

جداسازی و شناسایی استرول‌های طبیعی از گیاه اناریجه (*Pimpinella affinis*)یعقوب صراف<sup>۱\*</sup>، حسین دهقان<sup>۲</sup>، حدیث توحیدی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> بابلسر - دانشگاه مازندران - دانشکده شیمی - گروه شیمی آلی<sup>۲</sup> تهران - دانشگاه شاهد - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۷

تاریخ تصحیح: ۹۶/۰۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۰۵

## چکیده

در این پژوهش گیاه اناریجه (*P. affinis*) از منطقه دودانگه ساری واقع در استان مازندران جمع‌آوری و شناسایی شد. عصاره اتیل‌استاتی برگ این گیاه توسط روش کروماتوگرافی ستونی جزءبندی شد و در نهایت دو استرول گیاهی به نام بتا-سیتوسترول ( $\beta$ -sitosterol) و داکسترول (daucosterol) جداسازی و توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی (*EI-MS*) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته (*NMR*) شناسایی شدند. این دو ترکیب دارای خواص زیستی منحصر به فردی از جمله ضد *HIV*، ضد سرطان و ضد کلسترول بالای خون می‌باشند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده این است که می‌توان از گیاه اناریجه (*P. affinis*) به عنوان یکی از منابع استرول‌های گیاهی نام برد و از آنجا که این گیاه یک سبزی پرمصرف در نواحی شمالی کشورمان است، نتایج این تحقیق می‌تواند برای متخصصین علوم تغذیه مفید باشد.

کلمات کلیدی: اناریجه، *Pimpinella affinis*،  $\beta$ -sitosterol، daucosterol، جداسازی، شناسایی.

## ۱- مقدمه

اناریجه (*Pimpinella affinis*) گیاهی دو ساله با ارتفاع ۱۱۰-۲۰ سانتی‌متر، از خانواده چتریان (*Apiaceae*) و جنس *Pimpinella* می‌باشد. پراکندگی جغرافیایی این گونه در آناتولی، ایران، ترکمنستان، افغانستان، قفقاز و عراق است. در ایران در شمال، شمال غرب، مرکز، شرق و شمال شرق پراکنده است. جنس *Pimpinella* در ایران حدود ۲۳ گونه دارد [۱]. گونه‌های این جنس در مناطق مختلف اروپا، آسیا و از جمله ایران کاربردهای مختلفی دارند. برای مثال از گونه *P. anisum* به عنوان عامل خلط‌آور، ضد اسپاسم، افزایش‌دهنده شیر، ضد عفونی‌کننده، ضد نفخ و مدر در داروخانه‌ها و به عنوان افزودنی در صنایع نوشیدنی استفاده می‌شود. در فارماکوپه آلمان از *P. saxifraga* در داروهای خلط‌آور و افزایش‌دهنده ترشحات برونش استفاده می‌شود و در ترکیه از آن به عنوان یک داروی تسکین‌دهنده، خلط‌آور، ضد نفخ و مقوی نام می‌برند. گونه *P. major* در استرالیا به عنوان داروی ضد باکتری به فروش می‌رسد [۲-۴].

هدف از پژوهش حاضر، بررسی فیتوشیمیایی برگ‌های گیاه اناریچه (*Pimpinella affinis*) به عنوان یک سبزی پرمصرف در استان های شمالی ایران با جمعیتی بالغ بر ۸ میلیون نفر است. تحقیقات ما در منابع مختلف نشان می‌دهد که تا کنون هیچ گونه بررسی شیمیایی بر روی عصاره‌ها و ترکیبات غیرفرار این گونه صورت نپذیرفته است و با وجود این که ترکیبات زیادی از اندام‌های مختلف سایر گونه‌های جنس *Pimpinella* شناسایی شده‌اند و از این گونه‌ها در صنایع مختلف غذایی و دارویی دنیا استفاده می‌شود، این گونه بومی ایران همچنان ناشناخته مانده است. از این رو نتایج این پژوهش می‌تواند دارای موارد مفیدی برای شیمیدان‌ها، محققان علوم تغذیه و همچنین داروسازان باشد.

در این پژوهش به بررسی فیتوشیمیایی عصاره اتیل‌استاتی گیاه اناریچه به کمک روش‌های کروماتوگرافی ستونی<sup>۱</sup> و لایه نازک<sup>۲</sup> پرداخته شد و دو استرول گیاهی به نام‌های بتا-سیتوسترول<sup>۳</sup> و داکسترول<sup>۴</sup> جداسازی و توسط تکنیک‌های طیف-سنجی جرمی<sup>۵</sup> و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته<sup>۶</sup> شناسایی شدند. بتا-سیتوسترول یک استرول گیاهی و از دسته‌ی تری‌ترین‌های ۲۹ کربنه می‌باشد. این ترکیب مشتق اتیله شده‌ی کلسترول در موقعیت C-24 است. خواص ضد دیابتی، ضد سرطان روده بزرگ و سینه، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تب‌بری آن به اثبات رسیده است. همچنین این ترکیب در درمان بزرگی پروستات بسیار موثر است و موجب افزایش عملکرد سلول‌های T و عملکرد بهتر سیستم ایمنی می‌شود. مطالعه بر روی میکروزوم‌های کبدی نشان داد که بتا-سیتوسترول مانع از جذب کلسترول می‌شود و از عوارضی مانند سخت شدن رگ‌های خونی و سکت‌های مغزی جلوگیری می‌کند [۵]. داکسترول مشتق قندی بتا-سیتوسترول می‌باشد. این ترکیب با مهار آنزیم-های گلوکوزیدازی خواص ضد دیابتی منحصربه‌فردی از خود نشان می‌دهد و همچنین در درمان چند مرحله‌ای HIV با ثابت نگه داشتن میزان لنفوسیت‌های CD4 و تعدیل سیستم ایمنی نقش مهمی را ایفا می‌کند [۶].

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

در این پژوهش از حلال‌های نرمال هگزان، دی‌کلرومتان، کلروفرم، اتیل‌استات و متانول (تهیه شده از شرکت Merck)، محلول ۳ درصد معرف مولیبدات‌توفسفریک‌اسید هیدرات<sup>۷</sup> در اتانول (ساخت شرکت Sigma-Aldrich)، سیلیکاژل با مش ۷۰-۲۳۰ (تهیه شده از شرکت Merck) و TLC سیلیکاژل 60F<sub>254</sub> (تهیه شده از شرکت Merck) استفاده شد.

<sup>1</sup> Column chromatography

<sup>2</sup> Thin layer chromatography

<sup>3</sup>  $\beta$ -sitosterol

<sup>4</sup> Daucoesterol

<sup>5</sup> EI-MS

<sup>6</sup> NMR

<sup>7</sup> Phosphomolybdic acid hydrate

## ۲-۲- دستگاه‌ها

شناسایی ترکیبات به کمک دستگاه‌های تعیین نقطه ذوب (Electrothermal IA9000)، رزونانس مغناطیسی هسته Bruker Avance III (۴۰۰/۱۳) مگاهرتز برای  $^1\text{H}$  و ۱۰۰/۶۱ مگاهرتز برای  $^{13}\text{C}$  و دستگاه الکترونیوئیزاسیون-طیف‌سنج جرمی یا EI-MS (Agilent 5975C) انجام شد.

## ۲-۳- جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

برگ‌های تازه گیاه *Pimpinella affinis* در فروردین ماه سال ۱۳۹۱ از منطقه دودانگه ساری (استان مازندران) جمع‌آوری شد. سپس توسط بخش گیاه‌شناسی باغ گیاه‌شناسی نوشهر با شماره هرباریومی ۳۱۴۸ مورد تأیید قرار گرفت. پس از شستشو، گیاه توسط جریان هوای خشک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور خورشید خشک و جهت انجام فرایند عصاره‌گیری به صورت پودر درآورده شد.

## ۲-۴- عصاره‌گیری

در این پژوهش از روش غوطه‌ورسازی<sup>۱</sup> جهت به دست آوردن عصاره‌ی اتیل استاتی استفاده شد. بر این اساس جهت حذف ترکیبات روغنی و صمغی، ابتدا به ۲/۵ کیلوگرم از برگ گیاه خشک شده ۲۰ لیتر حلال نرمال هگزان اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. پس از جدا کردن حلال هگزان از گیاه توسط کاغذ صافی، باقی‌مانده گیاه توسط جریان هوای خشک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور خورشید خشک شد. در مرحله دوم جهت استحصال عصاره اتیل‌استاتی، ۲۰ لیتر حلال اتیل استات به گیاه اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت خیساندن، نمونه صاف و توسط تبخیرکننده دوار تحت فشار ۲۴۰ میلی‌بار تغلیظ شد. عملیات عصاره‌گیری در این مرحله نیز ۳ بار تکرار شد. در پایان این مرحله ۴۰ گرم عصاره اتیل‌استاتی (وزنی/وزنی ۱/۶٪) به دست آمد [۷-۹].

## ۲-۵- جزءبندی جداسازی ترکیبات عصاره اتیل‌استاتی

۴۰ گرم از عصاره اتیل‌استاتی گیاه اناریجه (*P. affinis*) به یک ستون کروماتوگرافی با طول ۷۰ و قطر ۵ سانتی‌متر (حاوی ۸۵۰ گرم سیلیکاژل با مش ۲۳۰-۷۰) انتقال داده شد. سیستم حلالی مناسب با آزمودن سیستم‌های حلالی مختلف (ترکیب درصدی مختلف هگزان: کلروفرم، هگزان: دی‌کلرومتان، هگزان: اتیل استات، دی‌کلرومتان: کلروفرم، دی‌کلرومتان: اتیل استات، دی‌کلرومتان: متانول، کلروفرم: اتیل استات، متانول) توسط تکنیک TLC جهت رسیدن به بهترین تفکیک ترکیبات عصاره اتیل‌استاتی تعیین شد. در نهایت با انتخاب سیستم حلالی هگزان: اتیل‌استات (۱:۲)، ستون به روش گرادیانی (با تغییر مستمر ترکیب درصد حلال شستشو) شسته شد. تجربه نشان داده است که شستشوی ستون کروماتوگرافی توسط سیستم حلالی ای با قطبیت کمتر از سیستم حلالی TLC سبب تفکیک بهتر ترکیبات آن خواهد شد. لذا

<sup>۱</sup> Maceration

سشتشوی ستون با هگزان ۱۰۰ درصد شروع شد. حلال در اثر جاذبه از ستون خارج شد و دبی آن توسط یک شیر تفلون تنظیم شد (۷ mL/min). به طور متوسط با هر ۱ لیتر شستشو ۵ درصد به نسبت اتیل استات اضافه می شد و افزایش درصد اتیل استات تا رسیدن به اتیل استات ۱۰۰ درصد ادامه داشت. سرانجام برای خروج کامل باقی مانده عصاره در ستون از حلال متانول استفاده شد. به طور متوسط هر ۱۳۵ میلی لیتر به عنوان یک جزء جدا شد. پس از شستشوی کامل ۱۴۹ جزء به دست آمد که با مقایسه آن‌ها توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و ادغام اجزاء مشابه، در نهایت ۲۹ جزء اصلی حاصل شد [۹]. در مجموع ستون توسط ۲۰ لیتر حلال شستشو داده شد. به طور کلی در طول جزءبندی عصاره اتیل استاتی ۱۳ لیتر حلال مصرف شد. جدول ۱ نسبت حلال‌های به کارگرفته شده برای شستشوی ستون و شماره اجزاء حاصله را نشان می دهد.

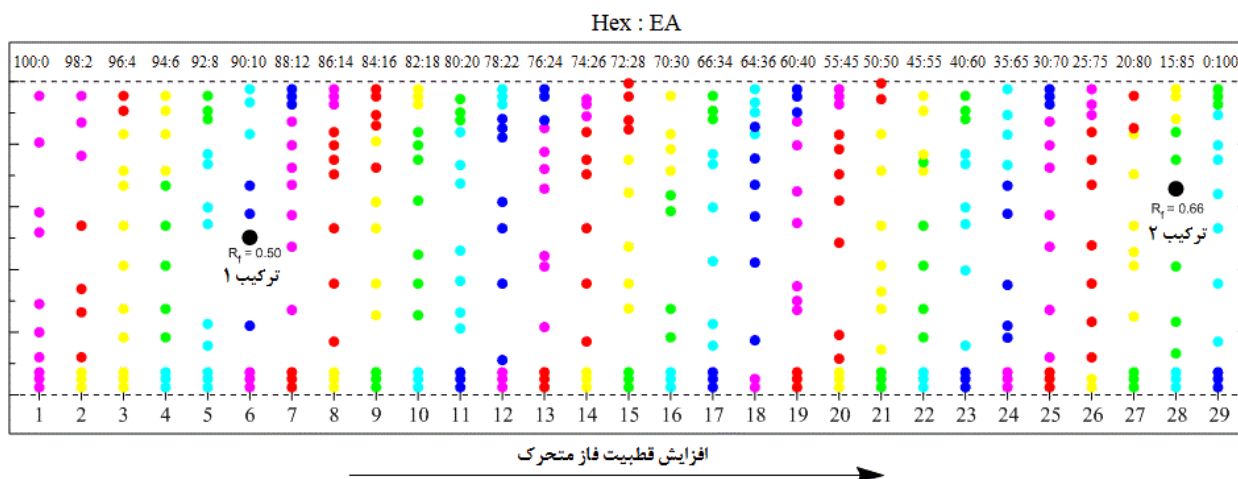
جدول ۱. نسبت حلال‌های مورد استفاده جهت شستشو و جزء های به دست آمده از ستون اول

درصد حلال شستشو (هگزان: اتیل استات)	شماره جزء اولیه	جزء نهایی	درصد حلال شستشو (هگزان: اتیل استات)	شماره جزء اولیه	جزء نهایی
۶۵-۳۵	۵۹-۶۲	F۱۹	۰-۱۰۰	۱	F۱
۶۵-۳۵	۶۳-۷۰	F۲۰	۹۵-۵	۲-۵	
۶۵-۳۵	۶۷	F۲۱	۹۵-۵	۶-۹	F۲
۶۵-۳۵	۶۸	F۲۲	۹۵-۵	۱۰-۱۲	F۳
۶۰-۴۰	۶۹	F۲۳	۹۵-۵	۱۳-۱۵	F۴
۷۰-۳۰	۷۰-۷۱	F۲۴	۹۰-۱۰	۱۶	F۵
۶۵-۳۵	۷۲-۸۵		۹۰-۱۰	۱۷	F۶
۶۰-۴۰	۸۶-۸۷		۹۰-۱۰	۱۸-۱۹	F۷
۵۵-۴۵	۸۸-۹۲		۹۰-۱۰	۲۰	F۸
۵۵-۴۵	۹۲-۱۰۴	F۲۵	۹۰-۱۰	۲۱	F۹
۵۰-۵۰	۱۰۵-۱۱۲		۹۰-۱۰	۲۲	F۱۰
۵۰-۵۰	۱۱۳-۱۱۷	F۲۶	۹۰-۱۰	۲۳	F۱۱
۴۵-۵۵	۱۱۸-۱۲۱		۹۰-۱۰	۲۴	F۱۲
۴۰-۶۰	۱۲۲		۹۰-۱۰	۲۵-۲۶	F۱۳
۴۰-۶۰	۱۲۳-۱۲۷	F۲۷	۹۰-۱۰	۲۷-۲۸	F۱۴
۳۵-۶۵	۱۲۸-۱۳۲		۸۵-۱۵	۲۹-۳۵	
۳۰-۷۰	۱۳۳	F۲۸	۸۵-۱۵	۳۶-۳۷	F۱۵
۲۵-۷۵	۱۳۴-۱۳۵		۸۰-۲۰	۳۸-۴۰	
۲۵-۷۵	۱۳۶-۱۳۸	F۲۹	۸۰-۲۰	۴۱-۴۲	F۱۶
۲۰-۸۰	۱۳۹-۱۴۱		۸۰-۲۰	۴۳-۴۵	F۱۷
۱۰-۹۰	۱۴۲-۱۴۴		۷۵-۲۵	۴۶-۵۳	
۰-۱۰۰	۱۴۵-۱۴۷		۷۰-۳۰	۵۴-۵۵	
متانول	۱۴۸-۱۴۹		۷۰-۳۰	۵۶-۵۸	F۱۸

از میان ۲۹ جزء به دست آمده از عصاره‌ی اتیل‌استاتی، جزء ۶ به دلیل تفکیک بهتر ترکیبات آن در TLC (دارای ۶ جزء با  $R_f$  های ۰،۰۲۴، ۰،۰۵، ۰،۰۶، ۰،۰۷، ۰،۰۸۵، ۰،۰۹۴ و ۰،۰۹۷) و همچنین وجود رسوب بسیار جزئی در آن، برای جداسازی مجدد انتخاب شد. مقدار ۰،۰۵ گرم از جزء ۱۷ به یک ستون کروماتوگرافی با طول ۵۰ و قطر ۲ سانتی متر (حاوی ۳۰ گرم سیلیکاژل با مش ۷۰-۲۳۰) انتقال داده شد و توسط سیستم حلالی هگزان: کلروفرم به روش گرادیانی (با تغییر مستمر ترکیب درصد حلال شستشو) شسته شد. جهت تفکیک مطلوب تر ترکیبات، شستشوی ستون با هگزان ۱۰۰ درصد شروع شد. حلال در اثر جاذبه از ستون خارج شد و دبی آن توسط یک شیر تفلون تنظیم شد (۵ mL/min). به طور متوسط با هر ۲۰۰ میلی لیتر شستشو ۵ درصد به نسبت کلروفرم اضافه شد و افزایش درصد کلروفرم تا رسیدن به کلروفرم ۱۰۰ درصد ادامه پیدا کرد. به طور متوسط هر ۱۰۰ میلی لیتر به عنوان یک جزء جدا شد. پس از شستشوی کامل ۲۲ جزء به دست آمد که با مقایسه آن‌ها توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و ادغام اجزاء مشابه، در نهایت ۷ جزء اصلی حاصل شد. در مجموع ستون توسط ۲۰۲ لیتر حلال شستشو داده شد. جدول ۱ نسبت حلال‌های بکارگرفته شده برای شستشوی ستون و شماره اجزاء حاصله را نشان می دهد. همچنین شکل ۱ موقعیت ترکیبات بر روی صفحات TLC را نشان می دهد. با توجه به این شکل با افزایش شماره جزء‌های به دست آمده، قطبیت ترکیبات آن‌ها بیشتر شده و بنابراین جهت جداسازی مطلوب، قطبیت و ترکیب درصد فاز متحرک برای هر جزء تغییر می کند.

جدول ۲. نسبت حلال‌های مورد استفاده جهت شستشو و جزء های به دست آمده از ستون دوم

درصد حلال شستشو (هگزان-کلروفرم)	شماره جزء اولیه	جزء نهایی	درصد حلال شستشو (هگزان-کلروفرم)	شماره جزء اولیه	جزء نهایی
۵۵-۴۵	۱۲	F۵	۳۰-۷۰	۲-۱	F۱
۶۰-۴۰	۱۴-۱۳		۳۵-۶۵	۳	F۲
۶۵-۳۵	۱۵	F۶	۳۵-۶۵	۴	F۳
۷۰-۳۰	۱۶		۴۰-۶۰	۶-۵	
۷۵-۲۵	۱۸-۱۷		۴۵-۵۵	۸-۷	
۸۰-۲۰	۲۰-۱۹	F۷	۵۰-۵۰	۱۰-۹	F۴
۸۵-۱۵	۲۲-۲۰		۵۵-۴۵	۱۱	



شکل ۱. موقعیت ترکیبات ۲۹ جزء به دست آمده از ستون اول بر روی صفحات TLC

در نهایت ترکیب ۱ به صورت رسوبی سفید رنگ از جزء ۲ ستون کروماتوگرافی دوم خالص و جهت شناسایی توسط تکنیک NMR آماده شد. این ترکیب فاقد جذب در طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر بود و با معرف مولیبداتوفسفریک اسید لکه‌ای سرمه‌ای رنگ ایجاد کرد. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۱۳۶-۱۳۳ درجه سانتی‌گراد بود و طیف جرمی آن نشان‌دهنده جرم مولکولی ۴۱۴/۴ می‌باشد. طیف NMR (کربن و پروتون) این ترکیب در حلال  $CDCl_3$  گرفته شد.

ترکیب ۲ توسط شستشو به وسیله حلال‌های مختلف، به صورت رسوبی سفید رنگ از جزء ۲۸ ستون کروماتوگرافی اول خالص و جهت شناسایی توسط تکنیک NMR آماده شد. این ترکیب فاقد جذب در طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر بود و وجود آن توسط معرف مولیبداتوفسفریک‌اسید تعیین شد. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۲۸۷-۲۸۵ درجه سانتی‌گراد بود و طیف جرمی آن نشان‌دهنده جرم مولکولی ۵۷۶/۵ می‌باشد. طیف NMR (کربن و پروتون) این ترکیب در حلال  $DMSO-d_6$  گرفته شد.

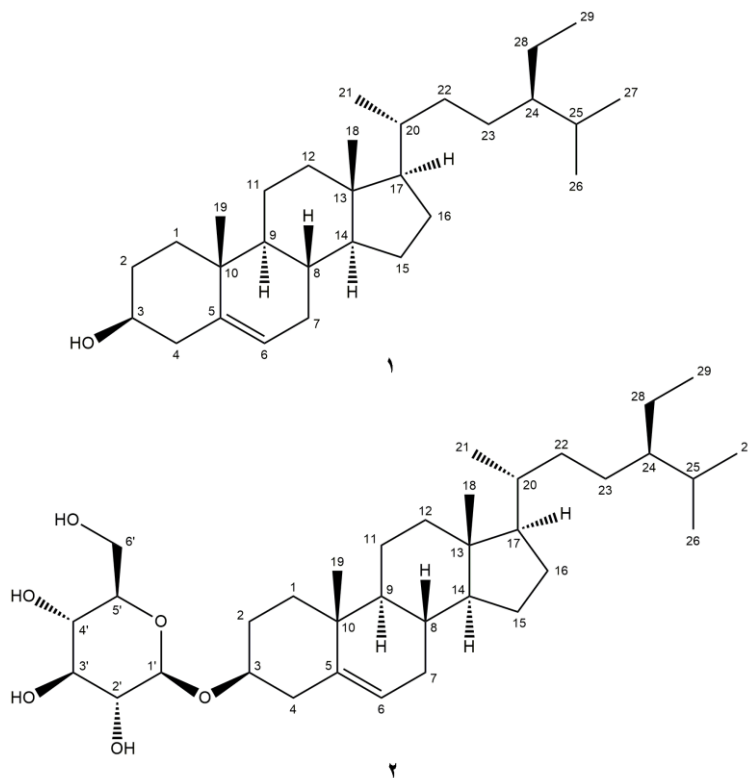
### ۳- نتایج و بحث

عصاره اتیل‌استاتی برگ گیاه اناریجه (*P. affinis*) توسط روش خیساندن با بهره وزنی/ وزنی ۱/۶ درصد به دست آمد و اجزای آن به کمک روش‌های کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک تفکیک شد و در نهایت دو ترکیب ۱ و ۲ به ترتیب از جزء‌های ۱۷ و ۲۸ به دست آمدند.

ترکیب ۱ به صورت رسوبی سفید رنگ از جزء ۱۷ عصاره اتیل‌استاتی خالص شد و به خوبی در کلروفرم قابل حل می‌باشد. این ترکیب فاقد جذب در طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ می‌باشد و با معرف مولیبداتوفسفریک‌اسید لکه‌ای سرمه‌ای رنگ ایجاد می‌کند. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۱۳۶-۱۳۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. طیف جرمی این ترکیب جرم مولکولی ۴۱۴/۴ را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آنالیز طیف‌های  $^1H$ NMR و  $^{13}C$ NMR این ترکیب (در حلال  $CDCl_3$ ) حاکی از وجود یک استرول گیاهی به نام بتا-سیتوسترول (شکل ۲) است که با گزارش‌های موجود در منابع کاملاً مطابق است [۱۰]. در طیف  $^1H$ NMR

سیگنال یک پروتون اولفینی به صورت یکتایی و پهن در ppm ۵/۳۶ و یک چندتایی در ppm ۳/۵۴ مشخص هستند. تعدادی گروه متیل در فاصله ۰/۷ تا ppm ۱/۱ دیده می‌شود که دو تای آن‌ها یکتایی و بقیه دوتایی یا سه‌تایی هستند. در طیف  $^{13}\text{CNMR}$  ۲۹ سیگنال وجود دارد. سیگنال‌های متعلق به یک پیوند دوگانه‌ی سه استخلافی در ppm ۱۲۱/۷ و ppm ۱۴۰/۷ وجود دارد. یک سیگنال در ppm ۷۱/۸ دال بر حضور یک کربن متصل به اکسیژن است. سایر سیگنال‌ها به همراه کربن مربوط به آن‌ها در جدول ۱ مشخص شده‌اند. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۱۳۶-۱۳۳ درجه سانتی‌گراد بود و طیف جرمی آن نشان‌دهنده جرم مولکولی ۴۱۴/۴ است که مطابق با طیف جرمی بتا-سیتوسترول می‌باشد. در نهایت با مقایسه فاکتور بازداری ( $R_f$ ) ترکیب ۱ با نمونه استاندارد بتا-سیتوسترول به روش کروماتوگرافی لایه نازک (با سه فاز ساکن متفاوت هگزان: دی کلرومتان ۱:۲ ( $R_f=0/50$ ), هگزان: کلروفرم ۱:۶ ( $R_f=0/41$ ) و هگزان: اتیل استات ۱:۸ ( $R_f=0/73$ )) ساختار این ترکیب اثبات شد.

ترکیب ۲ به صورت رسوب سفید رنگ از جزء ۲۸ به دست آمد. این ترکیب در حلال DMSO و مخلوط کلروفرم:متانول قابل حل است. این ترکیب فاقد جذب در طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر می‌باشد و وجود آن توسط معرف مولیبداتوفسفریک اسید تایید شد. نقطه ذوب آن ۲۸۷-۲۸۵ درجه سانتی‌گراد است. طیف جرمی این ترکیب جرم مولکولی ۵۷۶/۵ را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آنالیز طیف‌های  $^1\text{HNMR}$  و  $^{13}\text{CNMR}$  این ترکیب (در حلال DMSO- $d_6$ ) حاکی از وجود یک استرول قندی به نام داکسترول است که با گزارش‌های موجود در منابع کاملاً مطابق است (شکل ۲) [۱۱، ۱۲]. در طیف  $^1\text{HNMR}$  پیک مربوط به پروتون اولفینی C6-H در میدان پایین تر و در موقعیت ppm ۳/۴۶ دیده می‌شود. پروتون آنومری C1'-H نیز به شکل یک سیگنال دوتایی در موقعیت ppm ۴/۲۲ مشاهده می‌گردد. سایر پروتون‌های بخش قندی و پروتون C3-H به دلیل اتصال به اکسیژن در ناحیه ppm ۳/۷-۲/۸ ظاهر شدند. در طیف  $^{13}\text{CNMR}$  ۳۵ سیگنال وجود دارد که دو سیگنال مربوط به کربن‌های اولفینی (۱۲۱/۷ و ppm ۱۴۰/۹) در میدان پایین دیده می‌شوند. سیگنال مربوط به کربن آنومری در ppm ۱۰۱/۳ و سیگنال سایر کربن‌های قندی بین ۴/۵ تا ppm ۵/۶ ظاهر گردیدند. سایر سیگنال‌ها بین ۶/۶ و ppm ۱/۱ مشاهده شدند که مشخصات تمامی آن‌ها در جدول ۳ موجود است. این ترکیب دارای نقطه ذوب ۲۸۷-۲۸۵ درجه سانتی‌گراد بود و طیف جرمی آن نشان‌دهنده جرم مولکولی ۵۷۶/۵ می‌باشد. در نهایت با مقایسه فاکتور بازداری ( $R_f$ ) ترکیب ۲ با نمونه استاندارد داکسترول به روش کروماتوگرافی لایه نازک (با سه فاز ساکن متفاوت کلروفرم: متانول ۱:۲ به همراه یک قطره فرمیک اسید ( $R_f=0/66$ ), اتیل استات به همراه ۱ قطره فرمیک اسید ( $R_f=0/43$ ) و اتیل استات: متانول ۱:۶ ( $R_f=0/3$ )) ساختار این ترکیب اثبات شد.

شکل ۲. ساختار استرول‌های استخراج شده از عصاره اتیل استاتی برگ اناریجه (*P. affinis*)

جدول ۳ داده‌های طیف سنجی  $^1\text{H}$ NMR و  $^{13}\text{C}$ NMR دو ترکیب بتا- سیتوسترول (در  $\text{CDCl}_3$ ) و داکسترول (در  $\text{DMSO-d}_6$ )

را نشان می‌دهد.

جدول ۳. داده‌های طیف سنجی  $^1\text{H}$ NMR و  $^{13}\text{C}$ NMR ترکیب ۱ و ۲

ترکیب ۲ (داکسترول)		ترکیب ۱ (بتا- سیتوسترول)		موقعیت
جابجایی شیمیایی کربن	جابجایی شیمیایی پروتون ( $J$ )	جابجایی شیمیایی کربن	جابجایی شیمیایی پروتون ( $J$ )	
۳۷/۳	۱/۸۰ و ۰/۹۹	۳۷/۲	۱/۸۴ و ۰/۹۸	۱
۲۹/۷	۲/۱۴ و ۱/۷۸	۳۱/۶	۲/۲۸ و ۱/۶۸	۲
۷۷/۲	۳/۴۶	۷۱/۸	۳/۵۴	۳
۳۸/۸	۲/۶۰ و ۲/۳۷	۴۲/۳	۲/۲۴ و ۲/۰۴	۴
۱۴۰/۹	-	۱۴۰/۷	-	۵
۱۲۱/۷	۵/۳۳	۱۲۱/۷	۵/۳۶	۶
۳۱/۸	۱/۹۰ و ۱/۵۴	۳۱/۹	۱/۹۰ و ۱/۵۱	۷
۳۱/۹	۱/۳۸	۳۱/۹	۱/۲۷	۸
۵۰/۰	۰/۹۰	۵۰/۱	۰/۹۳	۹
۳۶/۷	-	۳۶/۵	-	۱۰
۲۱/۰	۱/۴۶	۲۱/۱	۱/۴۶	۱۱
۴۰/۰	۲/۱۲ و ۱/۱۴	۳۹/۸	۲/۰۱ و ۱/۱۳	۱۲
۴۲/۳	-	۴۲/۳	-	۱۳
۵۶/۶	۰/۹۰	۵۶/۸	۰/۹۶	۱۴
۲۴/۳	۱/۳۳	۲۴/۳	۱/۳۰	۱۵



ترکیب ۲ (داکسترول)		ترکیب ۱ (بتا-سیتوسترول)		موقعیت
جایابی شیمیایی کربن	جایابی شیمیایی پروتون (J)	جایابی شیمیایی کربن	جایابی شیمیایی پروتون (J)	
۲۸/۳	۱/۲۲ و ۱/۸۱	۲۸/۲	۱/۲۳ و ۱/۷۰	۱۶
۵۵/۹	۱/۱۰	۵۶/۰	۱/۱۷	۱۷
۱۲/۱	۰/۶۵ یکتایی	۱۱/۹	۰/۶۹ یکتایی	۱۸
۱۹/۶	۰/۹۶ یکتایی	۱۹/۴	۱/۰۲ یکتایی	۱۹
۳۶/۰	۱/۴۱	۳۶/۱	۱/۴۵	۲۰
۱۹/۱	۰/۹۰ دوتایی (۶/۴)	۱۸/۸	۰/۹۳ دوتایی (۶/۸)	۲۱
۳۳/۸	۱/۵۰ و ۱/۱۶	۳۳/۹	۱/۵۴ و ۱/۱۷	۲۲
۲۵/۹	۱/۲۶	۲۶/۰	۱/۲۸	۲۳
۴۵/۶	۱/۰۲	۴۵/۸	۱/۰۵	۲۴
۲۹/۲	۱/۶۳	۲۹/۱	۱/۶۷	۲۵
۲۰/۲	۰/۸۱ دوتایی (۶/۴)	۱۹/۸	۰/۸۳ دوتایی (۶/۸)	۲۶
۱۹/۴	۰/۸۱ دوتایی (۶/۴)	۱۹/۰	۰/۸۵ دوتایی (۶/۸)	۲۷
۲۳/۰	۱/۵۲ و ۱/۰۵	۲۳/۰	۱/۵۸ و ۱/۱۰	۲۸
۱۲/۲	۰/۸۰	۱۲/۰	۰/۸۸	۲۹
۱۰/۱/۳	۴/۲۲ دوتایی (۸/۰)	-	-	۱'
۷۳/۹	۳/۰۴	-	-	۲'
۷۷/۴	۳/۱۱	-	-	۳'
۷۰/۵	۳/۰۶	-	-	۴'
۷۷/۲	۲/۹۰	-	-	۵'
۶۱/۵	۳/۶۳ دودوتایی (۱۰/۰ و ۵/۲) و ۳/۴۱	-	-	۶'

#### ۴- نتیجه گیری

دو ترکیب طبیعی با نام‌های بتا-سیتوسترول و داکسترول که دارای خواص بیولوژیکی منحصر به فردی می‌باشند از عصاره ایل‌استاتی گیاه اناریجه (*p. affinis*) خالص سازی و شناسایی شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده این است که می‌توان از گیاه اناریجه (*p. affinis*) به‌عنوان یکی از منابع استرول‌های گیاهی نام برد و از آنجا که این گیاه یک سبزی پرمصرف در نواحی شمالی کشورمان است، نتایج این تحقیق می‌تواند برای متخصصین علوم تغذیه مفید باشد.

#### ۵- مراجع

- [1] V. Mozaffarian, Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran, Farhang Moaser, Iran, 2012.
- [2] N. Tabanca, E. Bedir, D. Ferreira, D. Slade, D.E. Wedge, M.R. Jacob, S.I. Khan, N. Kirimer, K. Husnu Can Baser, I.A. Khan, *Chem. Biodivers.*, **2** (2005) 221.
- [3] H. Kermanshahi, Hashemi Kamangar, S. Arami, Mirsalehian, M. Kamalinegad, Karimi, F. Jabalameli, *J. Babol Uni. Med. Sci.*, **13** (2011) 21.

- [4] W. Kisiel, Z. Janeczko, M. Zgud-Walaszek, *Phytochemistry*, **49** (1998) 2031.
- [5] A. Sen, P. Dhavan, K.K. Shukla, S. Singh, G. Tejovathi, *Sci. Sec. J. Biotech.*, **1** (2013) 9.
- [6] Z. Sheng, H. Dai, S. Pan, H. Wang, Y. Hu, W. Ma, *Molecules*, **19** (2014) 10563.
- [7] H. Dehghan, Y. Sarrafi, P. Salehi, *J. Food Drug. Anal.*, **24** (2016) 179.
- [8] Čanadanović- Brunet, M. Jasna, M.D. Sonja, S.Ć. Gordana, T.T. Vesna, I.M. Anamarija, M.Č. Vladimir, *Int. J. Food Sci. Tech.*, **41** (2006) 667.
- [9] M. Moridi Farimani, M.B. Bahadori, S. Taheri, S.N. Ebrahimi, S. Zimmermann, R. Brun, G. Amin, M. Hamburger, *J. Nat. prod.*, **74** (2011) 2200.
- [10] U.U. Pateh, A.K. Haruna, M. Garba, I. Iliya, I.M. Sule, M.S. Abubakar, A.A. Ambi, *Niger. J. Pharm. Sci.*, **8** (2009) 19.
- [11] V.U. Ahmad, A. Basha, *Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Springer Science & Business Media*, **5** (2010).
- [12] A. Paulo, M.L. Jimeno, E.T. Gomes, P.J. Houghton, *Phytochemistry*, **53** (2000) 417.