فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۴۳-۲۲۸ (۱۳۸۸)

شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس و بررسی عصاره کلروفرمی گیاه *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f.

زهره حبیبی[1*] و مریم یوسفی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، پست الکترونیک: Z_Habibi@sbu.ac.ir

۲- دانشجوی دکترای رشته شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۸

چکیده

در این تحقیق اسانس و عصاره قسمتهای هوایی گیاه *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f. مورد بررسی قرار گرفت. روغن اسانسی به‌وسیله روش تقطیر با آب بدست آمد و با کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف‌سنج جرمی جداسازی و شناسایی شد. ۲۷ ترکیب که ۷۰/۲٪ از کل اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شدند. ترکیبهای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس عبارت از E-نوسیفرول (۱۰/٤٪)، ژرانیل-n-پروپیونات (٦/٤٪)، Z-لانسئول استات (٤/۷٪) و آلوآرومادندرن اپوکساید (۳/٤٪) بودند. از عصاره کلروفرمی گیاه *C. stenocalathium* دو ترکیب شناخته شده به نامهای ψ-تاراکساستریل استات و ایلیسیک اسید خالص‌سازی شد که با استفاده از روش طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی شناسایی شدند. اثر ضد میکروبی عصاره خام کلروفرمی در برابر سه باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی بررسی شد. عصاره خام به‌ویژه در برابر دو گونه باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*) و یک گونه باکتری گرم منفی (*Escherichia coli*) فعالیت ضد باکتریایی بالایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f.، اسانس، عصاره کلروفرمی، اثر ضد میکروبی.

مقدمه

جنس *Codonocephalum* متعلق به خانواده کاسنی (Compositae) می‌باشد و در ایران دو گونه گیاه علفی چند ساله دارد. گونه *C. stenocalathium* انحصاری ایران و گونه *C. peakianum* علاوه بر ایران در افغانستان، ترکمنستان و آناتولی هم می‌روید (مظفریان، ۱۳۷۵). گونه *C. stenocalathium* به شکل گیاه غده‌دار، قهوه‌ای رنگ، ساقه ٦۰-۵۰ سانتی‌متر و گاهی بلندتر، نازک، سفت، نیمی از شاخه‌های بالایی راست و برگ‌دار، برگ‌ها اغلب دمبرگ‌دار، چرمی سخت، برگهای قاعده‌ای با دمبرگهای به طول ۸ سانتی‌متر، کاملاً سرنیزه‌ای، به طول ۱۵سانتی‌متر و عرض ۵/۵ سانتی‌متر، در وسط تقریباً پهن هستند. برگهای ساقه‌ای راست و افراشته یا در ساقه تقریباً به هم فشرده، در پایین طویل، در بالا بتدریج دمبرگها کوتاهتر، رو به بالا بتدریج کوتاهتر و سرنیزه‌ای باریک هستند. طبق بررسیهای انجام شده هیچ‌گونه گزارشی از تحقیق بر روی عصاره و

یا اسانس این جنس و گونه‌های آن وجود ندارد. به همین دلیل در این تحقیق ترکیبهای تشکیل‌دهنده اسانس، عصاره کلروفرمی و همچنین خواص ضد میکروبی عصاره خام کلروفرمی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

جمع‌آوری گیاه

اندامهای هوایی گیاه در اوایل تیرماه ۱۳۸۳ از ایلام (دره‌شهر به آبدانان، کبیرکوه) جمع‌آوری شده و در دمای محیط خشک شدند.

استخراج اسانس

برای استخراج روغنهای اسانسی از روش تقطیر با آب استفاده شد. برای اسانس‌گیری ۱۰۰ گرم از قسمتهای مختلف گیاه خشک و خرد شده و درون بالن ریخته شد؛ به محتویات بالن آب مقطر اضافه شد. میزان آب مقطر باید به حدی باشد که سطح گیاه را کاملاً بپوشاند. بالن درون هیتر قرار داده شد. اسانس‌گیری به مدت ٤ ساعت ادامه یافت. پس از اتمام اسانس‌گیری، اسانس جمع شده روی آب جمع‌آوری و توسط سولفات سدیم خشک ش. سپس اسانس درون شیشه‌ای ریخته شد و پس از تعیین وزن اسانس تا زمان آنالیز در یخچال در دمای ٤°C نگهداری شد.

شناسایی ترکیبهای تشکیل‌دهنده اسانس

اسانس پس از آماده‌سازی به دستگاه GC تزریق شد تا درصد ترکیبهای تشکیل‌دهنده آن معلوم شود و همچنین اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS آنالیز شد تا نوع ترکیبهای تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. شناسایی ترکیبها با استفاده از پارامترهای مختلف مانند شاخص بازداری (RI)، تزریق هم‌زمان برخی ترکیبهای استاندارد و مطالعه طیفهای جرمی و مقایسه آنها با ترکیبهای استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC/MS انجام شد.

عصاره‌گیری

جهت عصاره‌گیری، ۷۰۰ گرم از قسمتهای مختلف گیاه خرد و به مدت ٢٤ ساعت در حلال کلروفرم خیسانده شد. پس از گذشت ٢٤ ساعت عصاره حاصل صاف شد و توسط تبخیر کننده دوار در فشار کاهش یافته در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد غلیظ شد. عصاره حاصل در حمام آب گرم در حداقل متانول حل شد و به مدت ٤٨ ساعت به منظور چربی‌زدایی در فریزر قرار داده شد. پس از ٤٨ ساعت عصاره حاصل صاف شد و چربیها از آن جدا شدند. مجدداً توسط تبخیر کننده دوار در فشار کاهش یافته متانول عصاره تبخیر شد. پس از اتمام مراحل عصاره‌گیری و چربی‌زدایی عصاره باقیمانده (۳۰gr) به شکل یک شربت غلیظ سبز رنگ بدست آمد و برای جداسازی اجزاء آن از کروماتوگرافی ستونی استفاده شد.

برای پر کردن ستون از سیلیکاژل [Kieselgel 60/0.063-0.2] استفاده شد. برای شستشوی ستون از حلال کاملاً غیرقطبی پترولیوم اتر استفاده شد و سپس با افزودن دی‌اتیل‌اتر قطبیت افزایش یافت. حجم حلالهایی که در هر نوبت اضافه می‌شد ۱۰۰ml و حجم فرکشن‌های جمع‌آوری شده در هر ارلن ۵۰ml بود. در نهایت، ستون با متانول شسته شد تا تمامی اجزاء باقیمانده از ستون خارج شود. از فرکشن‌های بدست آمده، کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از ورقه‌های سیلیکاژل روی آلومینیوم انجام شد. فرکشن‌های مشابه بهم اضافه شدند. جهت خالص‌سازی بیشتر فرکشن‌ها از کروماتوگرافی ستونی مجدد (با ستونهای کوچک‌تر) و

کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه‌ای) استفاده شد.

تست‌های ضد میکروبی

تست‌های ضد میکروبی بر روی عصاره خام به روش انتشار دیسک انجام شد. در این تست‌ها از شش سویه میکروبی با مشخصات درج شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات باکتریهای مورد استفاده

نام میکروارگانیسم	شماره استاندارد	نوع باکتری
Bacillus Subtilis	ATCC 9372	گرم مثبت
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	گرم مثبت
Enterococcus faecalis	ATCC 15753	گرم مثبت
Klebsiella pneumoniae	ATCC 3583	گرم منفی
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27852	گرم منفی
Escherichia coli	ATCC 9763	گرم منفی

نتایج و بحث

اسانس حاصل از این گیاه دارای رنگ سبز و بازده ۰/۲٪ وزنی- وزنی بود. با بررسی زمانهای بازداری، شاخص بازداری، بررسی طیفهای جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیبهای استاندارد، ۲۷ ترکیب که ۷۰/۲٪ از کل اسانس را تشکیل می‌داد شناسایی شد. ترکیبهای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس عبارت بودند از: E-نوسیفرول (۱۰/٤٪)، ژرانیل- n-پروپیونات (٦/٤٪)، Z-لانسئول استات (٤/۷٪) و آلوآرومادندرن اپوکساید (۳/٤٪).

بررسی ترکیبهای تشکیل‌دهنده نشان می‌دهد که طبقه‌بندی مواد موجود در اسانس به شرح زیر می‌باشد:

منوترپنهای هیدروکربنی (٤/٤٪)، منوترپنهای اکسیژن‌دار (۱/٦٪) و سزکویی‌ترپنهای هیدروکربنی (٤۹/۷٪) و سایر ترکیبها (۱٤/٥٪).

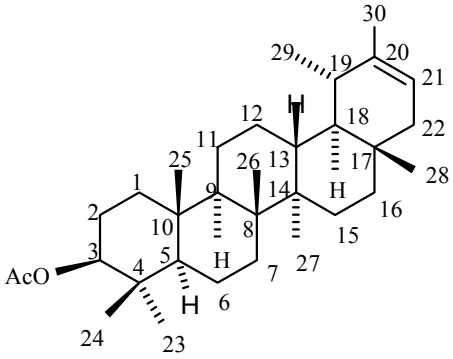
فهرست کامل ترکیبهای تشکیل‌دهنده اسانس همراه با شاخص بازداری، درصد نسبی و روش شناسایی در جدول ۲ آورده شده است.

عصاره‌گیری نیز به روش ذکر شده انجام شد. پس از انجام کروماتوگرافی ستونی، ۳۸ فرکشن جمع‌آوری شد و پس از انجام کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، فرکشن‌های مشابه بهم افزوده شدند. پس از انجام مراحل خالص‌سازی که شامل کروماتوگرافی مجدد ستونی، کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از صفحات TLC (۲۰×۲۰cm)، نوبلور کردن بود، از فرکشن‌های ۹-۱۱ (Petrol ۱۰۰٪)، و ۲۷-۲۵ (Petrol /Et_2O ٦۰:٤۰) به‌ترتیب یک تری‌ترپن شناخته شده به‌نام ψ-تاراکساستریل‌استات (ترکیب ۱) و یک سزکویی‌ترپن شناخته شده به نام ایلیسیک‌اسید (ترکیب ۲) بدست آمد.

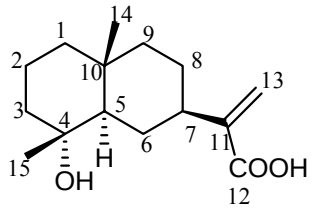
جدول۲ - نام و درصد کمی ترکیبهای تشکیل‌دهنده اسانس *Codonocephalum stenocalathium*

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
۱	α-pinene*	۹٤۰	۱/۸
۲	limonene*	۱۰۳۰	۱/۲
۳	*cis*-geraniol	۱۲۱٦	۱/٤
٤	methyl eugenol	۱۳۷۸	۱/٦
٥	α-yalangene	۱۳۸٦	۱/۹
٦	β-caryophyllene	۱٤۳۱	۳/٥
۷	γ-elemene	۱٤۳۷	۱/۳
۸	geranyl-n-propionate	۱٤۷٥	٦/٤
۹	germacrene D	۱٤۸۹	۱/٦
۱۰	β-Selinene	۱٤۹٥	۰/۸
۱۱	γ-gurjunene	۱٥۰٤	۰/۸
۱۲	δ-cadinene	۱٥۲٦	۲/٦
۱۳	*cis*-3-hexenyl benzoate	۱٥٥٥	۲/۷
۱٤	geranyl-n-butyrate	۱٥٦۳	۲/۱
۱٥	spathulenol	۱٥۷۹	۱/۹
۱٦	caryophyllene oxide	۱٥۸٦	۳/٥
۱۷	cubenol	۱٦۰۹	۰/۹
۱۸	α-cadinol	۱٦۳۹	۰/٦
۱۹	alloaromadendrene epoxide	۱٦٥۱	٤/٤
۲۰	vulgarone B	۱٦۸۰	۱/٦
۲۱	khusinol	۱٦۸۳	۰/۸
۲۲	*cis*-nuciferol	۱۷۱۱	۱/۳
۲۳	14-hydroxy-α-humulene	۱۷۱۷	۲/٤
۲٤	benzyl benzoate	۱۷٤۲	۳/٤
۲٥	*cis*-lanceol acetate	۱۹٤۱	٤/۷
۲٦	n-hexadecanoic acid	۱۹٤۹	۲/٦
۲۷	*trans*-nuciferol	۲۰۳۳	۱۳/٤۱

*: روش شناسایی، RI: شاخص بازداری، MS: طیف‌سنج جرمی، Co-I: تزریق هم‌زمان با نمونه استاندارد



(ترکیب ۱)



(ترکیب ۲)

نام دیگر ترکیب **۱**، ۲۰- تاراکساستن-β ۳- استات است و به‌صورت جامدی سفید رنگ می‌باشد. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۲۲۷-۲۲۸°C می‌باشد (Anjaneyulu *et al.*, 1985). براساس طیف HRMS آن دارای فرمول مولکولی $C_{32}H_{52}O_2$ و وزن مولکولی ٤٦٨/٣٨٨٩ می‌باشد (شکل ۱).

مشخصات طیفی ترکیب ۱

در طیف IR تری‌ترپن نوار موجود در $1724cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل استر مشاهده می‌شود.

در طیف ^1H NMR (شکل ۲) در δ=٥/٢٥ ppm، یک سیگنال دوتایی پهن دیده می‌شود که مربوط به H-۲۱ می‌باشد که به‌دلیل جفت شدن با H-۲۲، به یک دوتایی با J=٦/٥ Hz شکافته شده است و پهن شدن آن به‌دلیل ثابت جفت‌شدن کوچک با H-۲۲' است. در δ=٤/٤٨ ppm، یک سیگنال دوبار دوتایی با (J=١٠/٥, ٥/٦ Hz) مشاهده می‌شود که مربوط به H-۳ می‌باشد که مقدار ۱۰/۵ Hz نشان وجود گروه استات در حالت استوایی (β) می‌باشد. در δ=٢/٠٤ ppm یک‌تایی مشاهده شده مربوط به متیل گروه استات می‌باشد متیل اولفینی H-۳۰ در ۱/٦۳ ppm به‌صورت یک‌تایی ظاهر شده و بدین ترتیب وجود هشت متیل (غیر از متیل گروه استیل) نشان وجود تری‌ترپن پنج حلقه‌ایست و چون متیل ۲۹ به صورت دوتایی ظاهر شده، اسکلت تاراکساستران تأیید می‌شود. شش سیگنال یک‌تایی باقیمانده در ۰/۷۳ ppm، ۰/۸٤، ۰/۸٥، ۰/۸۷، ۰/۹٤، ۱/۰٤ =δ به‌ترتیب مربوط به متیل‌های شماره ۲٤، ۲۳، ۲٥، ۲۸، ۲۷ و ۲٦ می‌باشند. سیگنال دوتایی موجود در δ=۰/۹۸ ppm مربوط به H-۲۹ می‌باشد که توسط H-۱۹ به یک دوتایی با J=٦/٢ Hz شکافته شده است. سایر سیگنالها براساس NMR دوبعدی و مقایسه با طیف ^1H NMR ترکیبهای مشابه گزارش شده در منابع علمی گمارش شده‌اند (Herz & Watanabe, 1983؛ Akihisa *et al.*, 2004).

در طیف ^{13}C NMR این تری‌ترپن (شکل ۳)، ۳۲ سیگنال مشاهده می‌شود که سه سیگنال در میدان پایین قرار دارند. سیگنال موجود در δ=۱۷۱/۰۲ ppm، مربوط به کربن گروه کربونیل استری می‌باشد و دو سیگنال

موجود در δ=۱۳۹/۸۷ ppm و δ=۱۱۸/۸۹ ppm، به‌ترتیب مربوط به کربنهای اولفینی شماره ۲۰ و ۲۱ می‌باشند. سیگنال موجود در δ=۸۱/۰۰ ppm، مربوط به C-۳ می‌باشد که به‌دلیل اتصال به اکسیژن به میدان پایین جابه‌جا شده است. سایر سیگنالها در ناحیه ppm ٥٦-١٦ مشاهده می‌شوند. در طیف DEPT۱۳۵° (شکل ٤) وجود ۹ پیام مربوط به CH_2 و ۱۷ پیام مربوط به CH و CH_3 مشاهده می‌شوند که با توجه به طیف ^{1}H NMR، ۹ پیام این مجموعه متعلق به CH_3 و باقیمانده آن یعنی ۸ پیام مربوط به CH می‌باشد. مقایسه این طیف با طیف ^{13}C NMR مؤید وجود ٦ پیام مربوط به کربنهای نوع چهارم است.

بنابراین شیمی فضایی این ترکیب و نحوه قرارگیری استخلافات نسبت به هم با استفاده از طیف NOESY مشخص شد (شکل ٥). در طیف NOESY، ارتباط میان H-۳α، H-۲۳، H-٥α، H-۹α، H-۲۷ و H-۱۸α قابل تشخیص است و مؤید آن است که این هیدروژنها همگی در وجه آلفای مولکول قرار دارند. از طرف دیگر ارتباط میان H-٢٤ که مشخص شده است در وجه بتا قرار دارد، با H-۲٥، H-۲٦، H-۱۳β، H-۱۹β و H-۲۸ نشان آن است که این هیدروژنها در وجه بتای مولکول قرار دارند. گمارش پیامها در جدولهای ۳ و ٤ مشاهده می‌شود.

جدول ۳- جابه‌جایی شیمیایی مربوط به طیف ^{1}HNMR ترکیب ۱

شماره اتم	δ_H (ppm)
۱	۱/۰۱ (α) , ۱/٦۰ (β)
۳	٤/٤۸ dd (٥/٦ , ۱۰/٥)
٥	۰/۸ br (۱۰/۰)
٦	۱/۳ (β) و ۱/٥۰ (α)
۷	۱/۳ (β) و ۱/۳۳ (α)
۹	۱/۲۳ m
۱۱	۱/۲ (β) و ۱/۳۹ (α)
۱۳	۱/۷۲ d (۱۲/٦)
۱٥	۱/۰۰
۱٦	۱/۳۰(α), ۱/۱۹(β)
۱۸	۱/۰۲ dd
۲۱	٥/۲٥ d (٦/٥)
۲۲	۱/۲۸
۲۳	s ۰/۸٤
۲٤	s ۰/۷۳
۲٥	s ۰/۸٥
۲٦	s ۱/۰٤
۲۷	s ۰/۹٤
۲۸	s ۰/۸۷
۲۹	d ۰/۹۹ (٦/۰)
۳۰	s ۱/٦۳
CO Me	s ۲/۰٤

جدول ٤- جابه‌جایی شیمیایی مربوط به طیف ^{13}CNMR ترکیب ۱

شماره اتم	δ_c (ppm)
۱	۳۸/٤۷
۲	۲۳/۷۲
۳	۸۱/۰۰
٤	۳۷/۸۲
٥	٥٥/٤۱
٦	۱۸/۲۰
۷	۳٤/۱۹
۸	٤۱/۱۱
۹	٥۰/۳٦
۱۰	۳۷/۰٤
۱۱	۲۱/٦۳
۱۲	۲۷/٦۲
۱۳	۳۹/۲٤
۱٤	٤۲/۳٦
۱٥	۲۷/۰٥
۱٦	٤۲/۱۹
۱۷	۳٤/٤۱
۱۸	٤۸/۷۲
۱۹	۳٦/٤٥
۲۰	۱۳۹/۸۷
۲۱	۱۱۸/۸۹
۲۲	۳٦/۷۲
۲۳	۲۷/۹٦
۲٤	۱٦/٥۳
۲٥	۱٦/۰٦
۲٦	۱٦/۳۷
۲۷	۱٤/۷۲
۲۸	۲۱/٦٤
۲۹	۱۷/۷۲
۳۰	۲۲/٥٥
C=O	۱۷۱/۰۲
COMe	۲۱/۳۳

مشخصات طیفی ترکیب ۲

نام این ترکیب ایلیسیک اسید (Ilicic acid) و یا ٤α-هیدروکسی-۱۱(۱۳)- اودسمن-۱۲- اوئیک اسید است. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۱۷۸°C-۱۷٦، فرمول مولکولی $C_{15}H_{24}O_3$ و وزن مولکولی ۲۵۲/۳۵۳ می‌باشد. ترکیب استخراج شده به‌صورت کریستالهایی با شکل منظم هندسی است (Herz *et al.*, 1965). میزان خالص شده این ماده ۱/۲ گرم بوده که نسبت به وزن عصاره (۳۰ گرم)، ٤٪ از عصاره را تشکیل می‌دهد. در طیف IR این ترکیب نوار موجود در $1692cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل عامل اسیدی می‌باشد و نوار $3420cm^{-1}$ مربوط به گروه OH الکلی است. نوارهای موجود در $1620cm^{-1}$ و ۹۱٤ مشخصه گروه متیلن مزدوج با گروه کربوکسیل است.

در طیف ^1H NMR (شکل ٦) دو یک‌تایی در ppm δ=۵/٦٦ و ppm δ=٦/۲۹، مشاهده می‌شود که مربوط به پروتونهای اولفینی ۱۳ و ۱۳ است. یک یک‌تایی بسیار پهن نیز در ppm δ=٤/۸۰ مشاهده می‌شود که مربوط به OH متصل به C-٤ است. در ppm δ=۲/۵۲ یک سه‌تایی پهن دیده می‌شود که در واقع چهار بار دوتایی است و متعلق به H-۷α می‌باشد. می‌دانیم که همیشه به‌صورت طبیعی H-۷ به شکل α است و جهت‌گیری با J=۱۱/٦ Hz آن را تأیید می‌کند. H-۷α در طیف H-H COSY با H-٦β، H-٦α، H-۸α و H-۸β همبستگی نشان می‌دهد. H-۷α با H-۸β و H-۶β تقریباً مشابه کوپل کرده و شکل سه‌تایی به همین دلیل است و کوپل این هیدروژن با H-۶α و H-۸α به‌دلیل ثابت کوپلاژ کوچک فقط سبب پهن شدن این سیگنال شده است. در ppm δ=۱/۹۸ یک پیک دوتایی پهن مشاهده می‌شود که مربوط به H-٦α است که توسط H-٦β با J=۱۲/۰۲ Hz به‌صورت ژمینه شکافته شده است و پهن‌شدگی به‌دلیل کوپل با H-۷α است. در ppm δ=۱/۸۳ یک پیک دوتایی مربوط به H-۵ دیده می‌شود که به‌دلیل جفت شدن با H-٦β با ثابت جفت شدن ۱۲ Hz است. هیدروژنهای ۱، ۲ و ۳ در ناحیه ppm ۱/٦۰-۱/۳۳ ظاهر شده و گمارش آنها به‌دلیل نزدیکی پیامها در این ناحیه بسیار دشوار است. در ppm δ=۱/۲۸ یک پیک دوتایی پهن مربوط به H-۸α مشاهده می‌شود که به‌صورت ژمینه با H-۸β جفت شده و پهن شدن آنها به‌دلیل جفت شدن با ثابت جفت شدن کوچک با H-۷α است.

دو پیک یک‌تایی مشاهده شده در ppm δ=۱/۱۲ و ppm δ=۰/۹۲ با سطح زیر انتگرال سه پروتون به‌ترتیب مربوط به متیل‌های ۱۵ و ۱٤ می‌باشند. با استفاده از طیف دو بعدی H,H-COSY موقعیت کلیه پیامهای هیدروژنهای مختلف تعیین شد.

در طیف ^{13}C NMR (شکل ۷) ۱۵ سیگنال وجود دارد که بیانگر وجود یک سزکویی‌ترپن است. سیگنال موجود در ppm δ=۱٦۹/۳۳ مربوط به کربن گروه کربونیل عامل اسیدی است. دو سیگنال موجود در ناحیه اولفینی در ppm δ=۱٤٦/۵ و ppm δ=۱۲۱/۵۸ به‌ترتیب مربوط به C-۱۱ و C-۱۳ است. سیگنال موجود در ppm δ=۷۱/۵۱ متعلق به C-٤ است که حامل یک گروه هیدروکسیل است. در طیف DEPT۱۳۵° هفت پیام مربوط به CH_2، چهار پیام مربوط به CH و CH_3 مشاهده می‌شود که با توجه به وجود دو گروه متیل که در ^1H NMR به‌وضوح قابل مشاهده است، وجود دو CH و دو CH_3 در ساختار مولکولی تأیید می‌شود. با مقایسه این طیف با طیف ^{13}C NMR وجود چهار کربن نوع چهارم و موقعیتهای آن مشخص می‌شود. سایر پروتونها و کربنها براساس طیفهای H,H-COSY و C,H-COSY گمارش شده‌اند (شکل ۸ و ۹) و در جدولهای ۵ و ٦ ملاحظه می‌شوند.

جدول ۵- داده‌های طیفی مربوط به طیف ^{1}HNMR ترکیب ۲

شماره اتم	δ_H (ppm)
۱	m۱/۳۳ –۱/٦۰
۲	m۱/۳۳ –۱/٦۰
۳	m۱/۳۳ –۱/٦۰
٤	–
۵	(۱۲/۰) d ۱/۸۳
٦	m (β) (۱۲/۰) و ۱/۳۳–۱/٦۰ d (α)۱/۹۸
۷	ddbr ۲/۵۲
۸	(۱۲/۰) d (β) ۱/۱۹ , (۳/۳٤) d (α)۱/۲۸
۹	m۱/۳۳–۱/٦۰
۱۳	۵/٦٦ (H –۱۳) , ٦/۲۹ (H–۱۳′) s
۱٤	s ۰/۹۲
۱۵	s ۱/۱۲
OH	br ٤/۷۹

جدول ٦- جابه‌جایی شیمیایی مربوط به طیف ^{13}CNMR ترکیب ۲

شماره اتم	δ_C (ppm)
۱	٤٤/٦۲
۲	۱۹/۷٤
۳	٤۲/۷۲
٤	۷۱/۵۱
۵	۵٤/٤۵
٦	۲۷/۳۸
۷	٤۰/٤۸
۸	۲٦/۲٤
۹	٤۰/۸۹
۱۰	۳٤/۳۳
۱۱	۱٤٦/۵۰
۱۲	۱٦۹/۳۳
۱۳	۱۲۱/۵۸
۱٤	۱۷/۹۳
۱۵	۲۱/۱۳

برای تهیه عصاره خام این گیاه، جهت انجام آزمایش ضد میکروبی، بر روی ۱۰ گرم از قسمتهای مختلف آن مانند برگ و ساقه، کلروفرم تاحدی که روی گیاه را بپوشاند، اضافه شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت نگهداری و پس از این مدت صاف شد و فعالیت ضد میکروبی آن بر روی چند باکتری بررسی شد. نتایج این آزمایش در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول ۷- فعالیت ضد میکروبی عصاره خام گیاه *C. stenocalathium*

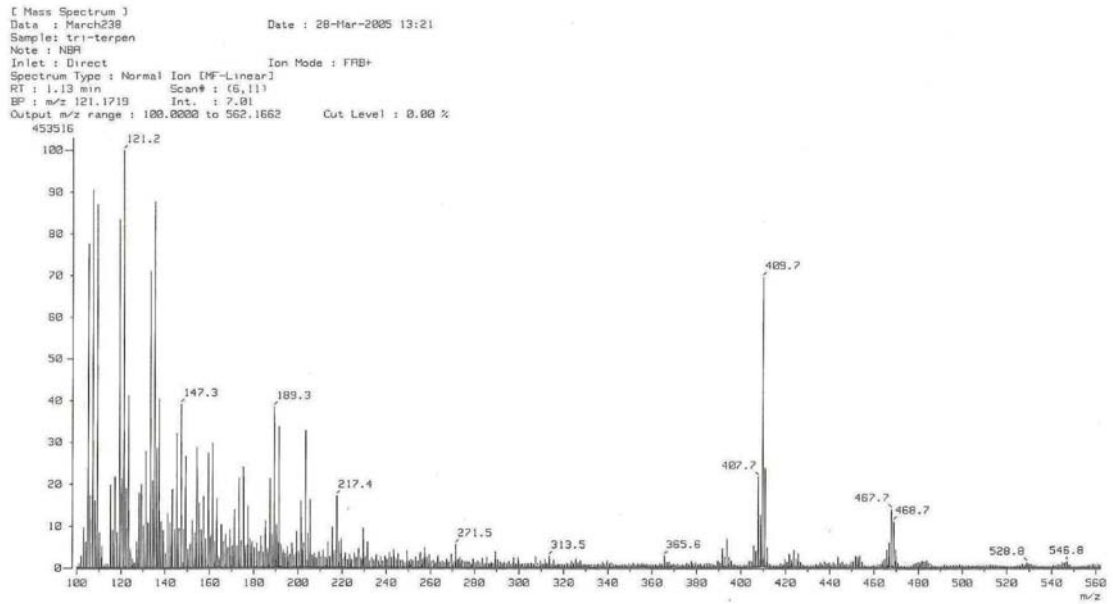
ردیف	نام میکرو ارگانیسم	قطر هاله عدم رشد (mm)
۱	*Staphylococcus aureus*	۲۵
۲	*Bacillus subtilis*	۲۵
۳	*Enterococus faecalis*	–
٤	*Escherichia coli*	۱۷
۵	*Klebsiella pneumonia*	–
٦	*Pseudomonas aeruginosa*	۱۵

(–) غیر فعال، (۱٤–۷) فعالیت متوسط، (۱٤<) بسیارفعال

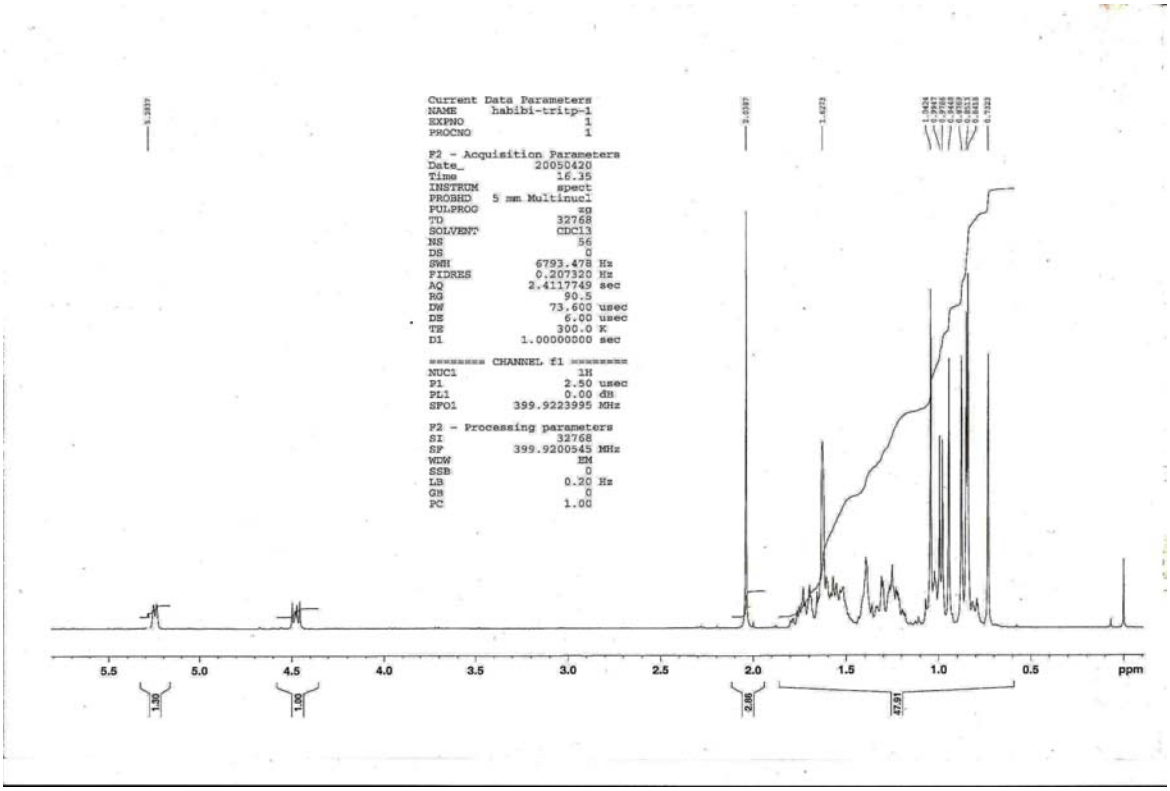
میزان تزریق برای هر دیسک= دو میکروگرم

همان‌گونه که دیده می‌شود عصاره خام این گیاه بر روی دو گونه باکتری گرم مثبت *S. aureus* و *B. subtilis* بسیار فعال و در مقابل *E. faecalis* فعالیتی نشان نمی‌دهد. در مورد باکتریهای گرم منفی نیز در مقابل *E. coli* بسیار فعال می‌باشد.

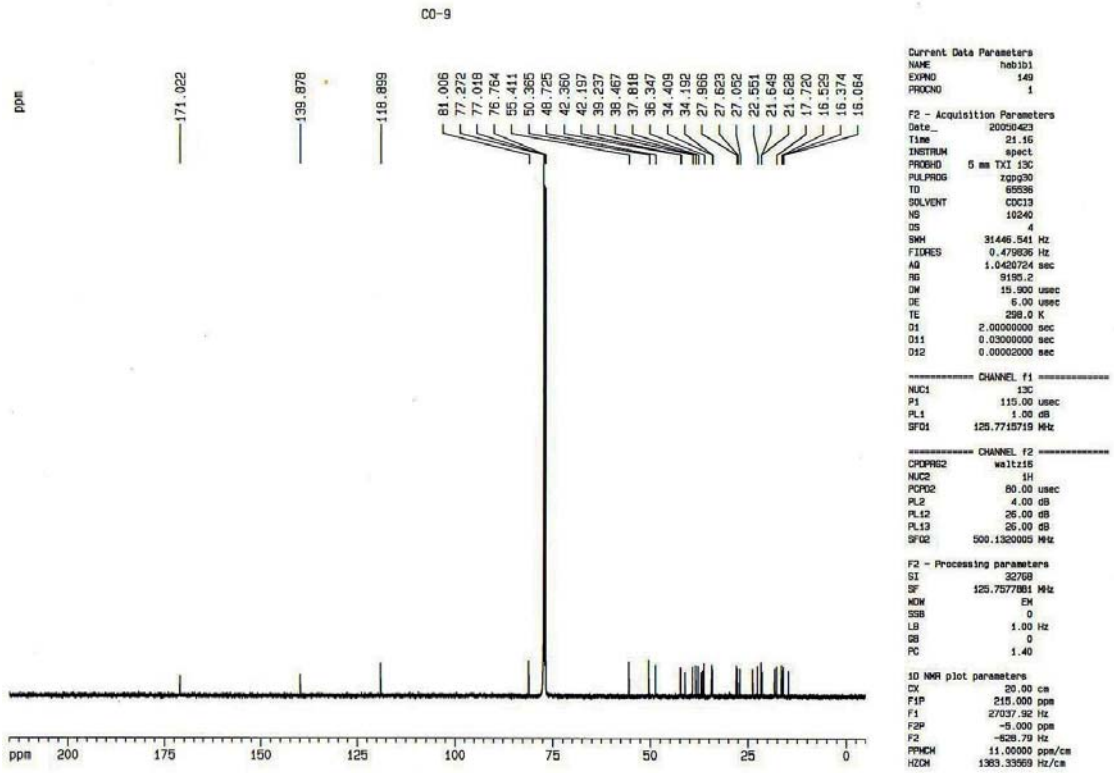
ترکیبهای جداسازی شده از گیاه *C. stenocalathium* در گذشته از برخی گونه‌های گیاهی دیگر استخراج شده‌اند (Bohlmann *et al.*, 1982) و خواص آنها بررسی شده است، اما تاکنون جداسازی آنها از این گونه گیاهی گزارش نشده است. طبق تحقیقات انجام شده در منابع علمی هیچ‌گونه گزارشی از تحقیق بر روی جنس کودونوسفالوم نیز وجود ندارد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده و اثر ضد التهابی که برای ایلیسیک اسید (Hernandez *et al.*, 2001) گزارش شده است، مقدار قابل ملاحظه آن در گیاه یاد شده می‌تواند جالب باشد.



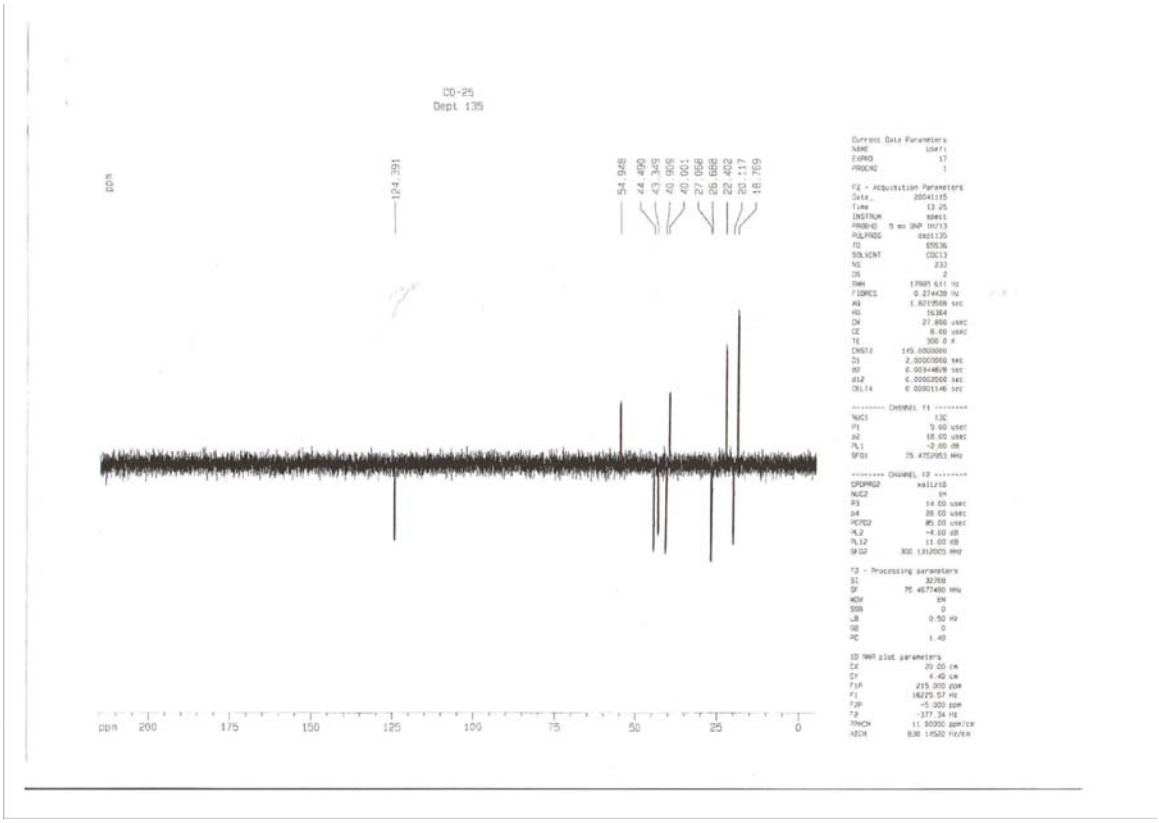
شکل ۱- طیف HRMS ترکیب ۱



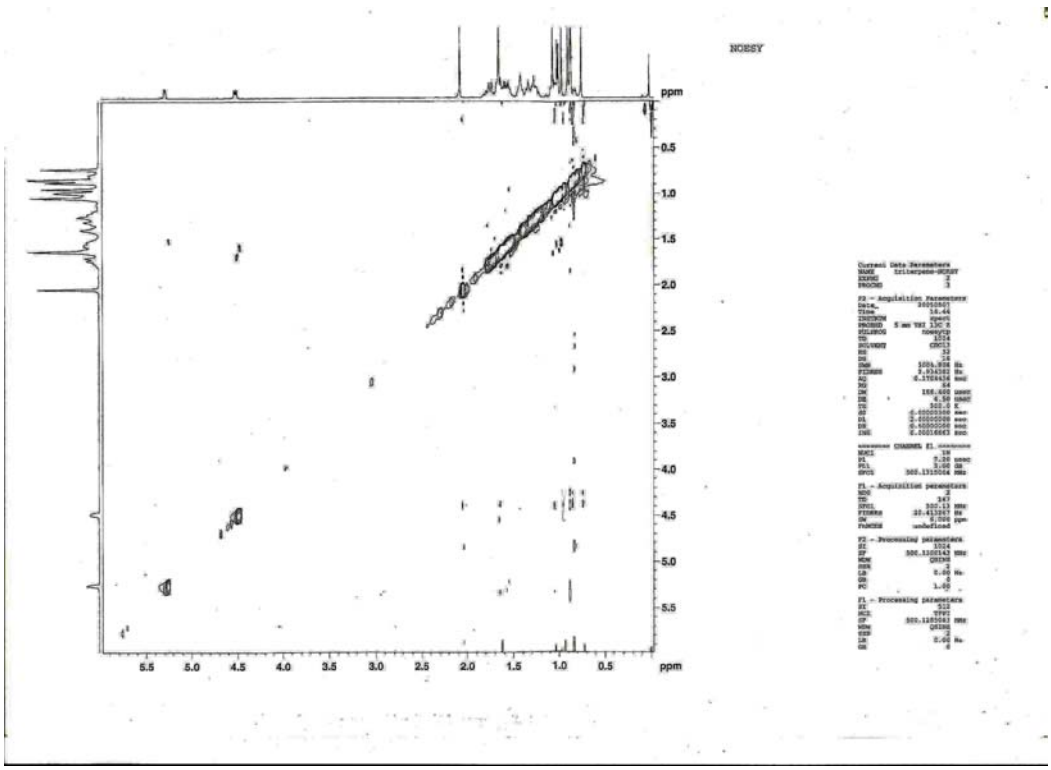
شکل ۲- طیف ^{1}H NMR ترکیب ۱



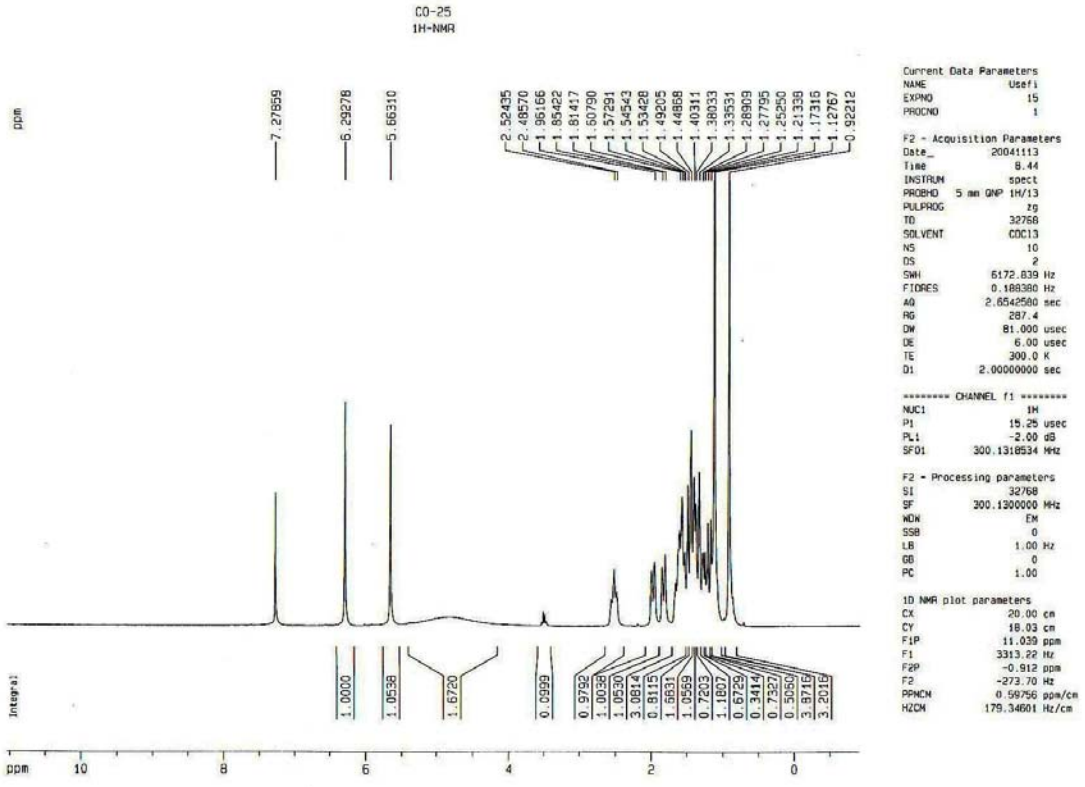
شکل ۳- طیف ^{13}C NMR ترکیب ۱



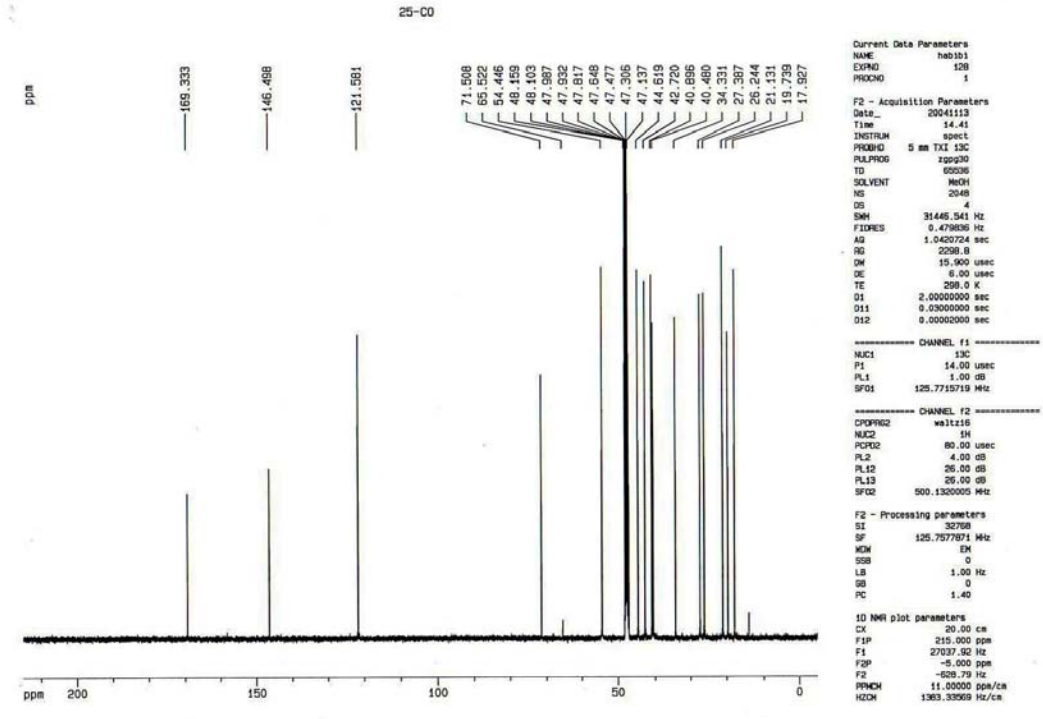
شکل ٤- طیف DEPT۱۳۵ ترکیب ۱



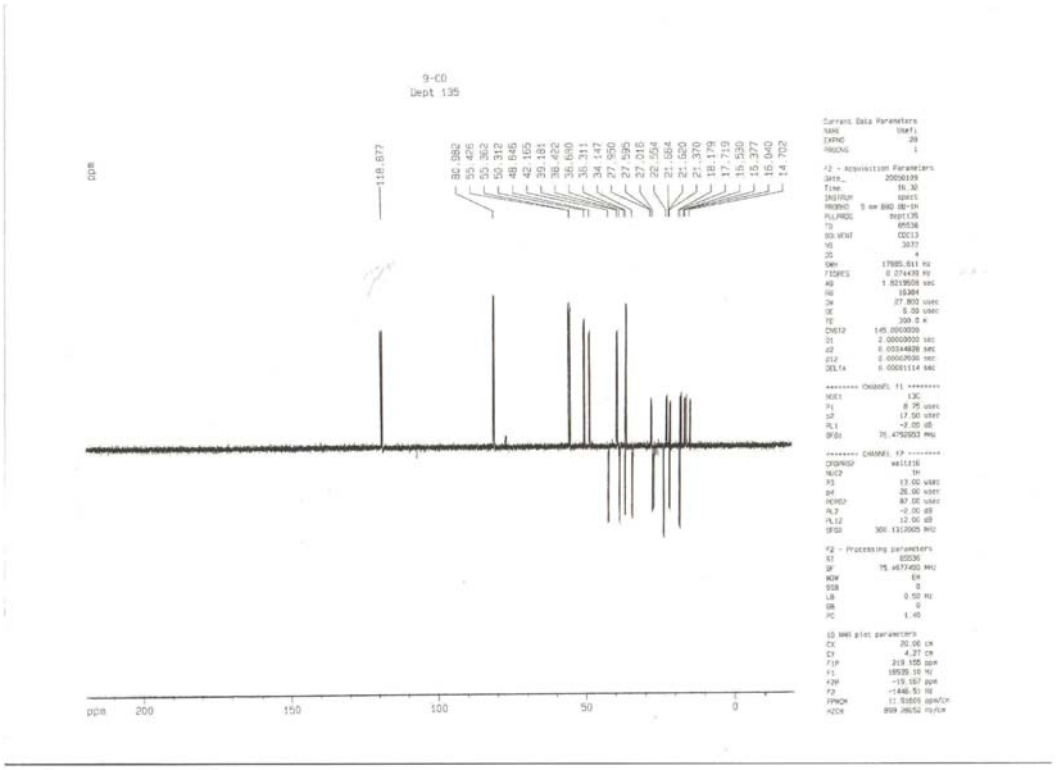
شکل ٥- طیف NOESY ترکیب ۱



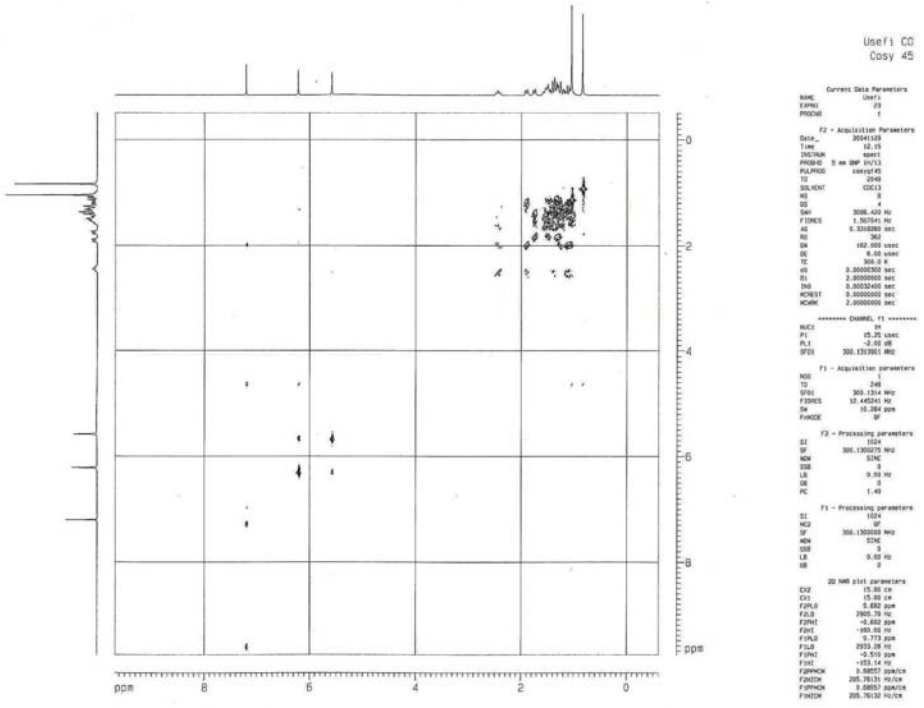
شکل ٦- طیف ^{1}H NMR ترکیب ۲



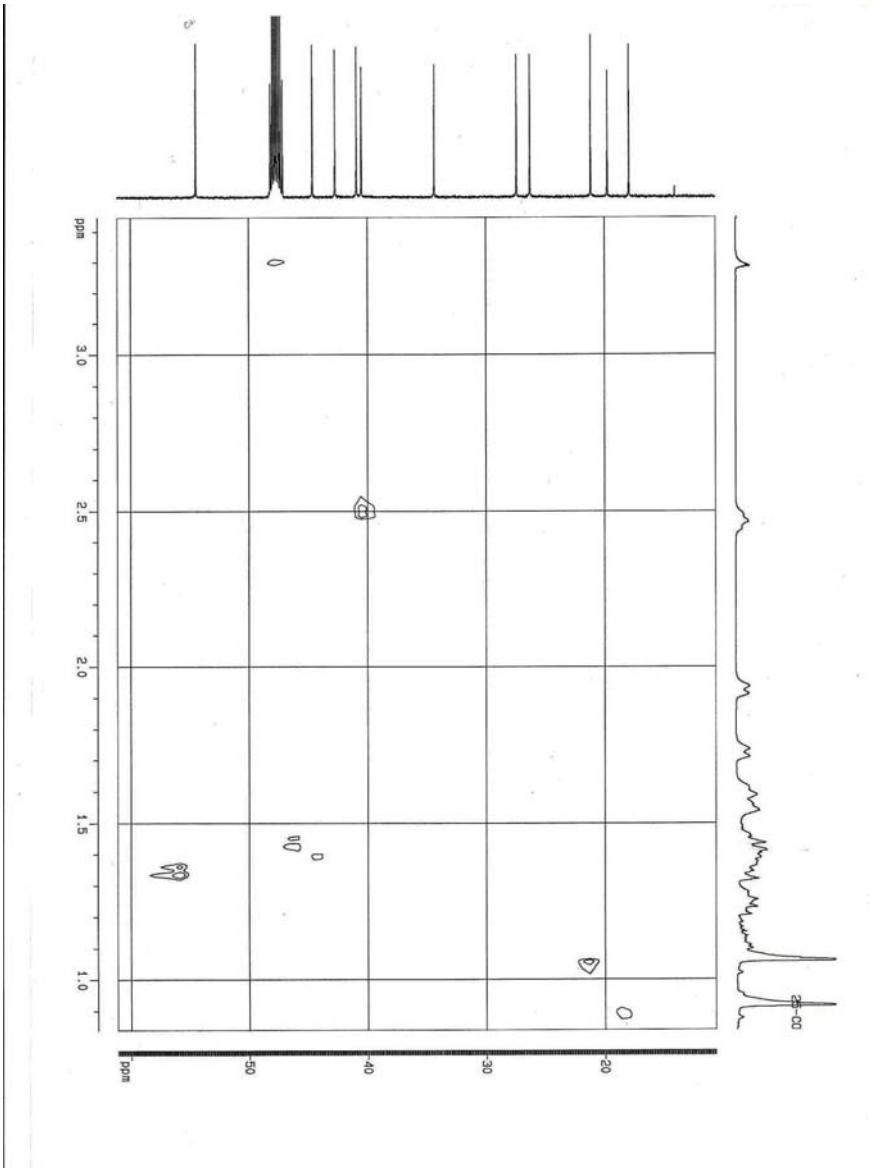
شکل ۷- طیف ^{13}C NMR ترکیب ۲



شکل ۸- طیف DEPT۱۳۵ ترکیب ۲



شکل ۹- طیف H,H-COSY ترکیب ۲



شکل ۱۰- طیف C,H-COSY ترکیب شماره ۲

منابع مورد استفاده

- مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران. ٦٧٠ صفحه.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Suzuki, T., Enjo, F., Koike, K., Nikaido, T. and Nishino, H., 2004. 3-Epicabrleahydroxylactone and other triterpenoids from *Camellia* oil and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. Chemical & Pharmaceutical Bulletin., 52: 153-156.
- Anjaneyulu, V., Harischandra Prasad, K., Ravi, K. and Connolly, J.D., 1985. Triterpenoides from *Mangifera indica*. Phytochemistry, 24: 2359-2367.
- Bohlmann, F., Singh, P., Robinson, H. and King, R., 1982. *epi*-ilicic acid from *Alcantara ekmaniana*. Phytochemistry, 21: 456-457.
- Hernandez, V., Carmen recio, M., Manez, S., Prieto, J.M., Giner, R.M. and Rios, J.L., 2001. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. Planta Medica, 67: 726-731.
- Herz, W. and Watanabe, K., 1983. Sesquiterpene alcohols and triterpenoids from *Liatris microcephala*. Phytochemistry, 22: 1457-1459.
- Herz, W., Chikamatsu, H. and Tether, L.R., 1965. Constituents of *Ambrosia ilicifolia* (Gray) Payne. Journal of Organic Chemistry, 31: 1632-1634.

Investigation of chemical constituents of essential oil and chloroform extract of *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f.

Z. Habibi[1*] and M. Yousefi[2]

1*- Corresponding author, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, E-mail: Z_Habibi@sbu.ac.ir
2- Ph.D. Student, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: October 2008 Revised: March 2009 Accepted: May 2009

Abstract

The chemical constituents of essential oil and the extract of *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f. were investigated. The oil of the aerial parts was obtained with hydrodistillation by Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Twenty-seven compounds, representing 70.9% of oil were identified. The main constituents were (E)-nuciferol (10.4%), geranyl-n-propionate (6.4%) and (*Z*)-lanceol acetate(4.7%). The chloroform extract of *C. stenocalathium* yielded two known compounds as pseudotaraxasterol acetate and ilicic acid. The structures of these natural products were elucidated by using ^{1}H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. The antibacterial activity of the crude extract was examined against three Gram-positive and three Gram-negative bacteria. The extract showed inhibitory effects on the growth of bacteria especially against *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* and *Escherichia coli.*

Key words: *Codonocephalum stenocalathium* Rech. f., essential oil, chloroform extract, antimicrobial effect.