

بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه Loganberry (*Rubus×Loganobaccus*) تکثیر شده از طریق کشت بافت

شیما مریخ^۱، محبوبه طاهرخانی^{۲*} و سیدرضا حسینی دوست^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی فیتوشیمی و شیمی فناوری اسانس، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲* - نویسنده مسئول، استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، تاکستان، ایران
پست الکترونیک: mahtaherkhani@yahoo.com
- ۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵

چکیده

گیاه مورد مطالعه، گیاهی هیبریدی با نام علمی Loganberry (*Rubus×Loganobaccus*) از خانواده Rosaceae و جنس *Rubus* می باشد که میوه‌ای مانند توت‌فرنگی می‌دهد. میوه این گیاه قرمز و بسیار ترش است و این گیاه بسیار کمیاب، یکی از ارقام تمشک قرمز می‌باشد. Loganberry بومی ایران نبوده و در حال حاضر از طریق کشت درون شیشه‌ای تکثیر می‌گردد. تاکنون تحقیقی از نظر فیتوشیمیایی بر روی گونه هیبریدی Loganberry انجام نشده است. در این تحقیق، عصاره برگ گیاه Loganberry (*Rubus×Loganobaccus*)، تکثیر شده از طریق کشت درون شیشه‌ای، از نظر ترکیب‌های طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این تحقیق، ابتدا مراحل عصاره‌گیری و چربی‌گیری انجام شد. عصاره روی ستون کروماتوگرافی برده شد و از نظر ترکیب‌های تشکیل‌دهنده بررسی شد. سپس ترکیب طبیعی با استفاده از روش‌های مختلف طیف‌سنجی IR، ¹H-NMR، ¹³C-NMR و dept 135 شناسایی شد. نتایج حاصل از روش‌های طیف‌سنجی منجر به شناسایی یک فلاونوئید به نام هسپریدین (Hesperidin) شد.

واژه‌های کلیدی: Loganberry، کشت درون شیشه‌ای، عصاره، هسپریدین.

مقدمه

ثانویه معمولاً دارای ساختار پیچیده بوده و ساختار آنها در مقایسه با ساختار متابولیت‌های اولیه که برای زنده ماندن سلول‌ها ضروری‌اند، متفاوت هستند (Protar & Spurgeon, 1981). گیاه Loganberry (*Rubus×Loganobaccus*) با نام فارسی لوگان‌بری متعلق به تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) می‌باشد (Darrow, 1955). Loganberry گیاهی هیبرید شده و

هر ماده‌ای که در گیاه شناسایی می‌شود دارای نقش خاصی در گیاه می‌باشد. به طوری که می‌تواند در ساختمان گیاه برای انجام اعمال حیاتی و یا در خواص فیزیکی و شیمیایی گیاه نقش داشته باشد. متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیب‌های آلی هستند که به طور مستقیم در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. متابولیت‌های

زیرمجموعه Raspberry می‌باشد (Darrow, 1955). میوه گیاه آن شبیه به تمشک سیاه بوده و رنگ میوه آن قرمز تیره مایل به صورتی می‌باشد. در حال حاضر این گیاه به صورت تجاری کشت می‌شود. میوه این گیاه قرمز و بسیار ترش است. این گیاه بسیار کمیاب و یکی از ارقام تمشک قرمز بوده و از طریق کشت درون شیشه‌ای تکثیر می‌گردد. همچنین انواع خزنده تمشک سیاه وجود دارد که کمتر از انواع ساقه افراشته و نیمه‌افراشته، مقاوم به سرما هستند. انواع افراشته و نیمه‌افراشته این گیاه، ساقه‌هایی با ارتفاع ۲ متر ایجاد می‌کنند اما در انواع خزنده آن طول ساقه‌ها به ۴/۵ متر می‌رسد و اغلب بجز لوگان‌بری خاردار و وحشی هستند و اگر بی‌توجه رها شوند می‌توانند جهان را به سرعت تسخیر کنند. البته تاکنون تحقیقی بر روی خواص فیتوشیمیایی و بیولوژیکی گونه هیبریدی لوگان‌بری انجام نشده است. همچنین تاکنون مطالعه‌ای بر روی گونه مورد بررسی در این تحقیق، آن هم به صورت کشت درون شیشه‌ای انجام نشده است. تحقیقات انجام شده بر روی سایر گونه‌ها نشان می‌دهد که جنس *Rubus* بیش از ۷۵۰ گونه دارد که تقریباً در تمامی دنیا پراکنده‌اند. این گونه‌ها را به سه دسته می‌توان تقسیم کرد: تمشک قرمز، تمشک سیاه، Dewberry (Robertson, 1974; Klein, 2009). *Rubus idaeus* × *strigosus* نام عمومی برای میوه خوراکی چندین گونه گیاه در خانواده *Rubus* از گلسرخیان گفته می‌شود که معمولاً در زیرسرد (Subgenus) *Idaeobatus* جای می‌گیرند. این نام همچنین به خود گیاه نیز گفته می‌شود. تمشک‌ها گیاهانی دیرپا با ساقه چوبی هستند. همچنین دیگر تحقیقات انجام شده بر روی سایر گونه‌های تمشک قرمز نشان می‌دهد که عصاره این میوه با نام تمشک سیاه و با نام علمی *Rubus occidentalis* L. دارای خاصیت ضد سرطانی در مقابل سلول‌های سرطانی روده بزرگ یا کلون می‌باشد. عوامل مؤثر در این خاصیت ضد سرطانی به وجود ترکیب‌های cyanidin 3-rutinoside

مشتقات گلوکوزیل استر آن، کوئرستین ۳- گلوکوزید، کوئرستین ۳- روتینوزید، کوماریک اسید مشتقات الاجیک اسید و همچنین مشتقات سیتریک اسید در میوه این گیاه نسبت داده می‌شود (Paudel et al., 2014). همچنین در برگ و میوه این گیاه وجود ترکیب‌های معدنی کروم، روی، منیزیم، کلسیم، مس، آهن و نیکل گزارش شده است (Toth et al., 2008). البته وجود عناصر معدنی کمیاب نیز در برگ گیاه *R. fruticosus* گزارش شده است (Wyttenbach et al., 1998). در یک تحقیق دیگر وجود اسیدهای فنولیک شبیه گالیک، الاجیک و کافئیک اسید و پاراکوماریک اسید و فلاونوئیدها مانند کوئرستین، کاتچین، اپی‌کاتچین، اپی‌کاتچین گالات، میریسیتین، کامفرول، پروسیانیدین هیپروزید B1 و کوئرستین ۳- گلوکوزید در برگ‌های گیاه *R. fruticosus* گزارش شده است (Milivojevic et al., 2011; Buricova et al., 2011). تری‌ترین‌ها و ترکیب‌های چند حلقه‌ای زیادی که از اسکوالن مشتق شده‌اند نیز از برگ گیاه *R. fruticosus* استخراج و شناسایی شده‌است. برخی از این تری‌ترین‌ها عبارتند از: rubinic acid, rubutic acid, -amyrin, 2-Hydroxyursolic acid (Sarkar & Ganguly, Mukherjee et al., 1984). رومی‌ها از برگ آن به‌عنوان چای در درمان بیماری‌ها استفاده می‌کردند و از برگ‌ها و شاخه‌های خیس شده آن در درمان زخم و از بین بردن مشکلات به‌هنگام زایمان استفاده می‌شده است (Connolly, 2003). عصاره برگ آن به‌عنوان دهان‌شویه برای درمان برفک دهان، التهاب لثه و زخم دهان استفاده می‌شود (Chiej, 1984; Chevallier, 1996). تمشک قرمز در درمان آسم و مشکلات تنفسی کاربرد دارد (Blumenthal et al., 1998). همچنین برگ تمشک قرمز در درمان کم‌خونی کاربرد دارد (Uarrera, 2003). جویدن برگ آن برای تقویت لثه و درمان

زیرمجموعه Raspberry می‌باشد (Darrow, 1955). میوه گیاه آن شبیه به تمشک سیاه بوده و رنگ میوه آن قرمز تیره مایل به صورتی می‌باشد. در حال حاضر این گیاه به صورت تجاری کشت می‌شود. میوه این گیاه قرمز و بسیار ترش است. این گیاه بسیار کمیاب و یکی از ارقام تمشک قرمز بوده و از طریق کشت درون شیشه‌ای تکثیر می‌گردد. همچنین انواع خزنده تمشک سیاه وجود دارد که کمتر از انواع ساقه افراشته و نیمه‌افراشته، مقاوم به سرما هستند. انواع افراشته و نیمه‌افراشته این گیاه، ساقه‌هایی با ارتفاع ۲ متر ایجاد می‌کنند اما در انواع خزنده آن طول ساقه‌ها به ۴/۵ متر می‌رسد و اغلب بجز لوگان‌بری خاردار و وحشی هستند و اگر بی‌توجه رها شوند می‌توانند جهان را به سرعت تسخیر کنند. البته تاکنون تحقیقی بر روی خواص فیتوشیمیایی و بیولوژیکی گونه هیبریدی لوگان‌بری انجام نشده است. همچنین تاکنون مطالعه‌ای بر روی گونه مورد بررسی در این تحقیق، آن هم به صورت کشت درون شیشه‌ای انجام نشده است. تحقیقات انجام شده بر روی سایر گونه‌ها نشان می‌دهد که جنس *Rubus* بیش از ۷۵۰ گونه دارد که تقریباً در تمامی دنیا پراکنده‌اند. این گونه‌ها را به سه دسته می‌توان تقسیم کرد: تمشک قرمز، تمشک سیاه، Dewberry (Robertson, 1974; Klein, 2009). *Rubus idaeus* × *strigosus* نام عمومی برای میوه خوراکی چندین گونه گیاه در خانواده *Rubus* از گلسرخیان گفته می‌شود که معمولاً در زیرسرد (Subgenus) *Idaeobatus* جای می‌گیرند. این نام همچنین به خود گیاه نیز گفته می‌شود. تمشک‌ها گیاهانی دیرپا با ساقه چوبی هستند. همچنین دیگر تحقیقات انجام شده بر روی سایر گونه‌های تمشک قرمز نشان می‌دهد که عصاره این میوه با نام تمشک سیاه و با نام علمی *Rubus occidentalis* L. دارای خاصیت ضد سرطانی در مقابل سلول‌های سرطانی روده بزرگ یا کلون می‌باشد. عوامل مؤثر در این خاصیت ضد سرطانی به وجود ترکیب‌های cyanidin 3-rutinoside

عصاره‌گیری

حدود ۴۰۰ گرم از اندام‌های هوایی خشک شده گیاه بدست آمده از طریق کشت بافت، کاملاً خرد شد. سپس برای استخراج ترکیب‌های گیاه، به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در مخلوط متانول، دی‌اتیل اتر و هگزان به نسبت ۱:۱:۱ در یک تانک در محلی تاریک خیسانده شد. سپس مخلوط حاصل را با قیف بوختر و پمپ خلأ صاف و محصول حاصل توسط دستگاه روتاری تبخیر و تغلیظ گردید. در پایان شیره غلیظ و ویسکوزی به رنگ سبز تیره بدست آمد.

چربی‌گیری

برای جدا کردن چربی‌ها و ترکیب‌های اشباع با زنجیره‌های بلند، عمل چربی‌گیری انجام شد. برای این کار حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به یک دکانتور دو لیتری اضافه شد و بعد عصاره حاصل با میزان بسیار کمی از متانول حل و به دکانتور منتقل شد. سپس بر روی آن حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر هگزان ریخته و سیستم دکانتور تکان داده شد. پس از هم خوردن کامل، دکانتور در جای ساکن مستقر شد تا جداسازی مراحل به طور کامل انجام شود. پس از جداسازی کامل، فاز بالایی که شامل فاز هگزان و مواد چربی و هیدروکربن‌های حل شده در آن است جدا شد و دوباره محلول فاز پایین به دکانتور منتقل گردید و به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر هگزان افزوده شد و آنقدر این عمل تکرار شد، تا جایی که در نهایت کل عصاره با حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر از هگزان شسته شد، به طوری که فاز هگزان مصرفی به بی‌رنگی رسید. در این مرحله فاز هگزان که شامل مواد چربی و مواد غیر قطبی است کنار گذاشته شد و فاز پایین یا فاز اصلی دوباره به دکانتور منتقل گردید. دوباره مشابه با مرحله قبل عمل شد، با این تفاوت که در این مرحله، از ۵۰۰ میلی‌لیتر از اتیل استات برای حل کردن مواد قطبی به جای هگزان استفاده شد. حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر اتیل استات به دکانتور که شامل فاز

برفک دهان و برگ‌های آن برای جلوگیری از عفونت‌های قارچی و آبنسه در پوست کاربرد دارند. همچنین این گیاه به شدت قابض، مقوی، و ادرارآور است و در درمان اسهال، اسهال خونی، التهاب مثانه و بواسیر مؤثر است (Riaz et al.; Leonti et al., 2009). عصاره آبی و بوتانولی از برگ *R. fruticosus* گزارش شده و در دیابت غیر وابسته به انسولین فعال می‌باشد (Xu et al., 2006).

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

بزرگ گیاه دو ماهه Loganberry (*Rubus*×*Loganobaccus*)، تولید شده از طریق کشت بافت، از شرکت دانش‌بنیان سلول فناوری دارو، پارک علم و فناوری دانشگاه تهران، شعبه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج تهیه شد.

مواد شیمیایی

حلال‌های آلی مانند هگزان، متانول، اتیل استات، دی‌اتیل اتر و سیلیکاژل، صفحات TLC و حلال دوتره نیز از شرکت مرک خریداری شد.

دستگاه‌ها

برای توزین مواد از ترازوی مدل AND HR-200 ساخت ژاپن با دقت ۴ رقم اعشار استفاده گردید. از دستگاه روتاری مدل EL 131 ساخت کشور آلمان مدل BUCHI 461 استفاده شد. تکنیک‌های طیف‌سنجی ¹H-NMR و ¹³C-NMR توسط دستگاه طیف‌سنجی تشدید مغناطیس هسته‌ای NMR موجود در دانشگاه امام حسین و ساخت شرکت BRUKER آلمان با قدرت ۲۵۰ مگاهرتز و حلال DMSO گرفته شد. تکنیک‌های طیف IR نیز از دستگاه FT-IR موجود در دانشگاه امام حسین و ساخت شرکت BRUKER تهیه شد.

نتایج

با استفاده از کروماتوگرافی ستونی ۳۳ فراکسیون جمع‌آوری شد که پس از سه روز در فراکسیون‌های ۱۹، ۲۰ و ۲۱ بلور شناسایی شد. پس از انجام TLC، لکه بنفش در این فراکسیون ۱۹+۲۰+۲۱ مشاهده گردید. سپس در مرحله بعد برای شناسایی و تعیین ساختار مولکولی از نمونه خالص‌سازی شده در فراکسیون ۱۹، طیف‌های IR، $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و dept گرفته شد و نتایج حاصل از طیف‌ها در جدول‌های ۱ تا ۳ و شکل‌های ۱ تا ۴ آورده شده است.

مشخصات طیف هسپریدین شناسایی شده گیاه *(Rubus×Loganobaccus) Loganberry*

$^1\text{H-NMR}$

مطابق جدول ۱، پیک ۲/۵ مربوط به حلال DMSO می‌باشد. پوشیده‌ترین هیدروژن مربوط به پروتون ^6H (متیل قندی) بوده که در دلتای ۱/۰۹ به صورت دوتایی ظاهر شده است. نپوشیده‌ترین هیدروژن نیز مربوط به پروتون OH شماره ۵ در دلتای ۱۲/۰۳ می‌باشد که علت این امر تشکیل پیوند هیدروژنی با کربونیل مجاور می‌باشد. پروتون‌ها و شکافتگی‌ها مطابق جدول ۱ می‌باشد که در این میان، هشت پروتون مربوط به پروتون‌های دو حلقه قندی همه با هم با انتگرال ۸ در ناحیه ۳/۶ تا ۳/۳ ظاهر شده‌اند. تنها پروتون‌های ^1H و ^3H به دلیل اینکه استالی بوده و از دو جهت به اکسیژن متصل هستند به صورت جداگانه‌ای ظاهر شده‌اند. در ناحیه ۶ تا ۷/۷ نیز پروتون‌های مربوط به حلقه‌های آروماتیک ظاهر شده‌اند که شکافتگی و نحوه ظهور آنها در طیف در جدول ۱ آورده شده است.

پایین از مرحله قبل است افزوده و دکانتور تکان داده شد. پس از گذشت زمان کافی برای جداسازی، فاز بالا که فاز اتیل استات و مواد قطبی است جمع‌آوری گردید. دوباره این عمل تکرار شد تا جایی که فاز اتیل استات مصرفی به بی‌رنگی رسید. در نهایت فازهای اتیل استات که همان فاز اصلی ما می‌باشد جمع‌آوری شد. مرحله بعد فازهای اتیل استات از مرحله چربی‌گیری با دستگاه روتاری تغلیظ شد و عصاره ویسکوزی بدست آمد.

ستون کروماتوگرافی

پس از آماده کردن ستون کروماتوگرافی، عصاره‌ای را که جذب سیلیکاژل شده بود به ستون می‌افزاییم. برای جداسازی ترکیب‌های موجود در عصاره که پلاریته‌های مختلف دارند، لازم است که پلاریته حلال‌های شستشو دهنده ستون به تدریج تغییر کند. به همین دلیل شستشوی ستون را با هگزان که یک حلال غیر قطبی است، آغاز کرده و به تدریج با افزودن تدریجی حلال اتیل استات، پلاریته را به سمت نیمه قطبی و بعد مرحله بعدی با افزودن مقادیر مشخصی از حلال متانول، پلاریته را به سمت قطبی می‌بریم. حجم حلال مصرفی در هر مرحله ۱۰۰ میلی‌لیتر و قطبیت نیز در مرحله تغییر حلال از ۳٪ تا ۱۰٪ در اواسط شستشوی ستون تغییر کرد.

کروماتوگرافی لایه نازک

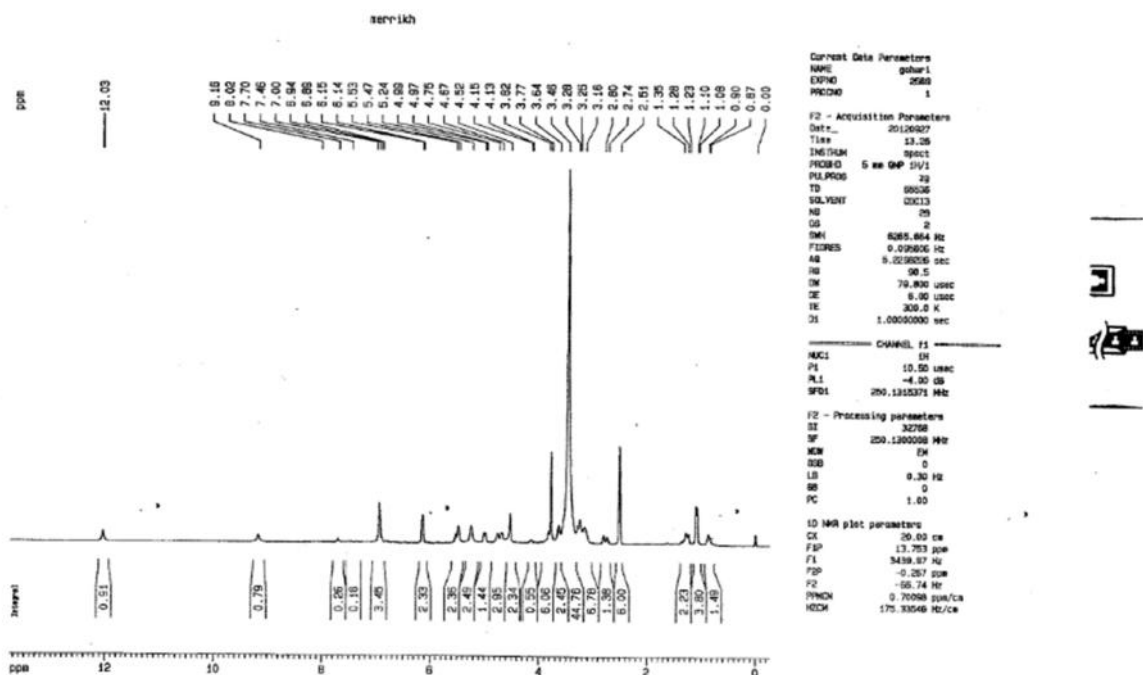
برای بررسی ترکیب‌های طبیعی موجود در فراکسیون‌ها، از همه آنها به‌ویژه فراکسیون ۲۲، کروماتوگرافی لایه نازک تهیه شد. ابتدا از حلال اتر و هگزان به نسبت ۱:۱ و در فراکسیون‌های بعدی به ترتیب از حلال‌های اتیل استات: هگزان به نسبت ۳:۷ و اتیل استات: اسید فرمیک: آب به نسبت ۱:۱:۸ استفاده کرده و برای مشاهده لکه‌ها از لامپ UV استفاده شد.

جدول ۱- نتایج طیف $^1\text{H-NMR}$

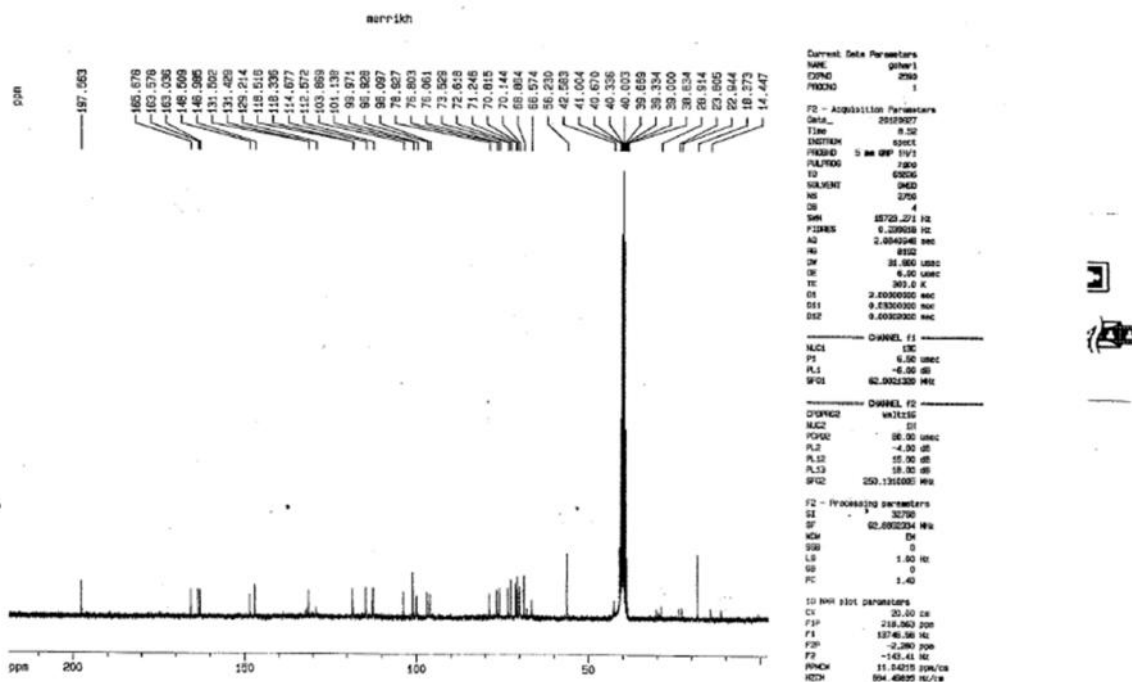
انتگرال	J (HZ)	شکافتگی	(ppm)	شماره هیدروژن
1H	12.2, 3	dd	5.51	۲
1H	17.1, 3	dd	2.76	۳a
1H	17.1, 12.2	dd	3.21	۳b
-	-	-	-	۴
-	-	-	-	۵
1H	2	d	6.14	۶
-	-	-	-	۷
1H	2	d	6.93	۸
-	-	-	-	۱'
1H	1.9	d	7.70	۲'
-	-	-	-	۳'
-	-	-	-	۴'
1H	8.1	d	7.33	۵'
1H	8.1, 1.9	dd	7.45	۶'
1H	7.4	d	4.98	۱''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۲''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۳''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۴''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۵''
2H	-	brs	3.63	۶''
1H	-	brs	4.52	۱'''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۲'''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۳'''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۴'''
1H	overlapped	-	3.3-3.6	۵'''
3H	5.5	d	1.09	۶'''
3H	-	s	3.77	OCH ₃
1H	-	s	12.03	۵-OH
1H	-	s	9.16	۳'-OH

جدول ۲- نتایج طیف $^{13}\text{C-NMR}$

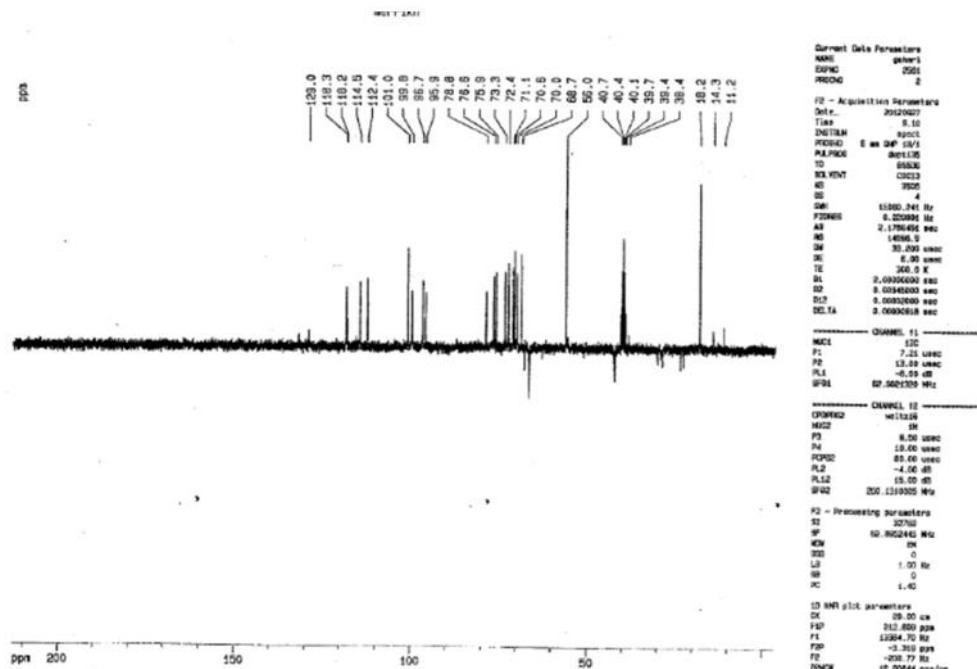
شماره کربن	(ppm)
۲	۷۸/۹۲
۳	۴۲/۵۸
۴	۱۹۷/۵۶
۵	۱۶۵/۶۷
۶	۹۶/۰۹
۷	۱۶۳/۵۷
۸	۹۶/۹۲
۹	۱۶۳/۰۳
۱۰	۱۰۳/۸۶
۱'	۱۳۲/۱۵
۲'	۱۱۲/۵۷
۳'	۱۴۸/۵۰
۴'	۱۴۶/۹۸
۵'	۱۱۴/۶۷
۶'	۱۱۸/۵۱
۱''	۹۹/۹۷
۲''	۷۲/۶۱
۳''	۷۶/۰۶
۴''	۷۰/۱۴
۵''	۷۶/۸۰
۶''	۹۹/۵۷
۱'''	۱۰۱/۱۳
۲'''	۷۱/۲۴
۳'''	۷۰/۸۱
۴'''	۷۳/۵۲
۵'''	۶۸/۸۶
۶'''	۱۸/۳۷
OCH_3	۵۶/۲۳



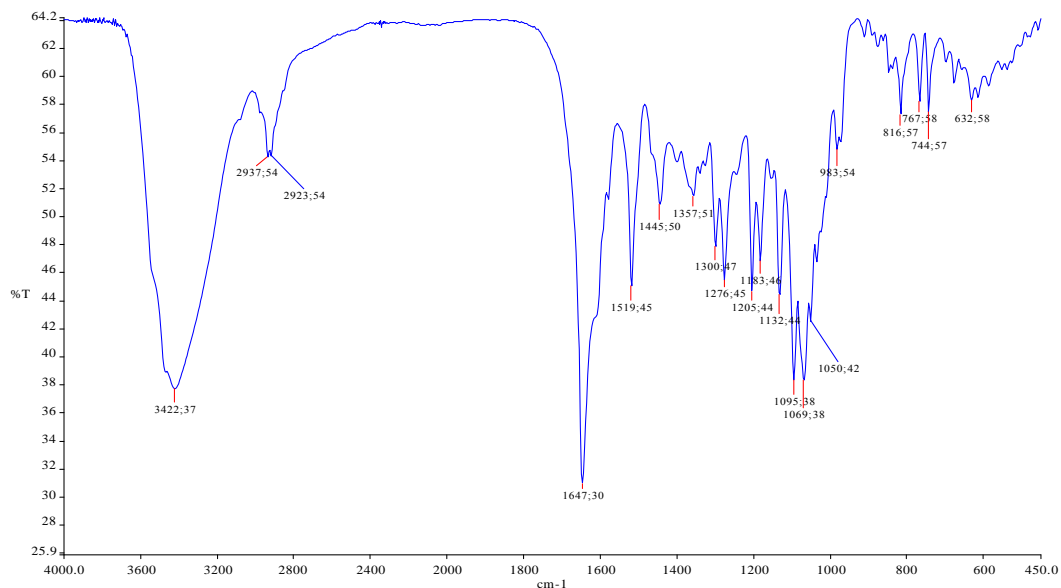
شکل ۱- طیف ¹H-NMR



شکل ۲- طیف ¹³C-NMR



شکل ۳- طیف 135 dept

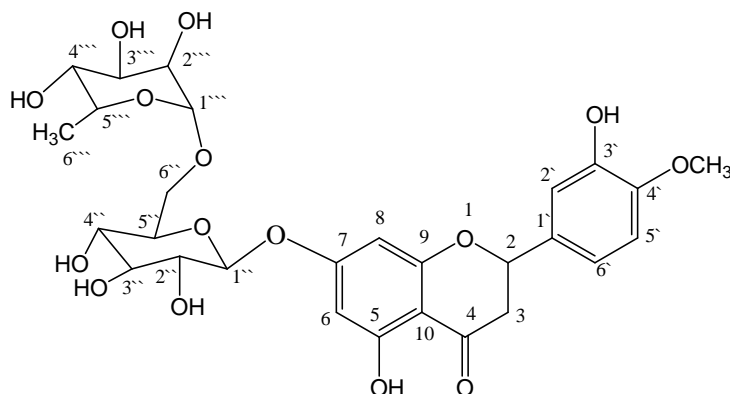


شکل ۴- طیف IR

می‌باشد. سایر پیک‌هایی که در طیف dept به صورت سربالا دیده می‌شود مربوط به کربن‌های CH و CH₃ می‌باشد. کربن‌های نوع چهار نیز در طیف ¹³C-NMR به صورت پیک کوتاه ظاهر شده‌اند، در صورتی که در طیف dept پیکی از خود نشان نمی‌دهند. پوشیده‌ترین کربن مربوط به کربونیل کتوننی (کربن شماره ۴) بوده که در دلتای ۱۹۷/۵۶ ظاهر شده‌است. پوشیده‌ترین کربن نیز مربوط به متیل قندی (۶''') می‌باشد که در دلتای ۱۸/۳۷ ظاهر شده است. بلندترین پیک هم مربوط به گروه متوکسی (OCH₃) در دلتای ۲۳/۵۶ می‌باشد.

IR

مطابق جدول ۳، پیک پهن در ناحیه ۳۴۲۲/۳۷ مربوط به گروه هیدروکسیل (OH) می‌باشد. پیک کربونیل در فرکانس پایین‌تری در حدود ۱۶۴۷ cm⁻¹ ظاهر شده‌است که علت آن امکان رزونانس و توتومری کتو-انول و همچنین امکان تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشد. با توجه به داده‌های طیفی، وجود ترکیب هسپریدین با ساختار زیر (شکل ۵) اثبات می‌گردد.



شکل ۵- ساختار ترکیب هسپریدین استخراج شده از گیاه Loganberry

بحث

تنوع محیطی و ژنتیکی ترکیب‌های فنلی در تمشک قرمز توسط Anttonen و Karjalainen (۲۰۰۵) مورد پژوهش قرار گرفت. برای روشن شدن این موضوع، ترکیب‌های فنلی

جدول ۳- نتایج طیف IR

(cm ⁻¹)	Assignment
۳۴۲۲/۳۷	O-H
۳۰۵۰	C-H آروماتیک
۲۹۲۳/۵۴، ۲۹۳۷/۵۴	C-H آلکان (آلیفاتیک)
۲۸۵۰	C-H آلکان (اتری) OCH ₃
۱۶۴۷/۳۰	C=O
۱۲۰۵/۴۴	C-C
۱۱۳۲/۴۴	C-O
۱۶۰۰	C=C

¹³C-NMR

مطابق جدول ۲، همانطور که در جدول‌ها قابل رؤیت است ۲۸ کربن در طیف ¹³C-NMR دیده می‌شود که ۲۰ کربن در طیف dept ظاهر شده و ۸ کربن که نوع چهار می‌باشند در طیف dept پیکی نمی‌دهند. در این میان، دو پیک مربوط به CH₂ که در طیف dept به صورت سربالین آمده مربوط به کربن‌های شماره ۳ و ۶''

ترکیب فوق با فرمول مولکولی C₂₈H₃₄O₁₅ و جرم مولکولی 610.57 g·mol⁻¹ هسپریدین می‌باشد که با استفاده از طیف‌های IR، dept، ¹³C-NMR، ¹H-NMR برای اولین بار در این گیاه شناسایی و تعیین ساختار گردید.

از طیف متنوعی از گونه‌های تمشک رشد کرده در شمال اروپا در منطقه فنلاند مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد محتوای تام فلاونوئید به‌طور گسترده و قابل توجهی در بین گونه‌های مختلف آن متفاوت بوده و تنوع زیست محیطی بر مقدار کوئرستین تمشک‌های مختلف، مؤثر است (Anttonen & Karjalainen, 2005). اثر فشار بر روی سه آنزیم مهم و مسئول در شکل‌گیری رنگ و عطر تمشک قرمز (*Rubus idaeus*) و توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa*) به نام‌های بتا-گلوکوزیداز، پروکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز مورد مطالعه قرار گرفت. در یک بررسی توسط Garcia-Palazon و همکاران (۲۰۰۴) مشخص شد که غیر فعال بودن آنزیم‌ها به وجود آنتوسیانین‌ها در میوه این گیاه مرتبط است. در تحقیقی اثر غلظت نمک بر روی *red raspberry* (*Rubus idaeus* L. Autumn Bliss) توسط Neocleous و Vasilakakis (۲۰۰۷) مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمایش در شرایط طبیعی گلخانه انجام شد، گیاهان با محلول غذایی هوگلند حاوی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میلی‌مولار نمک آبیاری شدند. رشد گیاهی، پارامترهای فتوسنتزی، جریان آب، مقدار کلرید و سدیم، محتوای کلروفیل برگ و فلورسانس مشخص شد، در نتیجه افزایش نمک در محلول غذایی عامل کاهش فتوسنتز و کاهش هدایت روزنه شناخته شد. اثر عصاره‌های تمشک سیاه، تمشک قرمز، *Blueberry*، *Cranberry* و *Strawberry* بر روی عدم رشد و تحریک آپوپتوز سلول‌های سرطانی انسان در شرایط آزمایشگاهی توسط Seeram و همکاران (۲۰۰۶) بررسی شد و اثرات مهارکنندگی مشاهده گردید.

همچنین توسط Deighton و همکاران (۲۰۰۰) خواص آنتی‌اکسیدان دو گونه اهلی و وحشی *Rubus* با رنگدانه‌های متفاوت مورد پژوهش قرار گرفت. علاوه بر این، فنل کل، آنتوسیانین و اسید اسکوربیک محتویات مشخص شد. در نتیجه مقدار فنول *Rubus caucasicus* که یک تمشک گونه وحشی است، بیشتر از سایر گونه‌ها و مقدار آنتوسیانین آن کمتر از بقیه کشف شد. طی تحقیقات انجام شده توسط Oomah و همکاران (۲۰۰۰) خواص روغن‌های استخراج شده از دانه *Raspberry*

(*Rubus idaeus* L.) مورد آزمایش قرار گرفت. روغن بدست‌آمده از دانه ۱۰/۷٪ بود که مقاومت بالایی در برابر اکسیداسیون داشت. مقدار آنتی‌اکسیدان عصاره میوه تمشک سیاه (*Rubus sp.*) حاصل از دو منطقه آبی مختلف توسط Reyes-Carmona و همکاران (۲۰۰۵) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. طبق این تحقیق شاه‌توت وحشی بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیاء فریک و بالاترین قدرت رادیکال‌زدایی و همچنین بیشترین محتوای فنولی و آنتوسیانینی را داشت. همچنین نتایج نشان داد که سطح اسید اسکوربیک، مواد متشکله، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پلی‌فنول به‌طور عمده به ژنوتیپ بستگی دارد، نه به آب و هوا و یا فصل. علاوه بر آن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌زدایی با محتوای کل فنلی و آنتوسیانینی در ارتباط است (Reyes-Carmona et al., 2005). توت‌ها منبع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌های فنولی هستند که ممکن است اثرات بالقوه‌ای برای سلامتی داشته باشند، به‌طوری که مقدار فنول‌های کل در انواع تازه آن از ۶۱۷ تا ۴۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم معادل گالیک اسید (GAE) متغیر است (Heinonen et al., 1998). در این مطالعه، عصاره شش نوع توت به نام‌های توت سیاه، تمشک سیاه، زغال‌اخته، قره‌قاپ، تمشک قرمز و توت‌فرنگی از نظر وجود ترکیب‌های فنلی با استفاده دستگاه HPLC، اشعه ماوراء بنفش (HPLC-UV)، یونیزاسیون جرمی الکترواسپری و طیف‌سنجی (LC-ESI-MS) مورد بررسی قرار گرفت و وجود ترکیب‌های مهم فنولیک مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونول، فلاوانول، ellagitannins، gallotannins، پروآنتوسیانیدین و اسیدهای فنولیک در آنها اثبات شد (Seeram et al., 2006). عصاره این توت‌ها دارای درجات مختلفی از قدرت مهارکنندگی رشد سلول‌های سرطانی روده، پستان و پروستات بودند (Seeram et al., 2006). تاکنون تحقیقی بر روی ترکیب‌های طبیعی موجود در گونه هیبریدی Loganberry انجام نشده است. در این تحقیق برای اولین بار، عصاره برگ گیاه Loganberry (*Rubus*×*Loganobaccus*) از ایران، تکثیر شده از طریق کشت درون شیشه‌ای، از نظر ترکیب‌های طبیعی مورد بررسی قرار گرفت و یک فلاونوئید به نام هسپریدین با استفاده از

- Plants; Dorling Kindersley: London, UK, 336p.
- Chiej, R., 1984. Encyclopaedia of Medicinal Plants; MacDonald and Company Limited Maxwell House: London, UK, 448p.
 - Connolly, T.J., 2003. Newberry crater: a ten-thousand-year record of human occupation and environmental change in the basin-plateau borderlands. *Plains Anthropologist*, 48: 168-170.
 - Darrow, G.M., 1955. Blackberry-raspberry hybrids. *Journal of Heredity*, 46(2): 67-71.
 - Deighton, N., Brennan, R., Finn, C. and Davies, H.V., 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of Food Science & Technology*, 80(9): 1307-1313.
 - Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P. and Zabetakis, I., 2004. The effects of high hydrostatic pressure on α -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*). *Food Chemistry*, 88: 7-10.
 - Heinonen, I.M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10): 4107-4112.
 - Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C.C., Yang, W.C. and Tsai, G.J., 2010. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1): 123-130.
 - Klein, C., 2009. *Grow Your Own Fruit*. United Kingdom: Mitchell Beazley, 224p.
 - Leonti, M., Casu, L., Sanna, F. and Bonsignore, L., 2009. A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily De *Materia Medica revisited*. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 255-267.
 - Milivojevic, J., Maksimovic, V., Nikolic, M., Bogdanovic, J., Maletic, R. and Milatovic, D., 2011. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *fragaria* and *rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34: 1-9.
 - Mukherjee, M., Ghatak, K.L., Ganguly, S.N. and Antoulas, S., 1984. Rubinic acid, a triterpene acid from *Rubus fruticosus*. *Phytochemistry*, 23: 2581-2582.
 - Neocleous, D. and Vasilakakis, M., 2007. Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. 'Autumn Bliss'). *Scientia Horticulturae*, 112(3): 282-289.
 - Oomah, B.D., Ladet, S., Godfrey, D.V., Liang, J. and Girard, B., 2000. Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69(2): 187-193.

روش‌های مختلف طیف‌سنجی $^{13}\text{C-NMR}$ ، $^1\text{H-NMR}$ ، IR، شناسایی شد. ترکیب‌های فنولی مانند هسپریدین، روتین و کنکول از عصاره گیاه *Porphyra dentata* استخراج و شناسایی شده‌است. (Kazłowska *et al.*, 2010). همچنین از عصاره قلبایی پوست پرتقال (*Citrus sinensis*) متعلق به خانواده Rutaceae هسپریدین به‌عنوان یک فلاون گلیکوزید استخراج و شناسایی شد (Sharma *et al.*, 2013). هسپریدین، توهسپریدین و نارینجین به‌عنوان گلیکوزیدهای فلاونون فعال در عصاره دانه مرکبات شناخته شده‌اند (Banjerdpongchai *et al.*, 2016). هسپریدین در برابر زخم معده ناشی از نوشیدن الکل در موش صحرایی اثرات محافظتی دارد که بخشی از این حفاظت ممکن است مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی آن باشد (Selmi *et al.*, 2017).

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی بابت در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Anttonen, M.J. and Karjalainen, R.O., 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8): 759-769.
- Blumenthal, M., Werner, R.B. and Goldberg, A., 1998. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Integrative Medicine Communication, Austin, USA, 685p.
- Banjerdpongchai, R., Wudtiwai, B., Khaw-On, P., Rachakhom, W., Duangnil, N., Kongtawelert P., 2016. Hesperidin from Citrus seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways. *Tumor Biology*, 37(1): 227-237.
- Buricova, L., Andjelkovic, M., Cermakova, A., Reblova, Z., Jurcek, O., Kolehmainen, E., Verhe, R. and Kvasnicka, F., 2011. Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 29: 181-189.
- Chevallier, A., 1996. *The Encyclopedia of Medicinal*

- apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25): 9329-9339.
- Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H. and Marzouki, L., 2017. Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids in Health and Disease*, 16(1): 152.
 - Sharma, P., Pandey, P., Gupta, R., Roshan, S., Garg, A., Shulka, A. and Pasi, A., 2013. Isolation and characterization of Hesperidin from orange peel. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(5): 3892-3897.
 - Toth, A., Braun, M., Toth, Z.S., Gor, D. and Lakatos, G.Y., 2008. Element composition of *Rosa canina* and *Rubus fruticosus* fruits at an abandoned metalliferous minesite in N-Hungary. *Cereal Research Communications*, 36: 1655-1658.
 - Uarrera, P.M., 2003. Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia*, 74(6): 515-544.
 - Wytenbach, A., Furrer, V., Schleppe, P. and Tobler, L., 1998. Rare earth elements in soil and in soil-grown plants. *Plant Soil*, 199: 267-273.
 - Xu, Y., Zhang, Y. and Chen, M., 2006. Effective fractions of *Rubus fruticosus* leaf, its pharmaceutical composition and uses for prevention and treatment of diabetes. China Patent, CN1788755 A.
 - Paudel, L., Wyzgoski, F.J., Giusti, M.M., Johnson, J.L., Rinaldi, P.L., Scheerens, J.C., Chanon, A.M., Bomser, J.A., Miller, A.R., Hardy, J.K. and Reese, R.N., 2014. NMR-based metabolomic investigation of bioactivity of chemical constituents in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) fruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8): 1989-1998.
 - Protar, J.W. and Spurgeon, S.L., 1981. *Biosynthesis of Isoprenoid Compound (Vol. 1)*. Wiley, New York, 558p.
 - Reyes-Carmona, J., Yousef, G.G., Martínez-Peniche, R.A. and Lila, M.A., 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science & Technology*, 70(7): s497-s503.
 - Riaz, M., Ahmad, M. and Rahman, N., 2011. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 5920-5924.
 - Robertson, K.R., 1974. The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 55: 352-360.
 - Sarkar, A. and Ganguly, S.N., 1978. Rubitic acid, a new triterpene acid from *Rubus fruticosus*. *Phytochemistry*, 17: 1983-1985.
 - Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S. and Heber, D., 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate

Phytochemical investigation on the extract of loganberry, propagated via plant tissue culture

Sh. Merikh¹, M. Taherkhani^{2*} and S.R. Hosseini Doust³

- 1- M.Sc. student, Department of Phytochemistry and Essential Oils Technology, Faculty of Pharmaceutical Chemistry, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 2*- Corresponding author, Department of Chemistry, College of Science, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran, E-mail: mahtaherkhani@yahoo.com
- 3- Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: February 2017

Revised: September 2017

Accepted: September 2017

Abstract

The loganberry (*Rubus × loganobaccus*), belonging to the Rosaceae family and *Rubus* genus, gives fruits like strawberry. The fruit is red and very sour and this rare species is one of the cultivars of red raspberry. Loganberry is not native to Iran and currently is propagated through *in vitro* plant tissue culture. So far, phytochemical research has not been conducted on loganberry. In present study, the leaf extract of loganberry, propagated through *in vitro* culture, was investigated phytochemically. The extract of loganberry was purified and the obtained natural product was elucidated by NMR spectroscopy techniques. In this study, a flavonoid, namely hesperetin, was isolated from the leaves of the loganberry. This structure was elucidated by spectral methods (¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR and dept 135).

Keywords: Loganberry, plant tissue culture, extraction, hesperidin.