

شناسایی و تعیین مقدار فنل گلیکوزید آربوتین در برگ گیاه *Pyrus boissieriana Buhse* به دو روش HPLC و اسپکتروفتومتری

مریم جهرمی مقدم (Ph.D.)***

محمد رضانی (Ph.D.)**

محمد آزادبخت (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف : درخت تلکا (*Pyrus boissieriana Buhse*) که به گلابی وحشی نیز موسوم است، در جنگل های شمال ایران، به فراوانی، یافت می شود و از جلگه های ساحلی تا ارتفاعات زیاد، پراکنده است. دمگل، برگ ها و پوست برخی از گیاهان جنس *Pyrus* حاوی مقادیری از یک فنل گلیکوزید به نام آربوتین می باشد. آربوتین در مقادیر بالا در بسیاری از گیاهان از جمله تیره های Ericaceae, Rosaceae ... یافت می شود. از آربوتین برای ضد عفونی کردن مجاری ادراری و نیز به واسطه اثر آنتی اکسیدان و ضد آفتاب، استفاده می کنند. این ماده، دیورتیک و قاعده آور است.

مواد و روش ها : در این مطالعه، شناسایی آربوتین در برگ گیاه تلکا به دو روش HPLC و TLC صورت گرفت و سپس میزان آربوتین توسط روش های HPLC و اسپکتروفتومتری تعیین شد.

یافته ها : آربوتین منشا گیاهی داشته و در برگ برخی از گیاهان از جمله *Arctostaphylos uva-ursi* ۴ تا ۱۵ درصد، *Vaccinium vitis* ۵/۵ تا ۷ درصد و *Vaccinium myrtillus* ۰/۴ تا ۱/۵ درصد یافت می شود. در این تحقیق، میزان آربوتین ۷/۰۱ درصد به دست آمد و زمان بازداری آربوتین و زمان بازداری نسبی آن در مقایسه با هیدروکینون (استاندارد داخلی) به ترتیب ۵/۴۵۷ و ۰/۶۸۸ بود.

استنتاج : گیاهان *V. vitis* و *A. uva-ursi* در ایران وجود ندارند؛ بنابر این گیاه تلکا با توجه به مقدار بالای آربوتین و همچنین فراوانی و پراکندگی زیاد آن در شمال ایران می تواند به عنوان منبع غنی آربوتین مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی : فنل ها، گلیکوزیدها، مجرای ادراری، گیاهان شفابخش

مقدمه

و از جلگه های ساحلی دریا تا ارتفاعات زیاد، بالا می رود. ارتفاع این درخت، ۵ متر است. برگ آن تخم مرغی گرد با انتهایی کند است، ولی این انتها در

درخت تلکا با نام علمی *Pyrus boissieriana Buhse* که به گلابی وحشی نیز موسوم است، در جنگل های شمال ایران از ارسباران و آستارا تا گرگان پراکنده است

✉ ساری: خیابان سلمان فارسی - دانشکده داروسازی

*** دکتر داروساز

تاریخ تصویب: ۸۲/۷/۹

* دکترای تخصصی فارماکوتوزی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۲/۴/۲

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۲/۱۴

تابش‌های شدید اشعه فرابنفش به کار برده می‌شود. آربوتین برای چشم و پوست، حساسیت زانمی‌باشد (۴). آربوتین قاعده آور و دیورتیک است. میوه‌های تازه جنس Pyrus در انسان در مصرف خوراکی، فعالیت ضدتوموری و فعالیت ضدجوش زنی در برابر باکتری سالمونلاتیفی موریوم نشان داده اند (۵).

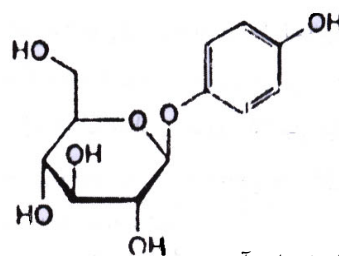
باتوجه به این که مهم‌ترین منبع سرشار شناخته شده از آربوتین در دنیا، گیاه انگور خرس (*Arctostaphylos uva-ursi*) می‌باشد که در ایران موجود نمی‌باشد و با توجه به خصوصیات برجسته این فنل گلیکوزید و موارد کاربردی آن در پزشکی و داروسازی، شناسایی، استاندارد کردن و تعیین مقدار آربوتین در یک گیاه بومی ایران به نام درخت گلابی وحشی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) مواد (ساخت Merck): متانول، پتاسیم هگزا سیانو فرات^۳، استاندارد آربوتین، کلرید آهن ۴، ۳-آمینو آنتی پیرین، آمونیاک، کلروفرم و اتیل استات. دستگاه‌های مورد استفاده: اسپکتروفتومتر (مدل دستگاه: Genesis2 ساخت: آلمان طول موج مری استفاده شده: ۴۵۵ nm)، دستگاه Rotary Evaporator (نام دستگاه روتاری: Laborata 4000، ساخت: آلمان، دمای استفاده شده: ۵۰ درجه سانتی گراد، دور چرخش: ۹۰ دور در دقیقه)، دستگاه Freeze drying (مدل دستگاه: Zirbus، ساخت: آلمان، دمای استفاده شده: ۵۲- درجه سانتی گراد)، لامپ فرابخش (نام دستگاه: Desaga، ساخت: آلمان، طول موج استفاده شده: ۲۵۴ nm)، دستگاه HPLC (مدل دستگاه‌ها: Knauer و Shimadzu، ساخت: آلمان و ژاپن (به ترتیب)، فاز UV Detector K-2600، HPLC Pump K-1001، فاز متحرک: متانول، آب (۹۰:۱۰)، نوع ستون: Eurospher-

برگ‌های جوان، کمی کشیده است. روی برگ، صاف و براق است و دارای رنگ سبز روشن می‌باشد. میوه آن کوچک، گرد و کمی گلابی شکل است (۱). دمگل، برگ‌ها و پوست برخی از گیاهان جنس Pyrus حاوی مقادیری از یک فنل گلیکوزید به نام آربوتین^۱ است (۲).

آربوتین (آربوتوزید) یک هیدروکینون گلوکوزید است که در مقادیر بالا در بسیاری از گیاهان از جمله تیره‌های Ericaceae, Rosaceae و... یافت می‌شود (۳). محتوای آربوتین در برگ برخی از گیاهان جنس Pyrus با تغییر کوچکی از زمان گل دادن تا زمان افتادن برگ‌ها ثابت است (۲). بهترین زمان برای دستیابی به مقادیر بیش‌تر آربوتین از برگ‌های برخی از گیاهان جنس Pyrus فصل بهار و از برگ‌های سبز و جوان می‌باشد. فرمول ساختار آن $C_{12}H_{16}O_7$ با وزن مولکولی ۲۷۲/۲۵ می‌باشد و در طول موج ۲۸۶ nm حداکثر جذب را در برابر اشعه فرابنفش دارا می‌باشد. آربوتین در گرما ناپایدار است و می‌تواند به شکل‌های مختلفی تجزیه شود (۴).



تصویر شماره ۱: ساختمان شیمیایی آربوتین

از آربوتین برای ضد عفونی کردن مجاری ادراری در عفونت‌های دستگاه ادراری و به عنوان پایدارکننده در فیلم‌های عکاسی استفاده می‌شود. نیز اثر آنتی اکسیدان و ضد آفتاب دارد و به عنوان عامل سفید کننده^۲ در فرمولاسیون اشکال دارویی موضعی محافظ در برابر

1. Arbutin
2. Whiting agent

به دستگاه تزریق گردید که منجر به بزرگ شدن پیک مربوط به آربوتین شد.

هـ) تعیین مقدار آربوتین گیاه به روش HPLC: نمونه های جداگانه از استاندارد آربوتین با غلظت های مشخص ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm (به همراه ۷/۵ میلی لیتر محلول هیدروکینون با غلظت نهایی ۱۵۰ ppm به عنوان استاندارد داخلی^۴ در هریک) در متانول تهیه شد و از هریک ۲۰ میکرولیتر (هر غلظت ۳ بار) به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس نمونه ای از عصاره (۰/۳ میلی لیتر عصاره به همراه ۷/۵ میلی لیتر محلول هیدروکینون با غلظت نهایی ۱۵۰ ppm، به عنوان استاندارد داخلی، با متانول HPLC grade به حجم ۲۵ میلی لیتر رسید.) به میزان ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. نتایج حاصل از سطوح زیر منحنی نمونه های استاندارد، رسم شد و با نتایج نمونه های عصاره، مقایسه شد. سپس مقدار آربوتین در گیاه تعیین شد^(۶).

و) تعیین مقدار آربوتین گیاه به روش اسپکتروفتومتری: ۰/۴ گرم پودر برگ گیاه تلکا با اندازه ذره ای حدود ۰/۲۵ میلی متر به همراه ۵۰ میلی لیتر آب مقطر دریک بشر ۲۵۰ میلی لیتری به مدت ۳۰ دقیقه بر روی بن ماری جوشان، حرارت داده شد. پس از سرد شدن دریک بالون ژوژه با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۵ میلی لیتر از این محلول به داخل قیف دکانتور ریخته شده، به ترتیب ۴۵ میلی لیتر آب مقطر، ۱ میلی لیتر محلول ۴-آمینو آنتی پیرین ۲ درصد، ۰/۵ میلی لیتر محلول آمونیاک ۳/۵ درصد و ۱ میلی لیتر محلول پتاسیم هگزا سیانو فرات ۸ درصد به دکانتور افزوده شد و پس از هربار افزودن محتویات، دکانتور تکان داده شده، مخلوط شد. در محلول حاصل، پس از ۵ دقیقه، واکنش امرسون^۵ صورت گرفت و کمپلکس قرمز مشاهده شد.

C₁₈، ساین ستون: ۲۵ سانتی متر، طول موج فرابنفش به کار رفته: ۲۸۶ nm، روش کار: ایزوکراتیک، (flow rate: 1 ml/min) (۶).

ب) تهیه گیاه و تایید علمی: در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۱ برگ های درخت تلکا از ارتفاعات ۱۲۰۰ متری جنگل های نکا در استان مازندران جمع آوری شد و نام علمی آن مورد تایید قرار گرفت و هرباریوم آن در واحد فارماکونوزی دانشکده داروسازی ساری تهیه شد.

ج) روش تهیه عصاره: ۱۰ گرم پودر برگ درخت تلکا با اندازه ذره ای حدود ۰/۲۵ میلی متر با حلال متانول خالص به مدت ۴ ساعت سوکسله شد و عصاره حاصل توسط دستگاه Rotary evaporator تغلیظ گردید.

د) روش شناسایی: شناسایی توسط HPLC^۱ و TLC^۲ صورت گرفت. در روش TLC، ۱ گرم عصاره در ۱ میلی لیتر متانول حل شده و ۲۵ میکرولیتر آن روی صفحه TLC کاشته شد. در کنار این لکه، لکه ای از نمونه استاندارد آربوتین (۰/۱ گرم آربوتین در ۱ میلی لیتر متانول حل شده) به میزان ۲۵ میکرولیتر کاشته شد و در مخزن اشباع حاوی فاز متحرک اتیل استات، متانول و آب (۱۰۰: ۱۳/۵: ۱۰) قرار داده شد. در زیر اشعه فرابنفش دو لکه مشاهده شد. با اسپری کردن معرف برلین بلو (پتاسیم هگزا سیانو فرات ۳ و کلرید آهن ۳) دو لکه آبی مشاهده شد^(۷).

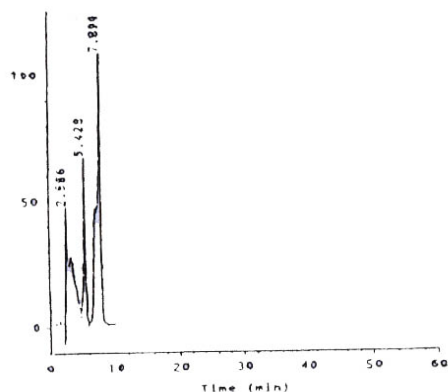
در روش HPLC، زمان بازداری آربوتین (RT^۳) در تزریق ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد آربوتین و سطح زیر منحنی آن تعیین شد. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول عصاره گیاه به دستگاه HPLC تزریق شد. جهت اطمینان، ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره حاوی استاندارد آربوتین (اضافه شده به صورت Additional standard)

4. Internal Standard
5. Emerson Reaction

1. High Performance liquid chromatography
2. Thin layer chromatography
3. Retention time

ترتیب مربوط به حلال، استاندارد آربوتین و هیدروکینون (استاندارد داخلی) هستند.

شرایط HPLC: نوع ستون: Eurospher 100- C₁₈، فاز متحرک: متانول، آب (۱۰: ۹۰)، اندازه ذره‌ای: ۵ میکرومتر، دتکتور: فرابنفش، طول موج به کار رفته: ۲۸۶ nm، سائز ستون: ۲۵ سانتی متری، روش کار: ایزوکراتیک سرعت جریان: ۱ ml/min، $A.U.F.S = 0.2$ در نمودار شماره ۱ و ۳ دستگاه مورد استفاده Knauer است، اما در نمودار شماره ۲ دستگاه مورد استفاده Shimadzu با سرعت جریان ۰/۵ ml/min است.



نمودار شماره ۱: پیک مربوط به محلول استاندارد آربوتین با غلظت ۵۰۰ ppm (به همراه استاندارد داخلی)

(ج) در جدول شماره ۱ نتایج HPLC مربوط به میانگین سه آزمایش انجام شده برای هریک از نمونه‌های استاندارد آربوتین (با استاندارد داخلی)، عصاره گیاه (با استاندارد داخلی) و نیز در نمودار شماره ۴ منحنی استاندارد آربوتین (با استاندارد داخلی) آورده شده است.

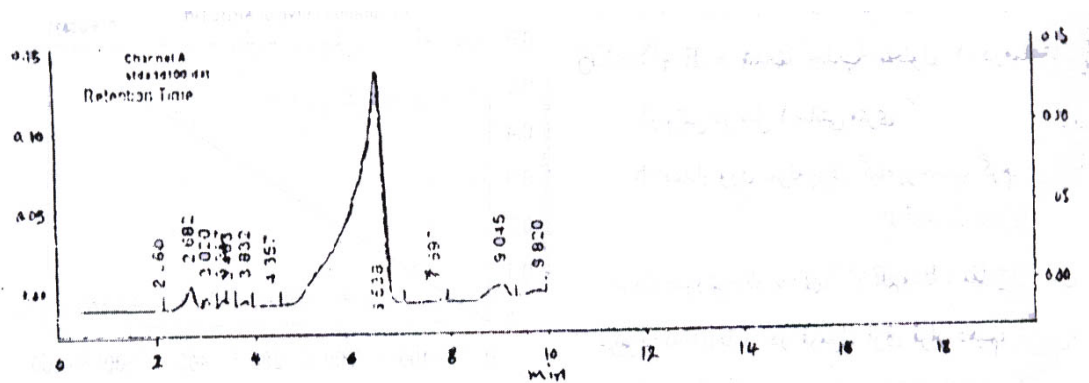
سپس محلول با ۲۵ میلی لیتر کلروفرم مخلوط شده، حاصل کلروفرمی از یک صافی عبور داده شد و این

عمل با باقی محلول و کلروفرم، ۳ بار تکرار شد و به محلول کلروفرمی در یک بالون ژوژه اضافه گردید و با کلروفرم به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. بعد در طول موج ۴۵۵ nm ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با آب مقطر، کالیبره شد و بعد جذب محلول کلروفرمی پس از شست و شوی سل کوارتز با متانول و کلروفرم خوانده شد (۸).

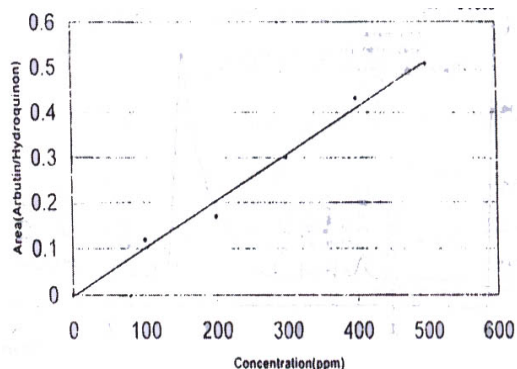
یافته ها

(الف) در زیر اشعه فرابنفش در روی صفحه TLC، لکه آربوتین استاندارد و لکه ای دیگر با همان R_f مشاهده شد که ناشی از آربوتین موجود در گیاه بود. (R_f نمونه گیاه ۰/۴ و مطابق با R_f استاندارد آربوتین بود.) با اسپری کردن معرف برلین بلو، دو لکه آبی با R_f یکسان (استاندارد آربوتین و آربوتین ردیابی شده در برگ گیاه) مشاهده شد.

(ب) در تصاویر شماره‌های ۴ و ۳ و ۲ نمونه هایی از پیک‌های مربوط به منحنی HPLC محلول‌های استاندارد آربوتین (به همراه استاندارد داخلی)، عصاره حاوی استاندارد آربوتین و عصاره گیاه (به همراه استاندارد داخلی) جهت شناسایی، مشاهده می‌شود. در تصویر شماره ۲ زمان بازداری‌های ۲/۵۸۶، ۵/۴۳۸ و ۷/۸۹۰ به



نمودار شماره ۲: پیک مربوط به محلول حاوی عصاره و استاندارد آربوتین ۱۰۰ ppm

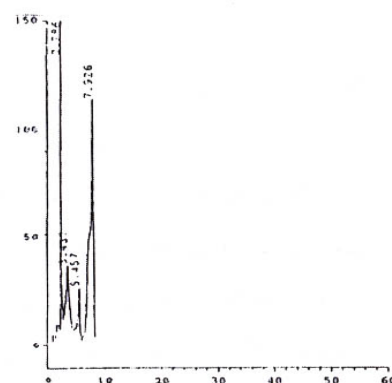


نمودار شماره ۴: منحنی استاندارد میانگین نمونه های استاندارد آربوتین (با استاندارد داخلی) در ۳ بار تزیق

د) مقدار آربوتین در عصاره گیاه: پیک عصاره رقیق شده، غلظتی معادل ۴۱۸/۴۴۷۷ ppm (۴۱۸/۴۴۷۷ میلی گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر) را نشان داد. بنابراین در ۲۵ میلی لیتر محلول آماده شده، معادل ۱۰/۴۶۱ میلی گرم خواهد بود.

از آنجایی که ۰/۳ میلی لیتر محلول عصاره با ۲۵ میلی لیتر، رقیق شده بود، حاوی ۱۰/۴۶۱ میلی گرم آربوتین بوده است. با توجه به این که از ۱۰ گرم برگ گیاه، ۲۰/۱ میلی لیتر عصاره به طریقه سوکسله تهیه شد و از ۰/۳ میلی لیتر آن جهت تهیه محلول تزریقی استفاده شد، مقدار آربوتین در ۲۰/۱ میلی لیتر برابر با ۷۰۰/۸۹۹۷ میلی گرم خواهد بود. بنابراین میزان آربوتین در گیاه ۷/۰۰۹ درصد ارزیابی شد.

ه) محاسبه مقدار آربوتین از روش اسپکتروفتومتری: با توجه به شدت جذب محلول ۱ درصد آربوتین در سل



نمودار شماره ۳: پیک مربوط به محلول عصاره گیاه (به همراه استاندارد داخلی)

جدول شماره ۱: نتایج آنالیز عصاره برگ تلکا و استانداردها به روش HPLC

نمونه ها	RT (min)	Area(mV*min)	% Area
میانگین استاندارد ۱			
آربوتین (۱۰۰ ppm)	۵/۵۰۶۰	۳/۸۶۸۷	۴/۹۸۱۵
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۸/۰۰۰۸	۳۲/۸۹۴۳	۵۵/۰۰۴۸
میانگین استاندارد ۲			
آربوتین (۲۰۰ ppm)	۵/۴۷۳۰	۵/۸۴۳۱	۷/۰۰۷۵
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۷/۹۴۳۰	۳۴/۶۶۰۶	۴۱/۶۰۶۴
میانگین استاندارد ۳			
آربوتین (۳۰۰ ppm)	۵/۴۴۰۰	۱۰/۷۱۰۹	۹/۵۳۲۱
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۷/۰۹۱۰	۳۵/۶۱۱۰	۳۱/۶۸۸۷
میانگین استاندارد ۴			
آربوتین (۴۰۰ ppm)	۵/۰۰۴۴	۱۴/۱۸۲۵	۱۱/۴۰۸۱
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۷/۹۲۶۰	۳۳/۰۰۱۴	۲۶/۸۸۱۶
میانگین استاندارد ۵			
آربوتین (۵۰۰ ppm)	۵/۰۴۳۸	۱۶/۵۹۷۳	۱۱/۱۸۶۹
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۷/۸۹۰۰	۳۲/۷۹۶۰	۲۲/۳۶۵۶
میانگین عصاره			
آربوتین	۵/۴۵۷۰	۱۵/۹۹۹۸	۱۳/۹۷۳۰
هیدروکینون (۱۵۰ ppm)	۷/۹۲۶۰	۳۸/۴۸۶۸	۳۳/۷۰۰۰

ضدتوموری و فعالیت ضد جهش ژنی در برابر باکتری سالمونلا تیفی موریوم نشان داده‌اند(۵).

Harborne (۱۹۹۸) برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی از روش‌های TLC, HPLC و GLC استفاده نموده است(۱۰). Lubsandorzhieva (۲۰۰۰) برای تعیین مقدار آربوتین، روش‌های یدومتري، فتوکالري متری، اسپکتروفتومتري و کروماتواسپکتروفتومتري را ذکر کرده است و خود از روش کروماتواسپکتروفتومتري استفاده نموده است(۳). Petricic (۱۹۸۱) برای تعیین مقدار آربوتین از روش اسپکتروفتومتري، و Sticher (۱۹۹۴)، Schieber (۲۰۰۱) و Sun (۱۹۹۷) از روش HPLC استفاده نموده‌اند(۱۲،۱۱،۶،۲).

در این ارزیابی به منظور شناسایی آربوتین در گیاه تلکا از روش‌های HPLC و TLC و برای تعیین مقدار آربوتین از روش HPLC و اسپکتروفتومتري استفاده شده است.

میزان آربوتین گزارش شده در برگ گیاه *Arctostaphylos uva-ursi* ۴ تا ۱۵ درصد، در برگ گیاه *Pyrus piraster* ۳/۳۸ درصد، در برگ گیاه *Pyrus amigdaliformis* ۴/۰۵ درصد، در برگ گیاه *Bergenia crossifolia* ۷/۵ درصد و در برگ گیاه *Vaccinium vitis* ۷ درصد می‌باشد(۷،۳،۲).

در این تحقیق، میزان آربوتین تعیین شده در برگ گیاه *Pyrus bioessieriana* ۷/۰۱٪ می‌باشد.

با توجه به خصوصیات ذکر شده، گیاه تلکا با ۷/۰۱ درصد آربوتین، نسبت به سایر گیاهان حاوی آربوتین که مقادیر کمتری از آن را دارا هستند، دارای ارزش و اهمیت ویژه ای است.

مقدار آربوتین در برگ گیاه تلکا در دو روش اسپکتروفتومتري و HPLC با هم مقایسه شد که مشابه هم بود. در روش HPLC مقدار آربوتین معادل ۷/۰۰۹ درصد و در روش اسپکتروفتومتري معادل ۷/۰۴۴۵ درصد

۱ سانتی‌متری ($E_1^{1\%} = 648$)، درصد کل ترکیبات هیدروکینونی بر اساس آربوتین مطابق فرمول زیر قابل محاسبه خواهد بود. این نکته را باید در نظر داشت که در این روش، غلظت تمام ترکیبات هیدروکینونی براساس آربوتین اندازه گیری می‌شود؛ اما در روش HPLC تنها میزان آربوتین، اندازه گیری می‌شود.

$$E_1^{1\%} = 500 \times E / b \times 100 = 100 \times E \times 250 / b \times 5 \times E_1^{1\%} = \text{درصد آربوتین}$$

E = مقدار جذب محلول نمونه مورد آزمایش

$E_1^{1\%}$ = شدت جذب محلول ۱ درصد

آربوتین در سل ۱ سانتی متری

b = مقدار وزن نمونه پودر گیاه بر حسب گرم.

در صورتی که بجای $E_1^{1\%}$ و b ، مقادیر عددی مربوط به آن‌ها را در فرمول فوق قرار دهیم، حاصل عبارت خواهد بود از (۸).

$$E = 19/3 \times \text{درصد آربوتین}$$

باتوجه به این که در گیاه تلکا $E = 0/365$ است، مقدار آربوتین حاصل از تلکا ۷/۰۴۴۵ درصد ارزیابی شد.

بحث

از آربوتین به منظور ضد عفونی کردن مجاری ادراری در عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده می‌شود. حداکثر اثرات ضد عفونی کنندگی آن ۴-۳ ساعت بعد از مصرف می‌باشد(۹). نیز آربوتین، اثر آنتی‌اکسیدان و ضد آفتاب دارد و با مهار سنتز ملانین، سبب سفید کردن پوست می‌شود. بنابراین به عنوان عامل سفید کننده در فرمولاسیون اشکال دارویی موضعی محافظ در برابر تابش‌های شدید اشعه فرابنفش به کار برده می‌شود. آربوتین برای چشم و پوست، حساسیت زانمی باشد(۴). آربوتین قاعده آور و دیورتیک است. میوه‌های تازه جنس *Pyrus* در انسان در مصرف خوراکی، فعالیت

تعیین مقدار می‌شوند، میزان ۷/۰۰۹ درصد آربوتین بیش‌تر مورد تایید می‌باشد.

تعیین شد. با توجه به دقت زیاد روش HPLC و این‌که در روش اسپکتروفتومتری، سایر فنل گلیکوزیدها نیز

فهرست منابع

۱. ثابتی حبیب الله. *جنگله‌ها، درختان و درختچه‌های ایران*. انتشارات دانشگاه یزد، ۱۳۷۳، صفحه ۵۶۱-۵۶۲.
2. Petricic J, Apostolski R, Srepol B. The leaf of the wild pear-tree as an arbutinic herb. *Farmaceutski Vestnik Ljubljana Journal*, 1981; 32(2): 107-110.
3. Lubsandorzhieva P.B, Zhigzhitov B.S, Dargaeva Zh.G, Nagaslaeva L.A. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2000; 34(5): pp 261-264.
4. Couteau C, Coifard L. Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Farmaco Journal*, 2000; 55(5): 410-413.
5. Bilia A.R, Rubio M, Alvarez M, Morelli I, Gonzalez M. New benzyl alcohol glycosides from *Pyrus bourgaeana*. *Planta Medica Journal*, 1994; 60(6): 569-571.
6. Sticher O, Soldati F, Lehmann D. HPLC separation and quantitative determination of arbutin, methyl arbutin, hydroquinone and hydroquinone monomethylether in *Arctostaphylos*, *Bergenia*, *Callena* and *Vaccinium* species. *Planta Medica Journal*, 1994; 60(6): 569-571.
7. Wagner H, Bladt S. Drugs containing arbutin, salicin and salicyl derivatives. In *Plant Drug Analysis*. 2th ed. Berlin: Springer. 1996: 247-253.
۸. قاسمی دهکردی نصرالله، طالب امیرمهدی. *استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص*، اصفهان : انتشارات چوگان با همکاری دانشگاه علوم پزشکی، ۱۳۸۰، صفحه ۸۸-۸۵.
9. Stambergova A, Supcikova M, Leifetova I. Evaluation of phenolic substances in *Arctostaphylos uva ursi*, determination of arbutin, methylarbutin and hydroquinone in the leaves by HPLC. *Ceska-a-slovenska-farmacie*, 1985; 34(5): 179-182.
10. Harborne J.B. Phenolic compounds. In *Phytochemical methods*, 3th ed, London: Chapman and Hall. 1998: 46-47.
11. Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phrnolic asids and flavonoids of apple and pear by HPLC. *Journal of Chromatography*, 2001; 910(2): 265-273.
12. Sun H, Wang X, Huang R, Yuan C. Determination of arbutin in the herbs of *Vaccinium vitis-idea* by HPLC. *Zhongguo-zhong-yao-za-zhi*, 1997; 22(9): 555.