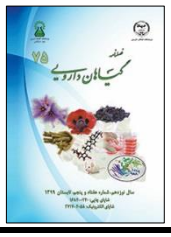
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۵): ۲۳۹-۲۵۳

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)

عماد نظریان‌پور، صمد نژاد ابراهیمی*

گروه فیتوشیمی، پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
آویشن شیرازی
بررسی فیتوشیمیایی
فلاونوئید
رزمارینیک اسید

چکیده

مقدمه: آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Boiss. گیاهی متعلق به خانواده‌ی نعناعیان است. این گیاه تنها در مناطق مرکزی و جنوبی ایران، قسمت‌هایی از پاکستان و افغانستان می‌روید. از این گیاه دارویی به عنوان چاشنی در بسیاری از غذاها در ایران استفاده می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است. گیاه *Zataria multiflora* دارای اثرات افزایش قدرت ایمنی، ضددرد، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدویروسی، ضدعفونی‌کننده و ضدقارچی است و نیز به طور گسترده‌ای در طب سنتی به عنوان داروی ضددرد، ضداسهال، برای درمان بیماری‌های عفونی و مشکلات گوارشی استفاده می‌شود. **هدف:** بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی آویشن شیرازی به کمک تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی و اسپکتروسکوپی می باشد. **روش بررسی:** در این تحقیق اجزای اصلی تشکیل‌دهنده عصاره متانولی آویشن شیرازی به روش کروماتوگرافی ستونی فاز نرمال و کروماتوگرافی نیمه تهیه‌ای فاز معکوس C18 به روش HPLC جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شد. **نتایج:** سه فلاونوئید گلیکوزید به نام‌های آپی ژنین-۷-O-گلیکوزاید (۱)، لوتئولین-۷-O-گلیکوپیروناید (۲) و لوتئولین-۷-O-روتینوزاید (۳) شناسایی شد ساختار آنها توسط مطالعات اسپکتروسکوپی NMR یک بعدی و دوبعدی نظیر ^{1}H-^{1}H-COSY، HSQC و HMBC تعیین شده است. همچنین سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولئانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶) با بررسی طیف جرمی و الگوی شکست آنها شناسایی شدند. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان می‌دهد که گیاه آویشن شیرازی منبع غنی از اجزا پلی فنولی و ترپنوئیدی می‌باشد.

۱. مقدمه

Zataria multiflora Boiss. با نام آویشن شیرازی گیاهی متعلق به خانواده‌ی نعناعیان است. در طب سنتی ایران گیاه آویشن شیرازی با نام ساتار یا زاتار شناخته شده است و یکی از منابع پرکاربرد و مؤثر برای درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی است [۱]. تاکنون مطالعات زیادی بر روی خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس این گیاه صورت گرفته است که نتایج این مطالعات نشان داد که خاصیت

مخففها: ELSD، دکتور پراکندگی نور تبخیری؛ HMBC، همبستگی چند باند ناجور هسته؛ HSQC، انسجام تک کوانتومی ناجور هسته

* نویسنده مسؤول: s_ebrahimi@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴ مرداد ۱۳۹۸؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۹ مرداد ۱۳۹۹؛ **تاریخ پذیرش:** ۱ شهریور ۱۳۹۹

doi: 10.29252/jmp.19.75.239

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]

[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

ضدقارچی آن تنها محدود به گونه‌های قارچ کاندیدا و *Malassezia* بوده است. در طب سنتی ایران از جوشاندن این گیاه به عنوان ضددرد، ضدعفونی‌کننده [۲]، ضدنفخ، ضد انگل و ضداسهال یاد شده است [۳]. مطالعات فارماکولوژیک نشان داده که عصاره‌ی آویشن شیرازی قادر است تا سرفه‌های ناشی از سرما خوردگی برونشیت را درمان و به عنوان ضد باکتری در بهداشت دهان و دندان توسط پزشکان طب سنتی تجویز می‌شود [۴] این گیاه با رایحه‌ی مطبوع و به عنوان طعم‌دهنده و چاشنی برای ماست و بسیاری از غذای فوری و در تهیه بسیاری از غذاهای محلی ایرانی کاربرد فراوانی دارد [۵] مطالعات صورت گرفته بروی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی نشان داد که اسانس آن حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات مونوترپنی مانند تیمول، کارواکرول، لینالول، گاما ترپینن وپاراسایمن بوده است [۶]. گزارش‌های اخیر بر روی این گیاه ثابت کرد که اسانس آن دارای خواص ضدانگلی و ضدقارچی بوده است و داروی ارزشمندی برای درمان کیست به شمار می‌رود. اخیرا در سال ۲۰۱۸ بوسکابادی و همکارانش اثرات ضدالتهابی وآنتی‌اکسیدانت اسانس این گیاه را گزارش و مؤثر بودن اسانس این گیاه در بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن را به اثبات رسانیده‌اند [۷]. با توجه به کاربرد گسترده‌ی این گیاه در طب سنتی ایران ضرورت مطالعات بیشتر فیتوشیمیایی بر روی آن به شدت احساس می‌شود. در ادامه تحقیقات ما با هدف جداسازی وخالص‌سازی وتعیین‌ساختار متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهان دارویی در این پژوهش به بررسی فیتوشیمیایی عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی پرداخته شد. این تحقیقات منجر به جداسازی و تعیین ساختار سه فلاونوئید گلیکوزید از عصاره‌ی متانولی این گیاه شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه‌ی نمونه

اندام هوایی گیاه آویشن شیرازی از رویشگاه طبیعی آن در یزد جمع‌آوری شد. گیاه جمع‌آوری شده توسط دکتر علی سنبلی (عضو هیأت علمی دانشگاه شهید بهشتی) شناسایی و نمونه‌ی هرباریومی آن در هرباریوم پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی ثبت شد. گیاه در معرض هوا و سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر شد.

۲.۲. مواد شیمیایی

حلال‌های آلی مانند: هگزان، متانول، اتیل استات، دی‌کلرومتان و همچنین اقلام مصرفی نظیر سیلیکاژل ستون کروماتوگرافی (Silica gel 60 ۰/۲۰۰–۰/۰۶۳ میلی متر) و صفحات کروماتوگرافی لایه نازک سیلیکاژل $60F_{254}$ (Merck, Darmstadt, Germany) و متانول خالص با درجه HPLC از شرکت مرک خریداری شدند. رزین Diaion-HP20 مخصوص کروماتوگرافی از شرکت ساپلکو آمریکا تهیه شد. حلال‌های دوتره ساخت شرکت Armar سوئیس بودند.

۳.۲. وسایل و دستگاه‌ها

به منظور تغلیظ عصاره، از دستگاه تبخیرکننده‌ی دوار در خلاء شرکت Heidolph آلمان استفاده شد. جهت جداسازی مواد، از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل فاز نرمال و تکنیک semi preparative-HPLC توسط دستگاه HPLC مدل K-1001 به همراه شیر تزریق با لوپ ۱۰۰ µl مدل D-14163، مجهز به آشکارساز PDA مدل K-2800، همگی ساخت شرکت Knauer آلمان و ستون‌های SunFire™ C18 (5µm, 19×50mm) و SunFire™ C18 (3.5µm, 3×150 mm) از شرکت Waters آمریکا مورد استفاده قرار شد. برای جداسازی ترکیبات به روش

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

کروماتوگرافی لایه نازک تهیه‌ای (Preparative Thin Layer Chromatography) از صفحه‌های کرماتوگرافی لایه نازک به ابعاد ۲۰ × ۲۰ سانتی‌متر و ضخامت ۱۰۰۰ میکرومتر و دارای جاذب F-254 استفاده شد. برای طیف گیری NMR ترکیبات، از دستگاه ۵۰۰ MHz بروکر آوانس III (Bruker Avance III 500 MHz spectrometer) با میکروپروب TXI ۱ mm ۱ درمیدان مغناطیسی ۵۰۰/۱۳ MHz برای ^{1}H و در میدان مغناطیسی ۱۲۵/۷ MHz برای ^{13}C سازماندهی شده بود، استفاده شد. آنالیزهای کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا متصل به اسپکترومتری جرمی توسط دستگاه LC-MS (8030) شامل پمپ دوتایی (ADLC-20) تنظیم‌کننده گرمایی ستون (CT0-20AC)، آشکارساز فوتودی یود (SDP-M20A) و سیستم کنترولر (CBM-20A) متصل به منفذ یونیزاسیون (Electrospray) مجهز به تفکیک‌کننده های یون چهارقطبی سه تایی متوالی (Triple Quadrupole) ساخت شرکت Shimadzu انجام گرفت. برای به دست آوردن طیف‌ها و آنالیز آنها پردازشگر LabSolution (Shimadzu)مورد استفاده قرار گرفت.

۴.۲. عصاره‌گیری

مقدار ۵۰۰ گرم اندام هوایی گیاه آویشن شیرازی خشک شده، توسط دستگاه خردکن خانگی آسیاب و برای عصاره گیری آماده شد. عصاره‌گیری توسط حلال هگزان در ابتدا سپس توسط حلال اتیل استات و درنهایت توسط حلال متانول صورت گرفت. عصاره‌گیری با استفاده از هر حلال در هفت مرحله و هر بار با استفاده از ۲ لیتر حلال انجام گرفت. سپس حلال آن بوسیله دستگاه تبخیرکننده دوار تحت شرایط خلاء و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و عصاره حاصل برای مراحل بعدی جمع‌آوری شد. طی این مراحل ۲۱ گرم عصاره هگزانی، ۶ گرم عصاره اتیل استاتی، ۱۴ گرم عصاره متانولی به دست آمد.

۵.۲. پروفایل فیتوشیمیایی عصاره متانولی توسط HPLC-PDA-MS-ELSD

پروفایل فیتوشیمیایی مواد تشکیل‌دهنده عصاره متانولی آویشن شیرازی به کمک HPLC مجهز به دتکتور ماورابنفش (Photodiode Array Detector) PDA و طیف سنجی جرمی (MS) و آشکارساز پراکندگی نور تبخیری (Evaporative Light Scattering Detector (ELSD ثبت شد. شرایط دستگاه اسپکترومتری جرمی به صورت ESI مثبت–منفی همزمان، ولتاژ موئینه 4.5 V، دمای موئینه $500^{0}C$، گاز اسپری (نیتروژن) Lmin-1 ۳ و گاز خشک کننده (نیتروژن) Lmin-1 ۱۵ بوده است. ثبت طیف‌های جرمی در هر دو مد مثبت و منفی در محدوده ۱۵۰۰–۱۶۰ دالتون با تعداد اسکن u/sec ۶۰۰۰ و سرعت تغییر مد مثبت–منفی sec ۰/۱۵۰ انجام شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه و سیستم حلالی آب استونیتریل داری ۰/۱ درصد فرمیک اسید و گرادیانت حلالی شامل ۵ درصد حلال استونیتریل به عنوان شروع آنالیز، و در ۳۰ دقیقه به ۱۰۰ درصد استونیتریل رسید و به مدت ۵ دقیقه به صورت ایزوکراتیک شویش شد. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود.

۶.۲. استخراج مایع – مایع

۱۴ گرم عصاره‌ی متانولی با استخراج مایع – مایع توسط دو حلال آب و دی‌کلرومتان به دو بخش آبی و دی‌کلرومتانی تقسیم شد. برای این کار حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به یک دکانتور ۲ لیتری اضافه شد و بعد عصاره‌ی حاصل با میزان بسیار کمی از متانول حل و به دکانتور منتقل شد. سپس برروی آن حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرمتان ریخته شد. پس از هم خوردن کامل دکانتور در جای ساکن مستقر تا جداسازی مراحل به طور کامل انجام شود. پس از

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

جداسازی کامل فاز پایینی که شامل فاز دی‌کلرومتانی بود جدا و دوباره به محلول موجود در دکانتور، ۲۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان اضافه شد و آنقدر این عمل تکرار شد تا جایی که کل عصاره‌ی ۶۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان شسته شد در این مرحله فاز دی‌کلرومتانی کنار گذاشته شد و توسط دستگاه روتاری خشک شد که شامل ۵ گرم عصاره دی‌کلرومتانی شد. عصاره دی‌کلرومتانی روی رزین DIAION HP20 بارگذاری شد. رزین توسط آب گاززدایی شده شسته شد تا جایی که محلول زیرین بی‌رنگ شد در نهایت رزین توسط متانول شسته و فاز متانولی برای خالص‌سازی بیشتر خشک و نگهداری شد. درنهایت مقدار ۳ گرم عصاره به دست آمد.

۷.۲. ستون کروماتوگرافی

پس از آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی (قطر ۲/۵ سانتی متر و طول ۷۰ سانتی‌متر)، ۳ گرم عصاره حاصل شده از مرحله قبل را با سیلیکاژل به نسبت یک به یک مخلوط و به ستون افزوده شد. از دو حلال، کلروفرم به عنوان حلال با قطبیت متوسط و متانول به عنوان حلال با قطبیت بالا برای شست وشوی ستون استفاده شد. محدوده تغییر قطبیت از متانول:کلروفرم ۱۰:۹۰ تا متانول:کلروفرم ۹۰:۱۰ بود. حجم حلال مصرفی برای هر فراکسیون ۱۰۰ میلی‌لیتر بود و در مجموع ۳۸ فراکسیون حاصل شد.

۸.۲. کروماتوگرافی لایه نازک

فراکسیون‌های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی توسط کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفتند و فراکسیون‌های مشابه مخلوط شدند. در مجموع ۱۲ فراکسیون به دست آمد. برای مشاهده لکه‌ها از لامپ UV و معرف فسفومولیبدات استفاده شد.

۹.۲. کروماتوگرافی نیمه تهیه‌ای مایع با کارایی بالا

فراکسیون‌های شماره ۳۸ و۲۰ و ۲۴ توسط کروماتوگرافی نیمه تهیه‌ای مایع با کارایی بالا که با گرادیانت شویشی متانول وآب (۶۰:۴۰) آغاز شد و در دقیقه ۵ به (۴۸:۵۲) متانول و آب رسید در دقیقه ۶ به (۴۷:۵۳) متانول و آب و تا دقیقه ۲۵ به صورت ایزوکراتیک شویش ستون ادامه پیدا کرد و درنهایت در دقیقه ۳۰ به ۱۰۰ درصد متانول رسید حجم تزریق ۴۰ میکرولیتر و غلظت محلول تزریق ppm ۲۰۰۰۰۰ و طول موج مورد استفاده برای مانیتور کردن پیک‌ها nm ۲۵۴ بود که در نهایت از فرکشن شماره ۳۸ ترکیب ۱ به میزان ۵ میلی‌گرم از فرکشن شماره ۲۰ ترکیب ۲ به میزان ۷ میلی گرم و از فرکشن شماره ۲۴ ترکیب ۳ به میزان ۵ میلی‌گرم خالص شد.

۳. نتایج

با استفاده کروماتوگرافی نیمه تهیه‌ای مایع با کارایی بالا ترکیب‌های آپی ژنین-۷-O-گلیکوزاید (۱)، لوتئولین -۷-O-گلیکوپیروناید (۲) و لوتئولین -۷-O-روتینوزاید (۳) خالص سازی شدند. سپس در مرحله بعد برای شناسایی و تعیین ساختار از نمونه‌های خالص‌سازی شده با استفاده از تکنیک‌های اسپکتروسکوپی یک و دو بعدی طیف گیری شد. سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولئانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶) با استفاده از طیف‌های جرمی در مد مثبت و منفی و بررسی الگوی شکست شناسایی شدند (شکل ۱).

۱.۳. مشخصات طیف فلاونوئید Luteolin 7-O-rutinoside

در طیف پروتون (شکل ۲) این ترکیب در ناحیه ppm ۶/۹۳ و ۷/۴۲ دو سیگنال دوتایی با انتگرال یک و ثابت شکافتگی Hz ۸/۱۷ و ۹/۴۴ قابل مشاهده است که به ترتیب مربوط به پروتون‌های ۵′و۶′ (شکل ۳) هستند. یک سیگنال یکتایی در ppm ۷/۴۱ قابل مشاهده است که با توجه به ارتباط در طیف HMBC با کربن‌های ppm ۱۱۹/۱۸ و ۱۵۰/۲۴

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

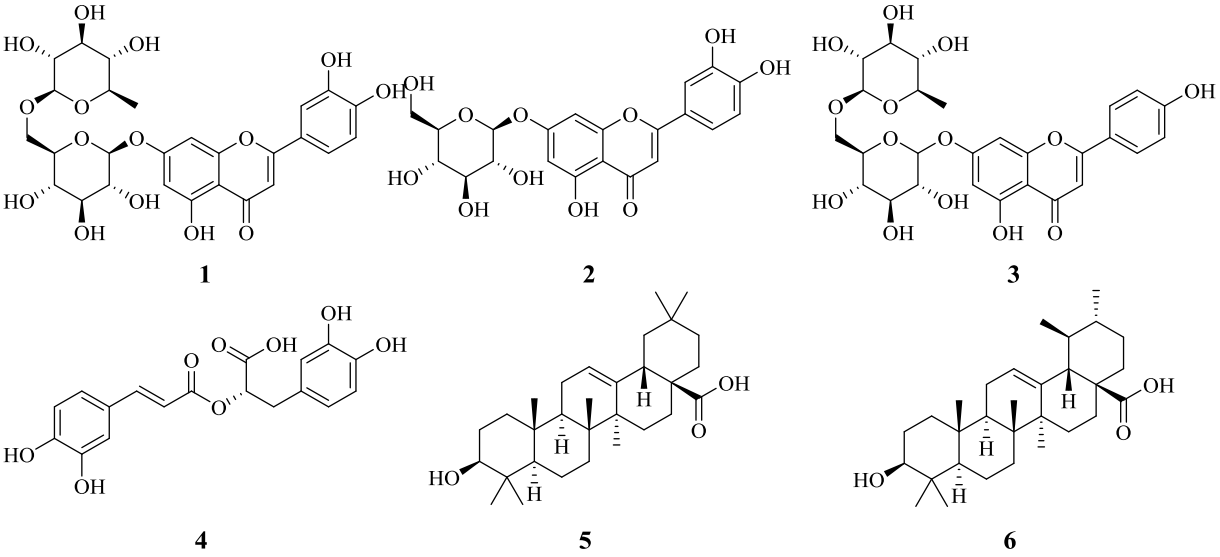
نشان می‌دهد که مربوط به پروتون ′۲است. یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک در ۶/۶۹ ppm قابل مشاهده است، که در طیف HMBC نیز با کربن ۱۸۱/۳۴ ppm ارتباط نشان می‌دهد که این سیگنال نیز احتمالاً مربوط به پروتون ۳ است که با کربونیل شماره ۴ در ارتباط است. در ۶/۴۶ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک قابل رویت است که این پروتون با کربن ۱۶۱/۵۲ ppm در طیف HMBC ارتباط نشان می‌دهد که مربوط به پروتون شماره ۸ است که با کربن شماره هفت که متصل به اکسیژن (OH) در ارتباط است. این کربن همچنین با پروتون ۶/۷۴ ppm در طیف HMBC ارتباط نشان می‌دهد (شکل۵) که این ارتباط نشان‌دهنده این است که این پروتون احتمالاً پروتون ۶ ساختار می‌باشد. در طیف پروتون در ناحیه ۱۲/۹۱ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک نشان دهنده OH موجود در موقعیت ۵ ترکیب است. سیگنال پروتون این گروه OH به علت پیوند هیدروژنی درون مولکولی با گروه کربونیل ظاهر می‌شود. ارتباط همه پروتون‌ها و کربن‌های متصل نیز در طیف HSQC قابل مشاهده است (شکل ۴) برای مثال ارتباط پروتون ۶/۶۹ ppm و کربن ۱۰۲/۸۰ ppm و همچنین پروتون ۶/۷۴ ppm و کربن ۹۴/۵۲ ppm و تمام کربن‌های متصل به هیدروژن در طیف پروتون این ترکیب در ناحیه ۳ تا ۵/۰۳ یک سری سیگنال که مربوط به گروه قندی است مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه در طیف HMBC ارتباطی بین پروتون آنومری قند (۵/۰۵ ppm) با ثابت کوپلاژ ۷/۳۸ و کربن ۱۶۱/۵۲ مشاهده می‌شود پس گروه قندی بر روی کربن شماره‌ی ۷ قرار می‌گیرد. قرارگیری سیگنال با انتگرال یک در جابجایی شیمیایی ۱ ppm وجود قند رامنوز را نشان می‌دهد. با توجه به ارتباط‌های گفته شده و همچنین سایر ارتباطات موجود، ساختار (۱) برای این ترکیب پیشنهاد می‌شود که مربوط به ترکیب فلاونوئیدی Luteolin 7-Rutinoside است. پیک یون مولکولی $[M+H]^+$ در ۵۹۵ *m/z* تاییدکننده ساختار شناسایی شده می‌باشد(شکل ۶). این ترکیب قبلاً از گیاه *Campanula persicifolia* گزارش شده است [۸].

۲.۳. مشخصات طیف فلاونوئید *Luteolin 7-(Cynaroside) O-glucopyranoside*

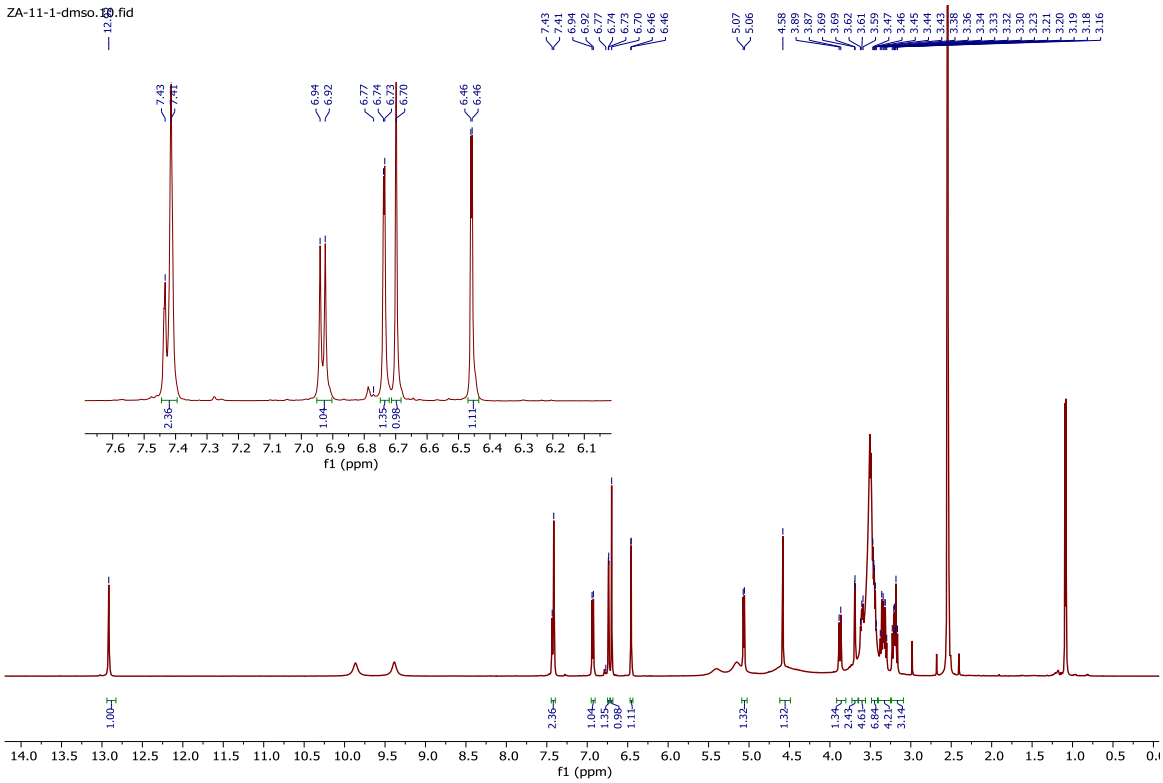
در طیف پروتون این ترکیب یک سیگنال یکتایی در ۶/۶۸ ppm دیده می‌شود که در طیف HSQC با کربن ۱۰۳/۴۵ ppm در ارتباط است. این سیگنال احتمالاً مربوط به پروتون شماره ۳ ترکیب است. همچنین در ناحیه ۶/۷۷ ppm سیگنالی به صورت یکتایی مشاهده می‌شود که در طیف HSQC با کربن ۹۵/۲۹ ppm در ارتباط است. این سیگنال نیز احتمالاً مربوط به پروتون شماره ۶ می‌باشد. همچنین در طیف HSQC این ترکیب پروتون‌های موجود در جابجایی شیمیایی ۶/۹۳ ppm و ۷/۸۸ به ترتیب با کربن‌های موجود در جابجایی شیمیایی ۱۱۶/۱۹ ppm و ۱۲۹/۳۱ ppm ارتباط نشان می‌دهند که مربوط به پروتون‌های ′۶ و ′۵ هستند. در طیف HMBC این ترکیب ارتباط پروتون ۶/۴۴ ppm با کربن ۱۶۲/۶۸ ppm یا کربن شماره ۷ که متصل به گروه OH است و همچنین ارتباط پروتون ۶/۷۷ ppm با کربن ۱۵۷/۵۷ ppm که مربوط به کربن شماره ۵ که این کربن نیز یک کربن درجه ۴ متصل به گروه OH است، قابل رویت است. ارتباط پروتون۷/۴۲ ppm با کربن ۱۵۰/۸۵ ppm مربوط به کربن شماره ′۳ و همچنین سیگنال کربن ۱۶۵/۶۳ ppm مربوط به کربن ′۴ نیز قابل مشاهده است. با توجه به این ارتباطات و همچنین سایر ارتباط‌های قابل مشاهده ساختار این ترکیب به صورت آورده شده در ساختار (۲) مشخص می‌شود. این ساختار با نام Luteolin 7-O-glucopyranoside که یک ساختار فلاونوئید گلیکوزیدی است که قبلاً از عصاره گیاه *Reseda luteola* جداسازی و

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

شناسایی شده است [۹]. پیک یون مولکولی $[M+H]^+$ در ۴۴۹ m/z تأیید کننده ساختار شناسایی شده می‌باشد.

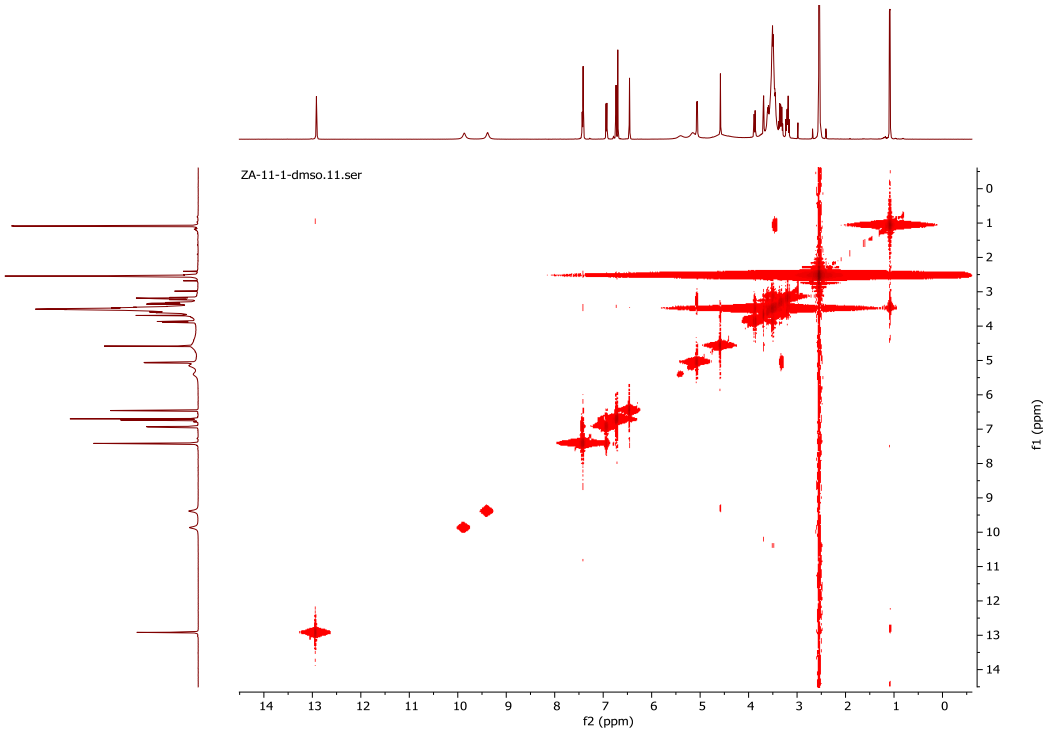


شکل ۱. ساختار اجزای شناسایی شده در عصاره متانولی آویشن شیرازی

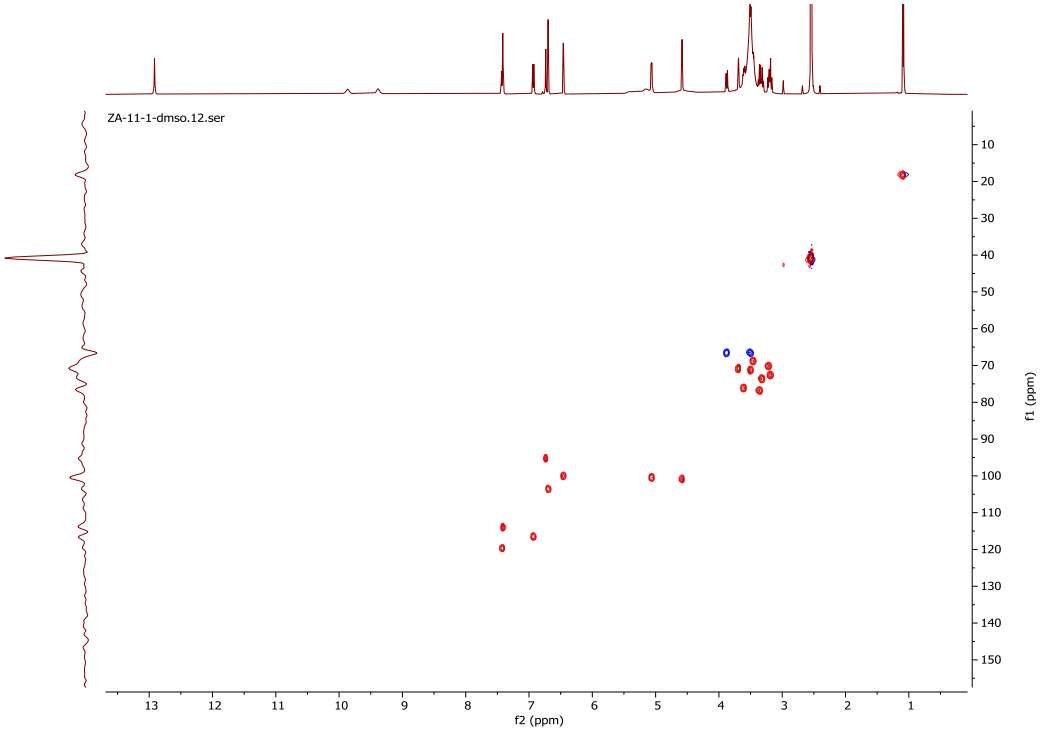


شکل ۲. طیف H NMR ترکیب شماره ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف‌سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

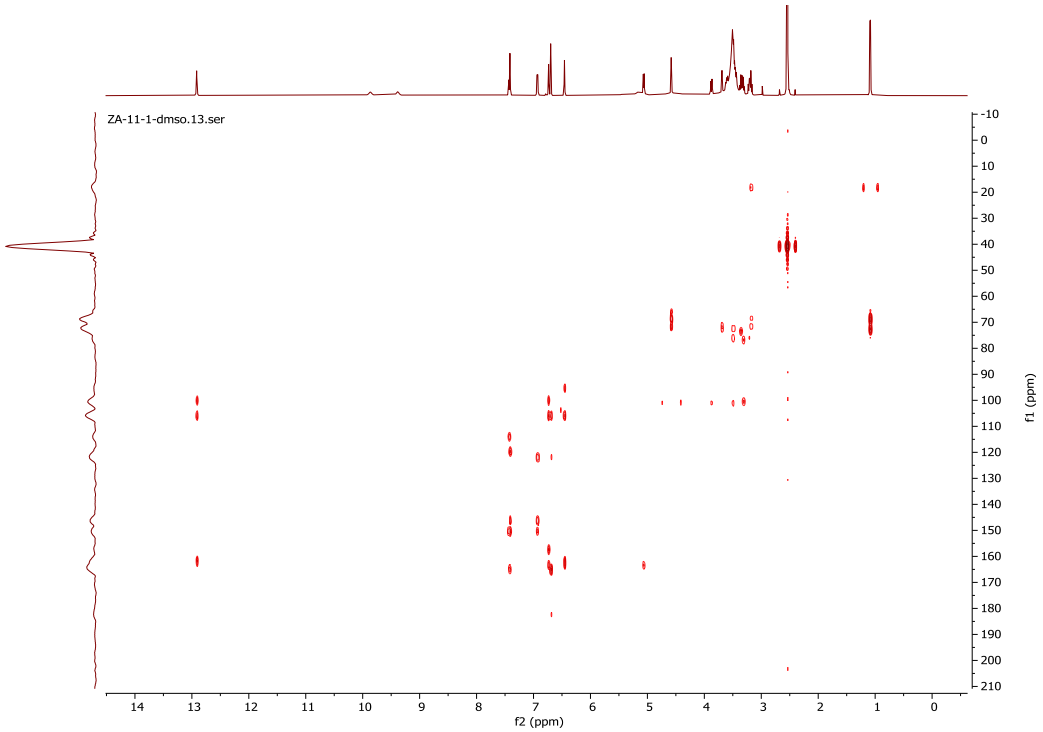


شکل ۳. طیف H-H COSY ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف‌سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)

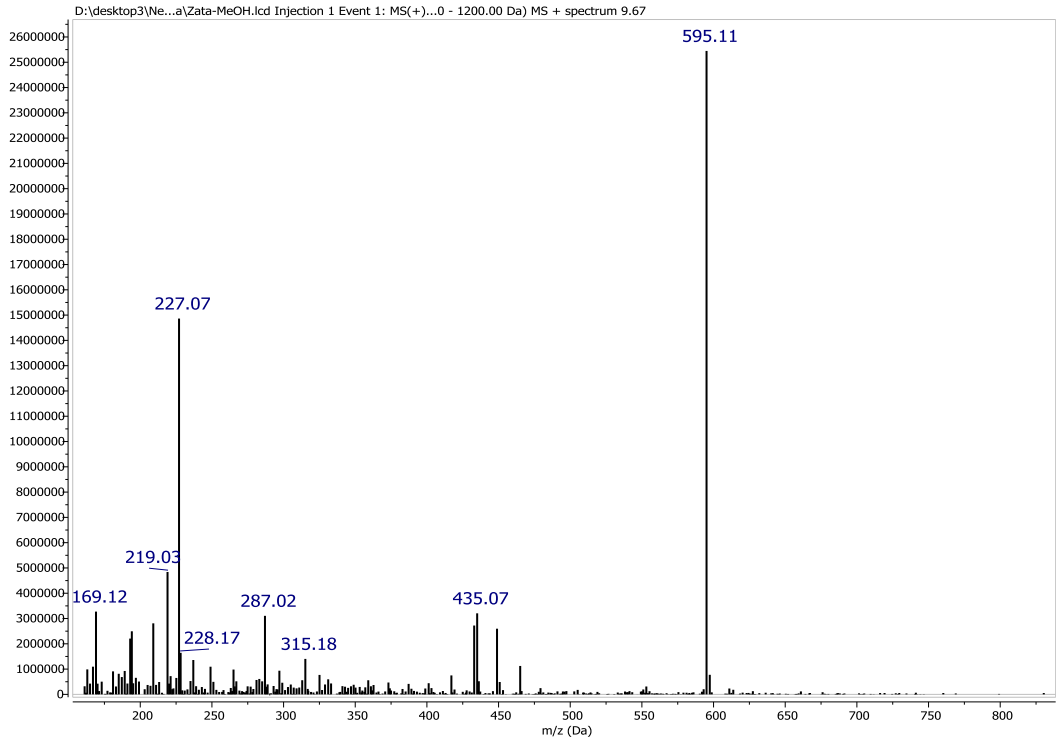


شکل ۴. طیف HSQC ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]



شکل ۵. طیف HMBC ترکیب ۱ (طیف سنج ۵۰۰ مگا هرتز، حلال DMSO دوتره



شکل ۶. طیف جرمی ترکیب ۱، Luteolin 7-O-rutinoside

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

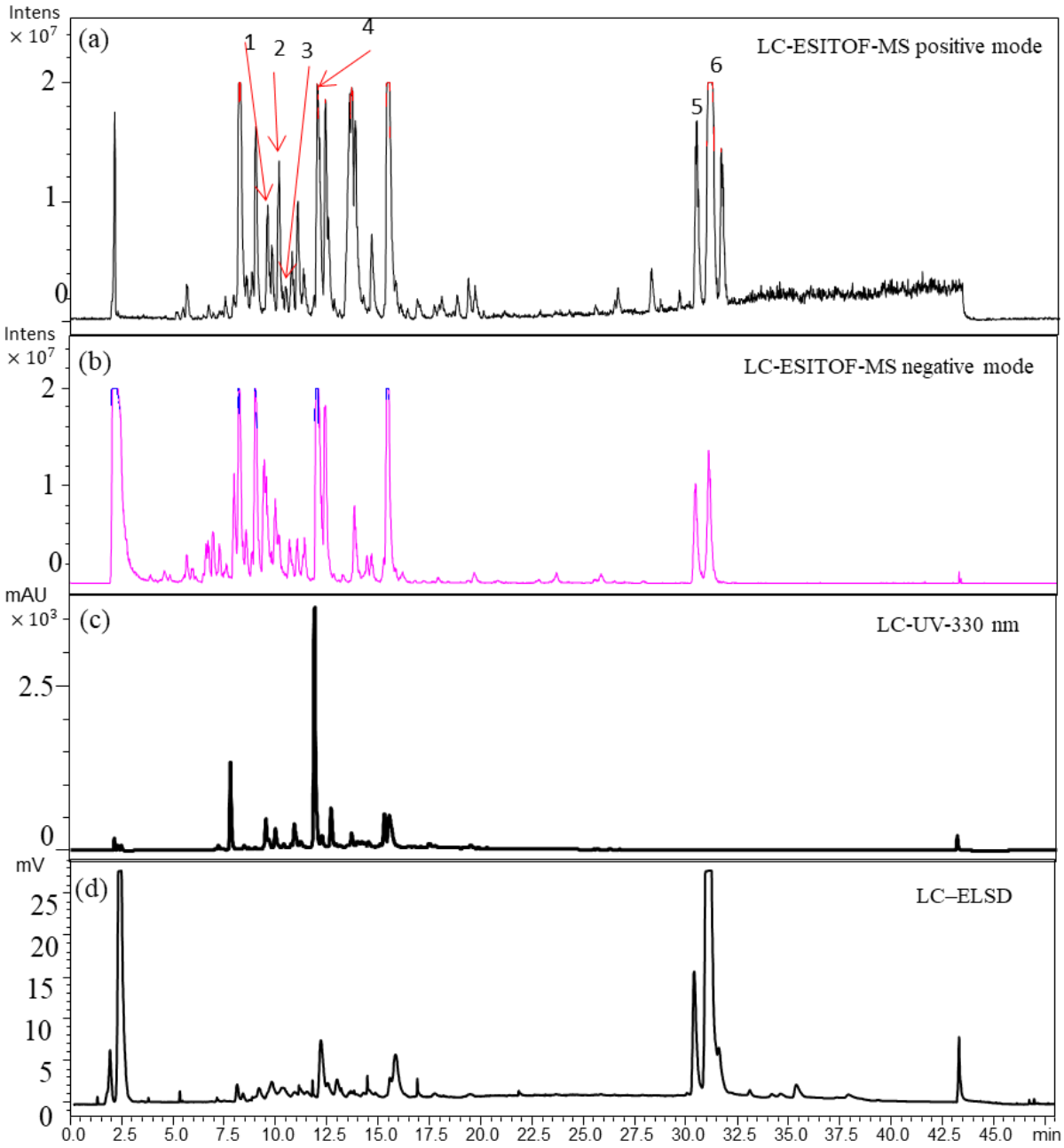
۳.۳. مشخصات طیف فلاونوئید Apigenin 7-O-rutinoside

در طیف پروتون این ترکیب سیگنال دوتایی با انتگرال دو یکی در ۶/۹۶ ppm و دیگری در ۷/۹۲ ppm با ثابت کوپلاژ برابر با ۸/۴۶ قابل مشاهده است که مربوط به پروتون‌های حلقه دارای استخلاف پاراست که هیدروژن‌ها به صورت قرینه ظاهر شده‌اند (′۵، ′۳ و ′۶، ′۲). همچنین یک سیگنال دوتایی با انتگرال یک در ۶/۷۶ ppm و یک سیگنال دوتایی دیگر نیز در ۶/۴۵ ppm قابل مشاهده هستند که با ثابت کوپلاژ ۲/۰۴ همدیگر را شکافته‌اند مربوط به پروتون‌های ۶ و ۸ می‌باشند. در ۶/۷۹ ppm یک سیگنال یکتایی با انتگرال یک وجود دارد که مربوط به پروتون ۳ بوده و همچنین یک سیگنال پهن در ۱۲/۹۴ ppm نیز مربوط به پروتون ۵ این ترکیب می‌باشد. همچنین پروتون‌های گروه قندی از ناحیه ۳ ppm تا ۵/۰۷ قابل رویت هستند. همچنین ارتباطی در طیف HMBC بین پروتون آنومری ۵/۰۶ با ثابت کوپلاژ ۷/۳۵ و کربن شماره ۷ در ۱۶۲/۱۰ قابل مشاهده است که بدین‌ترتیب گروه قندی در موقعیت ۷ ترکیب قرار می‌گیرد. در طیف HSQC این ترکیب ارتباط هر کربن و پروتون مربوطه‌اش (^1J) قابل مشاهده است. برای مثال پروتون ۶/۷۹ ppm ارتباطی با کربن ۱۰۳/۲۲ ppm نشان می‌دهد. همچنین پروتون ۶/۹۶ ppm با کربن ۱۱۶/۵۲ ppm و همچنین پروتون ۷/۹۲ ppm با کربن ۱۲۸/۹۱ ppm دارای ارتباط است. ارتباط سایر پروتون‌ها و کربن‌ها در طیف HSQC این ترکیب قابل مشاهده است. در طیف HMBC این ترکیب ارتباطی بین پروتون ۷/۹۲ ppm و کربن ۱۶۲/۳۹ ppm که احتمالاً مربوط به کربن ′۴ است قابل مشاهده می‌باشد همچنین ارتباط پروتون ۶/۹۶ ppm یعنی پروتون ′۳ و کربن ۱۲۱ ppm مربوط به کربن ′۱ نیز قابل مشاهده است. ارتباط بین پروتون ۶/۷۹ ppm (پروتون ۳) و کربن ۱۸۳/۵۶ ppm که مربوط به کربن ۴ یا کربونیل است نیز در این طیف قابل مشاهده است. ارتباط پروتون ۶/۴۵ ppm (پروتون ۸) و کربن ۱۶۲/۱۰ ppm یعنی کربن شماره ۷ نیز در این طیف قابل مشاهده است. با توجه به این ارتباطات بیان شده و سایر ارتباطات موجود درنهایت ساختار به صورت ساختار فلاونوئید گلیکوزیدی، ترکیب (۳) تایید شد که اسم ایوپاک آن Apigenin 7-O-rutinoside است. طیف جرمی این ترکیب با جرم ۵۷۹ برای یون مولکولی $[M+H]^+$ نیز این ساختار را تأیید می‌کند. این ترکیب قبلاً از عصاره گیاه *Galium ruthenicum* نیز گزارش شده است [۱۰].

۴.۳. ترکیبات شناسایی شده با استفاده از طیف جرمی ترکیبات

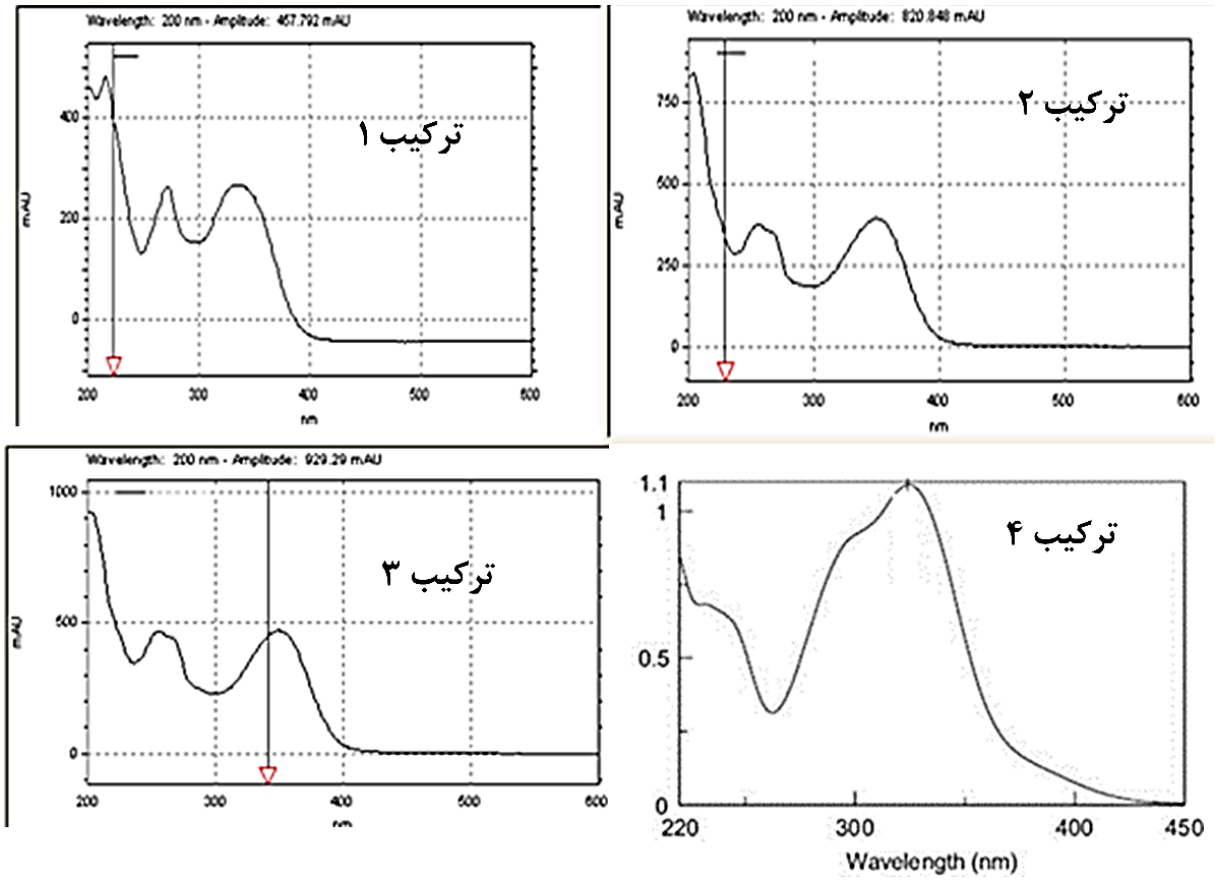
سایر اجزا به کمک مقایسه طیف جرمی ثبت شده در حالت یونیزاسیون مثبت و منفی و مقایسه طیف UV با مقالات مورد شناسایی قرارگرفتند (جدول ۱). کروماتوگرام HPLC-UV در طول موج ۳۳۰ نانومتر گرفته شد که در این طول موج پیک‌های اصلی دارای جذب UV حداکثری بودند. علاوه بر ترکیبات ۱-۳ که با کمک طیف‌های NMR و Mass ترکیبات شناسایی شدند. سه ترکیب رزمارینیک اسید (۴)، اولئانولیک اسید (۵)، اورسولیک اسید (۶)، با بررسی طیف جرمی ترکیبات و بررسی الگوی شکست آنها شناسایی شدند (شکل‌های ۷-۱۰).

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]



شکل ۷. طیف HPLC-UV-MASS–ELSD عصاره متانولی گیاه آویشن شیرازی و ترکیبات شناسایی شده که در طیف MASS شماره گذاری شده‌اند

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

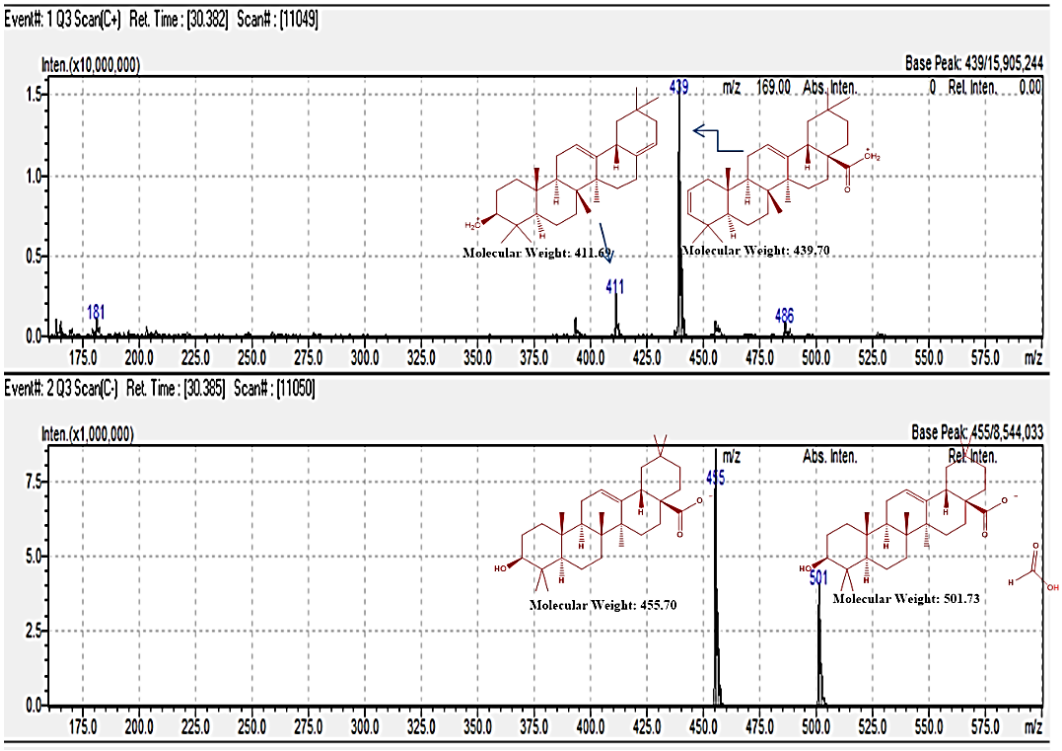


شکل ۸. الگوی جذب UV ترکیبات ۱ تا ۴

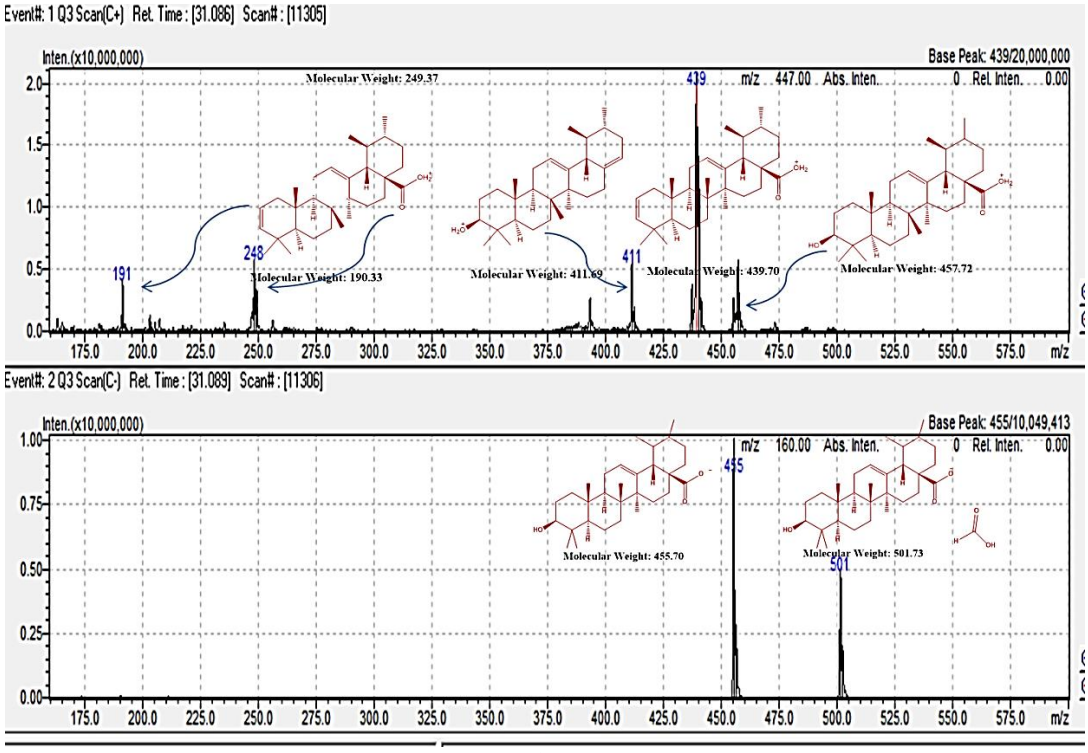
جدول ۱. زمان بازداری، UV_{max} و داده‌های طیف جرمی ترکیبات شناسایی شده

شماره ترکیبات	نام ترکیبات	زمان بازداری(دقیقه)	*m/z* $[M+H]^+$	UV max (nm)
۱	لوتئولین-۷-O-روتینوزاید	۸/۱۶	۵۹۵	۲۴۲، ۳۵۰
۲	لوتئولین -۷-O-گلیکوپیروناید	۸/۳۶	۴۴۹	۲۳۸، ۳۵۰
۳	آپی‌ژنین-۷-O-گلیکوزاید	۹/۶۷	۵۷۹	۲۴۳، ۳۵۰
۴	رزمارینیک اسید	۱۰/۱۰	۳۶۱	۲۴۸، ۳۳۴
۵	اولئانولیک اسید	۳۰/۵۱	۴۵۷	۲۱۰
۶	اورسولیک اسید	۳۱/۰۰	۴۵۷	۲۱۰

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]



شکل ۹. طیف جرمی اولئانولیک اسید و الگوی شکست آن در حالت یونیزاسیون مثبت (بالا) و منفی (پایین)



شکل ۱۰. طیف جرمی اورسولیک اسید و نحوه شکست آن در حالت یونیزاسیون مثبت (بالا) و منفی (پایین)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

۴. بحث

تاکنون خواص بیولوژیکی زیادی از این گیاه گزارش شده است از جمله تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر سندروم روده‌ی تحریک‌پذیر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس این گیاه با توجه به این که دارای مقادیر زیادی از تیمول و کارواکرول است. علایم این بیماری را بدون هیچ گونه عارضه جانبی تسکین می‌دهد [۲]. مطالعات فارماکولوژیک خاصیت ضددرد، ضدالتهاب و ضد اسپاسم اسانس و ترکیبات عمده اسانس این گیاه را تأیید کرده است. در تحقیقی بر روی اسانس گیاه آویشن شیرازی مکانیسم اثر ضدمیکروبی این اسانس بر روی باکتری *Lactobacillus curvatus* بررسی شد [۶]. بررسی اثر اسانس توسط میکروسکوپ TEM صورت گرفت. تغییرات مورفولوژیکی زیادی را بر روی دیواره‌ی سلولی باکتری نشان داد که حاکی از تأثیرات آنتی‌باکتریال اسانس بر روی باکتری بود.

تأثیر ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدانت و تقویت سیستم ایمنی این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات ضدالتهابی گیاه مانند: کاهش کل گلبول‌های سفید خون تعداد نوتروفیل‌ها و تعداد ائوزینوفیل‌ها اثبات شد. اثرات محافظتی این گیاه در سطح سرمی فسفولیپاز A_2 و پرتئین کل نشان داده شد علاوه بر این ترکیبات گیاهی مانند فلاونوئیدها و کارواکرول اثرات ضد التهابی از خود نشان دادند. این گیاه همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو با از بین بردن رادیکال‌های آزاد شده و می‌توانند در درمان آسیب‌های اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد [۷]. در تحقیقی دیگر تأثیر عصاره‌های هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی به عنوان محافظ کبد برای درمان آسیب حاد کبدی بر روی موش‌های مسموم شده با تتراکلرید کربن مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داده که عصاره هیدروالکلی *Zataria multiflora* اثر محافظتی بر روی سمیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن دارد [۱۱]. همچنین تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه *Leshmania tropia* و اثرات سمیت سلولی و فعالیت ضدمالاریا در یک مدل زیست سنجش برون‌تنی ارزیابی شده است. نتایج این تحقیق نیز نشان داد که ترکیبات شیمیایی گیاه آویشن شیرازی که منبع طبیعی مناسب از لیشمانیا علیه *Cutaneaus leishmaniasis* است [۱۲]. همچنین اثرات ضدجهش‌زایی این گیاه به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانت بسیار بالا و غنی بودن این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی به اثبات رسید. نتایج این تحقیق ثابت کرد که همه فراکسیون‌ها خصوصاً فرکشن متانولی بالاترین خاصیت ضدجهش‌زایی را از خود نشان داد [۱۳]. بررسی فیتوشیمیایی عصاره هگزانی گیاه آویشن شیرازی منجر به جداسازی زاتاریول که یک مشتق جدید ایزوپروپیل بنزن بود شد. همچنین ترکیبات شناخته شده‌ی پارا–سایمن، تیمول، تیمول متیل اتر، بتا سیسترول، استیگماسترول، اولئانولیک اسید، بتولنیک اسید، و هگزادکانولئک اسید نیز از این عصاره جداسازی و شناسایی شد [۱۴].

در گزارشی دیگر دو مشتق جدید پاراسایمن با نام‌های زاتاروزید A و زاتاروزید B ویک مشتق جدید تری استوکسی به همراه پارا هیدروکسی بنزوییک اسید از عصاره‌ی هگزانی گیاه آویشن شیرازی جداسازی و شناسایی شدند. بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌ی هگزانی آویشن شیرازی منجر به جداسازی و شناسایی سه ترکیب آروماتیک جدید، که دو تا از آنها مشتقات پاراسایمن بودند شد. علاوه بر این سه ترکیب جدید سه ترکیب دی‌هیدروکسی آروماندران، لوتئولین و آلفاتوکوفرول کوئینون نیز از این گیاه خالص‌سازی وشناسایی شده است [۱۵]. در پژوهشی دیگر بر روی عصاره‌ی متانولی گیاه آویشن شیرازی انجام شد، ترکیب رزمارینیک اسید از این عصاره جداسازی و خالص سازی شد [۱۶]. بررسی آنالیز شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی منجر به شناسایی تعداد ۲۵ ترکیب شد که ترکیبات عمده آن کارواکرول، تیمول و

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

پاراسایمن بود همچنین اثرات آنتی‌باکتریال این اسانس نیز مورد بررسی قرار گرفت که خاصیت ضد *E. coli* و *K. pneumoniae* را از خود نشان داد [۱۷]. با توجه به گزارش‌های متعدد ذکر شده از این گیاه مبنی بر داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب، فلاونوئیدهای خالص شده در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهاب ذکر شده برای این گیاه را مورد تأیید قرار می‌دهد.

مشارکت نویسندگان

این مقاله بخشی از نتایج رساله دکتری عماد نظریان‌پور می باشد که انجام بخش تجربی و نوشتن اولیه مقاله را انجام داده است. صمد نژادابراهیمی استاد راهنما و هدایت کار تجربی و تکمیل نوشتن مقاله را برعهده داشته است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به شماره طرح ۹۶۰۱۶۶۶۳ و معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی به دلیل حمایت‌های مالی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Fazeli M R. Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan-e Shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control.* 2007; 18(6): 646-649.

2. Mahboubi M. Systematic review: The potency of *Zataria multiflora* Boiss in treatment of vaginal infections. *Infectio.* 2018; 22(2): 76-83.

3. Ramezani M, Hosseinzadeh H and Samizadeh S. Antinociceptive effects of *Zataria multiflora* Boiss fractions in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 91(1): 167-170.

4. Ariaee N, Ghorbani J, Panahi M, Mohamadi M, Asili J, Ranjbar A, Farid Hoseini R and Jabbari F. Oral administration of *Zataria multiflora* extract decreases IL-17 expression in perennial allergic rhinitis. *Reports of Biochemistry & Molecular Biol.* 2018; 6(2): 203-207.

5. Khatibi S A, Misaghi A, Moosavy M H, Akhondzadeh Basti A, Mohamadian S and Khanjari A. Effect of nanoliposomes containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on gene expression of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 124(2): 389-397.

6. Ziaee E, Razmjooei M, Shad E and Eskandari M H. Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against *Lactobacillus curvatus*. *LWT.* 2018; 87: 406-412.

7. Khazdair M R, Ghorani V, Alavinezhad A and Boskabady M H. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2018; 32(1): 26-50.

8. Teslov L S and Koretskaya L N. Flavonoids of *Campanula persicifolia*. I. *Chem. Nat. Compd.* 1983; 19(6): 749-750.

9. Svendsen A B. [Isolation of luteolin-7-glycoside from the flowers of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm]. *Pharm Acta Helv.* 1959; 34(1): 29-32.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

10. Borisov M I. Flavonoids of *Galium ruthenicum*. *Chem. Nat. Compd.* 1974; 10(5): 677-677.
11. Shokrzadeh M, Mirzajani F, Javadi I and Modanloo M. Hepatoprotective effect of hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss to acute liver damage in mice exposed to carbon tetrachloride-induced toxicity. *Adv. Biores.* 2017; 8(5): 386-395.
12. Saedi Dezaki E, Mahmoudvand H, Sharififar F, Fallahi S, Monzote L and Ezatkhah F. Chemical composition along with anti-leishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora* . *Pharm Biol.* 2016; 54(5): 752-758.
13. Sharififar F, Dehghan-Noudeh G, Moshafi M, Ohadi M, Zaman-Basir M, Yazdanpanah E and Yusefian S. Antimutagenic activity of major fractions of *Zataria multiflora* Boiss by Ames method. *Asian J. Pharm.* 2015; 9: 195.
14. Ali M S, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M and Ahmad V U. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochemistry* 1999; 52(4): 685-688.
15. Ali M S, Saleem M, Ali Z and Ahmad V U. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 2000; 55(8): 933-936.
16. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A and Minaeian M. Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and in vitro cultures. *Fitoterapia* 2004; 75(3-4): 315-321.
17. Eftekhar F, Zamani S, Yusefzadi M, Hadian J and Nejad Ebrahimi S. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against extended spectrum β lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella pneumonia*. *Jundishapur J Microbiol.* 4(Suppl): 43-49.

How to cite this article: Nazaryanpour E, Nejad Ebrahimi S. Phytochemical investigation of methanolic extract of *Zataria multiflora* Boiss**.** ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(75): 239-253.
doi: 10.29252/jmp.19.75.239

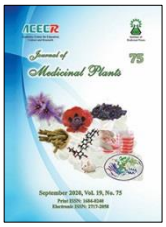
[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]

J. Med. Plants 2020; 19(75): 239-253

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Phytochemical investigation of methanolic extract of *Zataria multiflora* Boiss.

Emad Nazaryanpour, Samad Nejad Ebrahimi*

Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:
Avishane Shirazi
Phytochemical investigation
Flavonoid
Rosmarinic acid

ABSTRACT

Background: *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae) has been found in Iran, Afghanistan, and Pakistan. *Z. multiflora* called 'Avishane Shirazi' in Persian is used as a seasoned in many foods in Iran. The literature survey demonstrated that *Z. multiflora* has immunostimulant, pain-relieving, antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antiviral, antiparasitic, antifungal effects and also widely used in traditional medicine for analgesia, diarrhea, infectious diseases, and gastrointestinal problems. **Objective:** The subject of this study is performing phytochemical constituents of methanolic extract of *Z. multiflora*. **Methods:** The application of various chromatographic techniques such as normal and reverse C18 chromatography let to isolation, purification and identification of several flavonoids. **Results:** In this investigation, the fractionation of methanol extract of the aerial parts of *Z. multiflora* led to the isolation and purification of three known flavonoid glycosides namely Luteolin 7-O-glucopyranoside, Apigenin 7-O-rutinoside and Luteolin 7-O-rutinoside whose structures were determined by 1D and 2D-NMR spectroscopic studies, in particular, homo-COSY and hetero (HSQC and HMBC). **Conclusion:** The results show a methanolic extract of *Z. multiflora* is a rich source of flavonoids and triterpenoids.

Abbreviations: ELSD, Evaporative light scattering detector; HSQC, Heteronuclear single quantum coherence; HMBC, Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

* Corresponding author: s_ebrahimi@sbu.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.75.239

Received 5 August 2019; Received in revised form 19 August 2020; Accepted 22 August 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-05-12]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.15.5]

[DOI: 10.29252/jmp.19.75.239]