



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران

پردیس بین الملل - دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکتری عمومی داروسازی

موضوع:

مطالعه فیتوشیمیایی گیاه *Phlomis olivieri* Benth

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر نرگس یاسا

استاد همکار:

جناب آقای دکتر محمدرضا دلنوازی

نگارش:

فریده محمدی فر

سال تحصیلی ۹۵-۹۴

## چکیده:

استفاده از گیاهان دارویی جهت حفظ سلامت و درمان بیماریها در طول تاریخ همواره مورد توجه بشر بوده است. امروزه علاوه بر مصارف دارویی سنتی، این گیاهان به لحاظ جداسازی و شناسایی ترکیبات زیست فعال به عنوان lead compound در توسعه و تولید داروهای جدید با کارایی و ایمنی بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته اند که در این بین گیاهان تیره ی نعناع به لحاظ تنوع گونه ای، استفاده ی گسترده در طب سنتی و حضور دستجات مختلف ترکیبات طبیعی از اهمیت خاصی برخوردارند. بر اساس مطالعات انجام شده ۱۲۴ گونه و زیر گونه از گیاهان این خانواده منحصرأ در ایران رشد می کنند که این گیاهان از نظر مطالعه و تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات زیست فعال جدید و تولید فرآورده های دارویی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. (۱) جنس فلومیس از این خانواده دارای ۱۰۰ گونه در سراسر جهان است که تعدادی از آنها به صورت چای های گیاهی در درمان مشکلات گوارشی، جلوگیری از بیماریهای قلبی، کبدی و کلیوی و به صورت موضعی در جراحات و سوختگی ها مورد استفاده قرار می گیرند. (۲،۳) مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده روی گونه های مختلف جنس فلومیس نشان می دهد، فلاوونوئیدها، فنیل اتانوئیدها، ایریدوئیدها و تربنوئیدها مهمترین ترکیباتی هستند که به صورت آزاد و گلیکوزیده از گونه های مختلف این جنس مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفته اند. (۲،۳) طی مطالعات فارماکولوژیک اثرات آنتی دیابتیک، ضد دردی، آنتی اولسروژنیک، محافظت کننده قلبی-عروقی و آنتی باکتریال از گونه های مختلف این جنس گزارش شده است که حاکی از وجود ترکیبات زیست فعال متنوع و ارزشمند در گیاهان این جنس می باشد. (۲،۳) در نتیجه ی مطالعه ای فیتوشیمیایی روی گیاه *Phlomis caucasica* هفت گلیکوزید فنولی آنتی اکسیدان rutin، acteoside forsythoside B، chrysoeriol 7-O-rutinoside، naringenin، kaempferol 3-O-glucoside و chrysoeriol 7-O-rutinoside از این گیاه مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفته است. (۴) سه گلیکوزید فنیل اتانوئیدی واجد اثرات آنتی میکروبیال از گیاه *Phlomis lanceolata* جداسازی و گزارش شده است. (۵)

استخراج و جداسازی دو ترکیب *acteoside* و *chrysoeriol-7-O-β-D-glucoside* از گیاه *Phlomis olivieri* و یک گلیکوزید ایریدوئیدی به نام *Lamiide* و دو گلیکوزید فلاونوئیدی *chrysoeriol-7-β-D-(3-E-p-coumaroyl) glucoside* از گیاه *Phlomis persica* گزارش شده است. (۶) گیاه *Phlomis olivieri* یکی از این گیاهان اندمیک این جنس است که در غرب و مرکز ایران رشد می کند. از این گیاه در برخی مناطق مرکزی ایران به صورت موضعی جهت التیام زخم های سطحی استفاده می شده است. (۷،۸) در نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس گیاه *Phlomis aucheri* Boiss.، *caryophyllene oxide*، *β-caryophyllene* و *β-selinene* به عنوان ترکیبات عمده ی اسانس گزارش شده اند. (۹) بررسی ها نشان می دهد تاکنون مطالعات فیتوشیمیایی جامعی در ارتباط با این گونه انجام نشده و بدین جهت جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در این گیاه با هدف شناسایی متابولیت های ثانویه مسئول بروز اثرات گیاه، اجرای تست های بیولوژیک و آزمایشات فارماکولوژیک بر اساس ترکیبات جدا شده در مطالعات بعدی و در نهایت ارزیابی تولید فرآورده ی دارویی از گیاه ارزشمند به نظر می رسد.

در این پایان نامه بخش های هوایی این گیاه پس از جمع آوری از استان آذربایجان شرقی، شبستر، دامنه جنوبی میشوداغ، در هوای آزاد خشک و خرد شد. بخشی از آن توسط دستگاه کلونجر اسانس گیری شد و بخشی دیگر نیز توسط حلال متانول و متانول و آب ۸۰٪ مورد عصاره گیری قرار گرفت. عصاره متانولی توسط حلال های اتر دویترول، کلروفرم، اتیل استات، و متانول فرکشنه شد و فرکشن متانولی و اتیل استاتی برای بررسی انتخاب شد. با استفاده از روش کروماتوگرافی TLC و ستونی با فاز ساکن سیلیکاژل (فاز نرمال و فاز معکوس) و سفادکس LH-20 و روش کروماتوگرافی کاغذی ۷ ترکیب جداسازی که از بین آنها ۶ ترکیب از لحاظ ساختار شیمیایی شناسایی شد. در طول جداسازی از معرف انیس آلدئید-اسید سولفوریک جهت ظهور لکه ها بر روی TLC استفاده شد. شناسایی این ترکیبات با استفاده از روش های مختلف مانند Mass، <sup>13</sup>CNMR، <sup>1</sup>HNMR، UV و Shift reagent ها میسر گردید.

نتایج حاصل از مطالعه‌ی فیتوشیمیایی نشان‌دهنده‌ی دو فلاونوئید به نام‌های Isoquercetin (ترکیب C) و naringenin (ترکیب A) می‌باشد. همین‌طور دو ترکیب فنیل اتانوئیدی به نام‌های Verbascoside (ترکیب D) و Phlinoside C (ترکیب F)، یک ترکیب ایریدوئیدی به نام Ipolamide (ترکیب B) یک ترکیب فنلیک اسید بنام Chlorogenic acid (ترکیب E) می‌باشد.

در نتایج بررسی حاصل از اسانس *Phlomis olivieri* ۳۰ ماده شناسایی شد که بیشترین مواد تشکیل‌دهنده آن را  $\beta$ -caryophyllene (۲۵/۶۹٪)، germacrene D (۱۹/۵٪)،  $\alpha$ -pinene (۸/۹۹٪) و Caryophyllene oxide (۴/۱۹٪) تشکیل می‌دهند.

و در نتایج بررسی حاصل از اسانس *Phlomis persica* ۲۸ ماده شناسایی شد که بیشترین مواد تشکیل‌دهنده آن را Germacrene D (۱۷/۲٪)،  $\gamma$ -Elemene (۱۵/۴٪)، Bicyclo germacrene-D (10.8%) تشکیل می‌دهند.

کلمات کلیدی:

Verbascoside ، Teucroside ، Naringenin ، *Phlomis olivieri Benth* ، ipolamide ، اسانس .

Abstract:

*Phlomis olovieri* Benth. plant, from Lamiaceae family, is one of 100 species of *Phlomis* genus in the world, which has had extensive therapeutic application in Iranian traditional medicine.

The plant is known as “chemaleh” and has an extensive geographic distribution in almost all parts of Iran, especially west and central part. In traditional medicine “chemaleh” [phlomis] is brewed from and was used for gastrointestinal upset, heart, liver and kidney disease treatment.

Topical form of phlomis was used for burns and surgeries in traditional medicine.

Despite the identification of various natural compounds such as flavonoids, phenyl ethanoids, iridoids, di and triterpens, etc in several species of phlomis genus; complete phytochemical studies on this genus have not been done yet. Therefore more phytochemical studies, in addition to identifying effective ingredients, causing physiologic and pharmacologic effects, seems useful in order to assess the possibility of pharmaceutical production of drug considering widespread distribution of the plant.

The essential oils of the plants were extracted using hydrodistillation method. GC and GCMS were applied to analysing the chemical constituents of the oils and brine shrimp lethality test (BSLT) was used for the evaluation of general toxicity effects of the oils.

*Phlomis olivieri* Benth. and *Phlomis persica* Boiss. (Lamiaceae) are two medicinal species endemic to Iran. In the present study, we investigated the chemical compositions and general toxicity potentials of the essential oils obtained from the aerial parts of these two *Phlomis* species. In this thesis aerial part of the *Phlomis olivieri* was collected from Shabestar, south Mishodagh, East Azarbayjan, dried

outdoors, and ground, and aerial part of the *Phlomis persica* was collected from Borujen (Chaharmahal-Bakhtiari province) and Nahavand (Hamedan province) regions.

A total of 46 compounds were identified in the plants essential oils, among them  $\beta$ -caryophyllene (25.7%) and germacrene D (19.5) in *P. olivieri* and germacrene D (17.2%) and  $\gamma$ -elemene (15.4%) in *P. persica* were the main compounds. The essential oils of *P. olivieri* and *P. persica* exhibited a moderate toxicity activity (LD50:  $24.2 \pm 0.5$  and  $41.6 \pm 0.8$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively) in brine shrimp lethality test compared to podophyllotoxin (LD50:  $2.8 \pm 0.3$   $\mu\text{g/ml}$ )

Methanol solvent was fractionated using ether, dipethyl ether, chloroform, ethyl acetate, and methanol solvents.

In phytochemistry processes; Methanol and ethyl acetate fractions were chosen for assessment. Using TLC chromatography and column chromatography with silicagel as stationary phase (normal and reverse phase) and sephadex-LH20, two flavenoid, one phenyl ethanoid glycoside, one iridoid glycoside and one caffeic acid compounds were extracted which chemical structures of all were identified.

During extraction anisaldehyde-sulfuric acid reagent was used for the emergence of spots on TLC. Identification of this compounds was performed using different methods such as Mass,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ -NMR and shift reagents.

The results from phytochemical study indicated the presence of six compounds such as

Naringenin (A), Ipolamiide (B), Isoquercetin (C), Verbascoside (D) and Chlorogenic acid (E) and Phlinoside C (F).

Keywords: gosh bare, chemaleh, phlomis olivieri Benth, flavenoid, verbascoside, chlorogenic acid, ipolamiide, essential oil.