مطالعه محتوای ساپونین در بخش‌های هوایی و ریشه سه گونه از جنس *Verbascum* L.

رویا کرمیان* و فاطمه قاسملو

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۸

چکیده

ساپونین‌ها، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در بسیاری از گیاهان و برخی از جانوران یافت می‌شوند. آنها گلیکوزیدهایی با وزن مولکولی بالا هستند که دارای گروه قندی متصل به یک آگلیکون تری‌ترپنوئیدی یا استروئیدی می‌باشند. بسیاری از ساپونین‌ها خاصیت پاک‌کنندگی دارند و در آب کف پایدار ایجاد می‌کنند. جنس گل ماهور (*Verbascum* L.) حاوی ترکیبات و اجزاء فعالی است که فعالیت سیکلواکسیژنازی را کاهش می‌دهد. در این بررسی، محتوای ساپونین کل در ریشه و بخش‌های هوایی ۳ گونه از جنس *Verbascum* شامل *V. nudicaule*، *V. sinuatum* و *V. speciosum* به صورت کمی و کیفی به روش‌های طیف‌سنجی نوری و کروماتوگرافی لایه نازک مطالعه شد. در این بررسی، ۵ فرکشن مختلف از هر اندام گیاه بدست آمد که مقدار ساپونین استخراج شده از ریشه بیشتر از بخش‌های هوایی بود. در میان این سه گونه، *V. speciosum* بیشترین مقدار ساپونین را هم در ریشه و هم در بخش‌های هوایی نشان داد. همچنین کروماتوگرافی لایه نازک عصاره سه گونه *Verbascum* بر روی صفحات TLC، لکه‌های ساپونینی را با R_fهای مختلف در محدوده ۰/۷۳-۰/۱۳ آشکار نمود.

واژه‌های کلیدی: طیف‌سنجی نوری، ساپونین، کروماتوگرافی لایه نازک، *Verbascum* L.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۱۳۴۱۶۱، پست الکترونیکی: R_karamian@basu.ac.ir

مقدمه

مواد مؤثره گیاهان همواره به عنوان موادی غیر قابل جایگزین مورد استفاده بوده و خواهند بود. با گذشت زمان تعداد گیاهان دارویی شناخته شده افزوده شده و زمینه‌های کاربرد آنها نیز گسترده‌تر شده‌است. به طور کلی ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان، شامل مجموعه متنوعی از ترکیبات مانند ساپونین‌ها، فنل‌ها، هیدروکسامیک اسیدهای حلقوی، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ایزوفلاونوئیدها، سزکوئی-ترپنوئیدها، مشتقات اندولی حاوی سولفور و برخی ترکیبات دیگر هستند (۱۱، ۱۶، ۲۲، ۱۹). ساپونین‌ها گلیکوزیدهایی با وزن مولکولی بالا هستند که از یک بخش قندی متصل به آگلیکون تری‌ترپنوئیدی یا استروئیدی تشکیل می‌شوند. آگلیکون یا بخش غیرقندی مولکول ساپونین‌ها، ژنین یا ساپوژنین نامیده می‌شود که با پیوند گلیکوزیدی به بخش قندی متصل می‌شود. با توجه به نوع ژنین، ساپوژنین‌ها را می‌توان به سه گروه ۱) گلیکوزیدهای تری‌ترپنوئیدی، ۲) گلیکوزیدهای استروئیدی و ۳) گلیکوزیدهای آلکالوئیدی- استروئیدی تقسیم نمود. یک یا بیش از یکی از این سه ساختار، در برخی گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. اهمیت این ترکیبات به دلیل فعالیت ضدمیکروبی مؤثر آنهاست که اغلب در مقادیر فراوان در گیاهان سالم یافت می‌شوند. این مولکول‌ها به عنوان حفاظت‌کننده‌های گیاهی ضدمیکروبی نیز شناخته شده‌اند (۱۱، ۱۶، ۱۷، ۲۲، ۱۹). قندهایی که به طور معمول در ساختار ساپونین‌ها وجود دارند، آرابینوز، گالاکتوز، گلوکز، رامنوز، گزیلوز، گالاکتورونیک اسید و گلوکورونیک اسید هستند (۵، ۶).

اعضای جنس گل ماهور (*Verbascum* L.) متعلق به تبار Verbaceae از تیره Scrophulariaceae (۲۱) با ۴۲ گونه در ایران هستند که ۱۴ گونه از آنها انحصاری است (۹). گل ماهورها (*Verbascum* L.) با گل‌های زرد رنگ و برگ‌های اغلب کرک‌آلود و ضخیم خود مشخص می‌شوند (۴). از روزگاران کهن از این گیاهان برای درمان سرفه و مشکلات تنفسی استفاده می‌شده‌است. مهاجران اروپایی این گیاه را با خود به آمریکا برده و از این گیاه برای درمان سرفه، سرماخوردگی، التهاب حلق و گلو، ورم لوزه‌ها، اسهال و بواسیر و عفونت‌های مجاری ادراری استفاده می‌کرده‌اند (۱۴). گونه‌های گل ماهور حاوی ترکیبات و اجزاء فعالی هستند که می‌توانند فعالیت سیکلواکسیژنازی را کاهش دهند. در عصاره این گیاهان مواد واجد فعالیت پاد-عفونی‌کنندگی و پادالتهابی مانند ساپونین گلیکوزید، گلیکوزید فنیل اتانوئید و ورباسکوزید وجود دارند که مورد اخیر دارای قدرت ترمیم‌کننده زخم نیز می‌باشد (۱۳).

آزمایش‌های انجام شده بر روی گل ماهور مشخص نموده-است که این گیاه دارای ترکیبات متعددی ازجمله هشت گروه عمده ساپونین‌ها، ایریدوئید گلیکوزیدها، فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها مانند ورباسکوزید، مونوترپن گلیکوزیدها، نئولیگنان‌ها مانند نئولیگنان، فلاونوئیدها مانند آپی‌ژنین، استروئیدها و اسپرمین آلکالوئیدها می‌باشد (۲۷).

مطالعه محتوای میزان فنل و فلاونوئید کل در سه گونه *Verbascum* شامل *V. nudicaule*، *V. sinuatum* و *V. speciosum* نشان داده‌است که گونه *V. sinuatum* با محتوای فنل و فلاوونوئید کل ۱۱۸/۲ و ۵/۷۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک، بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید کل را در بین سه گونه داراست. همچنین بررسی فعالیت آنتی-اکسیدانی این سه گونه نشان داد که عصاره متانولی بخش-های هوایی این گونه‌ها توانایی قابل ملاحظه‌ای در مهار رادیکال آزاد 2, 2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) و کلات‌کنندگی آهن دارند (۱۲). ایریدوئید گلیکوزیدها بطور گسترده در جنس *Verbascum* یافت می‌شوند، بویژه catalpol، aucubin و مشتقات آسیلی آنها که در گونه‌های مختلف این جنس گزارش شده‌است (۲۳، ۲۴).

Amirnia و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود بر روی خواص ضدباکتریایی گونه *V. speciosum* علیه سه گونه باکتری (*Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Escherichia coli*) نشان دادند که عصاره آبی و اتانولی گونه *V. speciosum* در تمام غلظت‌های اعمال شده، خاصیت ضدباکتریایی نشان می‌دهند و با افزایش غلظت این خاصیت نیز افزایش می‌یابد. Senator و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گونه *V. sinuatum* بیشترین بازدارندگی را در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان می‌دهد، اما در برابر باکتری‌های گرم منفی پتانسیل بازدارندگی کمتری دارد.

با توجه به خواص دارویی، آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی جنس *Verbascum* و فقدان گزارش‌های کافی در مورد این گیاه، انجام هر گونه مطالعه در زمینه استخراج و شناسایی ترکیبات مؤثره این گیاه حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر، محتوای ساپونین در بخش‌های هوایی و ریشه سه گونه از جنس *Verbascum* شامل *Verbascum nudicaule*، *Verbascum sinuatum* و *Verbascum speciosum* با استفاده از حلال‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به نتایج بدست آمده، بهترین حلال و مناسبترین اندام برای استخراج ساپونین در این گونه‌ها معرفی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: سه گونه گیاهی از جنس *Verbascum* L. از ارتفاعات الوند همدان از ارتفاع ۲۱۰۰ متری جمع‌آوری شدند. بخش‌های هوایی و ریشه آنها پس از جمع‌آوری، در دمای اتاق و سایه خشک شدند و برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. محل جمع آوری، ارتفاع محل،

زمان جمع‌آوری و شماره هرباریومی گونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده‌است.

جدول ۱- مشخصات گونه‌های مورد مطالعه از جنس *Verbascum*.

شماره هرباریومی	تاریخ	ارتفاع (متر)	جمع‌آوری‌کننده	محل جمع‌آوری	گونه
BASU 28813	۱۳۹۰/۰۲/۰۳	۲۱۰۰	کرمیان و قاسملو	همدان: ارتفاعات الوند	*V. sinuatum*
BASU 28814	۱۳۹۰/۰۲/۰۵	۲۱۰۰	کرمیان و قاسملو	همدان: ارتفاعات الوند	*V. speciosum*
BASU 28815	۱۳۹۰/۰۲/۰۵	۲۱۰۰	کرمیان و قاسملو	همدان: ارتفاعات الوند	*V. nudicaule*

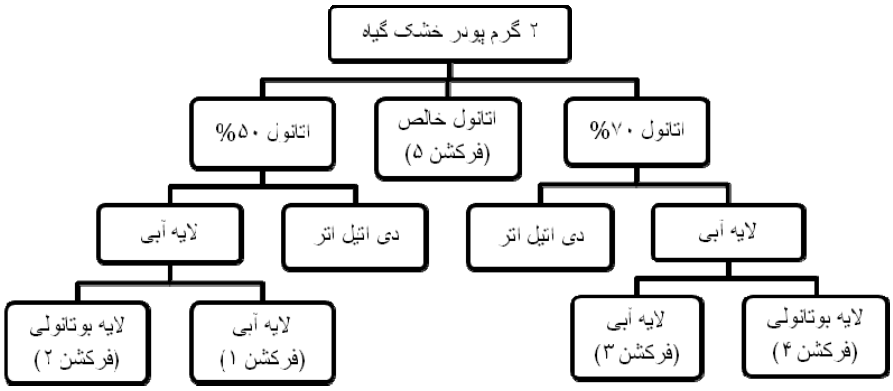
تعیین اندیس کف‌کنندگی ساپونین‌ها: ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر آب جوش حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از سرد شدن، مخلوط حاصل صاف شد و از آن محلول‌هایی با غلظت ۱۰-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در سه تکرار تهیه شد. سپس محتوای لوله‌ها به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از ورتکس در جهت طولی بشدت مخلوط شدند و در نهایت، ارتفاع کف حاصل در آنها اندازه‌گیری گردید (۲۶).

استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی: در این روش ۲ گرم پودر خشک در دستگاه سوکسله با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪، ۷۰٪، ۱۰۰٪ هر یک به مدت ۲ ساعت عصاره-گیری شد. ابتدا با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ عصاره‌گیری شروع و پس از زمان ۲ ساعت عصاره حاصل جدا شد. سپس عصاره‌گیری با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ ساعت ادامه یافت. عصاره حاصل جداسازی و در نهایت عصاره‌گیری با اتانول خالص به پایان رسید. عصاره‌های حاصل تحت خلأ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. سپس مواد ساپونینی و غیرساپونینی عصاره‌های اتانولی ۵۰٪ و ۷۰٪ در یک قیف جداکننده توسط ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر جداسازی و دو فاز آبی و فاز دی‌اتیل اتری (که حذف شدند) حاصل شد، سپس لایه آبی در یک قیف جداکننده با ۱۰ میلی‌لیتر *n*- بوتانول، به دو لایه آبی و بوتانولی تفکیک شد (شکل ۱). در نهایت بخش‌های آبی و بوتانولی عصاره‌های اتانولی ۵۰٪ و ۷۰٪ و عصاره حاصل از اتانول ۱۰۰٪ تحت خلأ توسط دستگاه روتاری Lab Tech مدل Ev 311 تغلیظ شدند و مورد سنجش قرار گرفتند (۲۲).

مطالعه کمی ساپونین‌ها به روش طیف‌سنجی نوری: در هر مرحله عصاره‌گیری ۰/۰۱ میلی‌لیتر از فرکشن‌های مختلف در لوله آزمایش ریخته شد و تا تبخیر کامل حلال درون آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، به هر یک از لوله‌ها ۵ میلی‌لیتر معرف وانیلین ۰/۷٪ در اسید سولفوریک ۶۵٪ اضافه شد. این معرف ناپایدار است و باید تازه تهیه شود. مخلوط موجود در لوله‌ها با استفاده از ورتکس بشدت هم زده شد و به مدت یک ساعت، در حمام آب گرم با دمای (۱ ± ۶۰ سانتی-گراد) قرار گرفت. سپس واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب یخ متوقف و در نهایت جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۷۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (۸). برای رسم منحنی استاندارد از ساپونین استاندارد (Merck) استفاده شد. منحنی استاندارد در محدوده صفر تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رسم شد. محتوای ساپونین موجود در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد (شکل ۲) برآورد شد و بر حسب درصد وزن خشک محاسبه گردید.

مطالعه کیفی ساپونین‌ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): ۶۰ میکرولیتر (سه بار و هر بار ۲۰ میکرولیتر پس از خشک شدن لکه قبلی) از فرکشن‌های

مختلف استخراج شده بر روی صفحات آلومینیومی (۲۰ × ۲۰) پوشیده شده از یک لایه سیلیکاژل $60F_{254}$ (Merck) (به عنوان فاز ثابت) قرار داده شد. سپس صفحات درون تانک کروماتوگرافی که قبلاً با مخلوط آمونیاک، اتانول و *n*- بوتانول (۷/۵: ۲/۵: ۱۰/۵) (به عنوان فاز متحرک) اشباع شده‌بود، قرار داده شدند (۲۵).



شکل ۱- روش استخراج ساپونین در سه گونه *Verbascum*.

برای ظهور لکه‌های ساپونین، صفحات TLC پس از خشک شدن با محلول اسید سولفوریک ۱۵٪ افشانه شدند. در نهایت صفحات به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در آون ۱۱۰ سانتی-گراد قرار گرفتند، تا رنگ آنها در نور مرئی آشکار گردد (۲۵). پس از ظهور لکه‌ها R_f هر یک از آنها از رابطه زیر محاسبه شد:

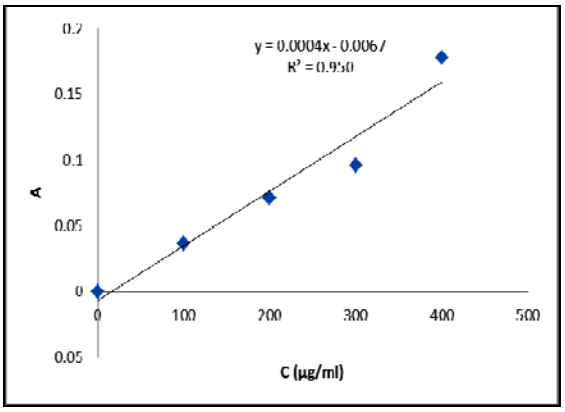
R_f = فاصله طی شده حلال از مبدأ / فاصله طی شده لکه از مبدأ

مطالعات آماری: سنجش مقدار کمی ساپونین با سه تکرار انجام شد. پس از اثبات وجود اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One-way)، گروه‌بندی آنها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq 0.05$ انجام شد.

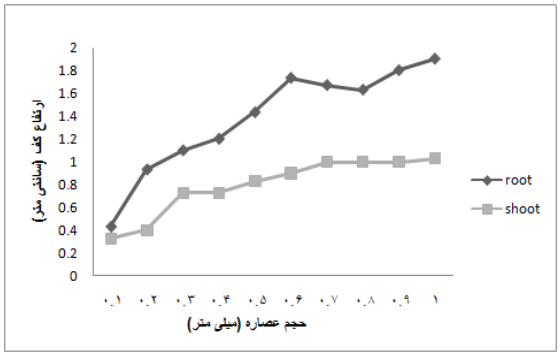
نتایج

تعیین اندیس کف‌کنندگی ساپونین‌ها: با مشاهده کف پایدار در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی (۲۶) وجود ساپونین در ریشه و بخش‌های هوایی گونه‌های مختلف *Verbascum* ثابت شد. ارتفاع کف در لوله‌ها کمتر از یک، مساوی و یا بیشتر از یک سانتی‌متر بود. با افزایش حجم عصاره (غلظت عصاره)، ارتفاع کف پایدار ایجاد شده در لوله‌ها نیز افزایش یافت.

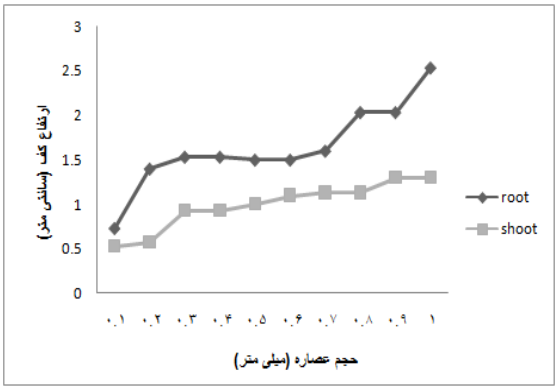
ارتفاع کف ایجاد شده در ریشه گونه‌های *V. sinuatum* و *V. speciosum* معادل ۲/۰۳ سانتی‌متر و در بخش‌های هوایی به ترتیب معادل ۱/۰۳ و **۱/۳** سانتی‌متر بود، که نشان دهنده شاخص کف‌کنندگی بسیار زیاد ریشه و بخش‌های هوایی این دو گونه است (اشکال ۳، ۴).



شکل ۲- منحنی استاندارد ساپونین



شکل ۳- مقدار کف ایجاد شده بر اساس غلظت عصاره در گونه *Verbascum sinuatum*.

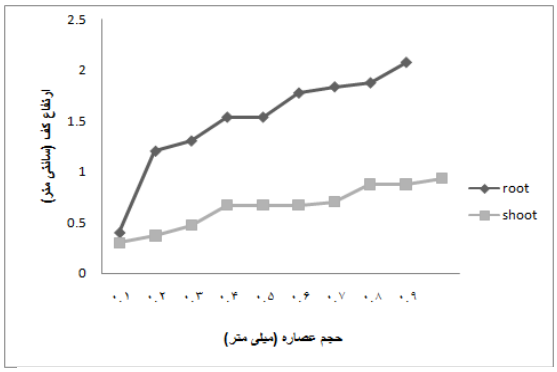


شکل ۴- مقدار کف ایجاد شده بر اساس غلظت عصاره در گونه *Verbascum speciosum*.

ارتفاع کف ایجاد شده در ریشه گونه *V. nudicaule* معادل ۲ سانتی‌متر بود که نشان داد شاخص کف‌کنندگی آن بیشتر از یک (۱۰۰٪) است. اما ارتفاع کف ایجاد شده در بخش-های هوایی کمتر از یک (۰/۹۳) است، که نشان دهنده شاخص کف‌کنندگی کمتر آن بود (شکل ۵).

استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی: در این مطالعه ۵ فرکشن مختلف از هر اندام بدست آمد. فرکشن‌های حاصل از ریشه در هر سه گونه *Verbascum*، حاوی بیشترین مقدار ساپونین (درصد وزن خشک) در مقایسه با بخش-های هوایی بودند.

شکل ۵- مقدار کف ایجاد شده بر اساس غلظت عصاره در گونه *Verbascum nudicaule*.



در گونه *V. sinuatum*، بیشترین مقدار ساپونین استخراج شده مربوط به فرکشن ۱ ریشه و کمترین مقدار مربوط به فرکشن ۵ ریشه بود. در گونه *V. speciosum*، بیشترین مقدار ساپونین استخراج شده مربوط به ریشه (فرکشن‌های ۱ و ۲) و کمترین مقدار مربوط به اتانول خالص از بخش-های هوایی بود. در گونه *V. nudicaule* بیشترین مقدار ساپونین استخراج شده در ریشه و بخش‌های هوایی مربوط به فرکشن ۱ بود، که ساپونین حاصل از ریشه دو برابر بخش‌های هوایی بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه محتوای ساپونین در ریشه و بخش‌های هوایی سه گونه *Verbascum*.

	شماره فرکشن	نوع فرکشن	ساپونین ریشه (٪) *V. sinuatum*	ساپونین بخش‌های هوایی (٪) *V. sinuatum*	ساپونین ریشه (٪) *V. speciosum*	ساپونین بخش‌های هوایی (٪) *V. speciosum*	ساپونین ریشه (٪) *V. nudicaule*	ساپونین بخش‌های هوایی (٪) *V. nudicaule*
اتانول ۵۰٪	۱	اتانول ۵۰٪	۶/۹۹±۰/۰۷	۲/۲۸ ±۰/۰۵	۸/۶۶±۰/۳۷	۴/۶۹±۰/۰۶	۶/۷۷±۰/۱۲	۳/۰۵±۰/۰۴
	۲	اتانول ۵۰٪- بوتانول	۴/۸۶±۰/۲۷	۰/۸۶ ± ۰/۱۲	۹/۳±۰/۵	۱/۸۹±۰/۱	۳/۹۱±۰/۱۷	۱/۷۴±۰/۱۶
اتانول ۷۰٪	۳	اتانول ۷۰٪	۲/۴۱±۰/۰۲	۲/۰۵ ± ۰/۰۳	۴/۶۶±۰/۰۷	۲/۹۹±۰/۱۸	۴/۵۴±۰/۸۴	۱/۴۷±۰/۰۸
	۴	اتانول ۷۰٪- بوتانول	۱/۳۴±۰/۰۴	۲/۸۶ ± ۰/۶۳	۳/۴۵±۰/۱۱	۰/۹۷±۰/۰۳	۱/۶۷±۰/۰۹	۰/۵۴±۰/۰۴
اتانول ۱۰۰٪	۵	اتانول خالص	۰/۵۷±۰/۰۳	۰/۸۸ ± ۰/۱۲	۰/۹۵±۰/۰۳	۰/۶۳±۰/۵۴	۲/۳۹±۰/۰۷	۰/۱۹±۰/۰۱
جمع کل			۱۶/۱۷	۸/۹۲	۲۷/۴۳	۱۱/۱۶	۱۹/۲۸	۷

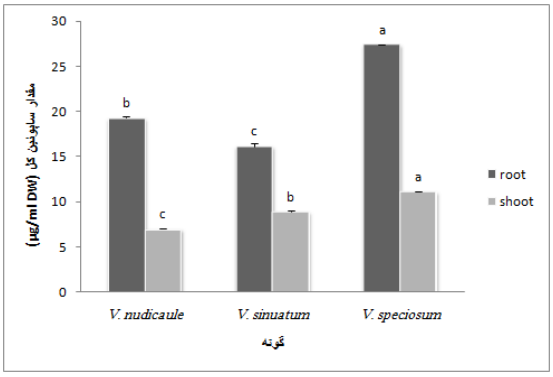
مقدار ساپونین بر حسب میانگین سه تکرار ± خطای معیار نشان داده شده است.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، از لحاظ مقدار کل ساپونین استخراج شده از بخش‌های هوایی و ریشه، اختلاف معنی‌داری میان سه گونه *Verbascum* وجود داشت. به طوری‌که بیشترین مقدار ساپونین کل در بخش-های هوایی و ریشه، متعلق به گونه *V. speciosum* بود. از سوی دیگر مقایسه مقدار ساپونین کل در ریشه و بخش-های هوایی هر سه گونه نشان داد که مقدار ساپونین استخراج شده از ریشه تقریباً دو برابر بخش‌های هوایی بود.

مطالعه کیفی ساپونین‌ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): کروماتوگرافی لایه نازک عصاره‌ها، پنج لکه ساپونینی را در محدوده ۰/۱۳–۰/۷۱ = R_f به رنگ‌های صورتی تا ارغوانی را آشکار نمود. لکه‌های غیرساپونینی با رنگ خاکستری بصورت همراه و یا جدا از لکه‌های ساپونینی (با توجه به مراحل مختلف استخراج و نوع حلال) در کروماتوگرام‌ها مشاهده شدند. عصاره خام واجد لکه‌های غیرساپونینی بود، که طی بخش‌سازی در حلال-های مختلف در مرحله آخر عصاره‌گیری حذف شدند. لکه شماره ۲ در ریشه گونه *V. sinuatum* با مقدار ۰/۳۱ = R_fو در بخش‌های هوایی آن لکه شماره ۲ با مقدار ۰/۴۷ = R_f اصلی‌ترین ترکیبات ساپونینی بودند (جدول ۳).

در ریشه *V. speciosum* لکه‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ با مقادیر ۰/۴۳ = R_f و در بخش‌های هوایی، لکه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ با مقادیر ۰/۴۶ = R_f بعنوان ترکیبات ساپونینی عمده شناسایی شدند (جدول ۴). در شکل ۷ تصاویر کروماتوگرام مربوط به فرکشن‌های مختلف استخراج ساپونین از ریشه و بخش‌های هوایی *V. speciosum* نشان داده شده است.

در ریشه *V. nudicaule* لکه شماره ۱ با مقدار ۰/۲۵ = R_f و در بخش‌های هوایی لکه شماره ۳ با مقدار ۰/۱۹ = R_f دو ترکیب ساپونینی اصلی بودند (جدول ۵) .



شکل ۶- مقایسه مقدار ساپونین کل استخراج شده از ریشه و بخش-های هوایی سه گونه مختلف *Verbascum*.

بر اساس آزمون دانکن اعداد با حروف مشابه در سطح $P \leq 0/05$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

بحث

نام ساپونین‌ها بر اساس فعالیت سطحی آنها انتخاب شده است، زیرا بسیاری از آنها دارای خاصیت کف‌کنندگی هستند و در آب کف پایدار تولید می‌کنند (۲۴). قابلیت ایجاد کف یکی از ویژگی‌های ساپونین‌هاست که با استفاده از آن می‌توان به احتمال حضور این ترکیبات در گیاه پی برد. عصاره‌های استخراج شده گیاهان مورد بررسی با تشکیل کفی پایدار در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی، وجود ساپونین را در بخش‌های هوایی و ریشه سه گونه *Verbascum* به اثبات رساندند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، میزان کف ایجاد شده در هر سه گونه *Verbascum* افزایش می‌یابد. ارتفاع کف پایدار ایجاد شده در ریشه و بخش‌های هوایی گونه‌های *V. sinuatum* و *V. speciosum* با هم برابر و در گونه *V. nudicaule* بیشتر بود. همچنین مقدار کف ایجاد شده در ریشه هر سه گونه بیشتر از ۱۰۰٪ بود. از آنجا که ساپونین‌ها در بسیاری از داروهای سنتی و گیاهان دارویی، به خصوص در مشرق زمین یافت شده‌اند، بنابراین تلاش زیادی برای تعیین ویژگی‌ها و خواص فارماکولوژیکی و زیستی آنها انجام شده است.

جدول ۳- مشخصات لکه‌های ساپونینی در ریشه و بخش‌های هوایی گونه *Verbascum sinuatum*.

ریشه	++	بنفش	۰/۳۱	۱
	+	بنفش روشن	۰/۲۵	۱
	+	بنفش روشن	۰/۴۴	۲
	++	بنفش	۰/۳۱	۳
	+	بنفش روشن	۰/۲۵	۳
	++	بنفش	۰/۳۱	۴
	+	بنفش روشن	۰/۲۵	۴
	+	بنفش روشن	۰/۳۱	۵
بخش‌های هوایی	++	بنفش	۰/۳۷	۱
	++	بنفش	۰/۴۷	۲

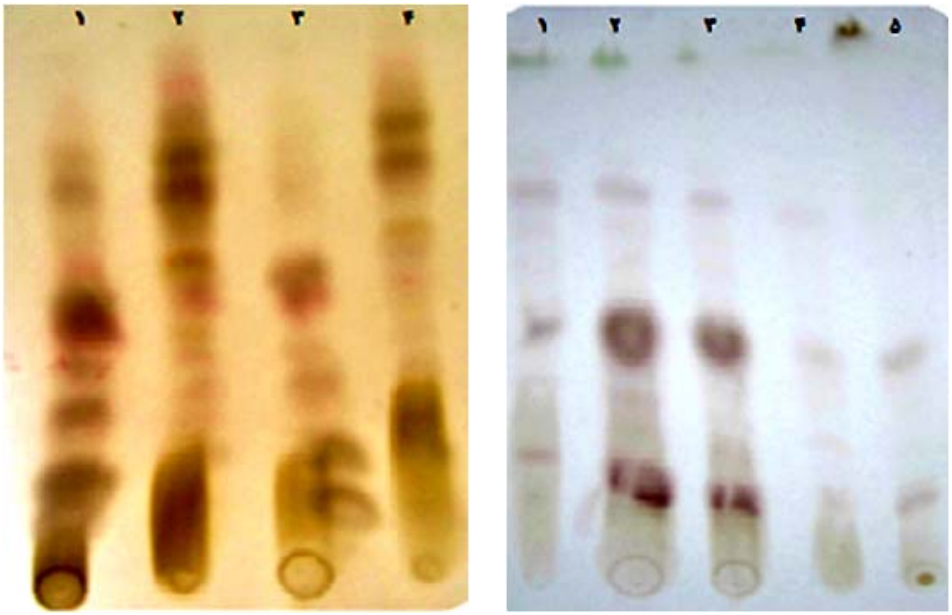
جدول ۴- مشخصات لکه‌های ساپونینی در ریشه و بخش‌های هوایی گونه *Verbascum speciosum*.

ریشه	+	صورتی روشن	۰/۶۴	۱
	+++	ارغوانی	۰/۴۳	۱
	+	صورتی روشن	۰/۷۱	۲
	+	صورتی روشن	۰/۴۳	۲
	++	ارغوانی	۰/۳۶	۲
	++	ارغوانی	۰/۳۶	۳
	+	ارغوانی	۰/۴۳	۴
	+	صورتی روشن	۰/۳۶	۴
بخش‌های هوایی	+	بنفش روشن	۰/۷۳	۱
	++	بنفش	۰/۴۶	۱
	++	بنفش	۰/۲۳	۱
	+	بنفش روشن	۰/۷۳	۲
	++++	بنفش	۰/۴۶	۲
	+	بنفش روشن	۰/۷۳	۳
	++++	بنفش	۰/۴۶	۳

جدول ۵- مشخصات لکه‌های ساپونینی در ریشه و بخش‌های هوایی گونه *Verbascum nudicaule*.

	++	بنفش تیره	۰/۲۵	۱
	+	بنفش روشن	۰/۱۳	۲
	++	بنفش تیره	۰/۱۳	۳
	++	صورتی	۰/۱۳	۴

[redacted]				
+	صورتی روشن	۰/۱۳	۵	
+	بنفش روشن	۰/۱۹	۱	
+	بنفش روشن	۰/۱۹	۲	
++	بنفش	۰/۱۹	۳	
+	بنفش روشن	۰/۱۹	۴	



شکل ۷- تصاویر کروماتوگرام مربوط به فرکشن‌های مختلف استخراج ساپونین از ریشه و بخش‌های هوایی در گونه *Verbascum speciosum*.
۱) فرکشن آبی۵۰٪ ، ۲) فرکشن بوتانولی ۵۰٪، ۳) فرکشن آبی ۷۰٪، ۴) فرکشن بوتانولی ۷۰٪ و ۵) اتانول خالص

دستیابی به روشی مؤثر برای استخراج، اولین قدم در زمینه مطالعه این ترکیبات است. بر اساس نتایج تحقیقاتی که بر روی استخراج ساپونین از گیاهان مختلف حاصل شده-است، مهمترین عاملی که باید در استخراج مواد مؤثر گیاهان دارویی مورد توجه قرار گیرد، انتخاب حلال مناسب است (۱)، زیرا بر مقدار، خلوص و غلظت اجزاء ساپونین استخراج شده اثر می‌گذارد، که خود با توجه به بخش‌های مختلف گیاه و نیز نوع مواد تشکیل‌دهنده آن تفاوت‌هایی را ایجاد می‌کند (۱۰). از سوی دیگر انتخاب حلال مناسب برای هر گروه از ترکیبات خام گیاهی بسیار مشکل است، زیرا همراه این ترکیبات مواد دیگری نیز وجود دارند که بر روی درجه حلالیت آنها تأثیرگذار است (۱). خالص‌سازی و فرآوری ساپونین‌ها نیازمند مراحل متوالی است. مراحل پیش‌تیمار ازجمله نحوه خشک کردن مناسب، کاهش سریع حجم اجزاء و چربی‌زدایی با استفاده از حلال‌های چربی‌دوست، باعث افزایش کارآیی عصاره-گیری می‌شود (۱۵). در بررسی حاضر برای استخراج، از اتانول با درجات صعودی استفاده شد و سپس در مرحله بعد با کاربرد دی‌اتیل‌اتر برای چربی زدایی از عصاره، ساپونین خالص‌تری توسط بوتانول نرمال جداسازی شد. تصاویر کروماتوگرام فاز بوتانولی حاصل از این روش نیز، حکایت از عدم وجود ناخالصی‌ها داشت.

با توجه به نتایج این بررسی می‌توان دریافت که گیاهان جنس *Verbascum* منبعی سرشار از ساپونین هستند و ساپونین حاصل از آنها دارای قدرت خوبی از نظر تولید کف پایدار بویژه در ریشه‌هاست. در این بررسی بهترین حلال اتانول ۵۰٪ بود که بیشترین مقدار ساپونین را از سه گونه مورد بررسی استخراج کرد. مقایسه بین فرکشن‌های مختلف در هر سه گونه نشان داد که فرکشن‌های مربوط به ریشه (بجز فرکشن‌های ۴ و ۵ در گونه *V. sinuatum*) محتوای ساپونینی بیشتری را نسبت به بخش‌های هوایی دارند. مقدار ساپونین استخراج شده از ریشه و بخش‌های هوایی گونه *V. speciosum* با محتوای ۴۲/۲۷٪ و ۱۶/۱۱٪، حاوی بیشترین مقدار ساپونین نسبت به دو گونه دیگر بود.

روش مورد بررسی در این پژوهش، قبلاً برای جداسازی ساپونین‌ها از گیاهان نگونسار (*Cyclamen coum*) و چوبک (*Acanthophyllum squarrosum*) استفاده شده (۱،۲،۳)، اما نتایج متفاوتی را حاصل نموده‌است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در اسکلت ساختمانی ترکیبات ساپونینی موجود در این گیاهان باشد. بنابر گزارش‌های موجود، مناسبترین روش برای استخراج ساپونین از ساقه گیاه نگونسار (۱) و بخش‌های هوایی گونه‌های مختلف *Silene* (۲)، از نظر دستیابی به محتوای ساپونین بالاتر و مواد مزاحم و غیرساپونینی کمتر، همین روش می‌باشد. اما در گیاه چوبک نتایج بهتری با بکارگیری روش‌های دیگر حاصل شده‌است (۳). بدیهی است شناسایی دقیق ساپونین‌ها با بکارگیری روش‌های دیگری مانند HPLC و NMR میسر خواهد بود.

منابع

۱.احمدبیگی، ز. و صبورا، ع. ۱۳۸۷. مقایسه کارایی سه روش استخراج ساپونین از ساقه غده‌ای گیاه نگونسار (*Cyclamen coum*). مجله علوم زیستی، جلد ۲۲، شماره ۲.

۲.جمالی، ر. ۱۳۹۰. مطالعه ساپونین‌ها و ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی-اکسیدانی آن‌ها در برخی از گونه‌های جنس *Silene* L. پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا همدان.

۳.عسگری، ژ. ۱۳۶۴. شناسایی ساپونین گیاه چوبک *Acanthophyllum squarrosum* و بررسی فیتوشیمیایی گیاه. پایان‌نامه دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.

۴. مظفریان، و. ۱۳۸۴. رده‌بندی گیاهی: دو لپه‌ای‌ها. چاپ سوم. انتشارات امیرکبیر.

۵. نیکنام، و. ۱۳۷۱. بررسی کمی و کیفی ساپوژنین‌های استروئیدی در گیاه کامل و کشت بافت شنبلیله. پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

6. Aminoddin, A., and Chowdhyry, A. R., 1983. Production of diosgenin in somatic callus tissue of *Dioscorea deltoidea*. Planta Media. 48, 92-93.

7. Amirnia, R., Khoshnoud, H., Alahyary, P., Ghiyasi, M, Tajbakhsh, M., and Valizadegan, O., 2011. Antimicrobial activity of *Verbascum speciosum* against three bacteria strains. Fresenius Environmental Bulletin [Fresenius Environ. Bull.]. 20, 690-693.

8. Ebrahimzade, H., and Niknam, V., 1998. A revised spectrophotometric method for determination of triterpenoid saponins. Indian Drug. 35 (6), 379-381.

9. Ghahreman, A., and Attar, F., 1999. Biodiversity of plant species in Iran. 1, 473-475. Tehran University Publication.

10. Guclu-Ustunda O., and Mazza, G., 2007. Saponin: properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 47, 231-258.

11. Hostettmann, K., and Marston, A., 1995. Saponins. (10), 267-268. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

12. Karamian, R., and Ghasemlou, F., 2013. Total phenolics content, antioxidant and antibacterial activities of three *Verbascum* species from Iran.

Journal of Medicinal Plants and By-Products. 1, 43-51.

13. Kupeli, E., Tatli, I. I., Akdemir, Z. S., and Yesilada, E., 2007. Biossay-guided isolation of anti-inflammatory & antinociceptive glycoterpenoids from the folwer of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Bentham. Journal of Ethnopharmacology. 110, 444-450.

14. Mirhaidar, H., 2005. Plant Sciences, Nashre Farhange Eslami. pp. 418-423 (In: Persian).

15. Muir, A. D., Paton, D., Ballantyne K., and Aubin, A. A., 2002. Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa. US Patent 6355249.

16. Osbourn, A. E., 1996a. Saponins and plant defense- a soap story. Trends in Plant Science. 1, 4-9.

17. Osbourn, A. E., 1996b. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell. 8, 1821-1831.

18. Price, K. R., Johnson I. T., and Fenwick, G. R., 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 26, 27-133.

19. Schonbeck, F., and Schlosser, E., 1976. Physiological Plant Pathology. In: Heitefuss, R., and Williams, P. H., (Eds.), Springer, Berlin, pp. 653-678.

20. Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Basile, A., and Sorbo, S., 2007. Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. Fitoterapia. 78, 244-247.

21. Sharifinia, F., 2007. Notes on the distribution and taxonomy of *Verbascum* in Iran. Iranian Journal of Botany. 31, 30-32. Tehran.

22. Sun, H. K., and Pan, H. J., 2006. Immunological adjuvant effect of *Glycyrrhiza uralensis* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 24 (11), 1914-1920.

23. Tatli, I. I., and Akdemir, Z. S., 2004. Chemical constituents of *Verbascum* L. species. Journal of Pharmaceutical Sciences (FABAD). 29 (2), 93-107.

24. Tatli, I. I., Akdemir, Z. S., Bedir, E., and Khan, I. A., 2003. 6-O- α -L- Rhamnopyranosyl catalpol derivative iridoids from *Verbascum cilicicum*. Turkish Journal of Chemistry. 27, 765-772.

25. Wagner H., and Bladt, S., 1998. Plant drug analysis (Atlas of Thin Layer Chromatography). Springer 306.

26. World Health Organization. 1998. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. 46.

27. Ziyaev, R., Abdosamatov A., and Yunsov S., 1971. Alkaloids form *Verbascum songaricum*. Khim Prir. Soedin. 7(6), 853-854.

Study of saponin content in aerial parts and roots of three *Verbascum* L. species

Karamian R. and Ghasemlou F.

Biology Dept., Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Saponins as secondary metabolites that are found in many plants and some animals are high molecular weight glycosides, consisting of a sugar moiety linked to a triterpens or steroid aglycone. Many saponins have detergency properties and give stable foam in water. Members of the genus *Verbascum* L. are characterized by yellow flowers and mostly smoke crack and thick leaves. The *Verbascum* species have active chemicals, which can reduce cyclooxygenase activity. Quantitative and qualitative studies of saponins from the aerial parts and roots of three *Verbascum* species, namely *Verbascum nudicaule*, *Verbascum sinuatum* and *Verbascum speciosum* were carried out by spectrophotometry and TLC method. In this study, 5 fractions were obtained from each section. Among three species studied, *Verbascum speciosum* showed high content of saponins in root and also aerial parts. In addition, thin layer chromatography of the extracts of three species on TLC plates represents some saponin spots with different R_f values in the range of 0.13-0.73.

Key words: Spectrophotometery, Saponins, Thin Layer Chromatography (TLC), *Verbascum* L.