جداسازی و شناسایی استرول¬های طبیعی از گیاه اناریجه (Pimpinella affinis)

یعقوب صرافی*[۱]، حسین دهقان[۲]، حدیث توحدی[۱]

[۱] بابلسر- دانشگاه مازندران- دانشکده شیمی- گروه شیمی آلی

[۲] تهران- دانشگاه شاهد- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۰۵ تاریخ تصحیح: ۹۶/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۷

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 (β-sitosterol) و داکستـرول (daucosterol) جداسازی و توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی (EI-MS) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR) شناسایی شـدند. ایـن دو ترکیـب دارای خواص زیستی منحصربه‌فردی از جمله ضد HIV، ضد سرطان و ضد کلسترول بالای خون می‌باشند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده این اسـت 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 شـمالی کشورمان است، نتایج این تحقیق می‌تواند برای متخصصین علوم تغذیه مفید باشد.

کلمات کلیدی: اناریجه، Pimpinella affinis ، β-sitosterol ، daucosterol ، جداسازی، شناسایی.

۱- مقدمه

اناریجه (Pimpinella affinis) گیاهی دو ساله با ارتفاع ۱۱۰-۲۰ سانتی‌متر، از خانواده چتریان (Apiaceae) و جنس Pimpinella می باشد. 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، ضدعفونی‌کننده، ضد نفخ و مدر در داروخانه ها و به عنوان افزودنی در صنایع نوشیدنی استفاده می‌شود. در فارماکوپه آلمان از P. saxifraga در داروهای خلط آور و افزایش‌دهنده ترشحات برونش استفاده می‌شود و در ترکیه از آن به عنوان یک داروی تسکین دهنده، خلط‌آور، ضد نفخ و مقوی نام می‌برند. گونه P. major در استرالیا به عنوان داروی ضد باکتری به فروش می‌رسد [۲-۴].

* **نویسنده مسئول:** استادیار دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران ysarrafi@umz.ac.ir

هدف از پژوهش حاضر، بررسی فیتوشیمیایی برگ‌های گیاه اناریجه (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 می تواند دارای موارد مفیدی برای شیمیدان‌ها، محققان علوم تغذیه و همچنین داروسازان باشد.

در این پژوهش به بررسی فیتوشیمیایی عصاره اتیل‌استاتی گیاه اناریجه به کمک روش‌های کروماتوگرافی ستونی[1] و لایه نازک[2] پرداخته شد و دو استرول گیاهی به نام‌های بتا- سیتوسترول[3] و داکستترول[4] جداسازی و توسط تکنیک‌های طیف-سنجی جرمی[5] و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته[6] شناسایی شدند. بتا- سیتوسترول یک استرول گیاهی و از دسته‌ی تری‌ترپن‌های 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 سکته‌های مغزی جلوگیری می‌کند [۵]. داکستترول مشتق قندیِ 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 مولیبداتوفسفریک‌اسیدهیدرات[7] در اتانول (ساخت شرکت Sigma-Aldrich)، سیلیکاژل با مش ۷۰-۲۳۰ (تهیه شده از شرکت Merck) و TLC سیلیکاژل $60F_{254}$ (تهیه شده از شرکت Merck) استفاده شد.

[1] Column chromatography
[2] Thin layer chromatography
[3] β-sitosterol
[4] Daucosterol
[5] EI-MS
[6] NMR
[7] Phosphomolybdic acid hydrate

۲-۲- دستگاه‌ها

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

۲-۳- جمع‌آوری و آماده سازی 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 سانتی گراد و به دور از نور خورشید خشک و جهت انجام فرایند عصاره‌گیری به صورت پودر درآورده شد.

۲-۴- عصاره گیری

در این پژوهش از روش غوطه‌ورسازی[1] 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 سانتی گراد 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 سانتی متر (حاوی ۸۵۰ گرم سیلیکاژل با مش ۲۳۰-۷۰) انتقال داده شد. سیستم حلالی مناسب با آزمودن سیستم های حلالی مختلف (ترکیب درصدهای مختلف هگزان: کلروفرم، هگزان: دی کلرومتان، هگزان: اتیل استات، دی کلرومتان: کلروفرم، دی کلرومتان: اتیل استات، دی کلرومتان: متانول، کلروفرم: اتیل استات، کلروفرم: متانول، اتیل استات: متانول) توسط تکنیک TLC جهت رسیدن به بهترین تفکیک ترکیبات عصاره اتیل استاتی 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

[1] 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 باقی‌مانده 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 ۱۴۹جزء 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.

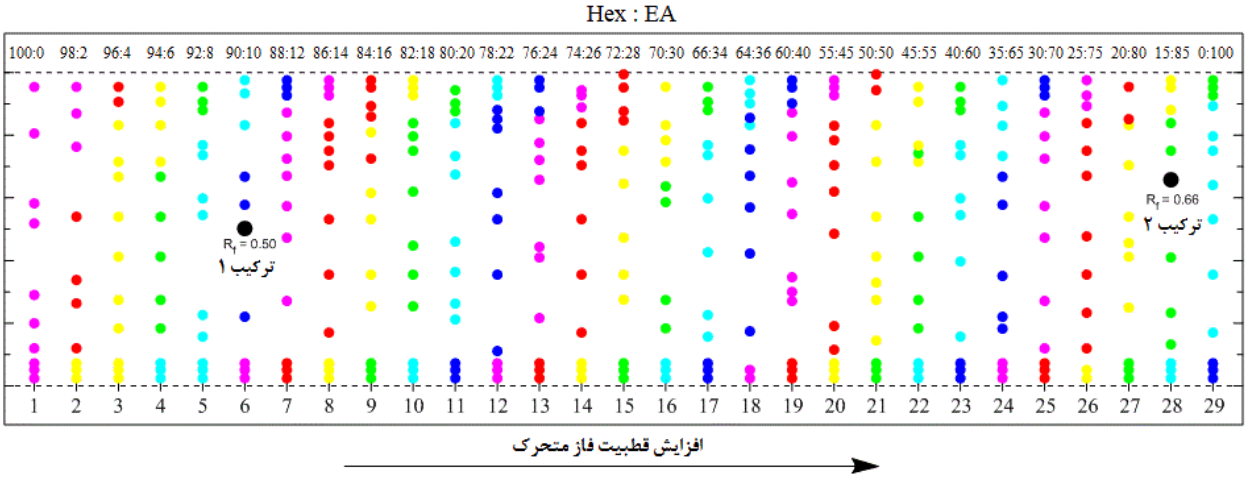
جدول ۱. نسبت حلال‌های مورد استفاده جهت شستشو و جزء های به دست آمده از ستون اول

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

از میان ۲۹ جزء به دست آمده از عصاره‌ی اتیل‌استاتی، جزء ۶ به‌دلیل تفکیک بهتر ترکیبات آن در TLC (دارای ۶ جزء با R_f های ۰،۰۲۴، ۰،۰۵، ۰،۰۶، ۰،۰۷، ۰،۰۸۵ و ۰،۰۹۴ و ۰،۰۹۷) و همچنین وجود رسوب بسیار جزئی در آن، برای جداسازیِ مجدد انتخاب شد. مقدار ۰،۵ گرم از جزء ۱۷ به یک ستون کروماتوگرافی با طول ۵۰ و قطر ۲ سانتی متر (حاوی ۳۰ گرم سیلیکاژل با مش ۲۳۰-۷۰) 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، 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 (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 ۲،۲ 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 آن ها 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

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



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-d6 گرفته شد.

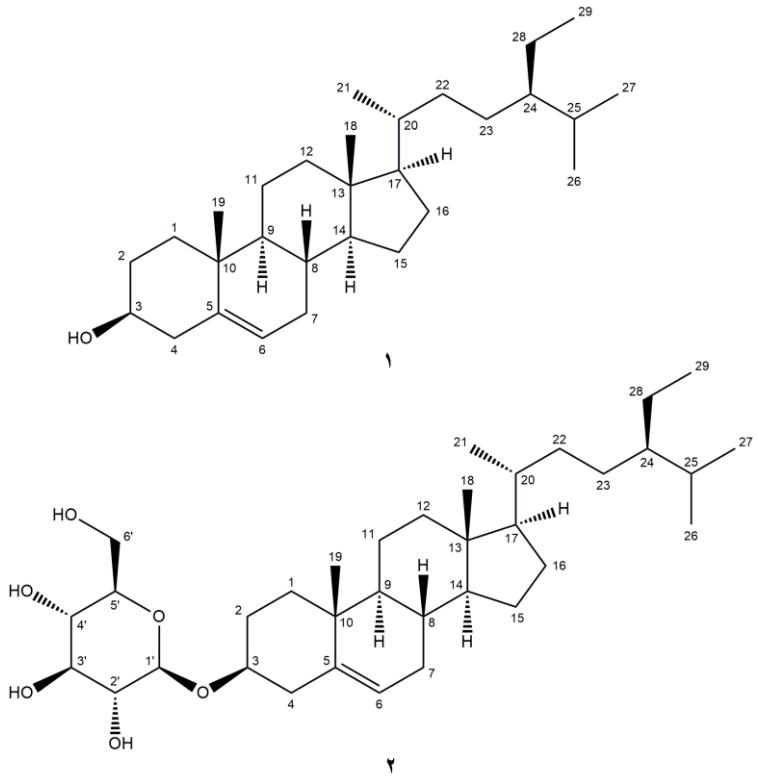
۳-نتایج و بحث

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 ۱و ۲ به ترتیب از جزءهای ۱۷ و ۲۸ به دست آمدند.

ترکیب ۱ به صورت رسوبی سفید رنگ از جزء ۱۷ عصاره اتیل استاتی 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 سورمه‌ای 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 ^{1}HNMR و ^{13}CNMR این ترکیب (در حلال $CDCl_3$) حاکی از وجود یک استرول گیاهی به نام بتا- سیتوسترول (شکل۲) است که با گزارش‌های موجود در منابع کاملاً مطابق است [۱۰]. در طیف ^{1}HNMR

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}CNMR ۲۹ سیگنال وجود دارد. سیگنال‌های متعلق به یک پیوند دوگانه‌ی سه استخلافی در 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=۰/۵۰)، هگزان: کلروفرم ۱:۶ (R_f=۰/۴۱) و هگزان: اتیل استات ۱:۸ (R_f=۰/۷۳)) 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}HNMR و ^{13}CNMR این ترکیب (در حلال DMSO-d6) 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}HNMR پیک مربوط به پروتون اولفینی C6-H درمیدان 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 پروتون های بخش قندی و پروتون C3-H به دلیل اتصال به اکسیژن در ناحیه ppm ۳/۷-۲/۸ ظاهر شدند. در طیف ^{13}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=۰/۶۶)، اتیل استات به همراه ۱ قطره فرمیک اسید (R_f=۰/۴۳) و اتیل استات: متانول ۱:۶ (R_f=۰/۳)) ساختار این ترکیب اثبات شد.



شکل ۲ . ساختار استرول‌های استخراج شده از عصاره اتیل‌استاتی برگ اناریجه (P. affinis)

جدول ۳ داده‌های طیف سنجی ^{1}HNMR و ^{13}CNMR دو ترکیب بتا- سیتوسترول (در $CDCl_3$) و داکسترول (در DMSO-d6) را نشان می‌دهد.

جدول ۳. داده‌های طیف سنجی ^{1}HNMR و^{13}CNMR ترکیب ۱ و ۲

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

	ترکیب ۱ (بتا- سیتوسترول)		ترکیب ۲ (داکسترول)	
موقعیت	جابجایی شیمیایی پروتون (*J*)	جابجایی شیمیایی کربن	جابجایی شیمیایی پروتون (*J*)	جابجایی شیمیایی کربن
۱۶	۱/۲۳ و ۱/۷۰	۲۸/۲	۱/۲۲ و ۱/۸۱	۲۸/۳
۱۷	۱/۱۷	۵۶/۰	۱/۱۰	۵۵/۹
۱۸	۰/۶۹ یکتایی	۱۱/۹	۰/۶۵ یکتایی	۱۲/۱
۱۹	۱/۰۲ یکتایی	۱۹/۴	۰/۹۶ یکتایی	۱۹/۶
۲۰	۱/۴۵	۳۶/۱	۱/۴۱	۳۶/۰
۲۱	۰/۹۳ دوتایی (۶/۸)	۱۸/۸	۰/۹۰ دوتایی (۶/۴)	۱۹/۱
۲۲	۱/۱۷ و ۱/۵۴	۳۳/۹	۱/۱۶ و ۱/۵۰	۳۳/۸
۲۳	۱/۲۸	۲۶/۰	۱/۲۶	۲۵/۹
۲۴	۱/۰۵	۴۵/۸	۱/۰۲	۴۵/۶
۲۵	۱/۶۷	۲۹/۱	۱/۶۳	۲۹/۲
۲۶	۰/۸۳ دوتایی (۶/۸)	۱۹/۸	۰/۸۱ دوتایی (۶/۴)	۲۰/۲
۲۷	۰/۸۵ دوتایی (۶/۸)	۱۹/۰	۰/۸۱ دوتایی (۶/۴)	۱۹/۴
۲۸	۱/۱۰ و ۱/۵۸	۲۳/۰	۱/۰۵ و ۱/۵۲	۲۳/۰
۲۹	۰/۸۸	۱۲/۰	۰/۸۰	۱۲/۲
۱′	–	–	۴/۲۲ دوتایی (۸/۰)	۱۰۱/۳
۲′	–	–	۳/۰۴	۷۳/۹
۳′	–	–	۳/۱۱	۷۷/۴
۴′	–	–	۳/۰۶	۷۰/۵
۵′	–	–	۲/۹۰	۷۷/۲
۶′	–	–	۳/۶۳ دودوتایی (۱۰/۰ و ۵/۲) و ۳/۴۱	۶۱/۵

٤-نتیجه‌گیری

دو ترکیب طبیعی با نام‌های بتا- سیتوسترول و داکسترول که دارای خواص بیولوژیکی منحصر به فردی می‌باشند از عصاره اتیل‌استاتی 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.

٥-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.