ORIGINAL ARTICLE

Phytochemical Analysis of Rhamnus cornifolia

Mohammad Azadbakht[1], Leila Moezi[2], Seyyed Mohammad Hossein Tabaei[3]

[1] Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[3] Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received December 29, 2014 ; Accepted April 13, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Rhamnus cornifolia* is one of the species belonging to the rhamnaceae family that is abundantly found in different parts of Iran. *Rhamnus frangula* is one of the most important species of this family which contains anthraquinones that act as stimulant laxative. In this study we investigated *Rhamnus cornifolia* Boiss which to the best of our knowledge, no phytochemical study has been done on this plant yet.

Materials and methods: The plants were collected from Sisakht, Iran and morphological and microscopical characters of the plant were examined. An Antrakinon compound was isolated from the bark of the plant by column and thin-layer chromatography and identified by infrared, ultraviolet and mass spectrometry. Quantitative determination of total ash, water-soluble ash, acid-insoluble ash and sulphated ash were performed in the bark of *Rhamnus cornifolia*. Vitamin C concentrations in leaves were determined by titrimetric method.

Results: The structure of the isolated anthraquinone compound was identified to be 1-Hydroxy-3-methyl-6-vinyl-8-glycoside anthraquinone. Total ash, water-soluble ash, acid-insoluble ash and sulphated ash in the bark of *Rhamnus cornifolia* was 1.67%, 0.4%, 1.56% and 4.35%, respectively.

Conclusion: *Rhamnus cornifolia* is believed to be a species that contains valuable active ingredients.

Keywords: *Rhamnus cornifolia*, Anthraquinone, Ash, Vitamin C

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 292-306 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۳۰۶-۲۹۲)

بررسی فیتوشیمیایی گیاه رامنوس کورنیفولیا

محمد آزادبخت[۱]
لیلا معزی[۲]
سیدمحمدحسین طبایی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: گیاه رامنوس کورنیفولیا (*Rhamnus cornifolia*) یکی از گونه‌های خانواده عناب می‌باشد که به فراوانی در قسمت‌های مختلف ایران رویش دارد. از آنجا که گونه دیگر این خانواده یعنی *Rhamnus frangula* حاوی مشتقات ۱و۸ دی هیدروکسی آنتراکینون است که جزء مهم‌ترین مسهل‌های محرک طبقه‌بندی می‌شوند، بر آن شدیم تا گیاه رامنوس کورنیفولیا را که بر اساس اطلاعات موجود تاکنون مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار نگرفته است، مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری گیاه رامنوس کورنیفولیا از ۵ تا ۷ کیلومتری سی سخت به سمت دنا در استان فارس، این گیاه مورد بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفته و از نظر وجود مواد مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت جداسازی یک ترکیب آنتراکینونی از کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک استفاده شد و سپس با روش‌های دستگاهی از جمله طیف مادون قرمز، ماوراء بنفش و جرمی شناسایی گردید. هم‌چنین اندازه‌گیری میزان خاکسترهای گیاهی، ویتامین ث و عناصر فلزی در مورد گیاه انجام شد.

یافته‌ها: وجود آنتراکینون، سنوزید، تانن، فلاونوئید ، آلکالوئید و ساپونین (به میزان کم) در گیاه نشان داده شد. ترکیب جدا شده با عنوان ۱- هیدروکسی-۳- متیل-۶- وینیل-۸-گلیکوزید آنتراکینون می‌باشد. میزان خاکستر تام، محلول در آب، نامحلول در اسید و سولفاته به ترتیب ۶۷/۱ درصد، ۴/۰ درصد، ۵۶/۱ درصد و ۳۵/۴ درصد می‌باشد. ۱۲/۲۱ و ۶۷۰ میلی گرم می‌باشد.

استنتاج: به نظر می‌رسد رامنوس کورنیفولیا گونه ای با ارزش از لحاظ وجود مواد موثره گیاهی باشد.

واژه های کلیدی: رامنوس کورنیفولیا، آنتراکینون، خاکستر، ویتامین ث

مقدمه

طبیعت منبعی غنی از ترکیبات دارویی می‌باشد که بخشی از آن‌ها در گیاهان نهفته‌اند. امروزه به دلیل بروز عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی در درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است و تحقیقات در زمینه استخراج ترکیب‌های فعال بیولوژیکی از گیاهان به سرعت در حال انجام می‌باشد(۱). کشور ما ایران به دلیل تنوع آب و هوایی و شرایط اقلیمی مساعد دارای پوشش گیاهی بسیار غنی می‌باشد و چه بسیارند گنجینه‌های با ارزشی که هنوز ناشناخته مانده‌اند.

مولف مسئول: لیلا معزی– شیراز: دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی E-mail: moezile@yahoo.com
۱. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران
۲. دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
۳. استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۹/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۰/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱/۲۴

آنتراکینون‌ها مشتق آنتراسن بوده و از بزرگ‌ترین کینون‌های طبیعی می‌باشند که اغلب به صورت متصل به قندها در گیاهان یافت می‌شوند(۲). آنتراکینون‌ها گروهی با عملکردهای متفاوت هستند که از نظر ساختمانی وابسته به آنتراسن هستند. ساختار اصلی این ترکیبات ۹ و ۱۰- دیوکسوآنتراسن است. آنتراکینون‌ها به صورت پودر کریستالی با ظاهر زرد رنگ یا خاکستری روشن تا خاکستری مایل به سبز می‌باشند(۳). آنتراکینون‌ها عمدتا به عنوان ملین استفاده می‌شوند و در درمان بیماری‌های پوستی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند(۴). به علاوه، آنتراکینون‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشند(۵). علاوه بر این موارد، اثرات گوناگون دیگری از آنتراکینون‌ها در انسان و حیوانات آزمایشگاهی گزارش گردیده است. هر دو آنتراکینون‌های طبیعی و مصنوعی کاربردهای گسترده‌ای در صنعت و دارو داشته و در نتیجه انسان به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم درمعرض این ترکیبات قرار می‌گیرد(۶). عصاره‌های گیاهی حاوی آنتراکینون‌ها با توجه به خواص درمانی و دارویی گسترده در حال حاضر به طور فزاینده برای استفاده در لوازم آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی، رنگ و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند(۷). در حالی که آنتراکینون‌ها تنها در خانواده لیلیاسه از تک لپه‌ای‌ها یافت می‌شوند، در دولپه‌ای‌ها تیره‌های روناس، نیام داران، علف هفت بند، عناب (رامناسه)، اریکاسه، فرفیون، حنا، ساکسیفراسه، گل میمون و شاه پسند حاوی آنتراکینون می‌باشند(۲).

گیاه رامنوس کورنیفولیا (*Rhamnus cornifolia*) از خانواده رامناسه می‌باشد. نام فارسی این گیاه گردوی سیاه یا سیاه تنگرس صخره روی است که تنها جنس رامنوس می‌باشد که درختچه‌ای صخره رو است(۸). درختچه‌ای ایستاده یا خوابیده، دوپایه، پوشیده از کرک‌های خشن و زبر ، بدون تیغ، دارای برگ‌های خزان‌ریز متناوب، چوب سخت، بیرون چوب سفید و درون چوب سرخرنگ است. موسم گل دهی این گیاه اردیبهشت و خرداد می‌باشد(۹). برنمولر این گونه را به دو واریته cornifolia و denudate تقسیم نموده است. در واریته cornifolia هر دو سطح برگ و دمبرگ پتویی پرپشت است ولی در واریته denudate گیاه به ظاهر بی‌کرک است(۱۰). این گونه در جنوب شرقی آناتولی، شمال عراق و شمال غرب، غرب و جنوب غرب ایران می‌روید(۱۱). هر دو واریته این گیاه در ایران رویش دارند. محل رویش واریته cornifolia در استان فارس، کوه دنا، بالای سی سخت و تل خسروی می‌باشد(۹،۱۰).

با این که مشتقات آنتراکینون گلیکوزیدها که دارای خواص ملین قوی و نیز اثرات متعدد دیگری هستند به فراوانی در بعضی از گیاهان یافت می‌شوند، تهیه سنتتیک آن‌ها مقرون به صرفه نمی‌باشد. از سوی دیگر، با توجه به وسعت کاربرد فرآورده‌های ملین از جمله فرآورده‌های آنتراکینونی در دانش پزشکی، به دنبال دستیابی به منبع جدیدی از ترکیبات فوق، گیاه رامنوس کورنیفولیا از خانواده رامناسه جمع‌آوری شده از کوه دنا که تنها رامنوس صخره رو می‌باشد، مورد بررسی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

کلروفرم، سیلیکاژل TLC، اسیدسولفوریک، اسید کلریدریک، اتر، استون، متانل، اتانل، سیلیکاژل ستون کروماتوگرافی، هیدروکسید پتاسیم، استات منیزیوم، اتیل استات، سود، اسید نیتریک، معرف واگنر، معرف مایر، معرف کلرور فریک و معرف استات سرب.

تهیه نمونه گیاهی

این گیاه از ۵ تا ۷ کیلومتری سی سخت به سمت دنا در استان فارس جمع‌آوری گردید. پس از جمع‌آوری، مواد زاید جداسازی شده، پس از جدا نمودن پوست از ساقه‌ها، برگ و پوست به صورت جداگانه خشک شدند. آسیاب کردن گیاه بلافاصله قبل از عصاره‌گیری انجام گرفت تا از تماس بیش‌تر پودر با هوا و عوامل

طبیعی و احتمال کاهش آنتراکینون‌ها جلوگیری شود. پس از آسیاب کردن، جهت افزایش راندمان استخراج، ذرات خرد شده گیاه از الک شماره ۲۵ رد شد.

روش‌های بررسی گیاه

بررسی‌های ماکروسکوپی

پس از شناسایی گیاه نمونه، خصوصیات ظاهری گیاه مانند شکل برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و جهت مقایسه، از اطلاعات موجود در منابع معتبر استفاده گردید(۱۰،۱۱). همچنین پودر برگ و پوست گیاه از نظر خصوصیات ظاهری نظیر رنگ، بو و طعم مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی های میکروسکوپی

در این مرحله عمل خرده نگاری بر روی پوست و برگ گیاه انجام گردید. برای این منظور ابتدا یک یا چند قطره از کلرال هیدراته یا پتاس ۵ درصد در وسط یک لام گذاشته و سپس مقدار کافی از پودر مورد آزمایش بر روی مایع قرار گرفته و بعد لامل با دقت بر روی آن قرار داده شد و در نهایت در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی های ۱۰ و ۴۰ مشاهده گردید.

آزمایشات مقدماتی جهت شناسایی مواد تشکیل دهنده

اطلاع از وجود ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه در فرآیند اسخراج دارای اهمیت بوده و از نظر اثرات درمانی نیز راه‌گشا خواهد بود. جهت انجام این آزمایشات در هر مورد از پوست و برگ گیاه و هم‌چنین از حضور یک شاهد استفاده گردید و نتایج حاصل با اطلاعات موجود در منابع معتبر در مورد گیاه استاندارد رامنوس فرانگولا مقایسه شد. در این تحقیق حضور آنتراکینون‌ها (آزمایش بورن تراگر)، سنوزیدها (آزمایش بورن تراگر تغییر یافته)، شناسایی آلوئین (واکنش شاتن)، آلکالوییدها، ساپونین، تانن، فلاونوییدها (آزمایش سیانیدین و آزمایش ردوکس) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جهت شناسایی آنتراکینون ها

فاز ثابت در این روش سیلیکاژل GF254 با ضخامت ۲.۰ سانتیمتر و فاز متحرک استفاده شده اتیل استات- متانل-آب (به نسبت ۱۰۰-۱۷-۱۳) بود. به این منظور ۵/۰ گرم از پوست و برگ رامنوس کورنیفولیا وزن گردید. به هر یک از نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر متانل ۱۰۰ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی حمام بخار حرارت داده شد و صاف گردید. هر یک از عصاره‌ها جداگانه با کمک لوله موئینه بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک کاشته شد. همچنین محلول استاندارد آلوئین که با غلظت ۱/۰ درصد متانول تهیه شده بود، بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک کاشته شد(۱۲،۱۳). کلیه مشتقات آنتراکینون در زیر اشعه ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر ایجاد فلوئورسانس می‌کنند. هم‌چنین تمامی مشتقات آنتراکینونی در زیر اشعه ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر ایجاد رنگ فلوئورسانس زرد یا قرمز قهوه‌ای می‌کنند. لکه‌های حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک در هر ۲ طول موج مشاهده و رنگ هر لکه و R_f (Retention factor) مربوطه محاسبه گردید. پس از اسپری کردن محلول ۵ درصد هیدروکسید پتاسیم در اتانول، آنتراکینون‌ها قرمز شده و در زیر اشعه ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر فلوئورسانس قرمز می‌دهند. آنترون‌ها و آنترول‌ها پس از اسپری کردن این ۲ محلول زرد شده و در زیر نور ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر فلوئورسانس زرد می‌دهند(۱۲). لکه‌های حاصل از اسپری کردن محلول ۵ درصد هیدروکسید پتاسیم در اتانول، در نور مرئی و اشعه ماوراءبنفش مشاهده و رنگ هر لکه در قسمت نتایج آورده شده است.

استخراج ترکیب آنتراکینونی از پوست

عصاره گیری

جهت عصاره‌گیری از پوست گیاه از روش خیساندن

استفاده گردید. برای انجام این عمل ۱۰۰ گرم از پودر پوست گیاه که از الک شماره ۲۵ رد شده بود با ۴۰۰ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد در یک ارلن ریخته و سپس به مدت نیم‌ساعت با هم‌زن برقی به‌هم‌زده شد. عصاره حاصل از استخراج توسط دستگاه روتاری، در دمای 45°C تغلیظ گردید. سپس حاصل تغلیظ در یک مکان تاریک، دور از نور قرار داده شد تا بقایای حلال نیز تبخیر گردد.

مرحله اول استخراج

پس از اتمام عمل عصاره‌گیری، جهت استخراج آنتراکینون‌های موجود از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده گردید. برای این عمل از ستون شیشه‌ای به قطر ۵ سانتی‌متر استفاده شد که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر از سیلیکاژل با اندازه ۶۰ پر گردید و عمل پک کردن ستون توسط فاز متحرک انجام گرفت. حلال مورد استفاده در طی عمل کروماتوگرافی اتیل استات، متانل، آب به نسبت ۱۰۰، ۱۷، ۱۳ و سرعت عبور حلال ۲۰ قطره در دقیقه بود. پس از آماده شدن ستون، ۲ گرم از عصاره تغلیظ شده با مقداری سیلیکاژل کاملا مخلوط گردید تا به صورت پودر درآید. سپس این پودر روی ستون کروماتوگرافی قرار داده شد. در طول عمل جداسازی، فراکسیون‌های۱۵میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید. با عبور حلال از ستون ابتدا باند زرد کم رنگ، سپس زرد پررنگ و در آخر زرد کم رنگ از ستون خارج شد. سپس برای بررسی آن‌ها از پلیت‌های کروماتوگرافی لایه نازک با فاز ساکن GF254 استفاده گردید. فاز متحرک اتیل استات، متانول و آب به نسبت ۱۰۰، ۱۷ و ۱۳ بوده، جهت بررسی لکه‌ها از اشعه ماوراءبنفش با ۲ طول موج ۲۵۴ و ۳۶۵ نانومتر استفاده گردید. فراکسیون‌های یکسان، مشخص و با هم مخلوط شدند. در این عمل ۵ فراکسیون به دست آمد. فراکسیون‌های به دست آمده با روتاری در حرارت 45°C تغلیظ گردیدند(۱۴).

مرحله دوم استخراج

از فراکسیون‌های به دست‌آمده در مرحله قبل، فراکسیون‌های شماره ۱، ۳ و ۵ با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک جدا شده و مورد بررسی قرار گرفتند. فاز ساکن در این مرحله سیلیکاژل GF254 بود که بر روی پلیت‌های ۲۰×۲۰ سانتی‌متر گسترده شده، دارای ضخامت نیم سانتی‌متر بود. فاز متحرک قبلی با نسبت‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفت و سرانجام از سیستم حلال اتیل استات، متانل، آب با نسبت ۱۰۰، ۵/۸، ۶ استفاده گردید. هر چند لکه‌ها در نور مرئی زرد رنگ بودند ولی در زیر نور ماوراءبنفش قرمز رنگ بودند. سپس لکه‌ها از روی پلیت تراشیده شده، به بشر منتقل شدند و توسط متانل خالص، استخراج گردیدند. پس از به هم زدن به وسیله کاغذ صافی، صاف گردیده، مواد به دست آمده توسط روتاری تغلیظ شدند و سپس توسط متانول، کریستاله شده و بعد از آن مورد تبلور مجدد قرار گرفتند. جهت شناسایی ساختمان یک ترکیب جدا شده از مراحل بالا کارهای زیر انجام گرفت:

الف) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک [فاز ثابت: سیلیکاژل GF254؛ فاز متحرک: اتیل استات- متانول- آب (۱۰۰-۱۷-۱۳)] خلوص ترکیب، R_f و رنگ لکه در نور مرئی و ماوراء بنفش و با معرف هیدروکسید پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت(۱۲). هم‌چنین آزمایش بورن تراگر بر روی ترکیب انجام گرفت.

ب) طیف‌های ماوراء بنفش در متانل، مادون قرمز در دی متیل سولفوکسید و جرمی تهیه گردید.

تعیین مقدار گلیکوزیدهای آنتراکینونی موجود در گیاه

به ۲۵/۰ گرم از پودر پوست گیاه که از الک شماره ۲۵ رد شده بود، ۲۵ میلی لیتر متانل ۷۰ درصد اضافه کرده، به بالن درب داری که قبلا به دقت وزن شده بود انتقال داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه همراه با حرارت رفلاکس شد. پس از خنک شدن دقیقا آن را وزن کرده و تغییر وزن با افزودن متانل ۷۰ درصد به وزن اولیه رسانده شد و سپس با کاغذ صافی صاف گردید. به ۵ میلی لیتر از حاصل صاف شده ۵۰ میلی‌لیتر آب و ۱.۰

میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ اضافه کرده و آن را به یک دکانتور انتقال دادیم. پس از مخلوط کردن سه بار و هر بار با ۲۰ میلی‌لیتر اتر دکانته کرده و پس از جدا شدن دو فاز، فاز آبکی به یک بالن ۱۰۰ میلی لیتر منتقل گردید. فازهای اتری با هم مخلوط شده و دو بار هر بار با ۱۵ میلی‌لیتر آب شست و شو داده شد. قسمت آبکی را به بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتر انتقال داده، توسط آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و فاز اتری دور ریخته شد. ۴۰ میلی‌لیتر از فاز آبکی به یک بالن منتقل و توسط ۵ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد سدیم کربنات خنثی گردید. سپس با ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد وزنی- حجمی کلرید آهن (III) به مدت ۲۰ دقیقه روی حمام بخار رفلاکس گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ به داخل بالن اضافه گردید و دوباره ۲۰ دقیقه به همراه همزدن روی حمام بخار حرارت داده شد تا کاملاً رسوب آن حل گردد. محلول حاصل پس از سرد شدن به یک دکانتور انتقال داده شد و ۳ بار هر بار با ۲۵ میلی‌لیتر اتر دکانته شد. سپس فازهای اتری مخلوط و دوبار هر بار با ۱۵ میلی لیتر آب شستشو داده شد و فاز اتری به یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتر منتقل و با اتر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۲۰ میلی لیتر از این محلول با احتیاط خشک گردید. حاصل باقیمانده در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۵/۰ درصد وزنی- حجمی استات منیزیم در متانل حل شد. جذب این محلول در طول موج ۵۱۵ نانومتر در مجاورت متانل خالص به عنوان شاهد قرائت گردید(۱۳). لازم به ذکر است که این آزمایش ۵ مرتبه انجام و نتایج آن در قسمت نتایج آورده شده است.

در فرمول بیر- لامبرت، هنگامی که غلظت بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر ذکر شود K که قدرت جذب مولی می‌باشد به نام جذب ویژه خوانده شده و با $A_{1cm}^{1\%}$ یا $E_{1cm}^{1\%}$ نشان داده می‌شود. مقدار آن جذب محلول ۱ درصد جسم در سلول ۱ سانتی‌متری است. در این جا مجموع آنتراکینون گلیکوزیدهای پوست بر مبنای گلوکوفرانگولین A محاسبه گردید که $E_{1cm}^{1\%}$ گلوکوفرانگولین A برابر با ۱۹۲ می‌باشد(۱۳).

$E_{1cm}^{1\%}$ گلوکوفرانگلوین A= ۱۹۲

M= وزن گیاه

A= میزان جذب خوانده شده در ۵۱۵ نانومتر

$$glucofrangulin\ A\% = \frac{A \times 3/06}{m}$$

تعیین میزان ویتامین ث موجود در برگ گیاه رامنوس کورنیفولیا به روش تیتریمتری

هدف از انجام این مرحله تعیین میزان ویتامین ث موجود در برگ گیاه و مقایسه آن با گیاه رامنوس فرانگولا می باشد زیرا طبق بررسی‌های موجود میزان این ویتامین در برگ رامنوس فرانگولا بسیار قابل توجه است(۱۵). برای انجام عمل تیتراسیون، در ابتدا ۵/۰ گرم از برگ خشک که قبلا آسیاب و توسط الک ۸۰ اندازه ذره‌ای آن یکنواخت شده بود دقیقا وزن شده و با مقداری ماسه شسته شده با اسید و ۱۲ میلی‌لیتر محلول متافسفریک اسید ۶ درصد در هاون چینی به خوبی مخلوط گردید. بعد از مدت یک ساعت مخلوط کردن مخلوط حاصل صاف گردید و ۵ میلی‌لیتر از نمونه حاصل را سانتریفوژ کرده و محصول شفاف حاصل را با استفاده از رنگ ۲ و ۶ دی کلروفنل تیتر کرده و نتایج حاصل ثبت گردید. این آزمایش برای ۲ نمونه انجام گرفت.

تعیین میزان خاکستر

به طور کلی تعیین خاکسترهای گیاهی از مهم‌ترین شاخص‌ها در ارزیابی گیاهان دارویی است. چهار نوع خاکستر گیاهی که اندازه‌گیری می شوند شامل خاکستر تام، خاکستر محلول در آب، خاکستر نامحلول در اسید و خاکستر سولفاته می‌باشد که برای پودر پوست گیاه اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان کاتیون های سدیم، مس، سرب، آهن و کلسیم در پوست گیاه

با توجه به یکی از عوارض عمده مسهل‌ها به خصوص ملین‌های محرک که به هم زدن تعادل آب و

الکترولیت بدن می‌باشد، در استفاده از پوست این گیاه به عنوان مسهل، اطلاع از میزان کاتیون‌های موجود حائز اهمیت می‌باشد. طیف سنجی جذب اتمی روشی برای تعیین میزان وجود یک عنصر در نمونه می‌باشد(۱۶) چهار گرم از پودر پوست گیاه که کاملا آسیاب شده و همگن بوده و در حرارت 103°C کاملا خشک شده بود در یک کروزه چینی ریخته و در کوره الکتریکی با درجه حرارت 250°C قرار داده شد. درجه حرارت در عرض یک ساعت به 650°C رسانده شد و ۶ ساعت در این دما قرار داده شد. سپس کروزه در درجه حرارت اتاق سرد گردید و به آن ۲cc اسید نیتریک ۵۰ درصد اضافه و بر روی هیتر خشک گردید. سپس ۱۰cc اسید نیتریک ۱۰ درصد به آن اضافه شد و مواد جامد در آن حل گردید. پس از سرد شدن در دمای اتاق محلول با صافی صاف شد و در یک بالون ژوژه ۱۰۰ میلی لیتر جمع گردید. هم‌چنین کاغذ صافی ابتدا با ۲ میلی لیتر اسید نیتریک رقیق و سپس آب شسته شد و بالون ژوژه با آب به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد(۱۷). جهت تعیین مقدار عناصر فلزی از محلول تهیه شده از خاکستر پوست و اسیدنیتریک استفاده گردید.

یافته ها

شناسایی گیاه

این گیاه توسط آقای دکتر جعفری (بخش هر باریوم دانشکده علوم دانشگاه شیراز) تحت نام علمی *Rhamnus cornifolia Boiss. & Hohen. Var. cornifolia Bornm* از خانواده رامناسه شناسایی گردید.

نتایج بررسی ماکروسکوپی

گیاه Rhamnus cornifolia درختچه ایستاده یا خوابیده صخره رو، پوشیده از کرک‌های خشن و زبر، بدون خار، چوب سخت، بیرون چوب سفید مایل به خاکستری و درون چوب سرخ مایل به قهوه‌ای است. این گیاه دارای ساقه‌های متعدد ایستاده یا خوابیده، و پوست خاکستری است. شاخه‌های جوان و شاخک‌ها، سبز مایل به خاکستری یا قهوه‌ای و پوشیده از کرک‌های کوتاه متراکم و برگ های انبوه است. رامنوس فرانگولا دارای شاخه‌های نازک به رنگ خاکستری متمایل به سیاه و راه راه سفید است. در رامنوس کورنیفولیا برگ‌ها بیضی، تخم مرغی یا واژ تخم مرغی، بعضی گرد به طول ۴ تا ۸ و عرض ۳ تا ۴ سانتی‌متر، دارای نوک کند یا تقریبا نوکدار، در قاعده قلبی شکل یا مدور و یا کنجی، کامل یا به طور خفیف کنگره‌ای دندانه دار و یا دارای حاشیه موج دار، در سطح وسط کمی چسبناک در سطح پشتی سبز رنگ پریده کمی متمایل به قهوه‌ای دارای ۷ تا ۱۰ رگبرگ فرعی برجسته، دمبرگ به طول ۸ تا ۱۵ میلی‌متر و پوشیده از کرک‌های کوتاه متراکم است. هر دو سطح برگ و دمبرگ پتویی پر پشت است. در فرانگولا برگ‌ها متناوب، نوک تیز، موجی و بی کرک، کوتاه‌تر از کورنیفولیا به طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر و عرض ۳ سانتی‌متر، لبه برگ‌ها صاف و تعداد رگبرگ‌ها ۶ تا ۱۰ می‌باشد.

در رامنوس کورنیفولیا، گل زرد مایل به سبز، بسیار کوچک، مجتمع در دسته‌های ۳ تا ۹ تایی، دمگل‌های فرعی به طول ۳ تا ۸ میلی‌متر و پوشیده از کرک های متراکم می‌باشد. در فرانگولا گل‌ها کوچک و در دسته‌های ۲ تا ۷ تایی هستند. در رامنوس کورنیفولیا، میوه به قطر ۵ میلی‌متر، تقریبا کروی یا گلابی شکل، رسیده آن سیاهرنگ و شفت مانند در پایین محصور در کاسه پایا، دانه‌ها ۳ تا ۴ عدد و در انتها کمی پهن و غضروفی می‌باشد، در حالی که میوه فرانگولا بزرگ‌تر و به قطر ۸ میلی‌متر است. پودر پوست رامنوس کورنیفولیا از نظر ماکروسکوپی دارای رنگ خردلی با بوی ضعیف ولی مشخص و مزه آن تلخ می‌باشد. پودر برگ رامنوس کورنیفولیا از نظر ماکروسکوپی دارای رنگ سبز با بوی مشخص و مزه آن کمی تلخ می‌باشد.

نتایج بررسی میکروسکوپی

در خرده نگاری پوست با کلرال هیدراته موارد زیر مشاهده گردید:

الف) تکه‌هایی از الیاف فیبری شده محتوی بلورهای اگزالات کلسیم منشوری که بسیار منظم قرار داشتند. در فرانگولا این بلورها با چنین نظمی دیده نمی شوند.

ب) بلورهای منفرد اگزالات کلسیم ستاره‌ای شکل (رزت) که به فراوانی در سر تا سر اسلاید پراکنده بودند.

ج) تکه هایی از بافت چوب پنبه و سلول های کرکی که در پوست مشاهده شدند.

د) در این گونه نیز مانند رامنوس فرانگولا و رامنوس گراندیفولیا و برخلاف سایر گونه های رامنوس سلول سنگین مشاهده نگردید. هم‌چنین نشاسته نیز دیده نشد. در خرده نگاری پوست که با پتاسیم هیدروکسید ۵ درصدانجام شد بافت قرمز گردید که نشانه حضور آنتراکینون در پوست است.

در خرده نگاری برگ موارد زیر مشاهده گردید:

الف) پارانشیم حفره‌ای که آوندها در بین آن‌ها قرار داشته و کریستال‌های اگزالات کلسیم ستاره‌ای شکل به فراوانی در آن پراکنده بودند.

ب) ساختمان آوند با بزرگنمایی بیش‌تر مشاهده گردید.

ج) برش عرضی برگ: برگ این گیاه دارای کوتیکول صاف و تعداد زیادی تارهای غیر ترشحی می‌باشد. تارها دارای ۱ تا ۵ سلول هستند. کریستال‌های اگزالات کلسیم به صورت ستاره‌ای به تعداد زیاد در کنار آوندها مشاهده می‌شوند. در این برش دو ردیف پارانشیم نردبانی و چند ردیف پارانشیم حفره‌ای و تارهای غیرترشحی در دو سطح رویی و زیری مشاهده گردید. خرده‌نگاری برگ با پتاسیم هیدروکسید نیز صورت گرفت که بافت قرمز رنگ دیده شد ولی در پوست قرمزی بیش‌تری مشاهده گردید.

نتایج تست‌های مقدماتی بر روی گیاه رامنوس کورنیفولیا

آزمایش شناسایی آنتراکینون ها

الف) آزمایش بورن تراگر: چنان‌چه این آزمایش مثبت باشد رنگ قرمز مشاهده می‌گردد؛ این آزمایش در مورد پوست و برگ گیاه مثبت بود.

ب) آزمایش بورن تراگر تغییر یافته: در صورت وجود سنوزیدها رنگ قرمز مشاهده می‌گردد که در این آزمایش هم پوست و هم برگ رنگ قرمز را نشان دادند.

ج) آزمایش شاتن: چنانچه آزمایش مثبت باشد محلول زرد رنگ در ناحیه ۳۶۵ نانومتر دارای رنگ سبز است که در این‌جا هم پوست و هم برگ رنگ آبی نشان دادند که نشانه عدم وجود کاسکاروزیدها در گیاه است.

آزمایش آلکالوئیدها

آزمایش مقدماتی: چنانچه نمونه حاوی آلکالوئید باشد با معرف واگنر رسوب قهوه‌ای مایل به سیاه و با معرف مایر رسوب سفید مایل به زرد می‌دهد. در مورد پوست آزمایش مایر کاملا منفی ولی آزمایش واگنر مقداری مثبت بود (به عبارتی چنانچه بلادون را در مورد آزمایش واگنر +++ در نظر بگیریم در مورد پوست رامنوس کورنیفولیا این آزمایش + بود). آزمایش مایر برای برگ کاملا منفی وآزمایش واگنر برای آن مثبت بود.

آزمایش اساسی

آزمایش مایر در هر دو مورد پوست و برگ منفی بود ولی در مورد آزمایش واگنر برگ ++ و پوست + بود. بنابراین، مقدار کمی آلکالوئید هم در پوست و هم در برگ گیاه موجود است که به نظر می رسد میزان آن در برگ کمی بیش‌تر باشد.

آزمایش ساپونین

چنان‌چه آزمایش در مورد ریشه شیرین بیان که به عنوان شاهد استفاده شد ++++ در نظر گرفته شود در مورد پوست ++ و در مورد برگ + بود.

آزمایش تانن

هر دو نمونه پوست و برگ در تست با معرف کلرورفریک ایجاد رنگ سبز متمایل به قهوه ای و در تست با معرف استات سرب ایجاد رسوب سفید کرد. بنابراین، تانن هم در پوست و هم در برگ گیاه وجود دارد.

آزمایش فلاونوئید

آزمایش سیانیدین: در پایان آزمایش رنگ قرمز تیره مشاهده شد که نشانه وجود فلاونون در پوست و برگ گیاه است.

آزمایش ردوکس: این آزمایش در مورد پوست و برگ گیاه منفی بود.

کروماتوگرافی لایه نازک

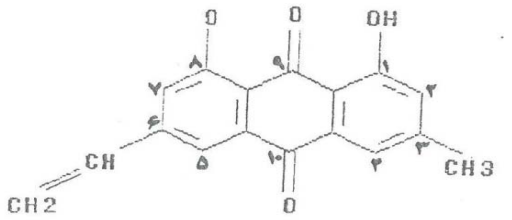
استاندارد مورد استفاده آلوین فلوکا بود که در R_f=۰/۵ لکه‌ای مشاهده شد که رنگ آن در نور مرئی زرد، در زیر لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر، قرمز و طول موج ۳۶۵ نانومتر،قرمز قهوه‌ای و نیز تحت تاثیر معرف پتاس به رنگ قرمز کم رنگ دیده شد، که این نتایج با اطلاعات آلوین موجود در کتاب Wagner در سال ۱۹۸۴ مطابقت دارد(۱۲). مشاهدات مربوط به پوست و برگ رامنوس کورنیفولیا در جداول شماره ۱ و ۲ ذکر گردیده است.

کروماتوگرافی ستونی

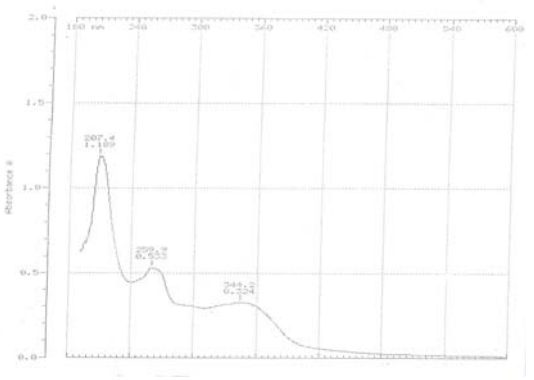
با عبور حلال از ستون کروماتوگرافی ابتدا باند زرد کم رنگ، سپس زرد پررنگ، و در آخر زرد کم رنگ از ستون خارج گردید. فراکسیون ۱۵ میلی‌لیتر تهیه شده جداگانه بر روی کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد و فراکسیون‌های یکسان مشخص و با هم مخلوط شدند. در این عمل ۵ فراکسیون به دست آمد. ترکیبات فراکسیون‌های ۱، ۳ و ۵ با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی گردید. در فراکسیون شماره ۵، دو ترکیب مشاهده شد که ترکیب اول کاملاً از خط نقطه شروع جدا می‌شد ولی ترکیب دوم به نظر ناخالص می‌آمد و مقداری از آن بر روی خط شروع باقی می‌ماند. ترکیب اول تحت آزمایشات بیش‌تری قرار گرفت و در نهایت ساختمان آن به‌عنوان یک آنتراکینون شناسایی گردید. ترکیب به‌دست آمده توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک شناسایی گردید به این ترتیب که بر روی پلیت کروماتوگرافی به رنگ زرد پر رنگ، زیر نور ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرمز و با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرمز مایل به قهوه‌ای و با معرف هیدروکسید پتاسیم رنگ قرمز پر رنگ در R_f=۲.۰ مشاهده گردید که این R_f با ماده مورد نظر مطابقت دارد. همچنین آزمایش بورن تراگر بر روی ترکیب انجام گرفت که نتیجه آن مثبت و آنتراکینون بودن ترکیب تایید گردید.

طیف ماورا بنفش

طیف ماوراءبنفش تهیه شده در متانول دارای طول موج‌های ماگزیمم جذبی در ۲/۳۴۴، ۹/۲۵۹ و ۴/۲۰۷ نانومتر می‌باشد (تصویر شماره ۱) که با جذب ماوراءبنفش آنتراکینون‌ها مطابقت دارد (تصویر شماره ۲).



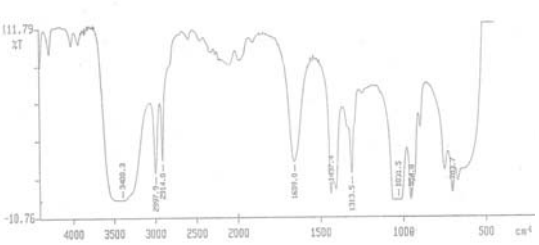
تصویر شماره ۱: ۱- هیدروکسی-۳-متیل-۶-وینیل-۸-گلیکوزید آنتراکینون ترکیب جدا شده از پوست گیاه *Rhamnus cornifolia*



تصویر شماره ۲: طیف ماوراء بنفش ترکیب آنتراکینونی شناسایی شده در متانل

طیف مادون قرمز

طیف مادون قرمز تهیه شده در دی متیل سولفوکسید حاوی نکات زیر می باشد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: طیف مادون قرمز ترکیب آنتراکینونی شناسایی شده در DMSO

الف) باند جذبی مشاهده شده در $1659\ cm^{-1}$ مربوط به گروه کربونیل می باشد.

ب) باند جذبی مشاهده شده در $3400/3\ cm^{-1}$ مربوط به جذب O-H می باشد.

ج) باند جذبی در ناحیه $2914\ cm^{-1}$ نشانه وجود ترکیباتی از جمله $-CH_3$ و $-CH_2$ و $-CH$ و جذب CH کربن sp^3 می‌باشد.

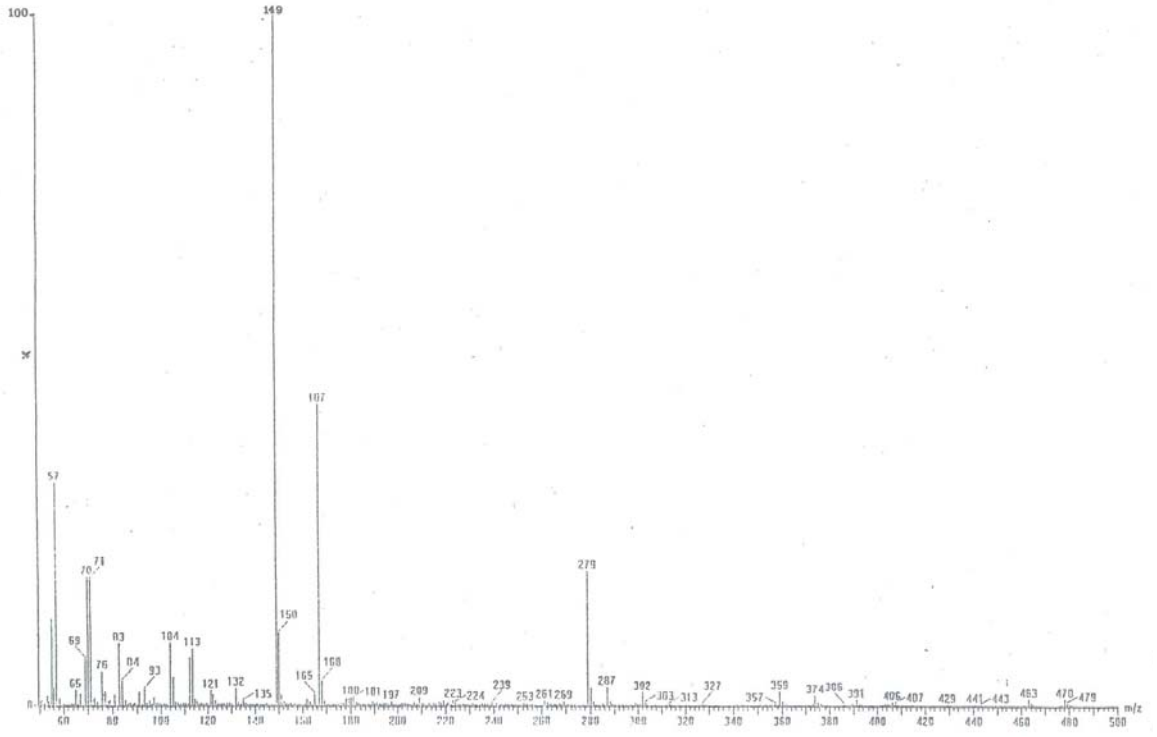
د) نوارهای جذبی نواحی $1437/4\ cm^{-1}$ و $1650\ cm^{-1}$ مربوط به وجود هسته فنیل در ساختمان است.

طیف جرمی

با توجه به این که پیک ۲۷۹، پیک یون مولکولی در نظر گرفته شده است و نیز با توجه به نتایج ماوراءبنفش و مادون قرمز که آنتراکینون بودن ترکیب را تایید می کند و همچنین ساختمان آنتراکینون ها و الگوی شکست آن‌ها در منابع، ترکیب آنتراکینونی احتمالا دارای ساختمان ۱- هیدوکسی- ۳- متیل-۶- وینیل- ۸- گلیکوزید آنتراکینون (تصویر شماره ۴) می‌باشد.

با توجه به این‌که در آنتراکینون‌ها قند به ساختمان اصلی متصل می‌باشد و همچنین منفی بودن آزمایش آلوئین که نشانگر وجود سی- گلیکوزیدها محسوب می‌شود، سایر شکست‌های مشاهده شده در اعداد بیشتر از ۲۷۹ مربوط به قند بوده که به صورت O- گلیکوزید احتمالا در ناحیه ۸ به آنتراکینون متصل می‌باشد. با توجه به منابع موجود در خصوص الگوی شکست در آنتراکینون‌ها شکست های زیر پیشنهاد می گردد:

هنگامی که مولکول یونیزه می گردد یکی از



تصویر شماره ۴: طیف جرمی ترکیب آنتراکینونی شناسایی شده

الکترون‌های مربوط به جفت الکترون غیرپیوندی اکسیژن به علت اتصال سست حذف می شود. یون اکسیژن مثبت تشکیل شده و سپس باند C-C می‌شکند و الکترون آزاد موجب ایجاد پیوند π با الکترون آزاد اکسیژن می گردد.

جدول شماره ۱: شناسایی آنتراکینون ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک در پوست گیاه رامنوس کورنیفولیا

شماره لکه	RF	رنگ لکه در نور مریی	رنگ لکه با معرف پتاس	رنگ در زیر لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر	رنگ در زیر لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر
۱	۰/۸۵	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۲	۰/۶۳	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۳	۰/۴۵	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۴	۰/۴	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۵	۰/۳۳	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۶	۰/۲۵	زرد پررنگ	قرمز پررنگ	قرمز	قرمز مایل به قهوه ای
۷	۰/۲	زرد پررنگ	قرمز پررنگ	قرمز	قرمز مایل به قهوه ای

جدول شماره ۲: شناسایی آنتراکینون ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک در برگ گیاه رامنوس کورنیفولیا

شماره لکه	RF	رنگ لکه در نور مریی	رنگ لکه با معرف پتاس	رنگ در زیر لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر	رنگ در زیر لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر
۱	۰/۸۵	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۲	۰/۷۵	زرد کمرنگ	قرمز مایل به نارنجی	قرمز کمرنگ	قرمز
۳	۰/۶۳	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۴	۰/۴	زرد کمرنگ	قرمز کمرنگ	قرمز	قرمز
۵	۰/۳	زرد پررنگ	زرد مایل به نارنجی	زرد مایل به قرمز	قرمز
۶	۰/۲۵	زرد پررنگ	قرمز پررنگ	قرمز	قرمز مایل به قهوه‌ای

سپس باند C-C بعدی خم شده و به آسانی نسبت به باند قوی اولیه قطبی می‌شود و در نهایت CO خنثی، مولکول را ترک خواهد کرد. مولکول باقیمانده یک یون فلوئورسانس می‌باشد که خود نیز شکسته شده، یک مونوکسید کربن خنثی دیگر از دست می‌دهد(۱۸،۱۹).

در مشتقات هیدروکسی آنتراکینون، علاوه بر جدا شدن ۲ مولکول منوکسیدکربن خنثی، اکسیژن هیدروکسی به صورت CHO رادیکال یا CO خنثی جدا می گردد. نحوه از دست دادن CO یا CHO مانند شکسته شدن گروه‌های کتونی می‌باشد. در آنتراکینون‌ها با استخلاف هیدروکسی ممکن است کلیه استخلاف‌ها و یا تعدادی از آن‌ها از ساختمان ماده جدا شوند(۱۸،۱۹). میزان آنتراکینون گلیکوزید در پوست گیاه به روش اسپکترومتری: میزان گلیکوزیدهای آنتراکینونی موجود در نمونه پوست گیاه بر اساس گلوکوفرانگولین آن برابر با ۱/۷۲ تا ۱/۸۶ گرم درصد بود. میزان گلیکوزید آنتراکینونی در پوست گیاه فرانگولا، ۳ تا ۶ گرم درصد گزارش شده است(۲۰).

نتایج تعیین مقدار ویتامین ث موجود در برگ گیاه

میزان ویتامین ث موجود در برگ ۸۵/۶۳ میلی گرم در ۱۰۰ گرم برگ خشک گیاه می باشد. میزان ویتامین ث در برگ گیاه فرانگولا برابر ۸۸۴ تا ۹۹۱ میلی گرم درصد گرم برگ خشک گیاه می‌باشد.

میزان خاکسترهای گیاهی در پوست رامنوس کورنیفولیا

میزان خاکستر تام رامنوس کورنیفولیا ۶۷/۱۰ درصد می‌باشد. میزان خاکستر تام در رامنوس فرانگولا نباید بیش‌تر از ۶ درصد باشد(۲۱). میزان خاکستر محلول در آب درصد گرم پوست خشک گیاه ۴/۰ درصد می‌باشد. میزان خاکستر نامحلول در اسید درصد گرم پوست خشک گیاه ۵۶/۱ درصد است. میزان خاکستر نامحلول در اسید درصد گرم پوست خشک رامنوس فرانگولا نباید بیش‌تر از ۵/۱ درصد باشد. میزان خاکستر سولفاته در صد گرم پوست خشک گیاه رامنوس کورنیفولیا ۳۵/۴ درصد می‌باشد. میزان خاکستر سولفاته درصد گرم پوست خشک رامنوس فرانگولا نباید بیش‌تر از ۸ درصد باشد(۲۱).

بحث

تحقیق حاضر اقدامی در جهت بررسی مورفولوژی و فیتوشیمیایی گیاه رامنوس کورنیفولیا بود. با توجه به حضور مشتقات ۱و۸ دی هیدروکسی آنتراکینون در گیاه استاندارد (فرانگولا) و کاربردهای متعدد این ترکیبات از یک سو و رویش فراوان گیاه رامنوس کورنیفولیا در نواحی شمال غرب، غرب و جنوب غربی ایران، تشابهات مورفولوژی و فیتوشیمیایی با گیاه

استاندارد، این گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات نشان می‌دهد که رامنوس کورنیفولیا تنها رامنوس صخره رو می‌باشد. هم‌چنین در حالی که شاخه‌های کورنیولیا دارای پوست خاکستری است، شاخه‌های فرانگولا خاکستری متمایل به سیاه و راه راه سفید است. برگ در کورنیفولیا بزرگ‌تر و به طور خفیف کنگره‌ای دندانه دار نوک کند و پوشیده از کرک است، در حالی که در فرانگولا، کوچکتر، صاف، نوک تیز و بی کرک می‌باشد. در کورنیفولیا گل‌ها در دسته‌های ۳ تا ۹ تایی و میوه‌ها کوچک تر هستند ولی در فرانگولا، گل‌ها در دسته‌های ۲ تا ۷ تایی و میوه‌ها بزرگ‌تر می‌باشند. میکروسکوپ از سال ۱۸۴۷ در تشخیص داروهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. میکروسکوپ وسیله بسیار با ارزشی جهت کشف تقلبات پودرهای گیاهی و تشخیص پودرهای خالص دارویی می‌باشد. قسمتی از شرح داروهای رسمی در فارماکوپه‌ها از بافت شناسی و مشخصات میکروسکوپی مقاطع گیاهان و پودرهای دارویی بحث می‌نماید. بخش زیادی از مواد دارویی گیاهی دارای ساختمان بافتی مشخص می‌باشند که جهت تشخیص آن‌ها به‌کار می‌روند(۲۲). در بررسی میکروسکوپی پوست کورنیفولیا، مانند فرانگولا، بلورهای اگزالات کلسیم منشوری و ستاره‌ای مشاهده شدند. در کورنیفولیا، بلورهای منشوری با نظم بیش‌تر و بلورهای ستاره‌ای با تعداد بیش‌تر نسبت به فرانگولا وجود داشتند. هم‌چنین در این گونه نیز مانند فرانگولا و گراندیفولیا و برخلاف سایر گونه‌های این خانواده، سلول سنگی مشاهده نگردید. برش عرضی برگ کورنیفولیا دارای تارهای حاوی یک تا پنج سلول بوده، کریستال‌های اگزالات کلسیم ستاره‌ای به تعداد زیاد در کنار آوندها مشاهده شدند.

در آزمایشات انجام شده جهت بررسی مواد متشکله موجود در پوست و برگ گیاه رامنوس کورنیفولیا، مشخص گردید که پوست و برگ این گیاه حاوی ترکیباتی مانند آنتراکینون، سنوزید، تانن، فلاونون و احتمالا آلکالوئید و ساپونین می‌باشد، تمامی مواد ذکر شده موجود در کورنیفولیا در گیاه رامنوس فرانگولا وجود دارد(۲۳). روش‌های کروماتوگرافی از دیگر روش‌های تجزیه‌ای که برای جداسازی و تشخیص مواد دارویی به کار می‌روند، نتیجه بهتری به دست می‌دهند. امروزه از این روش‌ها برای تشخیص و شناسایی اجسام در فارماکوگنوزی و همچنین برای تعیین درجه خلوص داروها و مشتقات آن‌ها استفاده می‌شود(۲۲). به منظور تشخیص کیفی گلیکوزیدهای آنتراکینونی از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید. به این صورت که عصاره متانولی حاصل از پوست و برگ گیاه همراه با آلوئین استاندارد، برگ سنا- شیرابه صبر زرد و پوست رامنوس کوردیکوس (دیگر گونه رامنوس که در ایران رویش دارد) بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک کاشته شد و با توجه به رنگ لکه ها، در نور مرئی، ماوراءبنفش و تحت اثر معرف هیدروکسید پتاسیم ۵ درصد در اتانول و نیز با توجه به R_f های هر یک از لکه‌ها، بر طبق نتایج مندرج در منابع معتبر(۱۲) می‌توان احتمال وجود ترکیباتی مانند frangulin A/B و glucofrangulin A/B در پوست و برگ گیاه را داد که به نظر می رسد مقدار گلوکوفرانگولین A/B در برگ نسبت به پوست بیش‌تر است. هم‌چنین مشاهده گردید که رامنوس کوردیکوس نسبت به کورنیفولیا دارای مقدار و تعداد مواد آنتراکینونی کمتری می‌باشد. به منظور شناسایی ترکیبات آنتراکینونی موجود در گیاه، عمل عصاره‌گیری انجام و سپس با کمک ستون کروماتوگرافی و سیستم حلال اتیل استات- متانل- آب به نسبت ۱۰۰-۱۷-۱۳، یک فراکسیون جدا و یک ترکیب از این فراکسیون با کمک کروماتوگرافی لایه نازک خالص و سپس در متانول کریستاله گردید. R_f بلورهای جدا شده و رنگ لکه ایجاد شده توسط آن در کروماتوگرافی لایه نازک در مقابل نورمرئی، ماوراءبنفش و معرف هیدروکسید پتاسیم۵ درصد در اتانل مشخص گردید و طیف‌های ماوراءبنفش آن در متانل، مادون قرمز در دی متیل سولفوکسید و جرمی

تهیه شد که با تفسیر طیف‌های حاصل به نظر می رسد ترکیب ۱-هیدروکسی ۳- متیل ۶- وینیل ۸- گلیکوزید آنتراکینون باشد.

Coskun میزان آنتراکینون‌های موجود در ۱۶ گونه رامنوس در ترکیه را اندازه گیری و دریافت که پوست دو گیاه رامنوس کورنیفولیا و رامنوس پالاسی دارای بیش‌ترین مقدار آنتراکینون است(۲۴). بر اساس روش تعیین مقدار آنتراکینون در فارماکوپه بریتانیا که مبتنی بر میزان گلوکوفرانگولین موجود در گیاه می باشد، میزان گلیکوزید آنتراکینونی موجود در پوست گیاه کورنیفولیا با استفاده از اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد که این میزان برابر با ۱/۷۲ تا ۱/۸۶ گرم درصد می‌باشد که نسبت به میزان آنتراکینون گزارش شده در پوست فرانگولا که ۳ تا ۶ گرم درصد می‌باشد، میزان قابل قبولی است. ویتامین ث جهت تولید و نگهداری لایه‌های سلولی بافت‌ها و به خصوص استخوان‌ها و دندان‌ها ضروری است. هم‌چنین ویتامین ث سبب پیشگیری و درمان بیماری اسکوربوت می‌شود. عده ای نیز عقیده دارند که این ویتامین موجب افزایش مقاومت بدن در برابر عفونت‌ها می گردد. هم‌چنین به طور قطع ثابت شده است که ویتامین ث در درمان زخم ها دارای ارزش زیادی است. اسید آسکوربیک عامل مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی است(۲۵). از آن‌جا که ویتامین ث موجود در برگ رامنوس فرانگولا بسیار قابل توجه و در حدود ۵/۵۳±۵/۹۳۷ میلی گرم درصد گرم برگ گیاه می‌باشد، در مصرف برگ این گیاه به عنوان مسهل نه تنها می‌توان به ارزش میزان ویتامین ث موجود در گیاه و تاثیر این ماده بر بدن اشاره نمود بلکه می‌توان احتمال داد از آن‌جا که ویتامین ث دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و این که فرم موثر آنتراکینون‌ها فرم احیا شده آن‌ها می‌باشد ویتامین ث می‌تواند در اعمال اثر مسهلی این ترکیبات کمک‌کننده باشد. البته اثبات این اثر سینرژیک نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد. میزان ویتامین ث موجود در برگ کورنیفولیا، ۸۵/۶۳ میلی گرم درصد گرم برگ خشک گیاه می‌باشد که در مقایسه با فرانگولا کم‌تر است.

آزمایشات کمّی نقش به‌سزایی در رد یا قبول یک فرآورده گیاهی به عنوان فرآورده استاندارد دارند و این آزمایشات همواره موید حضور ناخالصی ها و تقلبات موجود در نمونه گیاه می باشند. از جمله این آزمایشات تعیین میزان خاکستر است. خاکستر تام شامل خاکستر فیزیولوژیک می‌باشد که از خود گیاه مشتق شده است. در صورتی که خاکستر غیر فیزیولوژیک از باقیمانده مواد دیگر مانند شن و خاک (مواد غیرآلی خارجی) که به ماده گیاهی چسبیده‌اند به دست می‌آید(۲۲). خاکستر تام معمولا شامل کربنات‌ها، فسفات‌ها، سیلیکات‌ها و سیلیکا می‌باشد. در خاکستر سولفاته همه اکسیدها و کربنات‌ها به سولفات تبدیل می‌شوند(۲). میزان خاکستر نامحلول در اسید، حضور و مقدار سیلیس، مخصوصاً شن و خاکسترهای سیلیس مانند را مشخص می‌نماید(۲، ۲۲). در پوست کورنیفولیا میزان خاکستر تام ۶۷/۱۰ درصد، محلول در آب ۴/۰ درصد، نامحلول در اسید ۵۶/۱ درصد و سولفاته ۳۵/۴ درصد به دست آمد.

یکی از فاکتورهای مهم برای ساخت مواد موثره در گیاهان دارویی فلزات می‌باشند زیرا همان‌طور که می‌دانیم فلزات نقش مهمی در ایجاد پروسه‌های متابولیکی در گیاهان دارند و مواد موثره گیاهی نیز محصول این متابولیسم‌ها هستند. از سوی دیگر، مسهل‌های آنتراکینونی باعث کاهش شدید آب و الکترولیت بدن می‌شوند، به گونه‌ای که پتاسیم خون ۲۵ تا ۵۰ درصد کاهش می‌یابد. کاهش پتاسیم خون بروز علائمی مانند نفروپاتی لوله‌های کلیوی و کاهش فعالیت کلی ماهیچه‌ها و اختلالات قلبی مانند آریتمی و برادی کاردی را در پی دارد(۲۶). هم‌چنین بررسی میزان عناصری مانند سرب در قسمت‌های مختلف این گیاه هنگامی اهمیت پیدا می کند که مقدار این عنصر در حدی باشد که در بدن ایجاد سمیت نماید. این غلظت بیش‌تر در مورد گیاهانی مورد بررسی قرار می گیرد که در حاشیه جاده‌ها روئیده و به

صورت مصنوعی، در اثر عبور و مرور وسائط نقلیه موتوری، میزان سرب موجود در گیاه افزایش یابد. با توجه به مطالب فوق‌الذکر، میزان عناصر سدیم، پتاسیم، مس، سرب، آهن و کلسیم در پوست کورنیفولیا محاسبه گردید که به ترتیب برابر با ۱۹، ۱۸۰، ۴۹.۰، ۰۳۴.۰، ۱۲.۲۱ و ۶۷۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم پوست خشک گیاه می‌باشد. این گیاه حاوی مقدار زیادی کلسیم است که می‌تواند در افرادی که نیاز به کلسیم بیش‌تری دارند مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین میزان پتاسیم این گیاه نیز در حدی است که احتمالاً می‌تواند کاهش پتاسیم خون ناشی از مسهل‌های آنتراکینونی را جبران نماید. در نهایت، میزان سرب گیاه نیز بسیار کم بوده و نمی تواند موجب مسمومیت گردد.

در پایان باید متذکر شد با توجه به وجود آنتراکینون، سنوزید، تانن، فلاونویید، آلکالویید، ویتامین ث و ساپونین در گیاه رامنوس کورنیفولیا، به نظر می‌رسد این گیاه دارای ارزش کافی برای تحقیقات بیش‌تر و صرف هزینه و امکانات در آینده باشد.

References

1. Asghari ZH, Mazaheritehrani TM. Extraction of tannin from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and trimyristin from *Myristica fragrans* Houtt. by using microwave irradiation. Iran J Med Aromatic Plants 2010; 26(2): 185-195.
2. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 16th ed. Saunders, Elsevier Ltd; 2009. p. 232-247.
3. Mueller SO, Schmitt M, Dekant W, Stopper H, Schlatter J, Schreier P, et al. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors, genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. Food Chem Toxicol 1999; 37(5): 481-491.
4. Li FK, Lai CK, Poon WT, Chan AYW, Chan KW, Tse KC, et al. Aggravation of non-steroidal anti-inflamatory drug-induced hepatitis and acute renal failure by slimming grug containing anthraquiones. Nephrol Dial Transplant 2004; 19(7): 1916-1917.
5. Yen GC, Duh PD, Chuang DY. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. Food Chem 2000; 70(4): 437-441.
6. Dave H, Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications. Indian Journal of Natural Products and Resources 2012; 3(3): 291-319.
7. Alves DS, Pérez-Fons L, Estepa A, Micol V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. Biochem Pharmacol 2004; 68(3): 549-561.
8. Mozaffarian V. Herbal classification. Vol. 2. Tehran: Science of Today Publication; 1994. p. 306-307 (Persian).
9. Ghahreman A. Flora of Iran. Vol. 15. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands; 1996. p. 1841 (Persian).
10. Mobin S. Iranian plants. Vol. 4. Tehran: University of Tehran Publications; 1975. p. 292-294 (Persian).
11. Rechinger KH. Flora Iranica. Vol. 125. Graz: Akademische Druck-U. Verlagsantalt; 1977. p. 24-26, 122-125.
12. Wagner H. Plant Drug Analyst. New York: Springer-Verlag; 1984. p. 99-146.
13. Dept of Health. British Pharmacopoeia. Dept of Health; 1998. p. 259-261, 621-622.
14. Demuth G, Hinz H. Emodin-8-O-β-gentibioside, a new O-glycoside from *Rhamnus frangula*. Planta Med 1978; 33(1): 53-56.

15. Hughes RE. Use of cation exchange resin in the determination of urinary ascorbic acid. Analyst 1964; 89(1062): 618-620.
16. Vincevica-Gaile Z, Klavins M, Rudovica V, Viksna A. Research review trends of food analysis in Latvia: major and trace element. Environ Geochem Health 2013; 35(5): 693-703.
17. Pungor E. A prtactical guide to industrial analysis. USA: CRC Press; 1995. p. 181-191.
18. Mclafferty FW, Turecek F. Interpretation of mass spectra. USA: WA Benjamin, Inc; 1973. p. 127.
19. Beynons JH. Mass spectrometry and its application to organic chemistry. Academic press: Elsevier; 1968. p. 271-273.
20. Duke JA. Handbook of medicinal herbs. CRC Press; 1989. p. 200.
21. British Herbal Pharmacopoeia. UK. Bristol, British Herbal Medicine Association; 1983. p. 93-94.
22. Samsam-Shariat SH. Extracting active material of medicinal plants and their identification and evaluation. 1st ed. Isfahan: Mani publication; 2002. p. 10-12 (Persian).
23. Stahl VE, Schild W. Phrmazutisch Biologie, 4, Drogenanalyse. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1981. p. 99-105.
24. Coskun M. The quantitative determination of anthraquinone derivatives in Rhamnus species growing in South and East Anatolica. Int J Crude Drug Res 1989; 27(3): 167-170.
25. Aynehchi Y. Materia Medica. 3nd ed. Tehran: University of Tehran publications; 2012; 104-126 (Persian).
26. Smet PAGM. Adverse effects of herbal drugs. Vol.2. Berlin: Springer Verlag; 1993. p. 105-118.