مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355435.3036

جلد ۳۷، شماره ۵، صفحه ۸۵۸-۸۵۰ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.5.10.9

بررسی فیتوشیمیایی عصاره کلروفرمی *Nepeta haussknechtii* Bornm.

زهره چراغی[۱]، مریم یوسفی[۲]، زهره حبیبی[۳] و صبا قاسمی[۴*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشیار پژوهشی، مرکز تحقیقات ریزفناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا، تهران، ایران

۳- استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه شیمی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران، پست‌الکترونیک: sb.ghasemi@ilam-iau.ac.ir

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

چکیده

پونه‌سا (*Nepeta*) با بیش از ۲۸۰ گونه گیاهی یکی از مهم‌ترین جنس‌ها در تیره نعناعیان می‌باشد. در این تحقیق، گونه پونه‌سای عراقی (*N. haussknechtii* Bornm.) در فصل گلدهی از استان اردبیل جمع‌آوری شد و عصاره‌گیری با حلال کلروفرم انجام شد. با استفاده از کروماتوگرافی ستونی بر روی سیلیکاژل با گرادیان حلال n- هگزان -اتیل‌استات، ۲۹ جزء در عصاره خام کلروفرمی شناسایی شد. در نتیجه خالص‌سازی بیشتر جزء شماره ۵، یک استروئید شناخته شده به نام بتا-سیتوسترول (۱) حاصل گردید. همچنین، از خالص‌سازی جزء قطبی‌تر شماره ۹، تری‌ترپنویید شناخته شده اولئانولیک اسید (۲) شناسایی گردید. گمارش ترکیب‌ها توسط روش‌های طیف‌سنجی جرمی، IR، ^{1}H NMR، ^{13}C NM R، DEPT و ^{1}H^{1}H COSY انجام گردید. در نهایت، ساختار ترکیبات از طریق مقایسه داده‌های طیفی با آنچه که در منابع علمی معتبر گزارش شده است، تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: فیتوشیمی، پونه‌سای عراقی (*Nepeta haussknechtii* Bornm.)، ترپنوئید، بتا-سیتوسترول، اسید اولئانولیک.

مقدمه

خانواده نعناعیان (Labiateae)

تیره نعناع حدود ۲۰۰ جنس دارد که در ۴۰۰۰ گونه گیاهی طبقه‌بندی شده‌اند، این گیاهان در اغلب نقاط زمین و با بیشترین تراکم در منطقه مدیترانه یافت می‌شوند. تیره نعناع دارای گیاهان علفی، یک‌ساله و دارای ساقه‌های راست و خزنده‌اند. از دیگر ویژگی‌های این گیاهان آن است که دارای ساقه‌های چهار گوش و برگ‌های به‌طور کلی ساده‌اند. گل‌های آنها کامل، نامنظم، نر- ماده و مجتمع به‌صورت دسته‌هایی واقع در محور ساقه یا در قسمت انتهایی آن می‌باشد. یکی از دلایل رویش گسترده گیاهان این تیره به سازش‌پذیری بالای آنها با محیط زیست برمی‌گردد. تعداد زیادی از آنها قدرت سازش‌پذیری بالایی را با انواع شرایط آب و هوایی خشک از خود نشان می‌دهند و این کار را با تغییر شکل خصوصیات برگ‌های خود انجام می‌دهند (López *et al*., 2006 ؛Azadbakht, 1999).

به‌دلیل خواص با ارزش دارویی گیاهان این تیره، گونه‌های زیادی از آنها در صنایع پزشکی مورد استفاده قرار

می‌گیرند. تعداد زیادی از این گونه‌ها نیز به علت داشتن گل‌های زیبا و معطر، دارای ارزش زینتی هستند، به‌علاوه تعدادی از آنها مانند نعناع، مرزه و ریحان نیز به‌عنوان خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zargari, 1997). از جنس‌های مهم این تیره می‌توان *Teucrium* (۲۰۰ گونه)، *Ajuga* (۶۰ گونه)، *Scutellaria* (۲۰۰ گونه)، *Thymus* (۷۰ گونه)، *Phlomis* (۷۰ گونه)، *Nepeta* (۲۰۰ گونه)، *Stachys* (۲۰۰ گونه)، *Coleus* (۱۵۰ گونه) و *Salvia* (۹۰۰ گونه) را که بزرگترین جنس این خانواده هستند نام برد (Zargari, 1997).

جنس نپتا (*Nepeta*)

نپتا یا پونه‌سا نام یک سرده از تیره نعناعیان می‌باشد که در زبان انگلیسی به آن *nepeta*، catmin، catnep و grounivy می‌گویند. این جنس دارای بیشتر از ۲۸۰ گونه گیاهی است و در ایران ۷۹ گونه گیاه علفی یک‌ساله و چند ساله دارد که ۴۲ تا از آنها بومی ایران می‌باشند (Mozaffarian 2013). به‌علاوه برخی از گونه‌های این جنس در آسیای جنوب‌غربی، عراق، آناتولی، افغانستان، آسیای مرکزی، ماورای قفقاز، ترکمنستان، سوریه و پاکستان پراکنده‌اند (Goldansaz *et al*., 2019؛ Hussain *et al*., 2009).

در طب سنتی بسیاری از گونه‌های نپتا به‌عنوان معرق، ترمیم کننده زخم، ضد آسم، ضدتشنج، تب‌بر و مسکن بکار می‌روند. برخی از گونه‌های بومی نپتا در ایران، برای درمان بسیاری از اختلالات مانند بیماری عصبی، تنفسی و بیماری‌های مربوط به معده و روده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Salehi *et al*., 2018؛ Süntar *et al*., 2018؛ Sharma *et al*., 2021).

تحقیقات فراوانی در زمینه استخراج و شناسایی ترکیب‌های گوناگون بر روی گونه‌های مختلف این جنس انجام شده است. بررسی ترکیب‌های شیمیایی گونه‌های مختلف نپتا نشانگر وجود فلاون‌ها، کومارین‌ها، فلاون گلیکوزیدها، دی‌ترپنویدهای آبیتانی، استروییدها و سزکویی‌ترپنوییدها و کربوهیدرات‌ها به‌صورت عمده است (Sharma *et al*., 2021؛ Hussain *et al*., 2009). در ادامه به ذکر چند نمونه از تحقیقات انجام شده در این زمینه می‌پردازیم.

در تحقیقی که بر روی عصاره بوتانولی گونه *N. racemosa* انجام شده است چهار ترکیب ایریدوییید گلیکوزیدی همراه با تعدادی ترکیب فلاونوئیدی و پلی‌فنولی استخراج و شناسایی شده است (Goldansaz *et al*., 2019). همچنین عصاره متانولی سه گونه دیگر این جنس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ترکیب غالب در گونه *N. rtanjensis* ترانس، سیس-نپتالاکتون می‌باشد. این در حالی است که ایزومر سیس، ترانس این مونوترپن لاکتون به‌عنوان ترکیب غالب موجود در گونه *N. sibirica* بدست آمد و این ترکیب به مقدار بسیار ناچیزی از گونه *N. nervosa* استخراج شد. شایان ذکر است که رزمارینیک اسید ترکیب فنولی غالب هر سه گونه بود (Nestorović Živković *et al*., 2018). از عصاره دی‌کلرومتانی *N. sorgerae* یک ترکیب جدید دی‌ترپنوئید ایزوپیمارانی، همراه با دو تری‌ترپنوئید شناخته شده اولئانولیک اسید و اورسولیک اسید جداسازی و شناسایی شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بررسی شد (Yilmaz *et al*., 2012). در تحقیق دیگری که بر روی عصاره ریشه گیاه *N. clarkei* انجام شده است، سه دی‌ترپنوییید پارا-بنزو کینونی، به نام‌های لابدا- ۱۴- ان- ۸ و۱۳- دی‌اُل، کولئون- ۱۲- متیل اتر (Labda-14-en-8,13-diol, coleon U 12-methyl ether)، یک تری‌ترپنویید بنام اورسولیک اسید و دو استرول جداسازی و شناسایی شده است (Bisht *et al*., 2010).

با بررسی کامل منابع علمی مشخص گردید که تاکنون هیچگونه تحقیقی بر روی عصاره گونه *N. haussknechtii* انجام نشده است. بنابراین در این مطالعه با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه مستخرج شده از گونه‌های مختلف جنس نپتا برای اولین بار به بررسی فیتوشیمی عصاره این گونه پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تعیین نام علمی گیاهان

اولین مرحله برای شروع کارهای عملی در زمینه فیتوشیمی، جمع‌آوری گیاهانی سالم در فصل و ماه مناسب از سال (متناسب با نوع گیاه) و در نهایت اطمینان از شناسایی و نام‌گذاری صحیح علمی آنها می‌باشد. گونه گیاهی مورد نظر با کد هرباریومی TARI-102310 در فصل گلدهی (خردادماه) از استان گیلان–ارتفاعات ۷۱۲ کیلومتری ماسوله به خلخال توسط جناب آقای دکتر ولی‌الله مظفریان (گیاه‌شناس) جمع‌آوری و در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران، شناسایی و تعیین نام علمی آنها انجام شد.

روش‌های تجزیه‌ای

دمای ذوب ترکیب‌ها با استفاده از دستگاه الکتروترمال ۹۱۰۰ در لوله موئین بدست آمده و به‌صورت تصحیح نشده گزارش شده است. طیف‌های ^{1}H NMR و ^{13}C NMR و سایر طیف‌های دوبعدی با استفاده از اسپکترومتر Bruker AQS AVANCE (300 MHz) ثبت شده است. حلال مورد استفاده در طیف‌های NMR کلروفرم و متانول دوتره می‌باشند و جابجایی‌های شیمیایی براساس ppm نسبت به استاندارد داخلی تترامتیل سیلان گزارش شده است. طیف‌های جرمی با استفاده از دستگاه Shimadzu QP- 110 EX و طیف‌های IR با استفاده از قرص‌های KBr به‌وسیله دستگاه طیف‌سنج Magna 550 Nicolet FTIR ثبت گردیده است. حلال‌های مورد استفاده همگی از شرکت مجللی تهیه و پس از تقطیر مورد استفاده قرار گرفتند. صفحات TLC لازم برای انجام کروماتوگرافی لایه نازک، در آزمایشگاه به صورت صفحات شیشه‌ای 20×20 cm با قطر ۰/۳ میلی‌متر و از سیلیکاژل ۶۰ (GF_{254}) تهیه شدند. برای مشاهده لکه‌ها نیز از نور ماوراءبنفش در طول موج ۲۵۴ nm استفاده شد.

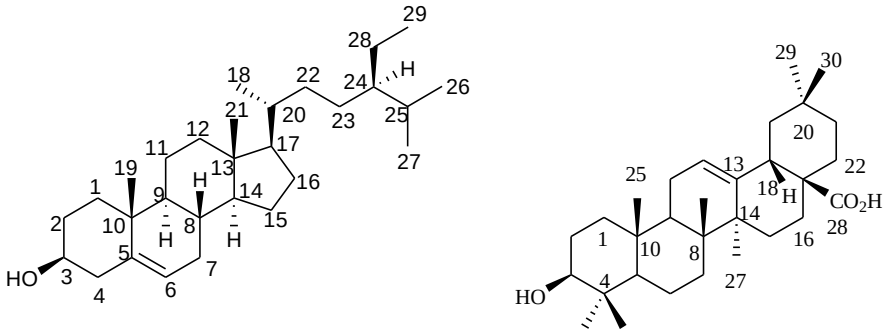
عصاره‌گیری و جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره

برای عصاره‌گیری حدود ۹۰۰ گرم از گیاه *Nepeta haussknechtii* خرد شده و به‌مدت ۴۸ ساعت در حلال کلروفرم خیس شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت عصاره حاصل صاف شده و با استفاده از تبخیرکننده چرخان در فشار کاهش یافته در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. به‌منظور افزایش میزان عصاره گیاه، عمل قرار دادن آن در کلروفرم و تغلیظ عصاره سه بار تکرار شد. سپس عصاره‌های تغلیظ شده در حداقل میزان متانول حل و به‌مدت ۴۸ ساعت به‌منظور چربی‌زدایی در فریزر قرار داده شد. پس از آن عصاره حاصل به‌منظور حذف چربی‌ها صاف گردید. عمل چربی‌گیری چندین بار تکرار و دوباره به‌وسیله تبخیرکننده چرخان، حلال عصاره تبخیر شد و به این ترتیب مقدار ۱۶ g عصاره غلیظ سبزرنگ برای کروماتوگرافی ستونی آماده گردید. ستون‌هایی که در این مرحله و یا مراحل بعدی جداسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند باید از لحاظ اندازه و ابعاد متناسب با مقدار نمونه تزریقی به ستون باشند تا بدین ترتیب هم جداسازی بخوبی انجام شود و هم اینکه نمونه در داخل ستون به تله نیفتاده و به هدر نرود، بدین‌ترتیب ستون مورد استفاده با طول ۷۰cm و قطر ۴cm انتخاب شد. به‌علاوه وزن سیلیکاژلی که به‌عنوان پرکننده در ستون استفاده می‌شود باید تقریباً ۵۰ برابر وزن نمونه تزریقی به ستون باشد. در ابتدا با استفاده از حلال *n*– هگزان دوغاب نسبتاً غلیظی از سیلیکاژل (60, 0.063-0.09mm) تهیه و به‌داخل ستون ریخته شد. پس از اتمام پر شدن ستون در حالی که روی آن حلال *n*– هگزان قرار داشت، سرستون بسته شد و به‌مدت یک شبانه‌روز باقی ماند. به‌منظور وارد کردن نمونه به ستون، عصاره گونه گیاهی مورد نظر در حداقل کلروفرم حل گردید و سیلیکاژل به‌تدریج به آن اضافه شد. حلال آن توسط تبخیرکننده دوار تبخیر و پودر یکنواخت حاصل از تثبیت عصاره بر روی سیلیکاژل به ستون اضافه گردید. با افزایش حلال‌هایی با قطبیت متفاوت، جداسازی انجام شد. به این ترتیب که شستشوی ستون با حلال کاملاً غیرقطبی *n*– هگزان شروع شد و با

افزایش اتیل استات به n- هگزان (هر بار ۱۰۰ میلی‌لیتر از مخلوط n- هگزان- اتیل استات با نسبت‌های ۹ به ۱، ۸ به ۲، ۷ به ۳، ۶ به ۴ و ...) قطبیت حلال شستشو افزایش یافت. در نهایت برای شستشوی ستون از حلال متانول استفاده شد تا تمامی اجزاء باقیمانده از ستون خارج شود. حجم اجزاء جمع‌آوری شده در هر ارلن ۵۰ml بود و ۴۳ جزء در ابتدا بدست آمد. از اجزاء بدست‌آمده کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از ورقه‌های سیلیکاژل روی آلومینیم انجام شد. اجزاء مشابه به هم اضافه شدند. برای خالص‌سازی بیشتر اجزاء از کروماتوگرافی ستونی مجدد (با ستون‌های کوچکتر) و کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای (۲۰×۲۰ cm)) استفاده شد. صفحات TLC در آزمایشگاه تهیه شدند و پس از قرار دادن نمونه بر روی این صفحات، برای توسعه حلال بر روی آنها به محفظه یا تانک TLC انتقال پیدا کردند. محفظه باید حاوی حلال کافی باشد، به‌نحوی که کف آنها را بپوشاند و برای کمک به اشباع محیط محفظه با بخارات حلال، درب آن باید پوشانده شود. پس از کامل شدن جداسازی، ترکیب‌ها به‌صورت لکه‌های جدا از هم و عمودی زیر نور ماوراءبنفش در طول موج ۲۵۴ nm مشاهده می‌شدند. پس از خالص شدن اجزاء، شناسایی ترکیب‌های خالص بدست آمده به کمک تفسیر طیف‌های IR، ^{1}H NMR، ^{13}C NMR، دوبعدی و مقایسه خواص فیزیکی و اطلاعات طیفی آنها با آنچه که در مراجع گزارش شده بود انجام گردید.

نتایج

برای جداسازی اجزاء اولیه، پس از انجام کروماتوگرافی ستونی و افزایش اجزای مشابه به هم، در نهایت ۲۹ جزء بدست آمد. در نتیجه خالص‌سازی بیشتر اجزاء با استفاده از کروماتوگرافی ستونی مجدد (با ستون‌های کوچک‌تر) و کروماتوگرافی لایه نازک، یک استروئید به نام بتا-سیتوسترول (شکل ۱-۱) و یک تری ترپنویید به نام اولئانولیک اسید (شکل ۱-۲) از این گیاه جداسازی شد.



(۱) (۲)

شکل ۱- ساختار بتا-سیتوسترول (۱) و اولئانولیک اسید (۲)

بتا-سیتوسترول با جرم مولکولی ۴۱۴ به‌صورت کریستال سفید رنگ و نقطه ذوب ۱۴۰-۱۳۸°C از جزء ۵ با قطبیت (*n*- هگزان:اتیل استات ۱:۷) جداسازی شد. مقدار جداسازی شده از این ماده حدود ۷۰۰mg می‌باشد. ساختار این ترکیب با استفاده از ویژگی‌های فیزیکی و مقایسه داده‌های طیفی آن با منابع علمی معتبر علمی تأیید گردید (Jayaprakasha *et al*., 2007).

شایان ذکر است که این ترکیب رشد سلول‌های سرطانی

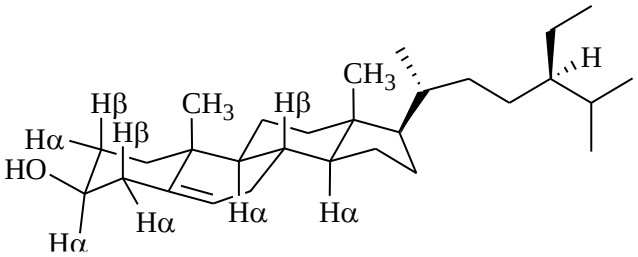
را کاهش داده و به‌عنوان یک ماده ضد سرطانی، در سرطان پروستات و سرطان روده بزرگ کاربرد دارد، از دیگر خواص بیولوژیکی آن می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد تب، ضد التهاب و آنتی‌باکتریایی آن اشاره نمود (Koelzer *et al.*, 2009؛ Li *et al.*, 2009).

اولئانولیک اسید با جرم مولکولی ۴۵۶ و نقطه ذوب ۳۰۵ درجه سانتی‌گراد به صورت کریستال‌های سفید رنگی از جزء ۹ با قطبیت (اتیل استات ۲۲:۸ *n*- هگزان) به مقدار ۲۰۰ mg از این گیاه جداسازی گردید. برای تأیید نهایی ساختار این ترکیب داده‌های طیفی آن با آنچه که در منابع معتبر علمی گزارش شده بود مقایسه شد (Khajuriaet *et al.*, 2007؛ Saimaru *et al.*, 2007). این ترکیب به‌دلیل خواص درمانی در اختلالات کبدی و ضد توموری دارای اهمیت فراوان می‌باشد، به‌علاوه اینکه مشتقات آن دارای اثرهای ضد ایدز نیز است (Kim *et al.*, 2015؛ Wolska *et al.*, 2010).

بحث

مشخصات طیفی ترکیب بتا-سیتوسترول

در میدان پایین طیف پروتون مربوط به این ترکیب، هیدروژن اولفینی شماره ۶ به‌صورت یک پیام پهن (یک دوتایی دوتایی) و در جابجایی شیمیایی ۵/۳۷ ppm ظاهر گردید که در نتیجه کوپلاژ آن توسط پروتون‌های H-۷α و H-۷β می‌باشد (شکل ۲). پیام مشاهده شده در ۳/۵۲ ppm با سطح زیر انتگرال یک مربوط به H-۳α است که توسط هیدروژن‌های ۲α و ۲β و ۴α و ۴β شکافته شده است و به‌دلیل اتصال به اکسیژن گروه هیدروکسی به میدان پایین جابجا شده است. پیام چندتایی ظاهر شده در ۲/۲۵ ppm با سطح زیر انتگرال دو مربوط به هیدروژن‌های متصل به کربن شماره ۴ می‌باشد. گروه‌های متیل موجود در ترکیب نیز به‌صورت پیام‌های یکتایی، دوتایی و سه‌تایی در میدان بالا ظاهر شده‌اند. گمارش سایر پروتون‌ها با مقایسه داده‌های طیفی با منابع علمی و مقالات مربوط به این ماده انجام شده و نتایج به‌طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است. در طیف ^{13}C NMR، ۲۹ پیام وجود ظاهر گردید که دو پیام ۱۴۰/۷۵ppm و ۱۲۱/۷۲ به‌ترتیب مربوط به کربن‌های اولفینی ۵ و ۶ است. پیام موجود در ۷۱/۸ ppm نیز متعلق به C-۳ می‌باشد که نشان‌دهنده اتصال آن به گروه هیدروکسیل است. پیام‌های موجود در ۳۱/۹ ppm، ۵۰/۱۱ و ۳۶/۵۰ به‌ترتیب مربوط به C-۸، C-۹ و C-۱۰ می‌باشند. سایر پیام‌های ظاهر شده در طیف با ساختار ترکیب همخوانی کامل دارد و گمارش کلی همه کربن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در نهایت ساختار ترکیب به کمک داده‌های طیف جرمی تأیید شد. طیف جرمی پیک یون مولکولی را در ۴۱۴ نشان داد که با فرمول مولکولی بتا-سیتوسترول ($C_{29}H_{50}O$) همخوانی کامل دارد و پیک ۳۹۶ مربوط به از دست دادن یک مولکول آب می‌باشد.



شکل ۲- شکل فضایی بتا-سیتوسترول

جدول ۱- جابجایی شیمیایی مربوط به طیف ^{1}H NMR و ^{13}C NMR ترکیب بتا-سیتوسترول

شماره اتم	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	شماره اتم	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
۱	α=۱/۸۴ m β=۱/۰۹	۳۷/۲۵	۱۶	α=۱/۸۷ m β=۱/۲۵	۲۸/۲۶
۲	α=۱/۴۹ m β=۱/۸۴ m	۲۹/۱۲	۱۷	α=۱/۱۳	۵۶/۰۴
۳	β=۳/۵۲ m α=۲/۲۵ m	۷۱/۷۹	۱۸	۰/۶۹ s	۱۱/۸۷
۴	β=۲/۲۸ m	۴۲/۲۹	۱۹	۱/۰۲ s	۱۹/۴۱
۵	–	۱۴۰/۷۵	۲۰	α و β=۱/۳۸	۳۶/۱۵
۶	β=۵/۳۷ br singlet	۱۲۱/۷۲	۲۱	۰/۹۳ (d , J= 6.0 Hz)	۱۸/۷۸
۷	α=۱/۴۹ β=۱/۹۶ m	۳۱/۶۵	۲۲	α=۰/۹۷ β=۱/۲۹	۳۳/۹۳
۸	α=۱/۴۳ m	۳۱/۹	۲۳	α و β =۱/۱۶m	۲۶/۰۴
۹	α=۰/۹۷	۵۰/۱۲	۲۴	۰/۹۲	۴۵/۸۱
۱۰	–	۳۶/۵۰	۲۵	۱/۶۹	۲۹/۱۲
۱۱	α و β=۱/۴۹	۲۱/۰۸	۲۶	۰/۸۱ (d, J= 6.6 Hz)	۱۹/۰۳
۱۲	α=۱/۱۶ β=۲/۰۱m	۳۹/۷۷	۲۷	۰/۸۴ (d, J= 6.6 Hz)	۱۹/۸۴
۱۳	–	۴۲/۲۹	۲۸	α و β = ۱/۲۵	۲۳/۰۵
۱۴	α=۰/۹۷	۵۶/۷۶	۲۹	۰/۸۶ (t, J= 6.45 Hz)	۱۱/۹۹
۱۵	α=۱/۴۹-۱/۶۹ m β=۱/۰۹	۲۴/۳۱			

مشخصات طیفی ترکیب اولئانولیک اسید

در طیف IR این ترکیب نوار شاخص مربوط به ارتعاشات کششی گروه کربونیل در cm^{-1} ۱۶۹۲، گروه هیدروکسیل در cm^{-1} ۳۴۴۳ و پیام مربوط به پیوند دوگانه در cm^{-1} ۱۴۶۴ مشاهده شد. در طیف ^{1}H NMR، یک پیام یکتایی پهن در موقعیت δ=۵/۲۹ ppm با سطح زیر انتگرال یک مشاهده گردید که دال بر وجود یک هیدروژن اولفینی در ساختار است. به‌علاوه اینکه طیف پروتون این ترکیب، دو پیام چندتایی دیگر را در ۲/۸۳ ppm و ۳/۲۲ نشان داد که به‌ترتیب تأییدکننده دو H-۱۸ و H-۳ می‌باشند. دو گروه متیل این ترکیب نیز در ۰/۷۶، ۰/۷۸، سه متیل به صورت پوشیده در ۰/۹۲ و دو متیل دیگر آن نیز به‌ترتیب در ۰/۹۹ و ۱/۱۴ ppm ظاهر شدند.

از بررسی طیف ^{13}C NMR این ترکیب با طیف DEPT 90 و DEPT 135 آن حضور ۳۰ کربن به اثبات رسید که بیانگر یک ترکیب با ساختار تری‌ترپنوییدی می‌باشد و از

این تعداد کربن هفت مورد آنها به‌صورت گروه‌های متیلی، ده گروه CH_2، پنج کربن نوع سوم (CH) و هشت عدد کربن به‌صورت نوع چهارم هستند. پیام ظاهر شده در ۱۸۱/۲۳ ppm مربوط به C-۲۸ است که به‌صورت یک گروه اسیدی می‌باشد. پیام‌های موجود در ۱۲۲/۵۴ ppm و ۱۴۴/۱۴ به‌ترتیب مربوط به C-۱۲ و C-۱۳ و پیام موجود در ۷۸/۸۸ ppm مشخصه C-۳ است که به گروه الکترون کشنده هیدروکسیلی وصل است. گمارش سایر کربن‌های این ترکیب در جدول ۲ آورده شده است. از بررسی طیف H,H COSY، ارتباط بین H-۱۸ با H-۱۹ و H-۱۹ در ۱/۳۱ ppm و ۱/۸۶به خوبی مشهود است، همچنین از طریق ارتباط H-۳ با پیک موجود در ۱/۸۰ ppm، موقعیت H-۲ تعیین گردید و موقعیت H-۱۱ نیز از طریق ارتباط آن با هیدروژن اولفینی واقع ۵/۲۹ ppm مشخص شد.

جدول ۲- جابجایی شیمیایی مربوط به طیف ^{13}C NMR ترکیب اولئانولیک اسید

شماره کربن	جابجایی شیمیایی (δ_C (ppm)	شماره کربن	جابجایی شیمیایی (δ_C (ppm)
۱	۳۸/۸۰	۱۶	۲۳/۵۸
۲	۲۶/۸۸	۱۷	۴۶/۶۶
۳	۷۸/۸۸	۱۸	۴۱/۵۴
۴	۳۸/۹۲	۱۹	۴۶/۲۳
۵	۵۵/۵۸	۲۰	۳۰/۸۳
۶	۱۸/۵۷	۲۱	۳۴/۰۹
۷	۳۲/۸۱	۲۲	۳۲/۹۹
۸	۳۹/۴۹	۲۳	۲۸/۱۲
۹	۴۷/۹۱	۲۴	۱۵/۷۱
۱۰	۳۷/۲۱	۲۵	۱۵/۳۸
۱۱	۲۳/۲۴	۲۶	۱۶/۹۷
۱۲	۱۲۲/۵۴	۲۷	۲۵/۹۹
۱۳	۱۴۴/۱۴	۲۸	۱۸۱/۲۳
۱۴	۴۱/۹۵	۲۹	۳۳/۱۴
۱۵	۲۷/۸۹	۳۰	۲۳/۶۱

سپاسگزاری

با تشکر از معاون محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام برای حمایت مالی پروژه و جناب آقای دکتر ولی‌الله مظفریان که جمع‌آوری و شناسایی گیاه را بر عهده داشته‌اند.

منابع مورد استفاده

- Azadbakht, M., 1999. Classification of Medicinal Plants. Tabib Press, Tehran, 420p.
- Bisht, D.S., Padalia, R.C., Joshi, S.C., Tewari, A. and Mathela, C.S., 2010. Constituents of *Nepeta clarkei* Hook.f. and their antioxidant activity. Indian Journal of Chemistry-Section B, 49B: 807-811.

- Goldansaz, S.M., Festa, C., Pagano, E., De Marino, S., Finamore, C., Parisi, O.A., Borrelli, F., Sonboli, A. and D'Auria, M.V., 2019. Phytochemical and biological studies of *Nepeta asterotricha* Rech. f. (Lamiaceae): isolation of nepetamoside. Molecules, 24(9): 1684.
- Hussain, J., Jamila, N., Khan, F.U., Devkota, K.P., Shahc, M.R. and Anwar, S., 2009. Nepetanal and nepetanoate: a new diterpene aldehyde and a benzene derivative ester from *Nepeta juncea*. Magnetic Resonance in Chemistry, 47: 625-627.
- Jayaprakasha, G.K., Mandadi, K.K., Poulose Shibu, M., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G.A. and Bhimanagouda, S.P., 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.
- Khajuria, A., Gupta, A., Garai, S. and Wakhloo, B.P., 2007. Immunomodulatory effects of two sapogenins 1 and 2 isolated from *Luffa cylindrica* in Balb/C mice. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 17: 1608-1612.
- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Yoon, Y. and Choi, K.H., 2015. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. PLoS One, 10: e0118800.
- Koelzer, J., Pereira, D.A., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G. and Fröde, T.S., 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus.* Food Chemistry, 117: 444-450.
- Li, J., Huang, X., Du, X., Sun, W. and Zhang, Y., 2009. Study of chemical composition and antimicrobial activity of leaves and roots of *Scrophularia ningpoensis*. Natural Product Research, 23: 775-780.
- López, J., Gonzal̀ez, A., Fenań́dez, J.A. and Bañón, S., 2006. Ornamental use of labiates for xeriscape in mediterranean area. Acta Horticulturae, 723: 459-464.
- Mozaffarian, V., 2013. Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Farhang Moaser Publishers: Tehran, Iran. 1444p.
- Nestorović Živković, J., Živković, S., Šiler, B., Aničić, N., Dmitrović, S., Divac-Rankov, A., Giba, Z. and Mišić, D., 2018. Differences in bioactivity of three endemic *Nepeta* species arising from main terpenoid and phenolic constituents. Archives of Biological Sciences, 70: 63-76.
- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y.H., Shibuya, M. and Ebizuka, Y., 2007. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 55: 784-788.
- Salehi, B., Valussi, M., Jugran, A.K., Martorell, M., Ramirez-Alarcon, K., Stojanovic-Radic, Z.Z., Antolak, H., Kregiel, D., Ksenija, S.M. and Sharifi-Rad, M., 2018. *Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy. Trends in Food Science and Technology, 80: 104-122.
- Sharma, A., Cooper, R., Bhardwaj, G. and Cannoo, D.S., 2021. The genus *Nepeta*: traditional uses, phytochemicals and pharmacological properties. Journal of Ethnopharmacology, 268: 113679.
- Süntar, I., Nabavi, S.M., Barreca, D., Fischer, N. and Efferth, T., 2018. Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent. Phytotherapy Research, 32: 185-198.
- Wolska, K.I., Grudniak, A.M., Fiecek, B., Kraczkiewicz-Dowjat, A. and Kurek, A., 2010. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. Central European Journal of Biology, 5: 543-553.
- Yilmaz, A., Cağlar, P., Dirmenci, T., Gören, N. and Topçu, G., 2012. A novel isopimarane diterpenoid with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Nepeta sorgerae*, an endemic species to the Nemrut Mountain. Natural product communications, 7: 693-696.
- Zargari, A., 1997. Medicinal Plants (Vol. 4). Tehran University Publication, Tehran, 103p.

Phytochemical study on chloroform extract of *Nepeta haussknechtii* Bornm.

Z. Cheraghi[1], M. Yousefi[2], Z. Habibi[1] and S. Ghasemi[3*]

1- Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
3*- Corresponding author, Department of Chemistry, Ilam Branch, Islamic Azad University, Ilam, Iran
E-mail: sb.ghasemi@ilam-iau.ac.ir

Received: August 2021 Revised: October 2021 Accepted: October 2021

Abstract

Nepeta is one of the most important genus from the fam. lamiaceae with more than 280 species. In this study, *N. haussknechtii* Bornm. was collected at the flowering stage from Ardabil province, Iran and its chloroform extract was prepared. The chloroform crude extract was subjected to the successive column chromatography on the silica gel using *n*-hexane–ethyl acetate solvent gradient to yield 29 fractions. Further purification of the fraction No.5 resulted in the isolation of one known steroid namely *β*-sitosterol (**1**). In addition, the known triterpenoid oleanolic acid (**2**) was identified from the purification of the more polar fraction No.9. The compounds were assigned by the mass spectrometry, IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, and ^{1}H^{1}H COSY. Finally, the structures of compounds were confirmed by comparison of the spectral data with those described in the literature.

Keywords: Phytochemistry, *Nepeta haussknechtii* Bornm., terpenoid, β-sitosterol, oleanolic acid.