# بررسی مقایسه‌ای و افتراقی گونه‌های گل ساعتی (*Passiflora incarnate* L.) و (*Passiflora caerulea* L.) در گیاه خام و فراورده‌های مرتبط

هما حاجی‌مهدی‌پور[۱]، شمسعلی رضازاده[۲]*، عباس حاجی‌آخوندی[۳]، مرتضی پیرعلی‌همدانی[٤]، افسانه رضایی[٥]، حمیرا زاهدی[٦]، نیلوفر کلانتری‌خاندانی[۷]

۱- استادیار، بخش داروهای گیاهی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
۲- استادیار، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۳- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
٤- دانشیار، گروه شیمی‌دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
٥- کارشناس، شرکت ایران داروک
٦- دکتر داروساز، بخش داروهای گیاهی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
۷- کارشناس، بخش داروهای گیاهی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب، خیابان فخررازی، خیابان شهدای ژاندارمری‌شرقی، پلاک ۱۷۲ طبقه سوم
صندوق‌پستی: ١٤٤٦ - ١٣١٤٥، تلفن و نمابر: ٦٦٩٧١١٩١ (٠٢١)
پست الکترونیک: Shrezazadeh@yahoo.com

**تاریخ دریافت:** ٨٤/١١/٥ **تاریخ تصویب:** ٨٥/١٢/١

## چکیده

**مقدمه:** جنس پاسیفلورا شامل گونه‌های متعددی است اما تنها دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea* در ایران به صورت کاشته شده وجود دارند. تحقیقات فارماکولوژیک و بالینی زیادی روی اثرات درمانی این گیاهان صورت گرفته است اما در میان گونه‌های مختلف تنها گونه *P. incarnata* به عنوان گونه رسمی برای استفاده در فرمولاسیون‌های دارویی تایید شده است که عمدتاً در درمان اضطراب و بی‌خوابی به کار می‌رود. این دو گونه از نظر خصوصیات گیاه‌شناسی شباهت زیادی به هم دارند که با روش‌های معمول گیاه‌شناسی از هم قابل افتراق نیستند.

**هدف:** هدف از این بررسی، تشخیص افتراقی دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea* در گیاه خام و فراورده‌های دارویی مرتبط است.

**روش بررسی:** در این تحقیق سرشاخه‌های هوایی دو گیاه به روش خرده‌نگاری با یکدیگر مقایسه شدند. هم‌چنین میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و نیز میزان فلاونوییدهای تام آن‌ها بر اساس هایپروزید سنجیده شد. الگوی فلاونوییدهای دو گیاه به روش **TLC** و الگوی ترکیبات عصاره اتانولی دو گیاه و نیز فراورده‌های دارویی قرص و قطره پاسی‌پی شرکت ایران داروک، عصاره خشک و قطره پاسی فلورا شرکت **Vogel** و قطره پاسی فلورا شرکت **Curarina** به روش **HPLC** بررسی و مقایسه شدند.

**نتایج:** دو گیاه *P. incarnata* و *P. caerulea* از نظر میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و فلاونوییدهای تام تفاوت زیادی با هم ندارند ولی تراکم و شکل روزنه‌ها، میزان کرک‌های روی اپیدرم تحتانی و نوع آوند در آن‌ها کاملاً متفاوت است. الگوی کروماتوگرام‌های **HPLC** و **TLC** دو گیاه نیز تفاوت چشمگیری با یکدیگر دارند.

**نتیجه‌گیری:** اندام‌های هوایی دو گیاه به روش خرده‌نگاری قابل تشخیص از یکدیگر هستند. هم‌چنین عصاره‌های حاصل از این دو گونه (به صورت مستقیم یا به کار رفته در فرمولاسیون‌های دارویی) را می‌توان با روش **HPLC** و یا **TLC** از یکدیگر تشخیص داد؛ البته این دو روش بسیار کارا بوده و نیاز به آماده‌سازی نمونه طی مراحل پیچیده ندارند.

**گل‌واژگان:** تشخیص افتراقی *Passiflora incarnata*, *Passiflora caerulea*, **HPLC, TLC**



Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

جنس پاسیفلورا در جهان حدود ٤٠٠ گونه گیاه علفی یا چوبی و اغلب بالا رونده دارد که اکثر آن‌ها بومی آمریکا و تعداد کمی بومی آسیا و استرالیا هستند. در ایران دو گونه *Passiflora incarnata* و *Passiflora caerulea* در بخش‌های شمالی کشور کاشته می‌شوند [١]. این جنس شامل ترکیبات متعددی است که عمده‌ترین آن‌ها مشتقات C-گلیکوزیله آپی‌ژنین و لوتئولین مانند ویتکسین، ایزوویتکسین، اورینتین و ایزواورینتین هستند که بالا بودن غلظت این ترکیبات، کیفیت گیاه را مشخص می‌کنند، اما هنوز مشخص نشده که دقیقاً کدام دسته از ترکیبات مسؤول اعمال فارماکولوژیک گیاه هستند [٢].

بر طبق منابع رسمی تنها گونه‌ای که ارزش دارویی آن مشخص شده و فرمولاسیون‌های دارویی از آن تهیه می‌گردد *P. incarnata* است [٣،٤،٥]. این گونه سال‌های زیادی است که به عنوان یک داروی قوی ضداضطراب و آرام‌بخش، در هومیوپاتی برای درمان بی‌خوابی، صرع، تتانوس و اسپاسم‌های عضلانی [٦]، در آروماتراپی برای کاهش هیجانات روحی [٤] و به صورت موضعی در هموروئید استفاده می‌شود [٦]. مصرف این گیاه در کتاب Commission E در بی‌قراری‌های با منشا عصبی، تائید نشده است [٧]. با توجه به شباهت ظاهری زیاد گونه‌های پاسیفلورا و امکان اشتباه در به کارگیری سایر گونه‌ها به جای گونه رسمی آن، شناسایی تفاوت‌های این گونه با سایر گونه‌ها از نظر ریخت‌شناسی و نیز ترکیبات موجود در آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. چون در ایران فقط دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea* به صورت کاشته شده وجود دارند، بنابراین در این تحقیق این دو گونه از نظر خرده‌نگاری و نیز الگوی ترکیبات موجود در آن‌ها بررسی شدند. هم‌چنین چندین فراورده موجود در بازار دارویی ایران و خارج که همگی حاوی *P. incarnata* هستند، از نظر الگوی ترکیبات با دو گیاه فوق مقایسه شدند.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌ها

سرشاخه‌های هوایی دو گیاه *P. incarnata* و *P. caerulea* در تابستان ١٣٨٤ به ترتیب از منطقه جنوب ساری و گرگان جمع‌آوری شده و توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی شناسایی شدند. قطره و قرص پاسی‌پی شرکت ایران داروک از بازار داخلی، اما عصاره خشک *P. incarnata* و قطره پاسیفلورای شرکت Vogel و قطره پاسیفلورای شرکت Curarina از بازارهای خارجی تهیه شدند.

### آماده‌سازی نمونه‌ها

گیاهان تهیه شده در سایه خشک شده و آسیاب گشتند. پودرهای حاصله جهت بررسی‌های خرده‌نگاری، تعیین میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و تعیین مقدار فلاونوییدهای تام [٨] استفاده شدند. جهت بررسی الگوی ترکیبات دو گیاه به روش HPLC، ٥ گرم از پودر هر گیاه در ٥٠ میلی‌لیتر اتانول ٧٠ درصد به مدت ١ ساعت رفلاکس شده و سپس صاف شد. نمونه قرص و عصاره خشک پاسیفلورا نیز به همین ترتیب آماده گردید. همه محلول‌های تهیه شده و نیز قطره‌ها قبل از تزریق به دستگاه HPLC از صافی ٠/٤٥ میکرومتر عبور داده شدند.

به منظور بررسی الگوی ترکیبات فلاونوئیدی دو گیاه به روش TLC، ١ گرم از پودر هر گیاه در ٥٠ میلی‌لیتر متانول ریخته شده و به مدت ١٠ دقیقه جوشانده شد. سپس مخلوط حاصله صاف گشت.

### بررسی خصوصیات میکروسکوپیک

پودر حاصل از سرشاخه‌های هوایی دو گیاه پس از بی‌رنگ کردن توسط پتاس ١٠ درصد و آب ژاول و رنگ‌آمیزی توسط میکروسکوپ نوری دوربین‌دار بررسی شدند.



Archive of SID
www.SID.ir

**بررسی کروماتوگرام ترکیبات عصاره اتانولی دو گیاه به روش HPLC**

برای آنالیز عصاره‌ها از دستگاه HPLC ساخت کارخانه Knuer مدل k-1001 استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و فاز متحرک ترکیبی از محلول A ( KH2PO4, 0.005M, pH 2.55) و محلول B (استونیتریل: متانول، ٦٥: ٣٥) به صورت گرادیان طبق جدول شماره ۱ انجام شد. ستون از نوع C18 با قطر ذرات ۵ میکرومتر و طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ٤/٥ میلی‌متر بود. دتکتور، UV و در طول موج ۳۳۵ نانومتر تنظیم شد.

**بررسی الگوی فلاونوییدهای دو گیاه به روش TLC**

جهت آنالیز الگوی فلاونوییدهای دو گیاه از صفحات HPTLC شرکت Camag، به ابعاد cm ۱۰×۱۰، فاز متحرک اسید فرمیک: آب: اتیل متیل کتون: اتیل‌استات، ۱۰: ۱۰: ۳۰: ۵۰، معرف فلانوییدها به همراه PEG 400 و لامپ UV به طول موج ٣٦٦ نانومتر و ویدئو اسکن CAMAG REPROSTAR 3 جهت تهیه عکس از صفحات استفاده شد.

## نتایج

نتایج به دست آمده از خرده‌نگاری اندام‌های هوایی دو گیاه *P. incarnata* و *P. caerulea* در شکل‌های شماره ۱ و ۲ آورده شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهند که:

۱- گونه *incarnata* دارای کرک‌های درشت روی اپیدرم تحتانی بوده ولی گونه *Caerulea* بدون کرک است.

۲- در گونه *caerulea* تراکم روزنه‌ها نسبت به گونه *incarnata* به صورت واضح بیشتر است.

۳- شکل روزنه‌ها در *incarnata* بیضی کشیده بوده ولی در *caerulea* به صورت کروی دیده می‌شود.

٤- نوع آوند در *incarnata* به صورت مشبک ولی در *caerulea* به صورت حلقوی است.

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و فلاونوئیدهای تام دو گیاه *P. incarnata* و *P. caerulea* در جدول شماره ۲ آورده شده‌اند.

الگوی کروماتوگرام HPLC عصاره اتانولی دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea* در شکل‌های شماره ۳ و ٤ آورده شده‌اند.

نتایج به دست آمده از بررسی الگوی ترکیبات موجود در عصاره اتانولی دو گونه گیاه و نیز قرص و قطره پاسی‌پی شرکت ایران داروک، عصاره خشک و قطره پاسیفلورای شرکت Vogel و نیز قطره پاسیفلورای شرکت *Curarina* که همگی حاوی *P. incarnata* هستند در جدول شماره ۳ آورده شده است.

با بررسی کروماتوگرام‌های HPLC مشخص می‌گردد که در گیاه *P. incarnata* و فراورده‌های حاصل از آن یک پیک در زمان بازداری ٦/٩ – ٥/٤ دقیقه ظاهر می‌گردد و ۵ پیک شاخص نیز در زمان بازداری ۱۲ – ۸ دقیقه قرار دارند که الگوی پیک‌های به دست آمده در تمامی نمونه‌ها یکسان است به گونه‌ای‌که پیک پنجم آن‌ها پیک غالب است. پیک‌های کوچک‌تری نیز در زمان بازداری ۱۵ – ۱۲ دقیقه مشاهده می‌شوند که در همه نمونه‌ها قرار ندارند و در زمره پیک‌های تشخیصی به حساب نمی‌آیند.

در گیاه *P. caerulea* الگوی کروماتوگرام کاملا متفاوت بوده به گونه‌ای‌که ٤ پیک شاخص در نواحی ۸/۹، ۱۰/۵، ۱۱/۰ و ۱۳/۳ مشاهده می‌گردند. بقیه پیک‌ها از نظر شدت کمتر بوده و ارزش تشخیصی ندارند.

کروماتوگرام TLC دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea* در شکل شماره ۵ آورده شده است. این کروماتوگرام نشان می‌دهد که لکه با فلورسانس زرد کمرنگ در RF= ۰/۹ فقط در *P. incarnata* و لکه زرد قهوه‌ای با RF= ۰/٦٥ و دو لکه قهوه‌ای تیره در ۰/٤٨ و RF= ۰/۳۷ و لکه زرد در RF = ۰/٤٢ فقط در *P. caerulea* دیده می‌شوند. در بقیه لکه‌ها تفاوتی بین دو گونه مشاهده نمی‌شود.

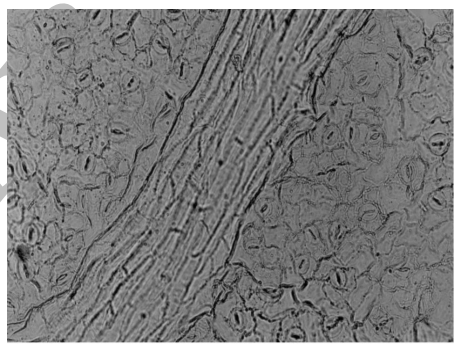


Archive of SID
www.SID.ir

**جدول شماره ۱- نسبت حلال‌های A و B استفاده شده در دستگاه HPLC جهت آنالیز عصاره‌ها در زمان‌های مختلف**

| زمان | محلول A | محلول B |
|---|---|---|
| ۰ | ۷٤ | ۲٦ |
| ۳ | ۷٤ | ۲٦ |
| ۲۲ | ۱۵ | ۸۵ |
| ۲۷ | ۷٤ | ۲٦ |
| ۳۰ | ۷٤ | ۲٦ |

**شکل شماره ۱- تصویر میکروسکوپی اجزای گیاه *P. incarnate***



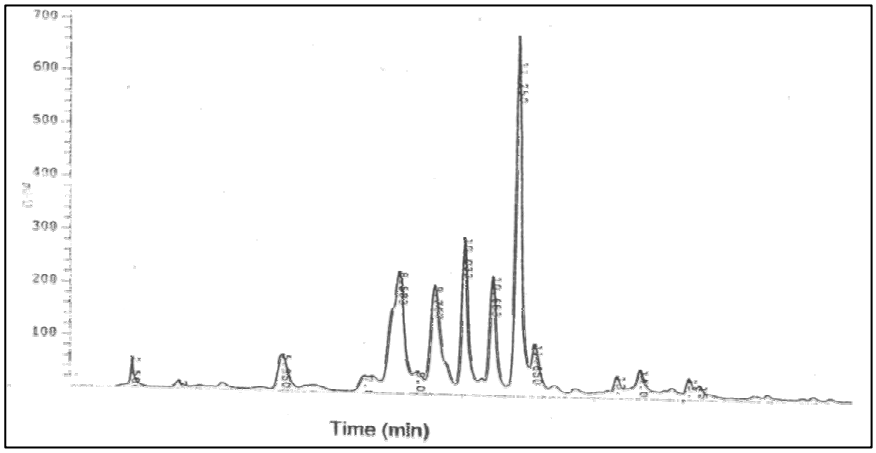
**شکل شماره ۲- تصویر میکروسکوپی اجزای گیاه *P. caerulea***

**جدول شماره ۲- مقایسه میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و فلاونوییدهای تام *P. incarnata* و *P. caerulea***

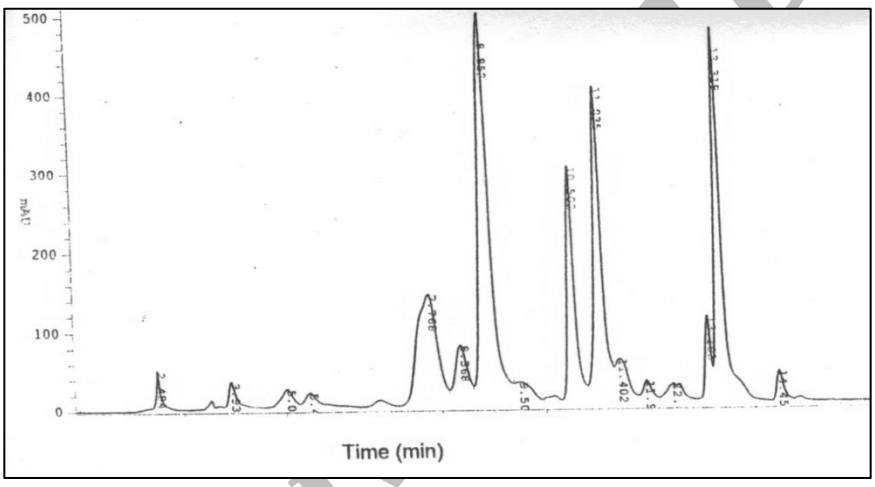
| نام گیاه | خاکستر تام | خاکستر نامحلول در اسید | فلاونوییدهای تام |
|---|---|---|---|
| *P. incarnata* | ٦/۹٦ درصد | ۰/۸۹ درصد | ۰/۳۰ درصد |
| *P. caerulea* | ۷/۳۵ درصد | ۰/۱۰ درصد | ۰/۳٦ درصد |



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل شماره ۳- الگوی کروماتوگرام HPLC عصاره اتانولی *P. incarnate***




**شکل شماره ٤- الگوی کروماتوگرام HPLC عصاره اتانولی *P. caerulea***

**جدول شماره ۳- زمان‌های بازداری اجزاء گیاه *P.incarnata* و *P. caerulea* و فرمولاسیون‌های دارویی در کروماتوگرام HPLC**

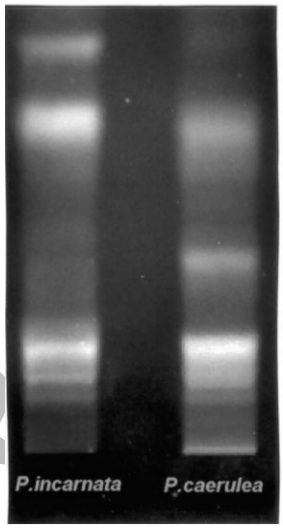
| نام نمونه | قرص پاسی پی | قطره پاسی پی | قطره پاسیفلورا (vogel) | قطره پاسیفلورا (curarina) | عصاره خشک | گیاه *P.incarnata* | گیاه *P. caerulea* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| زمان بازداری (دقیقه) | ٦/٣ | ٥/٤ | ٥/٧ | ٦/٩ | ٦/٧ | ٦/٠ | ٧/٨ |
| | ٨/٨ | ٨/٠ | ٨/٤ | ٩/٥ | ٩/٤ | ٨/٦ | ٨/٤ |
| | ٩/٣ | ٩/٠ | ٩/١ | ١٠/١ | ١٠/١ | ٩/٤ | ٨/٩ |
| | ٩/٩ | ٩/٨ | ٩/٧ | ١٠/٨ | ١٠/٧ | ١٠/٠ | ١٠/٥ |
| | ١٠/٤ | ١٠/٤ | ١٠/٢ | ١١/٣ | ١١/٣ | ١٠/٧ | ١١/٠ |
| | ١١/٠ | ١١/١ | ١٠/٧ | ١١/٩ | ١١/٨ | ١١/٢ | ١٣/١ |
| | ١٣/١ | – | ١١/١ | ١٢/٧ | – | ١١/٦ | ١٣/٣ |



Archive of SID
www.SID.ir

**ادامه جدول شماره ۳- زمان‌های بازداری اجزاء گیاه *P.incarnata* و *P. caerulea* و فرمولاسیون‌های دارویی در کروماتوگرام HPLC**

| نام نمونه | قرص پاسی پی | قطره پاسی پی | قطره پاسیفلورا (vogel) | قطره پاسیفلورا (curarina) | عصاره خشک | گیاه *P.incarnata* | گیاه *P. caerulea* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| زمان بازداری (دقیقه) | ۱۳/٦ | – | ۱۲/۷ | ۱۳/۱ | – | ۱۳/۵ | ۱٤/٤ |
| | ۱٤/۵ | – | ۱۳/۳ | ۱۳/۷ | – | ۱٤/۰ | – |
| | – | – | ۱۳/۹ | ۱٤/۳ | – | ۱۵/۲ | – |
| | – | – | ۱٤/٤ | ۱٤/۹ | – | – | – |
| | – | – | – | ۱۵/٤ | – | – | – |




**شکل شماره ۵- کروماتوگرام TLC دو گونه *P. incarnata* و *P. caerulea***

## بحث

بررسی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که دو گیاه تفاوت زیادی در میزان خاکستر تام، خاکستر نامحلول در اسید و نیز میزان فلاونوئیدهای تام با یکدیگر ندارند ولی نتایج خرده نگاری آن‌ها کاملاً با یکدیگر متفاوت بوده به گونه‌ای‌که خرده‌نگاری می‌تواند یک روش تشخیصی این دو گونه از یکدیگر باشد.

از نتایج به دست آمده از کروماتوگرام HPLC دو گیاه چنین بر می‌آید که در فراورده‌های دارویی وجود *P. caerulea* را به عنوان تقلب به راحتی می‌توان تشخیص داد که این تکنیک کارایی بسیار بالایی داشته و نیاز به آماده‌سازی نمونه در مراحل مختلف و پیچیده ندارد.

بررسی کروماتوگرام TLC دو گیاه نشان می‌دهد که این روش نیز روش مناسبی جهت تشخیص افتراقی دو گونه است به گونه‌ای‌که بسیار سریع و ساده بوده و نیاز به تجهیزات دستگاهی مانند HPLC ندارد.



Archive of SID
www.SID.ir

## منابع


1. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhang Moaser. 1996, p: 396.
2. Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M and Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 37: 399 - 403.
3. Calam DH. European Pharmacopoeia. 4th ed. EDQM. Strasbourg. 2002, p: 1709.
4. LaGow B. PDR for Herbal Medicines. 3th ed. Thomson PDR. Montvale. 2004, p: 622.
5. Sweetman SC. Martindale, The Complete Drug Reference. 35th ed. Pharmaceutical Press. London. 2007, p: 2143.
6. Dhawan K, Kumar S and Sharma A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis*. *Fitoterapia.* 2001; 72: 698 - 702.
7. Blumenthal M. The Complete German Commission E Monographs. Botanical Council. Austin. 1998, pp: 179 - 180.
8. Compilation Committee of Iranian Herbal Pharmacopoeia. Iranian Herbal Pharmacopoeia. Tehran: Ministry of Health and Medical Education. 2002, pp: 9 - 10, 702.


Archive of SID



www.SID.ir