

تعیین مقدار و جداسازی هایپرسین‌ها در گیاه گل راعی مزرعه‌ای خوزستان به روش اسپکتروفتوتمتری ماورای بنسن مرئی

نسرین عاقل^{۱*}، زهرا رمضانی^۲، هانیه جلالی طلب^۳

چکیده

زمینه و هدف: هایپرسین یک نفتودی آنترون با اثرات متعدد فارماکولوژیکی می‌باشد. گیاه گل راعی مزرعه‌ای با نام علمی *Hypericum triquetrifolium* Hypericaceae *Turra* گیاهی است علفی، چند ساله و متعلق به خانواده UV- جداسازی و تعیین مقدار هایپرسین‌ها از برگ، گل و ساقه گیاه گل راعی مزرعه- ای و نیز تعیین بهترین اندام جهت استخراج است. روش بررسی: پس از جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه (گل، برگ و ساقه)، عصاره متابولی به کمک دستگاه سوکسله تهیه شد. برای تشخیص هایپرسین‌ها طیف گرفته و با طیف استاندارد مقایسه شد. تعیین مقدار هایپرسین‌ها به روش اسپکتروفتوتمتری و با استفاده از منحنی استاندارد هایپرسین در طول موج ۵۹۰ nm انجام شد. یافته‌ها: میزان هایپرسین‌ها در ۱۰۰ گرم پودر خشک برگ، گل و ساقه به ترتیب ۳۱۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم تعیین گردید. طبق این نتایج، میزان هایپرسین‌ها در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است. نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که میزان هایپرسین‌ها در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است. کلید واژگان: گل راعی مزرعه‌ای، هایپرسین‌ها، اسپکتروفتوتمتری ماورای بنسن مرئی.

- ۱- دانشیار گروه فارماکوگنوزی.
- ۲- استادیار گروه شیمی دارویی.
- ۳- دکتر داروساز.

- ۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
- ۲- گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
- ۳- داروساز.

* نویسنده مسئول:
نسرین عاقل؛ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۹۸۹۱۶۶۰۰۳۲۲۸
Email:aghelnas@yahoo.com

(۱۰). عصاره متابولی گیاه دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی است
(۱۱).

جمع آوری گیاه گل راعی بهتر است در ابتدای زمان گل
دادن صورت بگیرد، زیرا که میزان هایپرسین در اندام های
مختلف در ابتدای شکفتان به حداقل میزان خود می رسد
(۱۲).

با توجه به اثرات درمانی قابل توجه هایپرسین ها تصمیم
گرفته شد تا در این کار تحقیقاتی ابتدا هایپرسین ها از اندام-
های مختلف گیاه گل راعی مزرعه ای رویش یافته در استان
خوزستان جداسازی و سپس در برگ، گل و ساقه تعیین
مقدار شود و پس از آن بهترین اندام برای استخراج
هایپرسین ها مشخص گردد.

روش بررسی

جمع آوری و خشک کردن گیاه
برگ، گل و ساقه گیاه گل راعی مزرعه ای در اوخر بهار
و اوایل تابستان سال ۱۳۸۷ از مزارع گندم اطراف روستای
باران گرد از شوایع شهرستان ایذه (شمال استان خوزستان)
جمع آوری گردید. نام علمی آن (*Hypericum triquetrifolium Turra*)
توسط بخش گیاهشناسی مرکز تحقیقات استان خوزستان تعیین و نمونه هر باریومی
گیاه در هر باریوم گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی
نگهداری شد. اندام های مختلف گیاه در دمای اتاق و در
سايه به مدت ۱۴ روز خشک و پس از آسیاب کردن تا هنگام
آزمایش در ظروف کدر و در جای خنک و خشک
نگهداری شدند.

استخراج مواد مؤثرة گیاه

مقدار ۵۰ گرم از ساقه، برگ و گل های گیاه آسیاب شده
را به طور جداگانه وزن شد و با حلال هیدرولکلی متابول
۷/۵۰ درصد و دستگاه سوکسله به مدت ۵ ساعت
عصاره گیری انجام شد. عصاره ها پس از صاف کردن، توسط

مقدمه

گیاه *Hypericum triquetrifolium Turra* با نام *Hypericum triquetrifolium Turra* می باشد که گیاهی پایا، بدون کرک، سبز
مات یا سبز متامیل به آبی، پرساقه و انبوه، دارای برگ های
مثلثی - سر نیزه ای و گل های زرد رنگ به طول ۱-۲ میلی-
متر و میوه کپسول تخم مرغی به طول ۳-۵ میلی متر می باشد
(۱).

در کشور ما این گیاه در استان های فارس، کردستان و
خوزستان پراکنده است. گل راعی مزرعه ای به صورت علف
هرز در مزارع زراعی گندم استان خوزستان در مناطق
باغملک، ایذه و دهدز می روید (۲).

کینونهای موجود در گیاه گل راعی مزرعه ای شامل
هایپرسین و پسودوهاپرسين می باشد که قسمت اعظم آنها
را هایپرسین تشکیل می دهد، بدین منظور هایپرسین ها را
تحت عنوان هایپرسین نیز می نامند (شکل ۱). هایپرسین یک
نفتودینامیک می باشد که دارای اثر
ضد ویروسی بر علیه گستره وسیعی از رترو ویروس ها
شامل HSV-1 و HSV-2 و CMV و HIV-1 می باشد
(۴-۳). هایپرسین همچنین دارای اثر ضد کم خونی، ضد
افسردگی، ضد سرطان، ضد استفراغ، حشره کشی، لاروکشی
و ضد میکروبی می باشد (۷-۵). حیواناتی که این گیاه را
می خورند، به علت تجمع آن در پوست نسبت به نور حساس
می شوند.

تحقیقات نشان داده است که عصاره گل راعی مزرعه ای
و هایپرسین موجود در آن دارای خاصیت ضد میکروبی بر
علیه گونه استافیلوکوکوس می باشد (۸). بعضی از فرآورده های
حاوی هایپرسین در درمان اختلالات عصبی مثل
نگرانی و دلواپسی مورد استفاده قرار می گیرد (۹).

اثر ضد دردی عصاره گل راعی مزرعه ای و هایپرسین
موجود در آن در موش به اثبات رسیده است که این فعالیت
مربوط به مهار باز جذب سروتونین و نور آدرنالین می باشد

تهیه استاندارد

استاندارد هایپرسین (فرمول مولکولی $C_{30}H_{16}O_8$ و با جرم مولکولی $M_w=504.43$) به مقدار ۱ میلی گرم از شرکت Roth آلمان تهیه شد.

رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد غلظت‌های متفاوتی از نمونه استاندارد (محلول‌هایی با غلظت $0.0006, 0.0015, 0.0028, 0.0058, 0.0075$ میلی گرم بر میلی متر) تهیه و طیف آنها در ناحیه $620-500$ نانومتر بعد از صفر کردن دستگاه با اتانول به عنوان شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SHIMADZU (ژاپن) ثبت گردید.

تعیین بازیافت

برای تعیین صحت اندازه‌گیری روش، طبق دو فرمول زیر بازدهی روش محاسبه شد.

$$\frac{\text{مقادیر هایپرسین تعیین شده}}{\text{مقادیر هایپرسین واقعی}} = \text{بازیافت درصد (b)}$$

$$\frac{\text{مقادیر هایپرسین تعیین شده}}{\text{مقادیر هایپرسین اضافه شده}} = \text{بازیافت درصد (a)}$$

$$\frac{\text{تکرارپذیری (دقت)}}{\text{}} =$$

برای تعیین دقیق روش، میزان جذب غلظت ml 0.0028 استاندارد در چهار روز متوالی و هر روز پنج بار با دستگاه خوانده و CV (Coefficient of Variation) آنها تعیین شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به وزن عصاره خشک مربوط به هر کدام از اندام‌ها، میزان هایپرسین‌ها در برگ، گل و ساقه در 100 گرم پودر خشک، بازیافت روش اسپکتروفتومتری، تعیین تکرارپذیری روش و مقایسه ضریب تغییرات بین روزها و درون روزها در جداول ۱ تا ۵ آورده شده است.

نتایج طیف‌های اسپکتروفتومتری ماورای بنتش مربوط به هایپرسین استاندارد و نمونه‌های برگ، گل و ساقه گیاه گل

دستگاه تقطیر در خلا در دمای 50 درجه سانتی‌گراد تغییط شدند.

استخراج هایپرسین

جداسازی هایپرسین طبق روش Knox و Dodge انجام شد (۱۳). به طور خلاصه، به 5 گرم از هر یک از عصاره اندام‌ها، محلول حلال آب: استون (۹۰:۱۰) اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه با همزن مغناطیسی همزدہ شد. عصاره استونی پس از صاف کردن به قیف دکانتور منتقل و با 20 میلی‌لیتر پترولیوم اتر، عمل جداسازی کاروتینوئیدها و کلروفیل انجام شد. عصاره استونی نهایی در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تحت خلا تغییط گردید.

به منظور اثبات حضور هایپرسین‌ها در عصاره‌های به دست آمده، بر روی صفحه‌های TLC، عصاره هر یک از اندام‌ها با هایپرسین استاندارد مقایسه شد و بر اساس آزمایشات اولیه صورت گرفته، محلول کلروفرم - مثانول (۱:۲) به عنوان حلال برگزیده شد.

مراحل تخلیص هایپرسین‌ها با TLC تهیه‌ای 50 میلی‌گرم از عصاره‌های برگ، گل و ساقه به صورت جداگانه روی صفحه‌های TLC لکه‌گذاری و عمل جداسازی اجزای عصاره‌ها با پیش‌روی حلال کلروفرم - مثانول (۱:۳) انجام شد. نوارهای قرمز رنگ مربوط به هایپرسین‌ها تراشیده و در اتانول $7/V$ درصد حل شد. برای جدا کردن سیلیکاژل نمونه‌ها، از سانتی‌فیوژ با دور پایین استفاده شد. به منظور اطمینان از جدا شدن کامل هایپرسین‌ها از سیلیکاژل، آن را در ستون شیشه‌ای با اتانول شسته و سپس حلال حاوی هایپرسین به حجم 5 میلی‌لیتر رسانده شد.

همچنین سیلیکاژل در حلال انتخابی TLC قرار داده شد و جذب آن را با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 590 نانومتر خوانده و مشخص شد که خود سیلیکاژل به عنوان شاهد اثری در جذب ندارد.

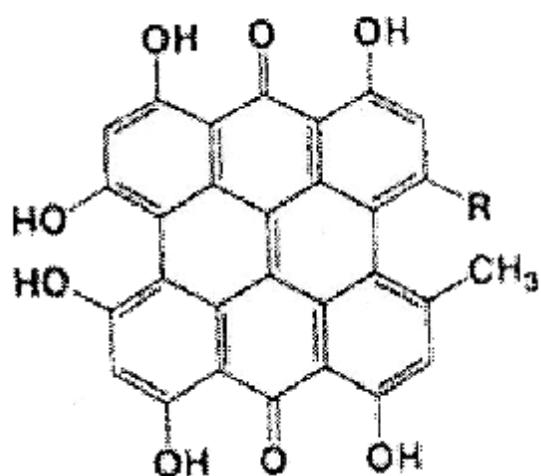
راعی مزرعه ای (در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر) به ترتیب در طول موج ۵۹۰ نانومتر در حلال اتانول (v/v ۵۰ درصد) رسم گردید (نمودار ۲).

شکل های ۶-۳ آمده است.

پس از تعیین جذب های مربوط به غلظت استاندارد، منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۰/۶ ppm تا ۷/۵ ppm در

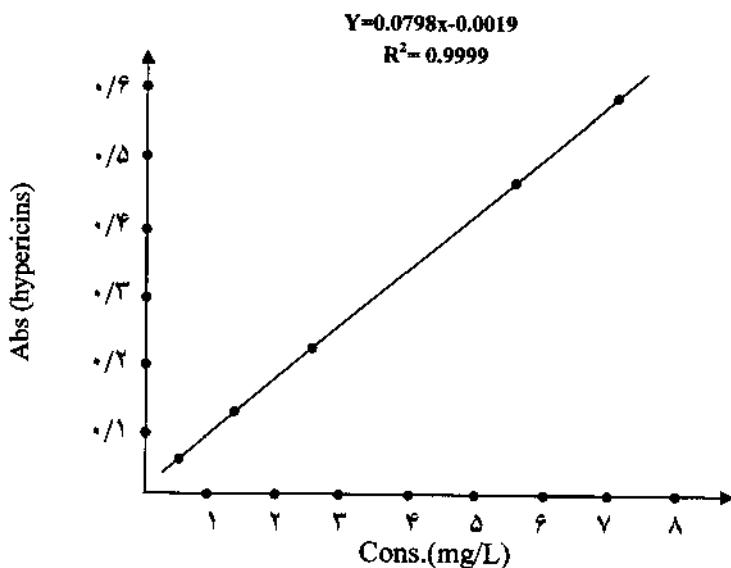
جدول ۱: مقادیر درصد عصاره خشک به دست آمده از برگ گل و ساقه گیاه بر حسب گرم

درصد (w/w)	اندام گیاه
۲۳/۴۸	برگ
۲۲/۲۳	گل
۱۶/۴	ساقه



R=CH₃, Hypericin
R=CH₂OH, Pseudohypericin

شکل ۱: ساختمان شیمیابی هیپرسین و پزودوهیپرسین



نمودار 2: منحنی خط کالیبراسیون هایپرسین در ناحیه غلظتی 0/6 تا 7/5 ppm

جدول 2: مقادیر هایپرسین در برگ، گل و ساقه در 100 گرم پودر خشک در هریک از اندامها (میانگین 3 بار اندازه‌گیری)

اندام	میلی گرم هایپرسین ها در 100 گرم پودر خشک
برگ	۳۱۰ ± ۰/۰۵۱
گل	۲۳۰ ± ۰/۰۲۸
ساقه	۱۵۰ ± ۰/۰۲۲

جدول 3: نتایج بازیافت روش UV-Visible در تعیین مقدار هایپرسین ها

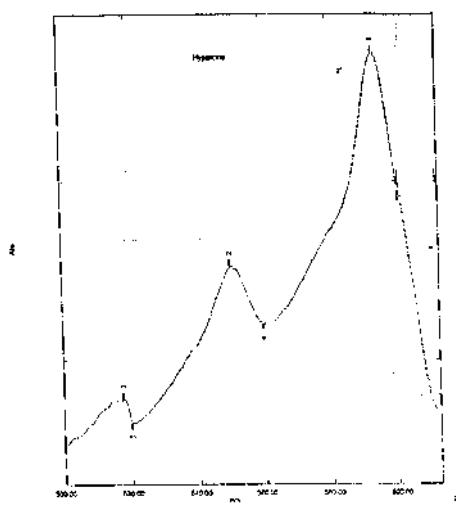
اندام	درصد بازیافت
برگ	۱۰۲/۱۰
گل	۱۰۲/۲۰
ساقه	۹۶/۷۵

جدول 4: نتایج مربوط به تعیین دقت (تکرارپذیری) برای غلظت 0/0028 mg/ml

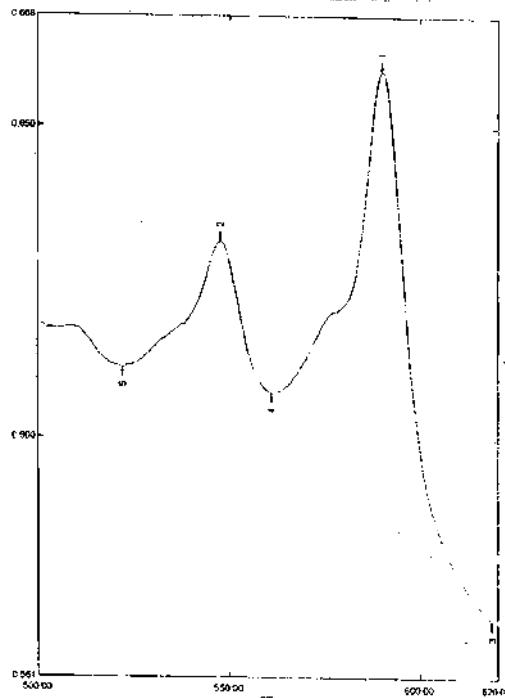
منبع	میانگین غلظت (mg/L)	درصد ضریب تغییرات
روز اول	۲/۷۹	۰/۰۱۴
روز دوم	۲/۱۳	۰/۰۰۶
روز سوم	۳	۰/۰۱۰
روز چهارم	۳/۱۴	۰/۰۰۶

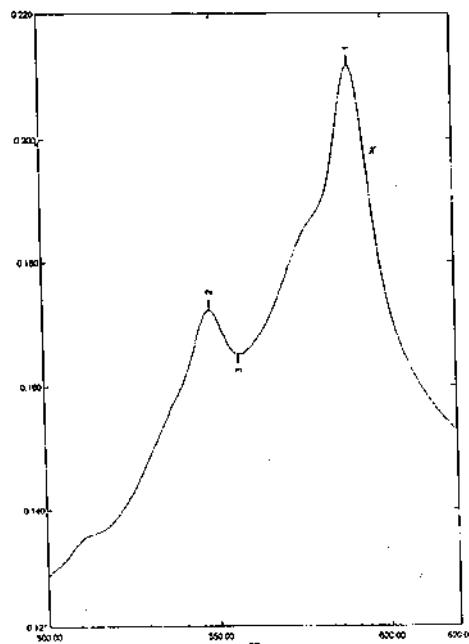
جدول ۵: نتایج مقایسه ضریب تغییرات بین روزها و درون روزها برای غلظت ۰/۰۰۲۸ mg/ml

منبع	ضریب تغییرات
بین روزها	۰/۰۳۶
درون روزها	۰/۰۰۹

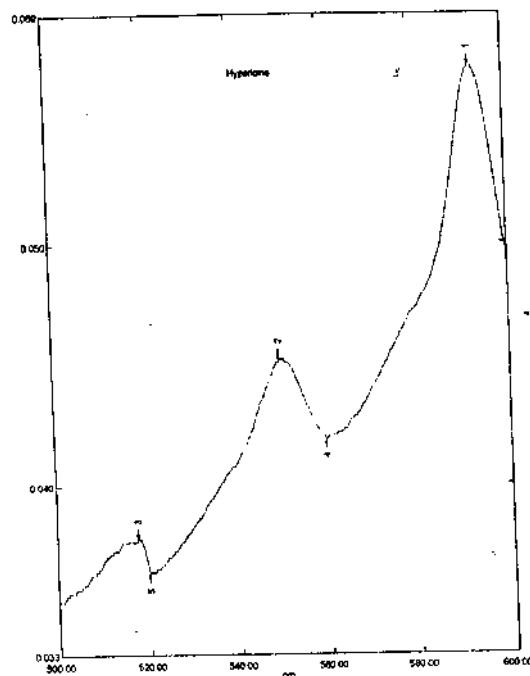


نمودار ۳: طیف اسپکتروفوتومتری ماوراءبنفس هایپرسین استاندارد در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر

نمودار ۴: طیف ماوراء بنفس هایپرسین برگ *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر



نمودار ۵: طیف ماورای بنتش هایپرسین گل *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر



شکل ۶: طیف ماورای بنتش هایپرسین ساقه *Hypericum triquetrifolium* در ناحیه ۵۰۰-۶۲۰ نانومتر

بحث

زایشی و ساقه‌ها غلاظت‌های بالاتری از این ترکیبات نفتودی آنtronon داشته است (۱۴).

مطالعه بر روی مقادیر هایپرسین‌های اندام‌های مختلف و *Hypericum* در مراحل مختلف رشد گیاه *Hypericum triquetrifolium* موجود در جزیره کرت (یونان) نشان داد که در شروع گل‌دهی بالاترین و در هنگام تشکیل میوه کمترین مقدار هایپرسین ثبت گردیده بود (۱۵).

تحقیقات قبلی در جهت تعیین مقدار هایپرسین در گیاه گل راعی مزرعه‌ای نشان داده است که میزان هایپرسین در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است و حدوداً برگ دارای ۳۶۰ میلی گرم هایپرسین در ۱۰۰ گرم پودر خشک می‌باشد (۱۶).

نتیجه‌گیری

نتایج اولیه بدست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که گیاه گل راعی مزرعه‌ای خصوصاً برگ‌های آن، می‌تواند منبع مناسب، ارزان و در دسترس جهت جداسازی هایپرسین‌ها موردن توجه قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتری جهت رسیدن به مراحل جداسازی انبوه این ترکیبات از منع گیاهی مورد نیاز است.

پیشنهاد می‌شود با کار بیشتر روی فاکتورهای موثر در استخراج و جداسازی هایپرسین‌ها، با افزایش راندمان استخراج و کاهش ناخالصی‌ها، روش بهینه‌سازی شود.

قدرتانی

تحقیق حاضر از طرح تحقیقاتی مصوب از پایان‌نامه دانشجویی استخراج شده است و بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز که حمایت مالی طرح را بر عهده داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

در سال‌های اخیر آنتراکینون‌ها، خصوصاً هایپرسین توجه بسیاری از محققین را در زمینه علوم دارویی و تغذیه به خود جلب کرده است. تاکنون اثرات مختلفی برای هایپرسین به اثبات رسیده است. از آن جمله می‌توان به اثرات ضد افسردگی، ضد میگرن، اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان، ضد باکتری و ضد التهاب اشاره کرد. گیاه گل راعی مزرعه‌ای حاوی هایپرسین می‌باشد و می‌توان آنرا به عنوان یک منبع فراوان، در دسترس و ارزان قیمت برای هایپرسین به شمار آورد.

همانند هر ترکیب گیاهی دیگر، نخستین گام جهت تهیه مفرون به صرفه این ماده دارویی، شناسایی و تعیین مقدار این ترکیب از منابع گیاهی آنها است. لذا در این تحقیق با روشی ساده، ارزان و تکرارپذیر اقدام به جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار هایپرسین از اندام‌های مختلف گیاه گل راعی مزرعه‌ای شد.

نتایج اندازه‌گیری نشان داد که مقدار هایپرسین در ۱۰۰ گرم پودر خشک برگ، گل و ساقه به ترتیب ۳۱۰ میلی- گرم، ۲۳۰ میلی گرم و ۱۵۰ میلی گرم می‌باشد که بر طبق این نتایج میزان هایپرسین در برگ نسبت به گل و ساقه بیشتر است.

مقایسه نتایج طیف UV استاندارد هایپرسین با هایپرسین‌های استخراج و خالص شده از گیاه گل راعی مزرعه‌ای نشان داد مقدار کمی ناخالصی در این اندام‌ها وجود دارد که به نظر می‌رسد میزان آن در ساقه بیشتر است. تغییرات مقادیر هایپرسین‌های اندام‌های مختلف *Hypericum triquetrifolium* در مراحل مختلف رشد گیاه رشد کرده در ترکیه مورد مطالعه قرار گرفته بود. نتایج تحقیق نشان داده است که میزان هایپرسین‌های برگ و اندام‌های زایشی در هنگام گل‌دهی و تشکیل میوه بیشترین مقدار را داشته است؛ در حالی که مقدار این مواد با افزایش رشد گیاه در ساقه‌ها کاهش می‌یابد. برگ‌ها در مقایسه با اندام‌های

منابع

- 1-Ghahraman A. Color Atlas of Iranian Flora. Research Institute of Forest and Rangelands publishing; 1996. p. 3071.
- 2-Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names. Tehran: Farhang Moaser; 1996. p. 137.
- 3-Xu Y,Lu C. Raman spectroscopic study on structure of human immunodeficiency virus (HIV) and hypericin-induced photosensitive damage of HIV. *Sci China C Life Sci* 2005;48:117-32.
- 4-Miskorsty P. Hypericin--a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets* 2002;3:55-84.
- 5-Blank M, Lavie G, Mandel M, Hazan S, Orenstein A, Meruelo D, et al. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. *Int J Cancer* 2004; 111:596-603.
- 6-Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 2001;34:116-8.
- 7-Carpenter S, Fehr MJ, Kraus GA, Petrich JW. Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: a molecular flashlight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 12273-7.
- 8-Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, et al. Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001;45:517-24.
- 9-Sarris J, Kavanagh DJ. Kava and St. John's Wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. *J Altern Complement Med* 2009;15:827-36.
- 10-Couladis M, Baziou P, Verykokidou E, Loukis A. Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytother Res* 2002;16:769-70.
- 11-Apaydin S, Zeybek U, Ince I, Elgin G, Karamenderes C, Ozturk B, et al. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *J Ethnopharmacol* 1999;67:307-12.
- 12-Bruni R, Sacchetti G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 2009;14:682-725.
- 13-Knox JP, Dodge AD. Isolation and activity of the photodynamic pigment hypericin. *Plant Cell Environment* 1985;8:19-25.
- 14-Ayan AK, Cirak C. Variation of hypericins in *Hypericum triquetrifolium* Turra growing in different locations of Turkey during plant growth. *Nat Prod Res* 2008;22:1597-1604.
- 15-Xenophontos M, Stavropoulos E, Avramakis E, Navakoudis E, Dornemann D, Kotzabasis K. Influence of the developmental stage on the (proto)-hypericin and (proto) pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete. *Planta Med* 2007;73:1309-15.
- 16-Alali F, Tawaha K, Al-Eleimat T. Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra (Hypericaceae) growing wild in Jorden . *Nat Prod Res* 2004;18:147-51.

Isolation and Determination of Hypericins from Different Parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra Grown in Khozestan by UV/Visible Spectrophotometry

Nasrin Aghel^{1*}, Zahra Ramezani², Haniyeh Jalalitalab³

1-Associate Professor of Pharmacognosy.

2-Assistant Professor of Medicinal Chemistry.

3-Pharmacist.

1-Department of Pharmacognosy, Medicinal Plant Research Center, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2-Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3-Pharmacist.

*Corresponding author:

Nasrin Aghel; Department of Pharmacognosy, Medicinal Plant Research Center, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +98916003228

Email: aghelnas@yahoo.com

Abstract

Background & Objective: Hypericin is a naphtodianthrone with multiple pharmacologic actions. *Hypericum triquetrifolium* Turra grows in different part of Iran. The aim of the present study was to isolate and determine the quantity of hypericins in different parts (leaf, flower and stem) of this plant grown in Khozestan province.

Materials & Methods: Different parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra (leaf, flower and stem) were collected and extracted with methanol 50% using soxhlet apparatus. Hypericin was determined using UV/Visible spectrophotometer at 590 nm.

Results: The percents of hypericin in leaves, flowers and stems were 310, 210 and 150 mg/100g, respectively.

Conclusion: Leaves and flowers of *Hypericum triquetrifolium* Turra have considerable amounts of hypericin.

Keywords: *Hypericum triquetrifolium* Turra, Hypericin, UV/Visible spectrophotometry.

►Please cite this paper as:

Aghel N, Ramezani Z, Jalalitalab H. Isolation and Determination of Hypericins from Different Parts of *Hypericum triquetrifolium* Turra Grown in Khozestan by UV/Visible Spectrophotometry. Jundishapur Sci Med J 2012;11(3):285-294

Received: Apr 28, 2010

Revised: May 4, 2011

Accepted: Jan 21, 2012