# اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی اندام های مختلف گیاه دارویی *Crataegus atrosanguinea* با استفاده از روش HPLC

**ابوالفضل علیرضالو*[۱]، پیمان صالحی[۲]، نوراله احمدی[۳]، مهدی عیاری[۳]، علی سنبلی[۲]، حمید حاتمی ملکی[۴]، زهرا اکبری[۵]**

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه. ۲- به ترتیب استاد و دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی. ۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران. ۴- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

*نویسنده مسئول: a.alirezalu@urmia.ac.ir

## چکیده

سرده ولیک (*Crataegus* L.) متعلق به تیره گل سرخ (Rosaceae) می باشد. کشور ایران یکی از اصلی ترین مراکز تنوع این گیاه دارویی ارزشمند محسوب می‌شود. اندام‌های مختلف ولیک (برگ، گل و میوه) به دلیل برخورداری از انواع فلاونوئیدها و پروآنتوسیانین‌ها اهمیت زیادی در صنایع دارویی دارند. بنابراین با هدف شناخت و بهره‌برداری از پتانسیل ژنوتیپ‌های بومی در کارهای اصلاحی، ترکیبات فلاونوئیدی گونه *C. atrosanguinea* در اندام های مختلف (برگ، گل و میوه) مورد بررسی قرار گرفت. در اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی اندام‌های مختلف گیاه دارویی ولیک (*C. atrosanguinea*) با دستگاه HPLC، نتایج نشان داد که میزان ترکیبات کلروژنیک اسید، ویتکسین رامنوزید، ویتکسین، روتین، هیپروزید، ایزوکوئرستین و کوئرستین در اندام‌های مختلف متفاوت می‌باشد. اندام گل و برگ میزان های بالاتری از ترکیبات مورد مطالعه نسبت به اندام میوه داشتند. بیشترین میزان کلروژنیک اسید (۲/۸۸ mg/g DW)، ویتکسین رامنوزید (۰/۹۰ mg/g DW )، ویتکسین (۲/۳۱ mg/g DW)، روتین (۰/۰۵ mg/g DW) در اندام برگ، بیشترین میزان هیپروزید (۴/۹۷ mg/g DW) در اندام گل و همچنین بیشترین میزان ایزوکوئرستین (۰/۶۸ mg/g DW) و کوئرستین (۰/۰۶۷ mg/g DW) در اندام میوه مشاهده شد. ویتکسین رامنوزید در اندام میوه، روتین در اندام های گل ومیوه و کوئرستین در اندام های گل و برگ مشاهده نشد. این مطالعه اولین گزارش از بررسی هفت ترکیب فنولی و فلاونوئیدی گونه *C. atrosanguinea* در ایران می باشد.

**کلمات کلیدی:** ولیک، تیره گلسرخ، صنایع دارویی، ترکیبات فنولی

## مقدمه

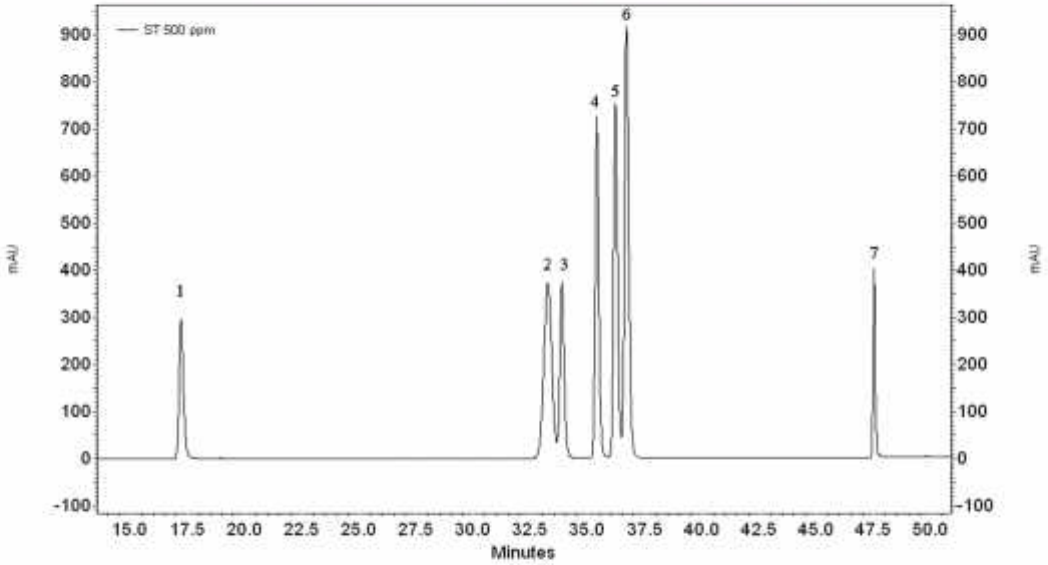
سرده ولیک (*Crataegus* L.) متعلق به تیره گل سرخ (Rosaceae) می باشد که ۱۵۰ تا ۱۲۰۰ گونه در جهان دارد و پراکنش آن عموما در مناطق معتدل نیمکره شمالی است. اصلی ترین مرکز تنوع آن آسیای صغیر و ایران است (Christensen, 1992). گونه های مختلف ولیک و عصاره های آنها به عنوان داروهای گیاهی در طب سنتی و طب نوین معرفی می شود و عامل اصلی استفاده از آنها در فرآورده های دارویی عموماً به دلیل داشتن اثرات آنتی اکسیدانی، محافظ قلب و عروق، افزایش دهنده جریان خون کرونری و پایین آورنده فشار خون می‌باشد. این گیاهان به طور معمول غنی از انواع پروسیانیدین ها، فلاونوئیدها و تری ترپن ها هستند که ترکیبات اصلی موثره در فعالیت های بیولوژیکی آنها محسوب می شوند (Melikoglu *et al*., 2004). از اندام های مختلف این گیاه، محصولات متنوع به تنهایی و یا در ترکیب با سایر گیاهان دارویی در سراسر اروپا تهیه شده است.

میوه ها، برگ ها و گل های ولیک دارای شماری از متابولیت های ثانویه مانند، فلاونوئیدها، الیگومریک پروسیانیدین ها، تری ترپن اسیدها، استرول ها و اسیدهای آلی و مقدار کمی از آمین های فعال کننده قلبی می باشد. از بین این ترکیبات فلاونوئید ها و الیگومریک پروسیانیدین ها به عنوان دو گروه اصلی مواد فعال زیستی محسوب می شوند که بسیاری از محصولاتی که از ولیک ها ساخته می شوند بر اساس کمیت و کیفیت همین ترکیبات استاندارد سازی و کنترل کیفیت می شوند (Chang *et al*., 2002).

باوجود پوشش انبوه مناطق مختلف کشور از گونه های مختلف ولیک، بر اساس دانش ما تاکنون هیچ ارزیابی جامعی از ترکیبات فنولی اندام های مختلف ولیک (گل، برگ و میوه) انجام نشده است. هدف این پژوهش، اندازه گیری ترکیبات فنولی گونه *Crataegus atrosanguinea* ولیک جمع آوری شده از منطقه بند اورمیه بود.

## مواد و روش ها

گیاه مورد آزمایش در این تحقیق گونه *Crataegus atrosanguinea* ولیک بود که اندام‌های مختلف این گیاه در بهار (جمع آوری گل و برگ) و پاییز (جمع آوری میوه) از منطقه بند اورمیه جمع‌آوری گردید. تعیین کمیت ترکیبات فنولی برگ، گل و میوه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفت. بدین منظور نمونه‌های برگ، گل و میوه بعد از خشک‌کردن آسیاب شدند و به منظور استخراج عصاره کل به مقدار یک گرم از نمونه‌های پودر شده را با متانول ۸۰ درصد در دستگاه سونیک ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و محلول به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد و حجم آن اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن مجدد نمونه ها با فیلتر سرسرنگی، در شیشه های کوچک دربدار مخصوص HPLC ریخته و تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در یخچال نگهداری شد. در این تحقیق از فلاونوئیدهای کوئرستین، ایزو کوئرستین، روتین، ویتکسین، ویتکسین رامنوزید، هیپروزید و همچنین کلروژنیک اسید با درجه خلوص بالا به عنوان استاندارد استفاده شد. آماده‌سازی محلول استاندارد به میزان ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm برای رسم منحنی کالیبراسیون دستگاه HPLC انجام شد. به منظور اندازه گیری فلاونوئیدها و کلروژنیک اسید نمونه های استاندارد و عصاره های تهیه شده از نمونه های گل، میوه و برگ به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) تزریق شد. میزان حجم تزریق به دستگاه HPLC برای استانداردها و نمونه های ولیک ۱۰ میکرولیتر بود.




شکل ۱- استانداردهای تزریق‌شده به دستگاه HPLC. ۱؛ کلروژنیک اسید، ۲؛ ویتکسین رامنوزید، ۳؛ ویتکسین، ۴؛ روتین، ۵؛ هیپروزید، ۶؛ ایزوکوئرستین، ۷؛ کوئرستین

## نتایج و بحث

در اندازه‌گیری کلروژنیک اسید و فلاونوئیدهای اندام‌های مختلف گیاه دارویی ولیک با دستگاه HPLC، نتایج نشان داد که میزان این ترکیبات (کلروژنیک اسید، ویتکسین رامنوزید، ویتکسین، روتین، هیپروزید، ایزوکوئرستین و کوئرستین) در اندام‌های مختلف گونه *Crataegus atrosanguinea* متفاوت می‌باشد. اندام های گل و برگ میزان بالاتری از این ترکیبات را دارا بودند. بیشترین میزان کلروژنیک اسید (۲/۸۸ mg/g DW) در اندام برگ و کمترین میزان این ترکیب (۰/۴۴ mg/g DW) در اندام میوه مشاهده شد. بیشترین میزان ویتکسین رامنوزید (۰/۹۰ mg/g DW) در اندام برگ و کمترین میزان این ترکیب (۰/۰۲ mg/g DW) در اندام گل مشاهده شد. ویتکسین رامنوزید در اندام میوه مشاهده نشد. بیشترین میزان ویتکسین (۲/۳۱ mg/g DW) در اندام برگ و کمترین میزان این ترکیب (۰/۱۳ mg/g DW) در اندام میوه مشاهده شد. بیشترین میزان روتین (۰/۰۵ mg/g DW) در اندام برگ مشاهده شد. روتین در اندام های گل و میوه مشاهده نشد. بیشترین میزان هیپروزید (۴/۹۷ mg/g DW) در اندام گل و کمترین میزان این ترکیب (۰/۸۸ mg/g DW) اندام میوه مشاهده شد. میزان ایزو کوئرستین در محدوده ۰/۶۸-۰/۴۸ mg/g DW محاسبه شد. بیشترین میزان ایزوکوئرستین (۰/۶۸ mg/g DW) در اندام میوه و کمترین میزان این ترکیب (۰/۴۸ mg/g DW) در اندام برگ مشاهده شد. کوئرستین فقط در اندام میوه مشاهده شد که میزان آن ۰/۰۶۷ mg/g DW بود. کوئرستین در اندام برگ و گل مشاهده نشد.

جدول ۱- میزان ترکیبات فنولی اندام های مختلف گونه *C. atrosanguinea*

| اندام | ترکیبات فنولی (mg/g DW) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | کلروژنیک اسید | ویتکسین رامنوزید | ویتکسین | روتین | هیپروزید | ایزوکوئرستین | کوئرستین |
| گل | ۱/۷۷ | ۰/۰۲ | ۰/۱۷ | - | ۴/۹۷ | ۰/۶۵ | - |
| برگ | ۲/۸۸ | ۰/۹۰ | ۲/۳۱ | ۰/۰۵ | ۱/۴۲ | ۰/۴۸ | - |
| میوه | ۰/۴۴ | - | ۰/۱۳ | - | ۰/۸۸ | ۰/۶۸ | ۰/۰۶۷ |

لیو و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی میوه‌های ۲۲ ژنوتیپ، گزارش کردند که نوع ژنوتیپ روی این ترکیبات موثر می‌باشد. در مشاهدات آنها هیپروزید ۰/۱ تا ۰/۸، ایزوکوئرستین ۰/۱ تا ۰/۳ و کلروژنیک اسید ۰/۲ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش شد. بحری-سلول و همکاران (۲۰۰۹) میزان ترکیبات فنولی گل‌های دو واریته گونه *C. azarolus* (*C. a.* var. *azarolus* و *C. a.* var. *aronia*) جمع‌آوری شده از تونس را گزارش کردند. کلروژنیک اسید، هیپروزید، روتین، اسپیرائوزید، (-)-اپی کاتچین، کوئرستین و پروسیانیدین B2 در همه نمونه ها یافت شدند. گل‌ها در حالت جوانه میزان ترکیبات فنولی بالایی نسبت به گلهای بازشده داشتند. در جوانه‌های *C. a.* var. *aronia* (۱۶۴ میلی‌گرم گالیک اسید اکی والانت بر کیلوگرم وزن خشک) ترکیبات فنولی بالایی نسبت به واریته *C. a.* var. *eu-azarolus* (۱۴۲ میلی‌گرم گالیک اسید اکی والانت بر کیلوگرم وزن خشک) مشاهده شد. در بررسی‌هایی که در کشور ترکیه روی گونه‌های مختلف ولیک انجام گرفت مشخص شد که گل و برگ گونه‌های *C. microphylla* و *C. stevenii* دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی هستند (Mericli and Melikoglu, 2002).

## منابع


1. Christensen, K. (1992). Systematic botany monographs (Revision of *Crataegus* and Nothosect). Crataeguineae (Rosaceae-Maloideae) in the old world, vol:35 THE. American society of plant taxonomists.
2. Melikoglu, G., Bitis, L. and Mericli, A.H. (2004). Flavonoids of Crataegus microphylla. Natural Product Research, Vol. 18, No. 3, pp. 211–213.
3. Mericli, A.H. and Melikoglu, G. (2002). Investigation on Turkish Crataegus Species. Acta Pharmaceutica Turcica, 44: 169-173.
4. Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F. and Chow, M.S. (2002). Hawthorn. The Journal of Clinical Pharmacology, 42: 605-612.


## Quantification of flavenoids in *Crataegus atrosanguinea* fruits, leaves and flowers by HPLC method


**A. Alirezalu[1*], P. Salehi[2], N. Ahmadi[3], M. Ayyari[3], A. Sonboli[2], and H. Hatami Maleki[4], Z. Akbari[5]**

1-Department of Horticultural Sciences, Urmia University. 2-Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University. 3- Department of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University. 4-Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Maragheh

*Corresponding author: a.alirezalu@urmia.ac.ir



### Abstract

Iran is one of the genetic centers for *Crataegus* but there are few studies that have attempted to describe the *Crataegus* genus of Iran. Due to its positive effects on the cardiovascular system, hawthorn has recently become quite a popular herbal medicine in phytotherapy. This study was undertaken in order to determination of seven polyphenols (chlorogenic acid, vitexin-2''-O-rhamnoside, vitexin, rutin, hyperoside, isoquercitrin and quercetin) of *C. atrosanguinea* different organs (leaves, flower and fruit). After extraction with 80% aqueous methanol, the phenolics of various organs were separated by high performance liquid chromatography (HPLC). The study revealed that there were differences in terms of phenolics characteristics among organs. Leaves and flowers organs had higher levels of phenolic compounds than fruits. Chlorogenic acid (2.88, 1.77, 0.44 mg/g DW), vitexin-2''-O-rhamnoside (0.9, 0.02, tr mg/g DW), vitexin (2.31, 0.17, 0.13 mg/g DW), rutin (0.05, tr, tr mg/g DW), hyperoside (1.42, 4.97, 0.88 mg/g DW), isoquercitrin (0.48, 0.65, 0.68 mg/g DW) and quercetin (tr, tr, 0.067 mg/g DW) were detected in leaves, flower and fruits respectively. Vitexin-2''-O-rhamnoside and rutin none detected in fruit. Quercetin and rutin none detected in flower. Also quercetin none detected in leaves. Results showed that different species are promising sources of phenolic compounds beneficial to be used in the pharmaceutical industries. This is the first report of seven polyphenols isolated from *C. atrosanguinea* leaves, flower and fruits in Iran.


**Keywords:** Hawthorn, Rosaceae, Pharmaceutical industry, Phenolic compounds