

فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۰ شماره ۳، صفحه ۳۲۳-۳۳۱، (۱۳۸۳)

تعیین میزان ژوگلون در برگ و میوه سبز درخت گردو (*Juglans regia* L.) توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

کامکار جایمند^۱، پروین بقایی^۲، محمدباقر رضایی^۱، سیدابوالفضل سجادی پور^۳
و ملیحه نصرآبادی^۳

چکیده

ژوگلون ترکیبی نفتوکینونی است که در برگ و پوسته میوه درخت گردو *Juglans regia* L. وجود دارد، و برای سالیان زیادی به‌طور وسیع در طب سنتی بکار می‌رود. در این تحقیق، نمونه‌هایی از برگ و پوسته سبز میوه گردو در ماه‌های مختلف سال ۱۳۸۱ از درختی در منطقه کلاک کرج جمع‌آوری شد. ابتدا نمونه‌ها با حلال استون توسط دستگاه سوکسوله چربی‌زدایی شده و سپس با کلروفرم ماده مورد نظر استخراج و برای اندازه‌گیری ترکیب ژوگلون پس از انجام مراحل مختلف خالص‌سازی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC استفاده گردید.

میزان ترکیب ژوگلون در طی دوره رشد در برگ گیاه، از حداقل ۰/۰۲۱ تا ۰/۱۱۴ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود که در مردادماه بیشترین میزان و در پوسته سبز میوه درخت به میزان ۰/۰۳۵ الی ۰/۵۳۴ میلی‌گرم در لیتر بود که در شهریور ماه بیشترین میزان را دربرداشت. در این تحقیق از دو حلال پترولیوم اتر و کلروفرم جهت استخراج ترکیب ژوگلون استفاده کردیم و کلروفرم به‌عنوان حلال بهتر شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: گردو، ژوگلون، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

۱- اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶ - ۱۳۱۸۵.

E-mail: Jaimand@rifr-ac.ir

۲- عضو هیأت علمی دانشگاه صنعتی امیرکبیر.

۳- دانشجویان کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی امیرکبیر.

مقدمه

ژوگلون ترکیبی نفتوکینونی است که در برگ تازه و پوسته سبز میوه درخت گردو یافت می‌شود (Wichtl *et al*، ۱۹۹۴). پوسته سبز میوه گردو را که اپی کارپ می‌نامند که دارای ترکیبها و اثراتی مشابه با برگ است. پوسته سبز میوه گردو دارای درصد املاح مختلفی از جمله پتاسیم (۰/۹۵ درصد)، ازت (۰/۸۴ درصد)، فسفر (۰/۷۸ درصد)، کلسیم (۰/۴۹ درصد) و منیزیم (۰/۱۰ درصد) می‌باشد (طباطبایی و همکاران، ۱۳۷۷).

ژوگلون بارزترین ماده موجود در اندام‌های مختلف گیاه گردو است، این ماده که نقطه شروع ترکیب ۱۶ مرحله‌ای اکسی تترا سایکلین است، یک کینون (۵- هیدروکسی ۱،۴ - نفتوکینون) با فرمول $C_{10}H_5O_2(OH)$ و وزن ملکولی ۱۷۴/۱۶ می‌باشد که پیش ماده ترکیب آن ۱،۴و ۵- تری هیدروکسی نفتالین گلوکوزید است که به صورت پیوند شده در اندام‌های هوایی به‌ویژه برگها وجود داشته و در اثر آبشویی تحت عمل هیدرولیز و اکسیداسیون قرار گرفته و به ژوگلون تبدیل می‌شود (زرگری، ۱۳۶۹).

از برگ و پوست میوه درخت گردو در طب سنتی برای اثرات دارویی گوناگون و مفیدی که دارد استفاده می‌کنند مانند داروی قابض و تجزیه کننده بافت‌های شاخی (Beauquesne *et al*، ۱۹۹۰)، ضد اسهال و ضد کرم پهن و تصفیه کننده و مقوی (Wichtl، ۱۹۹۴)، ضد قارچ (Nahrstedt، ۱۹۸۱) و کاهش دهنده قند خون (Neef *et al*، ۱۹۹۵)، از این گیاه اثر ضد ویروس بر علیه ویروس التهاب کیسه مخاط دهان (vesicularis stomatitis) نیز گزارش کرده‌اند (Husson *et al*، ۱۹۸۶). همچنین (Girzu *et al*، ۱۹۹۸) در مورد تأثیر تسکین‌دهندگی ترکیب ژوگلون تحقیقاتی انجام داده‌اند.

هدف از این تحقیق بررسی میزان و اندازه‌گیری ترکیب ژوگلون در طی دوره رشد

گیاه می‌باشد.

روش برداشت نمونه برگ و پوسته میوه درخت گردو

نمونه‌های برگ و پوسته سبز میوه درخت گردو در ماه‌های خرداد، تیر، مرداد، شهریور، مهر و آبان سال ۱۳۸۱ در استان تهران - شهرستان کرج، منطقه کلاک برداشت شده است و نمونه‌ها به صورت تازه مورد استخراج قرار گرفتند.

بررسی اثر حلال در استخراج ژوگلون از نمونه برگ درخت گردو

در مرحله نخست آزمایش با بررسی منابع (Wicht et al., ۱۹۹۴ و Beauquense et al., ۱۹۹۰) از دو حلال مختلف پترولیوم اتروکلورفرم جهت استخراج استفاده شد. بنابراین، پس از چربی‌زدایی توسط استون با مقایسه دو روش استخراج ژوگلون با پترولیوم اتر و استخراج با کلروفرم، مشخص گردید که استخراج با حلال کلروفرم، دارای بازده بالاتری می‌باشد. از این رو، در مراحل بعدی استخراج‌ها با استفاده از حلال کلروفرم انجام پذیرفت (مقدار ژوگلون در نمونه برگ خرداد ماه توسط پترولیوم اتر = $0.0078 \times 30 = 0.23412$ mg/g و مقدار ژوگلون در نمونه برگ خرداد ماه توسط کلروفرم = $0.37111 \times 30 = 11.13$ mg/g).

روش استخراج ژوگلون از برگ و پوسته میوه درخت گردو

مقدار ۱۰ گرم نمونه تازه از برگ و پوسته سبز میوه گردو، با حلال استون توسط دستگاه سوکسوله چربی‌زدایی شده و بعد استخراج توسط حلال کلروفرم صورت گرفت، با حذف حلال در دستگاه تقطیر در خلاء و تهیه ماده جامد به آن آب مقطر اضافه شد و سپس با اضافه کردن اتیل استات محلول به قیف جداکننده انتقال داده شد، مواد زائد وارد فاز آبی شد. آنگاه فاز اتیل استات را جدا کرده و بعد ماده بدست آمده با متانول به حجم رسانده شد. از محلول بدست آمده جهت اندازه‌گیری ترکیب ژوگلون

توسط دستگاه HPLC استفاده شد. بنابراین، از این روش برای تمام نمونه‌ها استفاده شده است.

شرایط دستگاهی HPLC

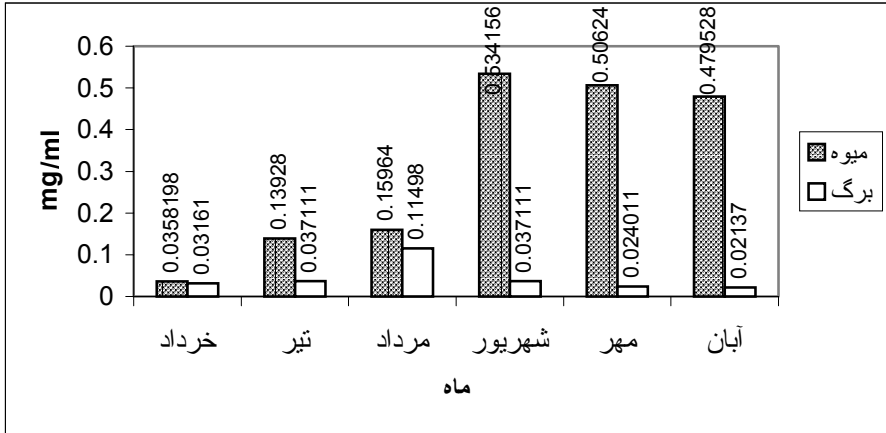
HPLC یا کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی تکنیک مناسبی برای جداسازی و اندازه‌گیری محصولات طبیعی، مواد دارویی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از روشهای دقیق جهت اندازه‌گیری ترکیب ژوگلون استفاده از HPLC می‌باشد. دستگاه مورد استفاده از شرکت Knuer مدل Well Chrom 2000 با پمپ مدل Maxi-star K-1000 و دتکتور مدل spectrophotometer K-2500، که در ۲۵۴ نانومتر تنظیم گردیده و ستون مورد استفاده Erospher 100 C₁₈ به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۴ میلیمتر و فاز متحرک متانول، آب و اسید استیک (۳۰ : ۶۵ : ۵)، با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه، و مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ μl میکرومیلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید.

رسم منحنی کالیبراسیون برای نمونه استاندارد

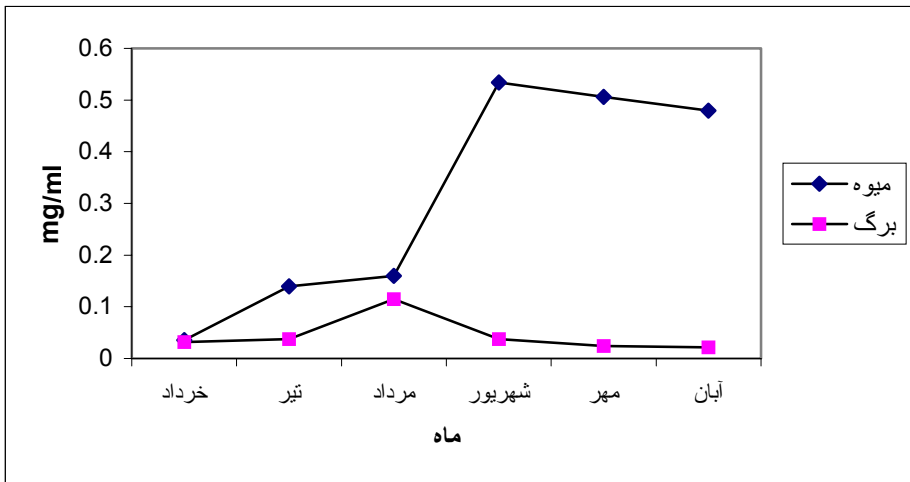
برای بررسی میزان ژوگلون با تهیه منحنی استاندارد به صورت زیر انجام شد. غلظتهای متفاوتی از نمونه استاندارد تهیه کرده (سه نمونه با غلظتهای ۰/۰۶۴ و ۰/۰۳۲ و ۰/۰۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) آنها را به دستگاه تزریق کرده بعد با داشتن سطح زیر طیف ماده مجهول و انطباق آن با منحنی کالیبراسیون، غلظت ماده مجهول را بدست می‌آوریم.

شکل شماره ۱- منحنی کالیبراسیون

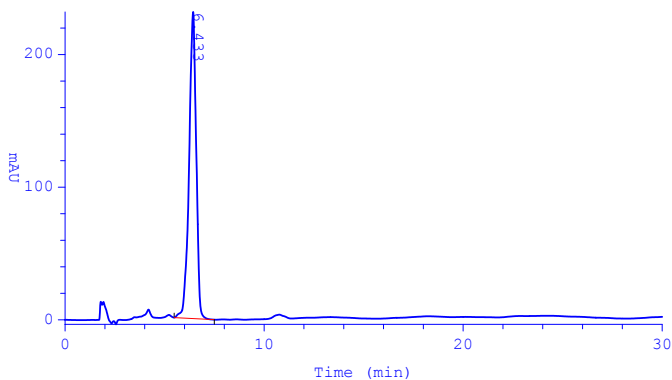
میزان ترکیب ژوگلون در طی دوره رشد در برگ در ماههای خرداد ۰/۰۳۱ میلی گرم در میلی لیتر، در تیر ۰/۰۳۷ میلی گرم در میلی لیتر، در مرداد ۰/۱۱۴ میلی گرم در میلی لیتر، در شهریور ۰/۰۳۷ میلی گرم در میلی لیتر، در مهر ۰/۰۲۴ میلی گرم در میلی لیتر و در آبان ۰/۰۲۱ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد و میزان این ترکیب در پوسته سبز میوه گردو در ماههای خرداد ۰/۰۳۵ میلی گرم در میلی لیتر، در تیر ۰/۱۳۹ میلی گرم در میلی لیتر، در مرداد ۰/۱۵۹ میلی گرم در میلی لیتر در شهریور ۰/۵۳۴ میلی گرم در میلی لیتر، در مهر ۰/۵۰۶ میلی گرم در میلی لیتر و در آبان ۰/۴۷۹ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. میزان این ترکیب در طی دوره رشد در برگ در مرداد ماه بیشترین و در پوسته سبز میوه درخت گردو بیشترین میزان در شهریور ماه می باشد. در مراحل اولیه آزمایش از حلالهای مختلف جهت تعیین بهترین حلال برای بیشترین میزان استخراج و ساده بودن روش استفاده شده است. بنابراین، از بین دو حلال پترولیوم اتر و کلروفرم حلال دوم مناسبتر تشخیص داده شده است که در مراحل بعدی آزمایش لحاظ گردید.



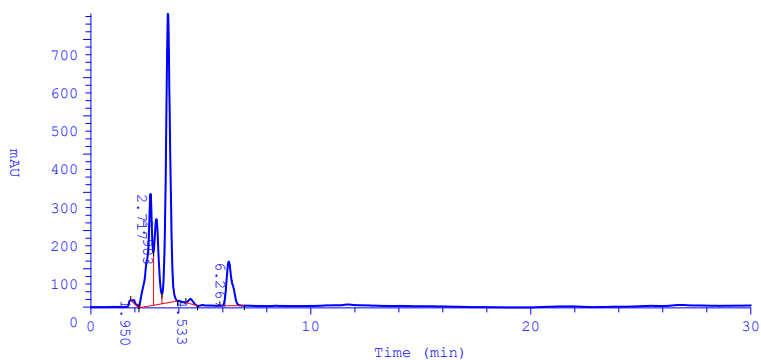
شکل شماره ۲- نمودار میزان ترکیب ژوگلون در ماههای مختلف



شکل شماره ۳- منحنی میزان ترکیب ژوگلون در ماههای مختلف



شکل شماره ۴- کروماتوگرام طیف استاندارد ترکیب ژوگلون با غلظت ۰/۰۶۴ mg/ml



شکل شماره ۵- کروماتوگرام طیف نمونه میوه گردو

Girzu, et al., ۱۹۹۸، میزان ترکیب ژوگلون را در برگ گیاه گردو توسط دستگاه HPLC تعیین کرده‌اند. برگ درخت در اردیبهشت ۱۹۹۶ جمع‌آوری و مقدار ۱/۲ گرم برگ را در ۱۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم به مدت یک ساعت خیسانده و بعد حلال کلروفرم توسط روش تقطیر در خلاء جدا گردید، باقی مانده را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل کرده و میزان ترکیب با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شده است. فاز متحرک در این تحقیق آب - فسفوریک اسید - استونتریل انتخاب و ترکیب ژوگلون در زمان بازداری ۹/۱ دقیقه شناسایی شده است. مقدار ژوگلون در ۵ نمونه بین ۰/۷۴۲۸ و ۱/۷۴۸۲ گرم در ۱۰۰ گرم بدست آمد.

Girzu, et al., ۱۹۹۸ در طی مراحل کار متوجه شدند که نگهداری ترکیب ژوگلون در محلول متانول قابل دوام نیست. اما برگ خشک را می‌توان در ۴ درجه سانتیگراد در محل خنک و تاریک نگهداری کرد.

در تحقیق حاضر جهت استخراج ژوگلون از حلال کلروفرم استفاده شد. ولی حلالهای فاز متحرک دستگاه HPLC متانول - آب و اسید استیک (۲۰ : ۶۵ : ۵) انتخاب گردید. ترکیب ژوگلون در این روش در زمان بازداری ۶ دقیقه شناسایی گردید. جهت میزان ژوگلون از برگ و پوسته سبز میوه نیز استفاده شده است، نتایج این بررسی را در شکل شماره ۲ و ۳ نمودار و میزان ترکیب ژوگلون را در ماههای مختلف سال در برگ و پوسته میوه گردو مشاهده کنید. میزان این ترکیب در طی دوره رشد گیاه در برگ در مرداد ماه (۰/۱۱۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشترین و در پوسته سبز میوه در شهریور ماه (۰/۵۳۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشترین میزان را دارا می‌باشد.

- طباطبایی، م. دهلوی، ا. و احمدی، ع. ۱۳۷۷. گردو، هیپوکوری و پکان. تألیف چاپ دوم. مؤسسه انتشارات جهاد دانشگاهی (ماجد).
- زرگری، ع. ۱۳۶۹. گیاهان دارویی. جلد چهارم. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه تهران.
- Wichtl, M. and Bisset, N.G. 1994, (Editor. Herbal Drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm. Stuttgart, pp. 281-282.
 - Beauquesne, B.L. Pinkas, M. Torck, M. and trotin, F. 1990, Plantes Medicinales des Regions Temerees, 2nd ed. Paris, Maloine, p.58.
 - Nahrstedt, A. Vetter, U. Hammerschmidt, F.J. 1981, Composition of the steam distillation product from leaves of *Juglons rigia*. *Planta Med.* 42: 313-332.
 - Neef, H. Declercq, P. Laekeman, G. 1995, Hypoglycaemic activity of selected European plants. *Phytother Res.*, 9: 45 – 48.
 - Husson, G.P. Vilagines, R. Delaveau, P. 1986, Recherch des proprietes antivirals de quelques extraits d, origine naturelle. *Ann. Pharm. Fr.* 44: 41-48.
 - Girzu, M. Carnat, A. Privat, A.M. Fialip, J. Carnat, A.P. and Lamaison, J.L. 1998, Sedative effect of Walnut leaf extract and Juglone, An isolated constituent, *Pharmaceutical biology*, vol. 36, No. 4, pp. 281-286.

Vol. 20 No. (3), 323-331 (2004)

Determination of Juglone from Leaves and fresh peels of *juglans regia* L. by High Performance Liquid Chromatography

K. Jaimand¹, P. Baghai², M. B. Rezaee¹, S. A.Sajadipoor³
and M. Nasrabadi³

Abstract

Juglone is a naphthoquinone compound present in walnut (*Juglans regia* L.; Juglandaceae) leaves and peels. that have been broadly used in traditional medicine for many years. In this research, samples were collected during June to November 2001 and (10 g) extracted with a Soxhlet apparatus for 2 hours. The concentrate of the acetone extract of the samples was defatted and then extracted with chloroform. The chloroform solution was evaporated under reduced pressure to give a dry residue recovered by methanol. The extract was analyzed by HPLC. Juglone content in leaves was from 0.021 mg/ml to 0.114 mg/ml and in peels were 0.035 mg/ml to 0.534 mg/ml, respectively.

Key words: *juglans regia* L., juglone, HPLC

1- Academic member of Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box: 13185-116, Tehran- Iran. E-mail; Jaimand@rifr-ac.ir.

2- Academic member of Amir Kabir University.

3- Ms.c students in Chemistry of Amir Kabir University.