فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۶۹۱-۶۸۱ (۱۳۹۲)

استخراج و اندازه‌گیری ترکیب کوئرستین و کامفرول در اندام‌های مختلف گونه گیاهی رازیانه *Foeniculum vulgare* Mill.

کامکار جایمند[۱]، هلن اهرابی اصلی[۲*] و زهرا بهراد[۳]

۱- دانشیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
۲*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، اداره کل استاندارد استان تهران، پست الکترونیک: helenahrabi@yahoo.com
۳- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

فلاونوییدها طبقه بزرگی از پلی‌فنل‌ها با بیش از ۴۰۰۰ ترکیب هستند که در گیاه نقش آنتی‌اکسیدانی را در فتوسنتز به‌عهده دارند و در انسان دارای اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، جلوگیری‌کننده سرطان و محافظت‌کننده از قلب می‌باشند. ترکیب کوئرستین و کامفرول در گروه فلاونول‌ها قرار دارند و برای مقابله با ویروس‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شوند. هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری ترکیب کوئرستین و کامفرول در گونه گیاهی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) بود. برای این منظور این گونه در اوایل خردادماه ۱۳۸۹ از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور جمع‌آوری، و بعد از اندام‌های مختلف (گل، برگ، ساقه و بذر) با روشهای مختلف استخراج شد. در روش اول نمونه با حلال کلروفرم توسط دستگاه سوکسله به مدت ۷۲ ساعت استخراج گردید. در روش دوم به نمونه قبلی که با حلال کلروفرم استخراج شده بود پس از جدا کردن حلال، متانول اضافه نموده و مجدداً عمل استخراج انجام شد. در روش سوم با توجه به میزان ماده خشک از اندام‌های مختلف گیاه تازه رازیانه توزین، سپس با حلال‌های متانول و اسیداستیک (به نسبت ۱:۹) توسط دستگاه آسیاب برقی خرد و همزمان صاف گردید. در روش چهارم گیاه تازه مطابق با میزان ماده خشک هر اندام ابتدا با دستگاه آسیاب برقی خردشد و بعد با حلال‌های متانول و اسیداستیک (به نسبت ۱:۹) و به مدت یک هفته خیسانده و بعد صاف گردید. بعد همه نمونه‌های بدست آمده به حجم ۳۰ میلی‌لیتر تغلیظ گردیدند. جمعاً ۳۲ نمونه بدست آمد که میزان ترکیب کوئرستین وکامفرول آنها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین مقادیر کوئرستین بدست آمده در *Foeniculum vulgare* Mill.، مربوط به گل (۲۹۹۰ppm)، برگ (۱۲۲۳ppm) و بذر تازه (۱۷۷۹ppm) در روش استخراج با متانول و در ساقه (۱۳۱۶ppm) به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک بدست آمد و کمترین مقادیر کوئرستین بدست آمده مربوط به روش اول (استخراج با کلروفرم) بود که در گل (۱۷ppm)، برگ (۱۵ppm)، ساقه (۹ppm)، و در بذر (۵۰ppm) بدست آمد. در شرایط کشت یکسان بیشترین مقادیر کامفرول بدست آمده در گل (۹۱۲ppm)، برگ (۲۷۳ppm)، ساقه (۱۸۴ppm) و در بذر تازه (۱۱۴۲ppm) به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک و کمترین مقادیر کامفرول بدست آمده مربوط به روش استخراج با کلروفرم است که در گل (۲۰۹ppm)، برگ (۵۵ppm)، ساقه (۴۵ppm) و در بذر (۴۲۷ppm) بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)، فلاونویید، کوئرستین، کامفرول، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).

مقدمه

Foeniculum vulgare Mill. از تیره چتریان، راسته آپیالس، و رده رازیانه‌هاست. گیاهی دوساله، پایا، با ساقه‌ای راست و شیاردار و برگ‌های متناوب با بریدگی‌های عمیق و نخی‌شکل، در انتهای ساقه گل‌آذین چتر مرکب متشکل از گل‌های کوچک زرد قرار دارد. میوه‌های آن به‌صورت دو فندقه و تمام گیاه دارای اسانس می‌باشد. دوران گلدهی آن تیر تا شهریور و زمان برداشت میوه‌ها، مرداد تا شهریور است. قسمت‌های مورد استفاده این گیاه؛ گل، میوه، ریشه، ساقه و دانه خشک شده آن می‌باشد.

از مصارف عمده این گیاه می‌توان به‌عنوان ضدانقباض عضلانی، ضدسرفه، مواد معطر، ضدنفخ، مدر، خلط‌آور، محرک رشد، ضددرد معده، و داروی تقویتی اشاره کرد (زمان، ۱۳۷۶).

فلاونوئیدها ترکیب‌های پلی‌فنولیکی هستند که در همه غذاها با سرچشمه گیاهی وجود دارند. فلاونوئیدها دارای اثرهای مختلفی بر روی سیستم سلولی پستانداران هستند (Melzig, 1996) و در این رابطه اهمیت گروه‌های هیدروکسیل موجود در جایگاه‌های ۵ و ۷ حلقه‌ی A هسته‌ی فلاون ثابت شده‌است (Sanchez de Rojas *et al*., 1996).

فلاونوئیدها دارای اثرهایی از قبیل خواص ضدالتهابی، ضدزخم، سیتوتوکسیک، خواص آنتی‌اکسیدانی و همچنین دارای اثرهای مختلفی بر روی آنزیم‌ها هستند (Sanchez de Rojas *et al*., 1996). فلاونوئیدها دارای اثرهای بازدارنده بر روی عملکرد پلاکت‌ها و لوکوسیت‌ها و دارای اثر محافظتی بر روی سلول‌های اندوتلیال هستند و به این ترتیب از اثر متقابل بین دیواره‌ی رگ‌ها و خون که باعث شروع ترومبوز می‌شوند جلوگیری می‌کنند. این عمل را از طریق اثر بر روی فاکتور بافتی مونوسیت‌های انسان که خود از عوامل شروع‌کننده‌ی انعقاد خون است انجام می‌دهند (Lale *et al*., 1996).

از مهمترین اثرهایی که در تحقیقات امروزی برای فلاونوئیدها قائل‌شده‌اند خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آنهاست (Hertog *et al*., 1997؛ Lale *et al*., 1996؛ Ishikawa *et al*., 1997؛ Haraguchi *et al*., 1996؛ Katan & Hollman, 1998؛ Sanchez de Rojas *et al*., 1996). به این ترتیب فلاونوئیدها می‌توانند دارای آثار درمانی در رابطه با بیماریهایی که در اثر استرس‌های اکسیداتیو تولید می‌شوند مانند آترواسکلروز کرونری، صدمات ایسکمی، دیابت ملیتوس، پروسه‌های پیری و سرطان باشند (Haraguchi *et al*., 1996). آنها با ممانعت از اکسیداسیون LDL، باعث کاهش خطرات ابتلا به بیماریهای ایسکمی قلبی (IHD) و آترواسکلروز کرونری می‌شوند (Ishikawa *et al*., 1997؛ Sanchez de Rojas *et al*., 1996؛ Katan & Hollman, 1998).

کوئرستین یک فلاونول است، فلاونوییدی مشتق‌شده از گیاهان که از آن به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای استفاده می‌شود (Stewart *et al*., 2008). کوئرستین برای جلوگیری از آزادسازی هیستامین (یک ماده شیمیایی التهابی، که در علائم آلرژی، مانند عطسه و خارش نقش دارد) در برخی از سلول‌های ایمنی بدن مؤثر است (Jaber, 2002). در یک مطالعه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۷ که بر روی ۴۱ بزرگسال صورت گرفت، محققان دریافتند که مصرف ۷۳۰ میلی‌گرم کوئرستین روزانه به مدت ۲۸ روز، کمک به کاهش فشار خون در افراد مبتلا به این بیماری می‌شود (Edwards *et al*., 2007). تحقیقات بر روی سلول‌ها

نشان داده‌است که کوئرستین کمک به کند شدن رشد برخی از انواع سلول‌های سرطانی می‌کند. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که کوئرستین از انواع سرطان، مانند سرطان روده جلوگیری می‌کند (Shoskes *et al*., 1999).

کامفرول، فلاونوئیدی طبیعی است که در چای، کلم بروکلی، گریپ‌فروت، سیب و منابع گیاهی دیگر وجود دارد (Park *et al*., 2006). مصرف کامفرول در چای و کلم بروکلی با کاهش خطر امراض قلبی همراه است. محققان در یک مطالعه ۸ ساله دریافتند که سه فلاونول (کامفرول، کوئرستین و میریستین) خطر سرطان لوزالمعده را تا ۲۳٪ کاهش می‌دهد (Nöthlings *et al*., 2007).

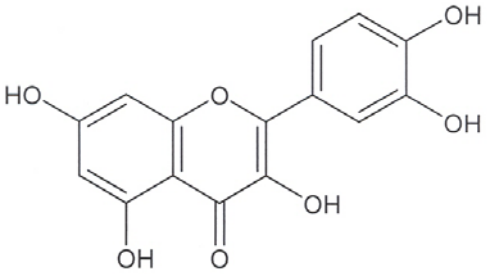
در تحقیقی که Moraes-de-Souza و همکاران (۲۰۰۸) بر روی سه ترکیب فلاونوئیدی میریستین، کوئرستین و کامفرول بر روی سرشاخه‌های هوایی گونه *Matricaria chamomilla* L. و *Foeniculum vulgare* Mill. که با روش استخراج متانولی انجام داده بودند و توسط دستگاه HPLC مورد شناسایی و اندازه‌گیری قرار دادند، میزان ترکیب‌های کوئرستین را در بابونه (۹۰ppm ± ۲۳۶۰) و در بذر رازیانه (۸۰ppm ± ۱۷۷۰) بدست آورند و میزان ترکیب کامفرول را فقط در بابونه (۱۰ppm ± ۱۰۱۰) گزارش کردند.

هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری ترکیب‌های فلاونوییدی کوئرستین و کامفرول در گونه رازیانه جمع‌آوری شده از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران می‌باشد. با توجه به اینکه تحقیقی در این زمینه در ایران صورت نگرفته و با توجه به خواص دارویی ترکیب‌های فلاونوییدی کوئرستین و کامفرول که برای مقابله با ویروس‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود، بررسی میزان این ترکیب در این گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار است (Middleton & Kandaswami, 1986).

خصوصیات شیمیایی ترکیب کوئرستین

ترکیب کوئرستین (Quercetin) با نام‌های علمی شیمیایی 2-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-3, 5, 7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one و همچنین با نام 3, 3′, 4′, 5, 7-pentahydroxyflavone و نام‌های اضافی meletin، sophoretin و cyanidenolon 1522 می‌باشد.

فرمول مولکولی آن $C_{15}H_{10}O_7$ (شکل ۱) و جرم مولکولی آن ۳۰۲/۲٤ است. حداکثر طول موج جذب آن در ۲۵۸UV و ۳۷۵ نانومتر است. یک گرم آن در ۲۹۰ میلی‌لیتر الکل خالص و در ۲۳ میلی‌لیتر الکل جوشان حل می‌گردد. در اسیداستیک گلاسیال محلول، در محلول آلکالین مایع با رنگ زرد می‌باشد. مخصوصاً در آب غیرمحلول است. مزه محلول الکلی آن خیلی تلخ است (O'Neil, 2001).



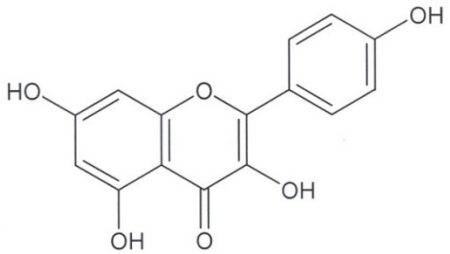
شکل ۱- فرمول ساختمانی کوئرستین

خصوصیات شیمیایی ترکیب کامفرول

ترکیب کامفرول (Kaempferol) با نام‌های علمی شیمیایی 3,5,7-Trihydroxy- 2[4-hydroxyphenyl]- 4H-1-benzopyran-4-one و همچنین با نام

3,4′,5-7-tetrahydroxyflavone و نیز با نامهـای اضـافی nimbecetin، 1497 pelargidenolon، populnetin، rhamnolutein، robigenin، swartziol و trifolitin می‌باشد.

فرمول مولکولی آن $C_{15}H_{10}O_6$ (شکل ۲)، جرم مولکولی آن ۲۸٦/۲٤ با میزان ترکیب C ٦۲/۹٤٪، H ۳/۵۲٪، O ۳۳/۵٤٪، با خواص: سوزن‌های زرد، نقطه ذوب ۲۷۸–۲۷٦ درجه، همچنین به‌عنوان پودر زرد روشن از اتانول–آب، ردیابی شده با نقطه ذوب ۲۸۰–۲۷۸ درجه گزارش شده‌است. حداکثر نور ۲٦۵UV و ۳٦۵ نانومتر (O'Neil, 2001).



شکل ۲- فرمول ساختمانی کامفرول

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های مورد آزمایش

با توجه به فصل رویش نمونه‌های رازیانه از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران در اوایل خرداد ۱۳۸۹ جمع‌آوری شده‌است.

روش اندازه‌گیری ماده خشک

۵ گرم از اندام هر گیاه را با ترازوی ۰/۰۰۰۰۱ گرم درون پلیت وزن کرده (A1) و در دمای آزمایشگاه به مدت یک روز خشک و مجدداً توزین کرده (A2) و مقدار ماده خشک (D) از فرمول (۱)، درصد رطوبت (H) از فرمول (۲) و همچنین مقدار گیاه تازه (F) که معادل ۲ گرم ماده خشک است، از روی فرمول (۳) زیر محاسبه شدند (جدول ۱).

فرمول (۱) $D= (A1-A2)/5*100$

فرمول (۲) $(5-D)*100= H$

فرمول (۳) $(5*2/(A1-A2)= F$

استخراج

استخراج ترکیب‌های گیاهی به چهار روش ذیر انجام شده‌است:

روش اول: مقدار ۲ گرم از اندام‌های خشک شده گونه گیاه رازیانه (گل، برگ، ساقه و بذر) به روش سوکسله با ۸۰ میلی‌لیتر کلروفرم به مدت ۷۲ ساعت قرار داده و بعد حلال جدا شده و به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد. هدف از استفاده حلال کلروفرم، جدا کردن کلروفیل از نمونه بوده که وقتی در مرحله بعد از حلال متانول استفاده می‌شود اندازه‌گیری با دتکتور UV دستگاه HPLC بهتر انجام شود. ولی هدف از اندازه‌گیری در این مرحله مشخص نمودن استخراج کوئرستین و کامفرول با حلال کلروفرم بود.

روش دوم: بعد از مرحله اول (استخراج با کلروفرم) از ۸۰ میلی‌لیتر متانول بر روی همان نمونه اول با روش سوکسله به مدت ۷۲ ساعت انجام گردید، بعد نمونه به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

روش سوم: در این روش بسته به میزان ماده خشک (جدول ۱) هر قسمت از گیاه، اندام‌های گیاه تازه (گل، برگ، ساقه و بذر) را وزن کرده و با حلال متانول–اسیداستیک (۹: ۱) توسط همزن برقی، مخلوط کرده و

بلافاصله با کاغذ صافی عصاره را صاف نموده، بعد نمونه به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد. هدف از استفاده از اسیداستیک به مقدار کم جدا کردن بهتر ترکیب‌های فلاونوییدی بود. Daigle و Conkerton (۱۹۸۲) بر روی ۳۶ گونه کار کردند و حلال مورد استفاده آنها جهت جداسازی ترکیب‌های فلاونوئیدی از فاز متحرک متانول: آب: اسید استیک (۵۰: ٤٥: ۵) بود.

روش چهارم: با توجه به میزان ماده خشک (جدول ۱) از اندام‌های گیاه تازه (گل، برگ، ساقه و بذر) وزن نموده و با حلال متانول–اسید استیک (۹: ۱) توسط همزن برقی، مخلوط کرده و به مدت یک هفته خیسانده، سپس با کاغذ صافی عصاره را صاف کرده و بعد نمونه به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۳۲ نمونه با روشهای ذکر شده تهیه و در یخچال نگهداری و برای تعیین میزان ترکیب کوئرستین و کامفرول به دستگاه HPLC تزریق گردید و طبق روش Daigle و Conkerton (۱۹۸۲) تجزیه انجام گردید.

جدول ۱- میزان ماده خشک اندام (گل، برگ، ساقه و بذر) گونه *Foeniculum vulgare* Mill.

اندام مورد استفاده	(H) (رطوبت٪)	ماده خشک در ۵ گرم گیاه تازه (D)	گیاه تازه (معادل ۲ گرم ماده خشک) (F)
گل	۷٦	۱/۲	۸
برگ	۷۸	۱	۱۰
ساقه	۸٦	۰.۷	۱٤/۲۵
بذر	۲۵	۳/۸	۲/۷

شرایط دستگاهی HPLC

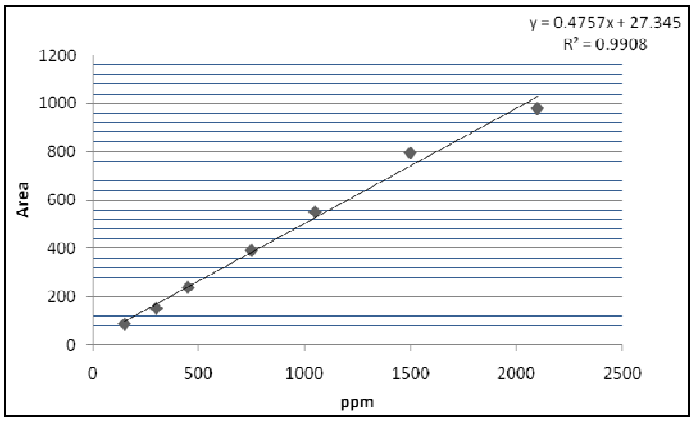
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تکنیک مناسبی برای جداسازی و اندازه‌گیری محصولات طبیعی، مواد دارویی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از روشهای دقیق برای اندازه‌گیری ترکیب‌های کوئرستین استفاده از HPLC است. دستگاه مورد استفاده ساخت شرکت Knauer مدل Well Chrom 2000، دارای پمپ مدل Maxi-star K-1000 و دتکتور uv-vis مدل Spectrophotometer K-2500 بود که در ۲۹۰ نانومتر تنظیم گردید. ستون مورد استفاده Eurospher 100C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ٤ میلی‌متر بود. به‌عنوان فاز متحرک از: متانول: آب: اسیداستیک (۵۰: ٤٥: ۵) با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰µl بود و انجام آزمایش ۲۰ دقیقه به طول انجامید.

آماده‌سازی استانداردها و رسم منحنی کالیبراسیون

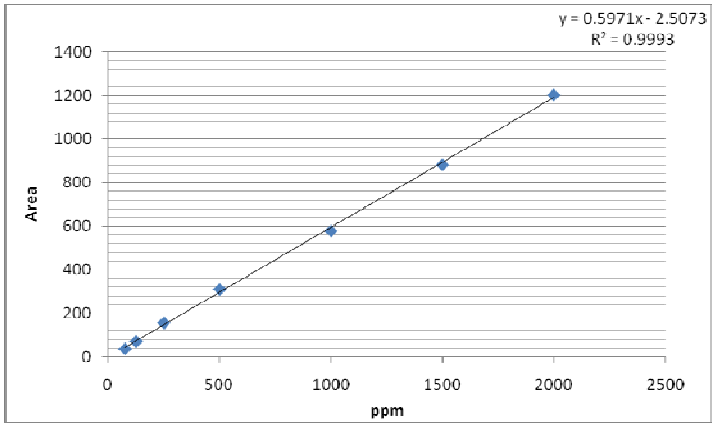
کوئرستین- استاندارد مورد استفاده در این طرح ترکیب کوئرستین Quercetin dehydrate با نام علمی 3,3′,4′,5,7-Pentahydroxyflavone با فرمول مولکولی $C_{15}H_{10}O_7 . 2H_2O$، با جرم مولکولی Mw 338.27 که به مقدار ۲۵ گرم از شرکت Fluka خریداری گردید. میزان ترکیب کوئرستین با تهیه منحنی استانداردها به‌صورت زیر بررسی شد. برای رسم منحنی خط کالیبراسیون (شکل ۳) جهت ترکیب کوئرستین با غلظت‌های متفاوتی از هفت

نمونه استاندارد با غلظت‌های ۱۵۰ppm، ۳۰۰ppm، ۴۵۰ppm، ۷۵۰ppm، ۱۰۵۰ppm، ۱۵۰۰ppm و ۲۱۰۰pm تهیه و بعد به دستگاه تزریق گردید.

کامفرول– استاندارد مورد استفاده دیگر در این طرح ترکیب کامفرول (Kaempferol) با نام علمی 3,5,7-Trihydroxy-2[4-hydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one، با فرمول مولکولی $C_{15}H_{10}O_6$ و با جرم مولکولی Mw ۲۸۶/۲ به مقدار ۱۰ میلی‌گرم از شرکت Sigma خریداری گردید. میزان ترکیب کامفرول با تهیه منحنی استانداردها به صورت زیر بررسی شد. برای رسم منحنی خط کالیبراسیون (شکل ٤) جهت ترکیب کامفرول با غلظت‌های متفاوتی از هفت نمونه استاندارد با غلظت‌های ۷۵ppm، ۱۲۵ppm، ۲۵۰ppm، ۵۰۰ppm، ۱۰۰۰ppm، ۱۵۰۰ppm و ۲۰۰۰ppm تهیه و بعد به دستگاه تزریق گردید. سپس میزان ترکیب کوئرستین و کامفرول در اندام‌های مختلف گونه رازیانه محاسبه شدند.



شکل ۳– منحنی خط کالیبراسیون ترکیب کوئرستین



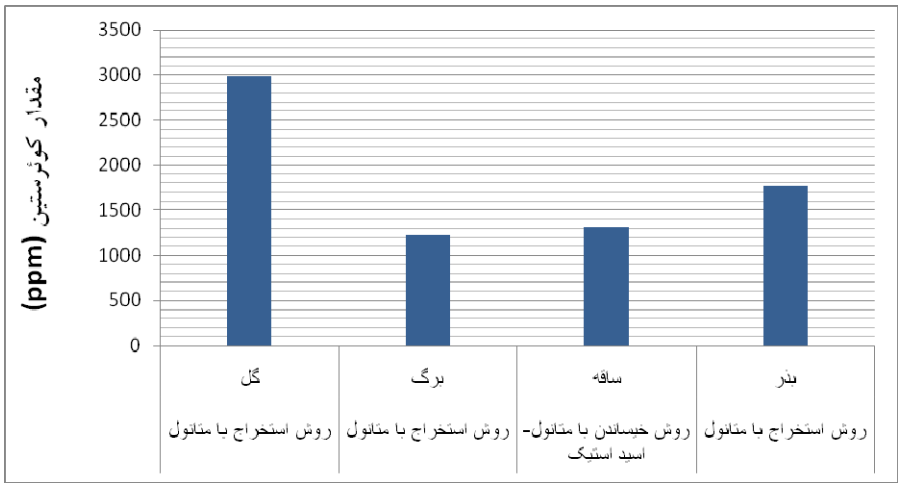
شکل ٤– منحنی کالیبراسیون ترکیب کامفرول

نتایج

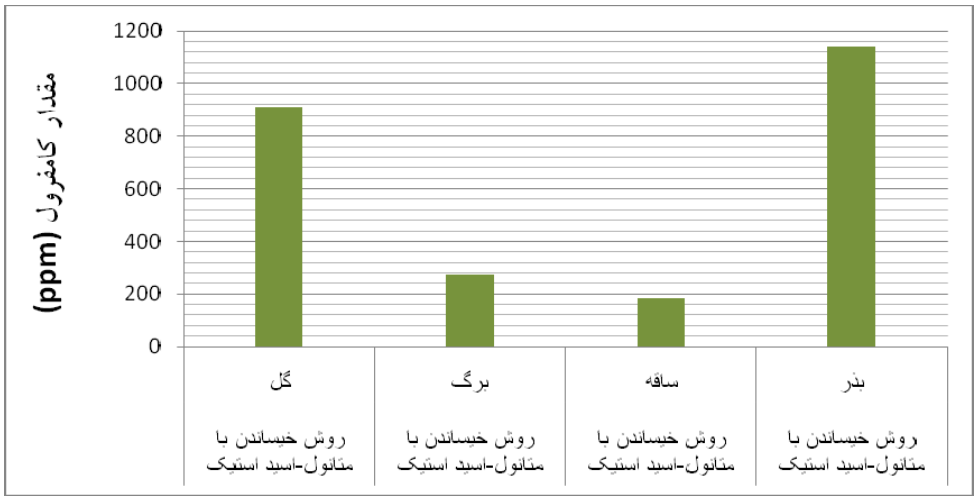
بررسی‌های انجام شده بر روی گونه رازیانه نشان داد که روشهای مختلف استخراج هر اندام میزان متفاوتی از ترکیب‌های کوئرستین و کامفرول را از گیاه خارج نمودند (جدول ۲). از آنجایی که حضور این ترکیب در اندام‌های مختلف (گل، برگ، ساقه و بذر) گونه یاد شده برای ما ارزشمند می‌باشند، انتخاب اندام و روش بهینه برای صنایع، جهت استخراج این ترکیب‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است.

نتایج بدست آمده در جدول ۲ نشان داد که در شرایط کشت یکسان بیشترین مقادیر کوئرستین بدست آمده در *Foeniculum vulgare* Mill.، گل (۲۹۹۰ppm)، برگ (۱۲۲۳ppm) و بذر تازه (۱۷۷۹ppm) به روش استخراج با متانول و در ساقه (۱۳۱۶ppm) به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک بوده و کمترین مقادیر کوئرستین بدست آمده مربوط به روش اول (استخراج با کلروفرم) است که از گل (۱۷ppm)، برگ (۱۵ppm)، ساقه (۹ppm) و بذر (۵۰ppm) حاصل شده‌است (شکل ۵).

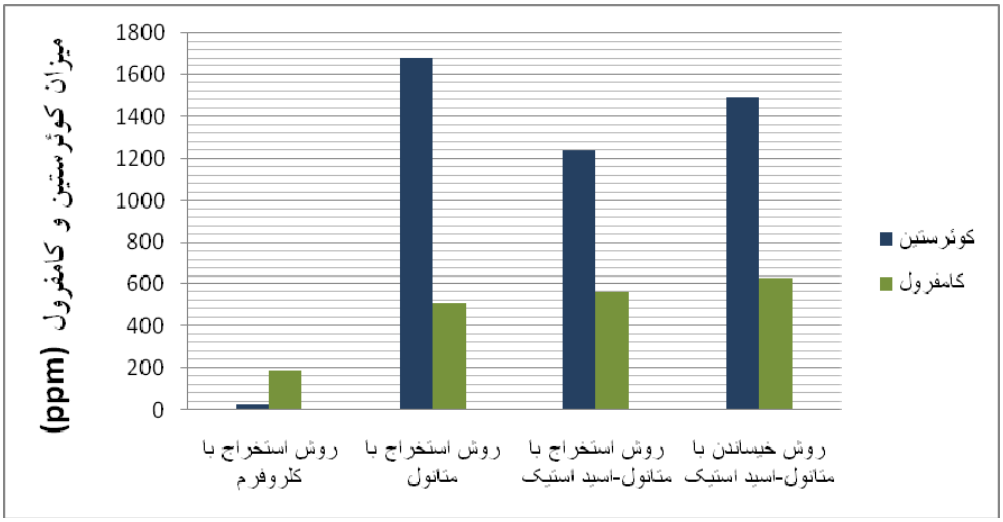
شکل ٦ نشان می‌دهد که بیشترین مقادیر کامفرول بدست آمده در گل (۹۱۲ppm)، برگ (۲۷۳ppm)، ساقه (۱۸٤ppm) و در بذر تازه (۱۱٤۲ppm) به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک و کمترین مقادیر کامفرول بدست آمده در جدول ۲ مربوط به روش استخراج با کلروفرم است که در گل (۲۰۹ppm)، برگ (۵۵ppm)، ساقه (٤۵ppm) و در بذر (٤۲۷ppm) گزارش شده‌است.



شکل ۵- بیشترین مقادیر کوئرستین بدست آمده در *Foeniculum vulgare* Mill.



شکل ٦- بیشترین مقادیر کامفرول بدست آمده در گیاه *Foeniculum vulgare* Mill.



شکل ۷- میانگین میزان کوئرستین و کامفرول در کل گیاه *Foeniculum vulgare* Mill.

جدول ۲- میزان کوئرستین و کامفرول بدست آمده از رازیانه به تفکیک اندام به ٤ روش آنالیز

اندام مورد استفاده	روش استخراج با کلروفرم		روش استخراج با متانول		روش استخراج با متانول- اسیداستیک		روش خیساندن با متانول- اسیداستیک	
	کوئرستین	کامفرول	کوئرستین	کامفرول	کوئرستین	کامفرول	کوئرستین	کامفرول
گل	۱۷	۲۰۹	۲۹۹۰	۷۸۷	۱۱۱۳	۷۹۰	۲۱۸٦	۹۱۲
برگ	۱۵	۵۵	۱۲۲۳	۲۱۹	۱۲۱۷	۲۲۳	۱۰۲۱	۲۷۳
ساقه	۹	٤۵	۷۳۱	۱۰	۱۲٦۵	۱۲۷	۱۳۱٦	۱۸٤
بذر تازه	۵۰	٤۲۷	۱۷۷۹	۱۰۱۰	۱۳۵۵	۱۰۹۱	۱٤۲۸	۱۱٤۲
میانگین	۲۳	۱۸٤	۱٦۸۱	۵۰۷	۱۲۳۸	۵۵۸	۱٤۸۸	٦۲۸

با توجه به میانگین مقادیر کوئرستین و کامفرول بدست آمده از کل گیاه *Foeniculum vulgare* Mill. مطابق جدول ۲، بیشترین مقدار میانگین کوئرستین (۱۶۸۱ppm) به روش استخراج با متانول، مقدار میانگین کامفرول (۶۲۸ppm) مربوط به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک و کمترین مقدار میانگین کوئرستین (۲۳ppm) و کامفرول (۱۸۴ppm) مربوط به روش استخراج با متانول است (شکل ۷).

بحث

ترکیب‌های فلاونوییدی کامفرول و کوئرستین دارای خواص دارویی هستند و برای مقابله با ویروس‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شوند (Middleton & Kandaswami, 1986).

اصولاً استخراج ترکیب‌های کامفرول و کوئرستین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی یا به‌عنوان افزودن رنگ بکار می‌روند. این ترکیب‌ها رادیکال‌های آزاد در بدن را که باعث سرطان و بیماریهایی از قبیل آترواسکلروز می‌شوند، پاک‌سازی نموده و در پیشگیری از بیماریهای قلبی و عروقی سودمند هستند (Rice-Evans *et al.*, 1996).

در تحقیقی که Moraes-de-Souza و همکاران (۲۰۰۸)، بر روی سه ترکیب فلاونوئیدی میریستین، کوئرستین و کامفرول بر روی سرشاخه‌های هوایی گونه‌های *Matricaria chamomilla* L. و *Foeniculum vulgare* Mill. که با روش استخراج متانولی انجام داده و توسط دستگاه HPLC مورد شناسایی و اندازه‌گیری قرار دادند، میزان ترکیب‌های کوئرستین در بابونه (۹۰ppm ± ۲۳۶۰) و رازیانه (۸۰ppm ± ۱۷۷۰) را بدست آورند و میزان ترکیب کامفرول را فقط در بابونه (۱۰ppm ± ۱۰۱۰) گزارش کردند.

در رابطه با میزان ترکیب کوئرستین در رازیانه Moraes-de-Souza و همکاران (۲۰۰۸) فقط ترکیب کوئرستین را در بذر به میزان ۸۰ppm ± ۱۷۷۰ گزارش نمودند که در مقایسه با تحقیق کنونی بر روی اندام‌های مختلف (گل، برگ، ساقه و بذر) به روش استخراج با متانول به‌ترتیب ۲۹۹۰ppm، ۱۲۲۳ppm، ۷۳۱ppm و ۱۷۷۹ppm بدست آمد، که با توجه با گزارش Moraes-de-Souza (۲۰۰۸) بر روی بذر نتایج مشابه می‌باشند و نتایج بر روی اندام‌های دیگر برای اولین‌بار گزارش می‌شوند. همان‌طوری که مشاهده می‌شود میزان کوئرستین در گل خیلی بیشتر از بذر می‌باشد. همچنین در بررسی ما میزان ترکیب کامفرول نیز بر روی اندام مختلف (گل، برگ، ساقه و بذر) به روش خیساندن با متانول و اسیداستیک به‌ترتیب ۹۱۲ppm، ۲۷۳ppm، ۱۸۴ppm و ۱۱۴۲ppm بدست آمدند، که نتایج حاضر نیز برای اولین بار گزارش می‌شود.

نتایج نشان داد که در شرایط یکسان کشت رازیانه، بیشترین مقادیر کوئرستین از گل (۲۹۹۰ppm) و بیشترین مقادیر کامفرول از بذر تازه (۱۱۴۲ppm) به روش خیساندن با متانول-اسیداستیک بدست آمد. بنابراین شرکت‌های دارویی که این نوع مواد را در محصولات خود استفاده می‌نمایند می‌توانند با استفاده از نتایج بدست آمده نسبت به استحصال صنعتی این ترکیب‌ها برای محصولات خود اقدام نمایند.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران انجام شده است و از زحمات کلیه عزیزانی که در این طرح ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- زمان، س.، ۱۳۷۶. گیاهان دارویی. انتشارات ققنوس، تهران، ۳۶۷ صفحه.
- Daigle, D.J. and Conkerton, E.J., 1982. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids. Journal of Chromatography A, 240: 202-205.
- Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A., Symons, J.D. and Jalili, T., 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. The Journal of Nutrition, 137(11): 2405-2411.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y. and Mizutani, K., 1996. Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. Planta Medica, 62(3): 217-220.
- Hertog, M.G.I., Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C. and Kromhout, D., 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. American Journal of clinical Nutrition, 65(5): 1489-1494.
- Ishikawa, T., Suzukawa, M., Ito, T., Yoshida, H., Ayaori, M., Nishiwaki, M., Yonemura, A., Hara, Y. and Nakamura, H., 1997. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. American Journal of clinical Nutrition, 66(2): 261-266.
- Jaber, R., 2002. Respiratory and allergic diseases: from upper respiratory tract infections to asthma. Primary Care, 29(2): 231-261.
- Katan, M.B. and Hollman, P.C.H., 1998. Dietary flavonoids and cardiovascular disease. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 8: 1-4.
- Lale, A., Herbert, J.M., Augereau, J.M., Billon, M., Leconte, M. and Gleye, J., 1996. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human monocytes. Journal Natural Products, 59(3): 273-276.
- Melzig, M.F., 1996. Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by selected flavonoids. Planta Medica, 62(1): 20-21.
- Middleton Jr, E. and Kandaswami, C., 1986. The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity, in flammation and cancer: 619-652. In: Harborne, J.B., (Ed.). The Flavonoids, Advances in Research Since. Chapman and Hall, London, 676p.
- Moraes-de-Souza, R.A., Oldoni, T.L.C., Regitano-d Arce, M.A.B. and Alencar, S.M., 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6(1): 41-47.
- Nöthlings, U., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E. and Kolone, L.N., 2007. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. American Journal of Epidemiology, 166(8): 924-931.
- O'Neil, M.J., 2001. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck and Company, Incorporated, USA, 2564p.
- Park, J.S., Rho, H.S., Kim, D.H. and Chang, I.S., 2006. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(8): 2951-2956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Pagange, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20(7): 933-956.
- Sanchez de Rojas, V.R., Somoza, B., Ortega, T. and Villar, A.M., 1996. Isolation of vasodilatory active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata*. Planta Medica, 62(3): 272-274.
- Shoskes, D.A., Zeitlin, S.I., Shahed, A. and Rajfer, J., 1999. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. Urology, 54(6): 960-963.
- Stewart, L.K., Soileau, J.L., Ribnicky, D., Wang, Z.Q., Raskin, I., Poulev, A., Majewski, M., Cefalu, W.T. and Gettys, T.W., 2008. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. Metabolism Clinical and Experimental, 57: S39-S46.

Extraction and determination of quercetin and kampferol in *Foeniculum vulgare* Mill.

K. Jaimand[1], H. Ahrabi Asli[2*] and Z. Behrad[1]

1- Department of Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Institute and Reaserch of Tehran Standard, Tehran, Iran, E-mail: helenahrabi@yahoo.com

Received: October 2011 Revised: November 2011 Accepted: February 2012

Abstract

This research was aimed to extract and measure the quercetin and kampferol in *Foeniculum vulgare* Mill. For this purpose, in the end of May 2010, samples were collected from Research Institute of Forests and Rangelands, and then various organs (flowers, leaves, stems, and seeds) were extracted with different methods. In the first method, samples were extracted with chloroform solvent by Soxhlet for 72 hours. In the second method, after removing the solvent, methanol was added to the previous sample extracted with chloroform solvent and extraction was repeated. In the third method, depending on the amount of dry matter, different organs of fresh fennel were weighted; then they were grounded with the solvents of methanol and acetic acid (ratio 1:9) by electric mill and were filtered simoltaneously. In the fourth method, new plants, in accordance with dry matter content of each organ, were grounded by electric mill and soaked for a week with the solvents of methanol and acetic acid (ratio 1:9) and then were filtered. Then, all samples were concentrated to 30 ml. A total of 32 samples were obtained and the composition of quercetin and kampferol was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that most of the quercetin in *Foeniculum vulgare* Mill., obtained in flower (2990ppm), leaves (1223ppm) and seed (1779ppm) was related to the method of extraction with methanol, and in stem (1316ppm) was related to the method of maceration with methanol-acetic acid. Also, the lowest quercetin obtained in flower (17ppm), leaves (15ppm), stem (9ppm), and seed (50ppm) was related to the first method (extraction with chloroform). In the same culture conditions, the highest value of kampferol obtained in flower (912ppm), leave (273ppm), stem (184ppm) and seed (1142ppm), was related to the method of maceration with methanol-acetic acid while the lowest kampferol obtained in flower (209), leave (55), stem (45) and seed (427), was related to the chloroform extraction method.

Key words: *Foeniculum vulgare* Mill., flavonoid, quercetin, kaempferol, high-performance liquid chromatography (HPLC).