR}$  ترکیب شماره ۱

طیف  $^{13}\text{C NMR}$  این ترکیب حضور دو گروه کربونیل را تأیید می‌کند. جابجایی شیمیایی پیام‌های کربونیل در طیف  $^{13}\text{C NMR}$  نشان می‌دهد که یکی از آن دو مربوط به گروه کربونیل استر (۱۸۳/۵ppm) و دیگری مربوط به گروه کربونیل کتون می‌باشد (۲۱۲/۷ppm). طیف‌های DEPT نشان می‌دهد که ترکیب از سه کربن متیل ( $\text{CH}_3$ ) و شش کربن متیلن ( $\text{CH}_2$ )، شامل یک گروه  $\text{CH}_2-\text{O}$  تشکیل شده‌است. همچنین پنج کربن متاین (CH) که یک کربن آن



۰/۹۴ppm و ۰/۸۸ و ۰/۸۴ مربوط به H-۱۸، H-۱۹ و H-۲۰ می‌باشند.

### تفسیر طیف $^{13}\text{C}$ NMR ترکیب شماره ۲

در طیف  $^{13}\text{C}$  NMR با توجه به DEPT۹۰ و DEPT۱۳۵ حضور پنج گروه متیل، سه گروه متاین، هشت گروه متیلن و چهار اتم کربن نوع چهارم تأیید می‌شود. در DEPT۹۰ سه پیام دیده می‌شود که نشان‌دهنده سه گروه متاین می‌باشد و در DEPT۱۳۵ هشت پیام با فاز منفی که مربوط به گروه‌های متیلن و شش پیام با فاز مثبت که سه‌تای آن مربوط به گروه‌های متاین و سه‌تای دیگر مسلماً به پنج گروه متیل مربوط می‌باشد، دیده می‌شود. پیام ظاهر شده در ۱۶/۳۷ppm در DEPT۱۳۵ به صورت یک پیام تیز نیست و پهن دیده می‌شود، پس می‌توان نتیجه گرفت که این احتمالاً سه پیام است که با هم همپوشانی کرده‌اند که طیف  $^{13}\text{C}$  NMR این مطلب را تأیید می‌کند، زیرا قبل از پیام ظاهر شده در ۱۸/۶۳ppm سه پیام یکتایی در ۱۶/۱۸ppm، ۱۶/۳۶ppm و ۱۶/۴۲ppm وجود دارند که مربوط به سه گروه متیل می‌باشند که با هم همپوشانی کرده‌اند و نتایج DEPT هم مؤید این امر می‌باشد. سپس با تفاضل تعداد کربن‌های متاین، متیلن و متیل از کل کربن‌ها در طیف  $^{13}\text{C}$  NMR تعداد کربن‌های نوع چهارم نیز مشخص شد. وجود بیست کربن نشان‌دهنده ساختار یک دی‌ترین است که با توجه به این اطلاعات بدست‌آمده و تحقیق در منابع شیمی مربوط به دی‌ترین‌ها ساختار یک لابدان دی‌ترین برای آن در نظر گرفته شد که طیف‌های  $^1\text{H}$  NMR و  $^{13}\text{C}$  و  $^1\text{H}$ -COSY این ساختار را تأیید می‌کند.

بوده، اما ارتباط H-۲ با H-۱ و H-۳ در ناحیه ۱/۸ppm- ۱/۵ قابل تشخیص است.

### HMBC و C,H-COSY

برای گمارش کربن‌های متصل به اکسیژن از ارتباطات C,H-COSY استفاده شد، با توجه به مشخص بودن هیدروژن‌ها موفق به گمارش کربن‌ها شدیم. برای گمارش کربن‌های نوع چهارم و تأیید ساختار از HMBC کمک گرفتیم.

توسط ارتباطات مشاهده شده در طیف HMBC کربن‌های C-۹ و C-۱۳ که هر دو اسپرو بوده و به اکسیژن متصل هستند گمارش می‌شوند، زیرا C-۹ با هیدروژن‌های H-۱۱ و H-۱۱' و کربن H-۱۳ با هیدروژن‌های H-۱۶، H-۱۶' و H-۱۴ کاملاً ارتباط نشان می‌دهند.

### تفسیر طیف $^1\text{H}$ NMR ترکیب شماره ۲ واضحی

در طیف  $^1\text{H}$  NMR این ترکیب یک پیام سه‌تایی در ۵/۴۴ppm و با ثابت شکافتگی ۶/۷Hz دیده می‌شود که مربوط به هیدروژن اولفینی H-۱۴ می‌باشد که با هیدروژن‌های H-۱۵ جفت شده‌است و پیام دوتایی در ۴/۱۶ppm با همان ثابت جفت شدن مربوط به دو هیدروژن H-۱۵ می‌باشد که به دلیل اتصال به اکسیژن در میدان پایین ظاهر شده‌است. پیام چندتایی ظاهر شده در ۲/۰۷ppm مربوط به H-۱۲ و پیام یکتایی در ۱/۷۴ppm نیز مربوط به H-۱۶ می‌باشد. همچنین در بالاترین میدان هیدروژن‌های متیل دیده شده‌اند، که پیام ظاهر شده در ۰/۸۹ppm مربوط به H-۱۷ و پیام‌های ظاهر شده در

مذکور این گونه سالویا می‌تواند منبع غنی و مفیدی برای استخراج این ترکیب‌ها باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی بدلیل حمایت مالی پروژه و جناب آقای دکتر ولی‌الله مظفریان که جمع‌آوری و شناسایی گیاه را عهده‌دار بودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع مورد استفاده

- آزادبخت، م.، ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. نشر طبیب، تهران، ۴۲۰ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳۷۶. گیاهان دارویی (جلد چهارم). انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۴۸۵ صفحه.
- قهرمان، ا.، ۱۳۷۳. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی) (جلد سوم). انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۷۶۸ صفحه.
- مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایرانی. فرهنگ معاصر، تهران، ۵۹۶ صفحه.
- Aguilar, J.L., Rojas, P., Marceol, A., Plaza, A., Bauer, R., Reiningger, E., Klass, C.A. and Merfort, I., 2002. Anti-inflammatory activity of two different extract of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2): 271-276.
- Ahmed A.A., Mohamed, A.E.H., Karchesy, J. and Asakawa, Y., 2006. Salvidorol, a nor-abietane diterpene with a rare carbon skeleton and two abietane diterpene derivatives from *Salvia dorrii*. *Phytochemistry*, 67(5): 424-428.
- Baskar, A.A., Ignacimuthu, S., Paulraj, G.M. and Al Numair, K.S., 2010. Chemopreventive potential of  $\beta$ - Sitosterol in experimental colon cancer model- an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10: 24-34.
- Bouic, P.J., Clark, A., Lamprecht, J., Freestone, M., Pool, E.J., Liebenberg, R.W., Kotaz, D. and van Jaarsveld, P.P., 1999. The effects of  $\beta$ -sitosterol (BSS) and  $\beta$ -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal Sports Medicine*, 20: 258-262.

### تفسیر طیف $^1\text{H NMR}$ ترکیب شماره ۳

در طیف  $^1\text{H NMR}$  و در میدان پایین در ۵/۳۷ppm یک پیام پهن ظاهر شده که مربوط به هیدروژن اولفینی  $\text{H}-6$  است. در ۳/۵۲ppm یک پیام چندتایی ظاهر شده که مربوط به هیدروژن  $\text{H}-3\alpha$  است که به علت حضور OH در میدان پایین تری ظاهر شده است. از شش متیل موجود در ساختار ترکیب، سه گروه متیل به صورت دوتایی، یکی به صورت سه تایی و دو تا به صورت یکتایی در میدان بالا ظاهر شده‌اند.

### تفسیر طیف $^{13}\text{C NMR}$ ترکیب شماره ۳

در طیف  $^{13}\text{C NMR}$  این ترکیب در میدان پایین دو پیام ظاهر شده است که یکی مربوط به کربن اولفینی  $\text{C}-5$  در ۱۴۰/۷۵ppm بوده و دیگری در ۱۲۱/۷۲ppm مربوط به  $\text{C}-6$  می‌باشد. پیام موجود در ۷۱/۷۹ppm متعلق به  $\text{C}-3$  است که به علت اتصال به گروه OH ناپوشیده شده است. گمارش کامل کربن‌ها و هیدروژن‌ها در جدول ۳ آمده است.

### نتیجه‌گیری

عصاره کلروفرمی گیاه *Salvia verticillata* با روش کروماتوگرافی ستونی خالص‌سازی گردید و برای شناسایی ساختار مولکولی ترکیب‌های استخراج شده، از روش‌های اسپکتروسکوپی به‌ویژه  $^1\text{H NMR}$  و  $^{13}\text{C NMR}$  استفاده شد. در نهایت یک استروئید به نام بتا- سیتوسترول و دو دی‌ترپنئوئید شناخته شده به نام‌های ماروبینون‌بی و پرگرینول از این گیاه بدست آمد. بنابراین با توجه به خواص ذکر شده در متن برای ترکیب‌های

- salvinorin A proceeds via the deoxyxylulose phosphate pathway. *Phytochemistry*, 68(14): 1872-1874.
- Mishra, B.B., Kishore, N., Tiwari, V.K., Tripathi, V. and Singh, D.D., 2010. Antifungal constituents isolated from the seeds of *Aegle marmelos*. *Phytochemistry*, 71(2-3): 230-234.
  - Moghaddam, F.M., Moridi Farimani, M., Seirafi, M., Taheri, S., Khavasi, H.R., Sendker, J., Proksch, P., Wray, V. and Edrada, R., 2010. Sesterterpenoids and other constituents of *Salvia sahendica*. *Journal of Natural Product*, 73(9): 1601-1604.
  - Paniagua-Perez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Alvarez-Gonzalez, I., Sanchez-Chapul, L., Perez-Gallaga, J., Hernandez, N., Flores-Mondragon, G. and Velasco, O., 2008. Cell protection induced by beta-sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity. *Archives of Toxicology*, 82(9): 615-622.
  - Rustaiyan, A. and Koussari, S., 1988. Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, 27(6): 1767-1769.
  - Rustaiyan, A. and Sadjadi, A., 1987. Salvisyriacolide, a sesterterpene from *Salvia syriaca*. *Phytochemistry*, 26(11): 3078-3079.
  - Salei, L.A., Popa, D.P. and Lazur'evskii, G.V., 1966. Diterpenoids from *Marrubium peregrinum* I. *Chemistry of Natural Compounds*, 2(4): 200-201.
  - Salei, L.A., Popa, D.P., Doleish, L. and Lazur'evskii, G.V., 1967a. The structure of peregrinol, a diterpenoid from *Marrubium peregrinum* II. *Chemistry of Natural Compounds*, 3(2): 75-78.
  - Salei, L.A., Popa, D.P. and Lazur'evskii, G.V., 1967b. Correlation of peregrinol, with sclareol III. *Chemistry of Natural Compounds*, 3(5): 301-303.
  - Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Öksüz, S., Ulubelen, A. and Kolodziej, H., 2002. Abietane diterpenoids and triterpenic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61(8): 881-885.
  - Ulubelen, A. and Topcu, G., 1984. Flavonoids and terpenoides from *Salvia verticillata* and *Salvia pinnata*. *Journal of Natural Product*, 47(6): 1068-1070.
  - Cioffi, G., Bader, A., Malafronte, A., Dal Piaz, F. and De Tommasi, N., 2008. Secondary metabolites from the aerial part of *Salvia palaestina* Benth. *Phytochemistry*, 69(4): 1005-1008.
  - Eidi, A., Eidi, M., Shahmohammadi, P., Mozaffarian, V., Rustaiyan, A. and Mazooji, A., 2011. Antidiabetic effect of *Salvia verticillata* L. aerial parts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacology*, 7: 66-73.
  - Habibi, Z., Eftekhari, F., Samiee, K. and Rustaiyan, A., 2000. Structure and antibacterial activity of a new labdane diterpenoid from *Salvia leriaefolia*. *Journal of Natural Products*, 63(2): 270-271.
  - Hatam, N.A.R., Porzel, A. and Seifert, K., 1995. Polyodonine, a prefulvanic labdane diterpene from *Marrubium polyodon*. *Phytochemistry*, 40: 1575-1576.
  - Hohmann, J., Janicsák, G., Forgo, P., Rédei, D., Máthé, I. and Bartók, T., 2003. New diterpenoids from the parts of *Salvia candelabrum*. *Planta Medica*, 69(3): 254-256.
  - Iida, A., Tanaka, Y., Mihara, T., Tabata, M., Honda, G., Shinghu, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Yesilada, E., Sezik, E. and Fujita, T., 1995. Marrubinones A and B, New labdane diterpenoids from *Marrubium astracanicum* (Labiatae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(9): 1454-1457.
  - Jayaprakasha, G.K., Mandadi, K.K., Poulouse, S.M., Jadegoud, Y., Gowda, G.A.N. and Patil, B.S., 2007. Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(14): 4923-4932.
  - Karioti, A., Skopeliti, M., Tsitsilonis, O., Heilmann, J. and Skaltsa, H., 2007. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *marrubium velutinum*. *Phytochemistry*, 68(11): 1587-1594.
  - Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P. and Teppner, H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd). DC. ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical result. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 23-34.
  - Kutrzeba, L., Dayan, F.E., Howell, J., Feng, J., Giner, J.L. and Zjawiony, J.K., 2007. Biosynthesis of

## Extraction and identification of $\beta$ - sitosterol and two diterpenoides from the aerial parts of *Salvia verticillata* L.

Z. Habibi<sup>1\*</sup>, M. Ghavidel<sup>2</sup> and M. Yousefi<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

E-mail: z\_habibi@sbu.ac.ir

2- M.Sc. student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

Received: December 2010

Revised: December 2011

Accepted: February 2012

### Abstract

In the current research, aerial parts of *Salvia verticillata* L. were collected during the flowering stage from Esfahan-Khor and its chloroform extract was investigated. Purification of crude extract was carried out by column chromatography on silica gel with a gradient of *n*-hexane-ethyl acetate. At the end of chromatography, the column was eluted by methanol. Finally thirty-seven fractions were collected; further purification was carried out by column chromatography (smaller columns) and thin layer chromatography (glass plates) in *n*-hexane-ethyl acetate as solvent for several times and yielded pure compounds. The structure of purified natural products was elucidated by using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and Mass spectrometry.  $\beta$ -sitosterol and two diterpenoides namely Marrubinone B and Peregrinol were isolated.

**Key words:** *Salvia verticillata* L., Labiatae, diterpenoide,  $\beta$ -sitosterol.