

مطالعه فلاونوئیدهای برگ اعضای جنس *Chrozophora* Neck (Euphorbiceae) در استان مرکزی با روش‌های کروماتوگرافی

میترا نوری^{۱*}، حسن زارع مایوان^۲، افشان مظاهری^۳

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک

۲- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی: ۸۷۹، کدپستی: ۳۸۱۵۶

تلفن: ۵ - ۴۱۷۳۴۰۱ (۰۸۶۱)، ۰۹۱۸۱۶۲۳۸۶۸، نمابر: ۴۱۷۳۴۰۶ (۰۸۶۱)

پست الکترونیک: m-noori@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۲

تاریخ تصویب: ۹۰/۱/۲۴

چکیده

مقدمه: فلاونوئیدها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه و از جمله ترکیبات پلی‌فنلیک هستند که در اندام‌های مختلف برخی از گیاهان وجود داشته و از جنبه‌های شیمیوتاکسونومی و فارماکوگنوزی دارای اهمیت می‌باشند. آنها در چرخه زندگی گیاهان آنتوموفیل، انتشار و بقای آنها نقش دارند.

هدف: هدف از انجام این پژوهش بررسی ترکیبات فلاونوئیدی برگ در جمعیت‌های جنس *Chrozophora* Neck در استان مرکزی می‌باشد.

روش بررسی: مطالعات فیتوشیمیایی بر روی برگ ۲۵ جمعیت از دو گونه جنس *Chrozophora* (*C. tinctoria* و *C. hierosolymitana*) متعلق به خانواده فرفیون جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان مرکزی در تابستان ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی و لایه نازک انجام شد. نمونه‌های شاهد از هر جمعیت به عنوان مرجع تهیه و در هرباریوم نگهداری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد فلاونوئیدهای موجود در همه جمعیت‌ها از نوع فلاونوئید سولفات، فلاونوئید *C* و *C-O* گلیکوزید و آگلیکون می‌باشند. آپی‌ژنین و کوئرستین در همه جمعیت‌های مورد مطالعه از هر دو گونه وجود داشت در حالی که روتین فقط در چهار جمعیت گونه *C. tinctoria* که برای اولین بار از استان مرکزی گزارش می‌شود، یافت شد.

نتیجه‌گیری: همه جمعیت‌های مورد مطالعه دارای ترکیبات فلاونوئیدی بوده اما نوع و تعداد آنها در نمونه‌های مورد مطالعه متفاوت است.

گل‌واژگان: *Chrozophora*، خانواده فرفیون، فلاونوئیدها، کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی، کروماتوگرافی لایه نازک، استان مرکزی



مقدمه

خانواده Euphorbiaceae دارای ۳۱۷ جنس و حدود ۸۰۰۰ گونه در دنیا می‌باشد [۱]. جنس *Chrozophora* از زیر خانواده *Acalyphoideae* با ۱۲ گونه در جهان [۲] و ۴ گونه در ایران متعلق به این خانواده است [۳، ۲]. اعضای این جنس گیاهان علفی یا درختچه‌ای بوده، دارای کرک‌های ستاره‌ای یا فلسی شکل متراکم هستند و اغلب در مناطق خشک زندگی می‌کنند [۲]. این جنس در مرکز، جنوب، غرب و نواحی حاره‌ای آسیا، جنوب اروپا تا شرق آفریقا گسترش یافته [۲، ۴، ۵] و چهار گونه *C. tinctoria*، *C. obliqua*، *C. gracilis* و *C. hierosolymitana* در ایران وجود دارد [۶ - ۲]. *C. tinctoria* در ایران به نام‌های گل عقربی، گوش بره، کرکی و وسمه و *C. verbasifolia* با نام مترادف *C. obliqua* به نام‌های علف پیرمرد، قیطان و آنکورزا شناخته می‌شوند [۱، ۶، ۷، ۸].

امروزه برای حل روابط بین گیاهان و فیلورنی آنها داده‌های شیمیایی کاربرد دارد که شیمو تاکسونومی نامیده می‌شود [۹]. در خانواده Euphorbiaceae نیز مطالعات فیتوشیمیایی برای رده بندی سیستماتیک اعضای این خانواده بسیار ارزشمند می‌باشد (Simpson & Levin, 1994) [۱۰]. متابولیت‌های ثانویه به خصوص فلاونوئیدها به نحو مؤثری در شیمو تاکسونومی دخالت دارند [۱۱]. فلاونوئیدها گروه متنوعی از مواد طبیعی فنلی هستند که در میوه‌ها، سبزیجات، دانه‌ها، پوست، ریشه و ساقه گیاهان وجود دارند [۱۲، ۱۳]. تأثیر فلاونوئیدها در سلامتی انسان قبل از اینکه به عنوان ترکیبات مؤثر از گیاهان جدا شوند، شناخته شده بود. بر اساس مطالعات Williams و Grayer در سال ۲۰۰۴ تقریباً ۹۰۰۰ فلاونوئید مختلف از منابع گیاهی گزارش شده است [۱۴]. مطالعات اولیه این ترکیبات را زاید، فاقد نقش مشخص و بخشی از تولیدات نهایی متابولیت‌ها دانسته که سمی بوده و گیاه برای کاهش اثرات سمی آنها را در واکوئل ذخیره می‌کند. علاوه بر این، فلاونوئیدها فعالیت‌های بیولوژیکی وسیعی داشته

و اثر مثبت آنها در سلامتی انسان سبب شده که در ۱۰ سال گذشته مورد توجه بیشتری قرار گیرند [۱۵]. اثرات فارماکولوژیک بسیاری از گیاهان دارویی به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی در آنها می‌باشد [۱۶]. فلاونوئیدها برای گیاهان به عنوان ترکیبات فیزیولوژیکی فعال محسوب شده، سبب مقاومت آنها در برابر استرس گردیده و گیاهان را در برابر علفخواران محافظت می‌کنند [۱۷]. فلاونوئیدها سبب گرده افشانی و پراکنش دانه گیاهان شده و از جمله عوامل مؤثر در تولید مثل می‌باشند. همچنین فلاونوئیدها در ایجاد رنگ گل‌ها در بسیاری از گیاهان نقش داشته و سلول‌های برگ را از خسارت‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند، بنابراین در هنگام پیری بازده جذب مواد غذایی را در گیاه افزایش می‌دهند [۱۸]. فلاونوئیدها ترکیبات ارزشمندی برای شیمو تاکسونومی خانواده‌ها و جنس‌های گیاهی هستند. مطالعات گذشته حضور فلاونوئیدها و مواد شیمیایی دیگر را در گونه‌های جنس *Chrozophora* تأیید می‌کند. Abdel-Sattar در سال ۱۹۸۵ وجود فلاونوئیدها را در جنس *Chrozophora* گزارش کرد [۱۹]. Hashim و همکاران او در سال ۱۹۹۰ از گونه‌های جنس *Chrozophora* گلیکوزیدهای کامفرول (Kampferol)، آکاستین (Acacetin)، لوتولین (Luteolin) و آپی جنین (Apigenin) را گزارش کردند [۲۰]. Mohemad در سال ۲۰۰۱ گلیکوزیدهای ایزورامنتین (Isoramnetin) و کوئرستین (Quercetin) را از گونه *C. obliqua* جدا کردند [۲۱]. در سال ۲۰۰۵ طلسمی و همکاران او از عصاره متانولی بخش‌های هوایی *C. tinctoria* فلاونوئید گلیکوزیدهای آپی جنین و کوئرستین را گزارش کردند [۲۲]. در سال ۲۰۰۶ دل‌آذر و همکارانش از عصاره متانولی بخش‌های هوایی گونه *C. tinctoria* ۵ فلاونوئید گلیکوزید استخراج کردند [۶]. از *C. sabulosa* ۷ فلاونوئید گلیکوزید گزارش شده است [۲۳]. Vassallo و همکاران او در سال ۲۰۰۶ از عصاره متانولی برگ‌های *C. senegalensis* سه فلاون گلیکوزید جدید جدا کردند [۲۴]. Hawas در سال ۲۰۰۷ گلیکوزیدهای آپی جنین



۲. اسپکتروفتومتر از شرکت Perkin-Elmer Lambda (Perkin-Elmer Lambda 15 UV/Viz Spectrophotometer)
۳. دستگاه تقطیر در خلاء از شرکت Heidolph (Heidolph laborrita 4000 efficient)
۴. کروماتوتانک‌های مشابه شاندون (طراحی و تهیه توسط دکتر میترا نوری)

۵. کلیه مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده از شرکت‌های MERCK و FLUKA از طریق ایران‌کم تهیه شدند.

روش‌ها

نمونه‌برداری، شناسایی و آماده‌سازی

نمونه‌برداری از ۲۵ جمعیت از جنس *Chrozophora* در مناطق مختلف استان مرکزی در تابستان سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ به روش randome انجام شد (جدول شماره ۱). گونه‌های جنس موردنظر با استفاده از منابع قابل دسترس شناسایی شدند [۷، ۶، ۳] که گونه *C. tinctoria* برای اولین بار از استان مرکزی گزارش شد. نمونه‌های شاهد از هر جمعیت تهیه و در هرباریوم دانشگاه اراک نگهداری شدند. برای شناسایی فلاونوئیدها، برگ‌های مناسب از هر جمعیت به طور جداگانه جمع‌آوری و پس از خشک کردن به صورت پودر درآمدند. ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های خشک هر جمعیت وزن و به روش آبی - الکلی (جوشاندن، ماسراسیون، فیلتراسیون) و تقطیر در خلاء (Heidolph laborrita 4000 efficient) عصاره‌گیری شدند. عصاره‌های هر جمعیت و همچنین معرف روتین به طور جداگانه بر روی کاغذ کروماتوگرافی واتمن شماره یک در ابعاد ۲۹ × ۲۳ لکه‌گذاری شد.

و لوتولین را از عصاره آبی اتانولی برگ‌های *C. brocchiana* استخراج کردند [۲۵]. اهمیت فلاونوئیدها در مطالعات شیمیوتاکسونومی به دلیل وجود آنها در اغلب گیاهان آوندی، تنوع ساختمانی، آسانی تشخیص و شناسایی می‌باشد [۲۶]. همچنین ارزش فلاونوئیدها در تمام سطوح رده‌بندی گیاهان گلدار از راسته تا واحدهای رده‌بندی پایین‌تر به عنوان شاهد تاکسونومیکی به اثبات رسیده است [۱۱]. به علاوه فلاونوئیدها از جمله کوئرستین و آپی ژنین از مواد شیمیایی گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که در پزشکی و داروسازی کاربرد دارند. تحقیقات نشان می‌دهد کوئرستین به عنوان یک آنتی‌هیستامین و ضدالتهاب طبیعی برای رفع علائم آسم و آلرژی به کار می‌رود. این فلاونوئید به جلوگیری از سرطان، خصوصاً سرطان پروستات کمک نموده و کاهنده دردهای آرتريت، علائم خستگی، افسردگی و اضطراب می‌باشد [۲۷]. مطالعات *In vitro* نشان داده است که کوئرستین در تنظیم ژنی آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک سیستم دفاعی دخیل بوده و سستز آنها را افزایش می‌دهد [۲۸]. مطالعات Geraets و همکاران او در ۲۰۰۹ نشان داد آپی جنین در درمان بیماری‌های مزمن ریوی مؤثر است [۲۹].

هدف از این مطالعه مقایسه فلاونوئیدهای ۲۵ جمعیت از جنس *Chrozophora* در استان مرکزی و رسم کلاستر داده‌های فیتوشیمی با استفاده از نرم‌افزار (Statistical Pacages for Social Scientists) (SPSS) که روابط بین تاگزونها (Cophenetic correlation) را براساس غلظت و نوع فلاونوئیدها نشان می‌دهد، می‌باشد. این ویژگی‌های شیمیو تاگزونومی و فارماکوگنوزی برای رده‌بندی و کاربرد اعضای خانواده Euphorbiaceae اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل

۱. کابینت UV از شرکت Camag (Camag UV Cabinet 254 & 366 nm)



کروماتوگرافی دو بعدی (Tow-Dimensional Paper Chromatography) (2-DPC)
کروماتوگرام‌های هر جمعیت به ترتیب در
کروماتوتانک‌های شاندون حاوی BAW (Butanol, Acetic)

جدول شماره ۱- اطلاعات نمونه‌های جمع‌آوری شده و تعداد، تراکم و نوع فلاونوئیدها بر مبنای داده‌های حاصل از TLC و 2-DC از جیمیت‌های جنس *Chrozophora* در استان مرکزی

Vocher Sample	Taxon	locality	Latitude	Longitude	Identification			Number of flavonoid sulphates	Flavonoid type		
					Rutin	Quercetin	Apigenin		Number of flavone - C and C-O-glycosides	Number of Aglycones	Number of Total flavonoides
*CAM1	<i>C. tinctoria</i>	Saveh	35° 26' N	50° 33' E	-	++++	++++	2	1	2	5
CAM2	<i>C. tinctoria</i>	Naragh	34° 01' N	50° 31' E	++	+++	+++	3	3	2	8
CAM3	<i>C. tinctoria</i>	Arak	34° 08' N	49° 42' E	++	+++	+++	3	3	2	8
CAM4	<i>C. tinctoria</i>	Pole doab	33° 13' N	49° 21' E	++++	++++	++++	3	3	2	8
CAM5	<i>C. tinctoria</i>	Mahalat	33° 05' N	50° 20' E	++	+++	+++	3	3	2	8
CAM6	<i>C. hierosolymitana</i>	Khomein	33° 38' N	50° 05' E	-	++	++	2	3	4	7
CAM7	<i>C. hierosolymitana</i>	Arak	34° 08' N	49° 42' E	-	++	++++	2	0	3	5
CAM8	<i>C. hierosolymitana</i>	Nymvar	33° 05' N	50° 33' E	-	++	+++	2	3	4	7
CAM9	<i>C. hierosolymitana</i>	Hossein abad	34° 14' N	49° 48' E	-	++	++	2	1	4	7
CAM10	<i>C. hierosolymitana</i>	Saveh	35° 08' N	50° 22' E	-	++	+++	2	1	4	7
CAM11	<i>C. hierosolymitana</i>	Arak	34° 14' N	49° 48' E	-	++++	+++	3	2	3	8
CAM12	<i>C. hierosolymitana</i>	Komijan	34° 42' N	49° 19' E	-	++	+++	2	1	4	7
CAM13	<i>C. hierosolymitana</i>	Arak North	34° 08' N	49° 42' E	-	++++	+++	3	2	3	8
CAM14	<i>C. hierosolymitana</i>	Hakim abad-e Saveh	35° 20' N	50° 33' E	-	++++	++++	1	0	3	4
CAM15	<i>C. hierosolymitana</i>	Shazand	33° 58' N	49° 33' E	-	+++	+++	3	2	3	8
CAM16	<i>C. hierosolymitana</i>	Milajerd	34° 23' N	49° 11' E	-	++	+++	2	1	4	7
CAM17	<i>C. hierosolymitana</i>	5 Km to Khomein	33° 05' N	50° 20' E	±	+++	+++	1	2	2	5
CAM18	<i>C. hierosolymitana</i>	Delijan	33° 47' N	50° 41' E	-	+++	+++	3	2	3	8
CAM19	<i>C. hierosolymitana</i>	Ashtian	34° 25' N	50° 10' E	-	++	+++	2	1	4	7
CAM20	<i>C. hierosolymitana</i>	Hak	34° 13' N	49° 21' E	-	++	+++	2	0	5	7
CAM21	<i>C. hierosolymitana</i>	Farahan	34° 34' N	49° 38' E	-	++	+++	2	0	5	7
CAM22	<i>C. hierosolymitana</i>	Naragh	34° 01' N	50° 31' E	-	++++	+++	3	2	3	8
CAM23	<i>C. hierosolymitana</i>	Arak-Modar	34° 44' N	49° 38' E	-	++	+++	2	1	4	7
CAM24	<i>C. hierosolymitana</i>	Arak East	34° 05' N	49° 45' E	-	++++	+++	2	0	2	4
CAM25	<i>C. hierosolymitana</i>	Darestan	34° 34' N	49° 49' E	-	++	+++	2	0	5	7

علامت اختصاری: - (عدم وجود فلاونوئید)، ± (وجود یا عدم وجود فلاونوئید)، + (وجود فلاونوئید)، ++ (غلظت فلاونوئید کم)، +++ (غلظت فلاونوئید متوسط)، ++++ (غلظت فلاونوئید زیاد)، +++++ (غلظت فلاونوئید خیلی زیاد)

مخلوط به مدت ۰/۵ ساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از بیرون آوردن و سرد شدن لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر اتیل استات به هر لوله اضافه شد. پس از تشکیل دو فاز مجزا، محلول رویی برداشت شد و بعد از تبخیر، در ۵ میلی‌لیتر اتانول حل شد و به همراه استانداردهای قابل دسترس کوئرستین، روتین و آپی جنین (تهیه شده از MERCK و FLUKA) در متانول ۸۰ درصد برای کروماتوگرافی لایه نازک (Tow-Dimensional Paper Chromatography) (TLC) در سه حلال مختلف استفاده شد. کروماتوگرام‌ها در حلال‌های BAW، CAW (3:0.4:6 Chlorophorm, Acetic acid, Water) و فروستال قرار داده شدند. در پایان کروماتوگرام‌ها خشک و با UV در طول موج ۳۶۶ نانومتر خوانده شدند. مقادیر RF برای هر لکه محاسبه و با مقایسه با استانداردهای مورد استفاده،

HOAc و (acid, Water) (اسید استیک ۱۵ درصد) به طور جداگانه قرار داده شده، پس از پایان کروماتوگرافی خشک و به وسیله UV در طول موج ۳۶۶ نانومتر (Camag UV Cabinet 254 & 366 nm) خوانده و لکه‌ها بر روی آنها علامت‌گذاری شدند. مقادیر RF لکه‌های هر یک از کروماتوگرام‌ها در BAW (بوتانول، اسید استیک، آب مقطر به نسبت ۵:۱:۴) و HOAc ۱۵ درصد محاسبه و سپس با استفاده از کلید شناسایی اولیه لکه‌ها شناسایی شدند [۳۰، ۳۱].

هیدرولیز اسیدی و شناسایی فلاونوئیدهای آگلیکون

مقدار ۰/۵ میلی‌گرم از عصاره‌های مورد استفاده در 2-DPC هر جمعیت در ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شدند و در لوله‌های آزمایش برچسب‌دار ریخته شدند. به هر لوله آزمایش ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار افزوده و



آنالیز داده‌ها

داده‌های حاصل از کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی و کروماتوگرافی لایه نازک پس از کد گذاری با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز مؤلفه‌های اصلی (Principal Components Analysis) (PCA) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره‌های ۲ و ۳) و کلاستر مربوطه رسم شد (شکل شماره ۱).

شناسایی و غلظت هر یک از فلاونوئیدهای شناسایی شده بر اساس ابعاد لکه‌ها و شدت رنگ آنها در UV366 nm (Camag UV Cabinet 254 & 366 nm) با استفاده از Chromatographic Map & UV Spectroscopy و منابع معتبر ۳۰ و ۳۱ انجام شد. شناسایی و ارزشیابی نهایی به وسیله RF از روی ترسیم کروماتوگرافی، اندازه‌گیری لکه‌های منظم دارای hRf یکسان، نقشه کروماتوگرافی مکان و رنگ لکه، طیف‌ها (Perkin-Elmer Lambda 15 UV/Viz Spectrophotometer)، مراجعه به منابع مناسب و تجربه صورت گرفت.

جدول شماره ۲- دو جزء از آنالیز PCA و رابطه ویژگی‌های فیتوشیمیایی در ۲۵

جمعیت از گونه‌های *Chrozophora* در استان مرکزی.

ماتریس مؤلفه‌های گردش یافته

صفات	مؤلفه‌ها	
	۱	۲
تعداد فلاون C و C/O گلیکوزید	۰/۹۴۷	
تراکم روتین	۰/۸۳۳	
وجود روتین	۰/۸۲۹	
تعداد فلاونوئید سولفات‌ها	۰/۸۰۲	
تعداد کل فلاونوئیدها	۰/۶۹۹	-۰/۶۲۰
تراکم فلاونوئیدها		۰/۷۷۶
تعداد آگلیکون‌ها	-۰/۵۶۸	-۰/۷۷۶
تراکم آبی جنین		۰/۶۶۹

توجه: روش آنالیز: تجزیه به مؤلفه‌های اصلی. روش چرخشی: نرمال سازی واریانس با کازیر.

مقادیر پر رنگ شده ارتباط معنی دار مثبت هستند $p \geq 0.05$

a. چرخش در ۳ تکرار متمرکز شده است.

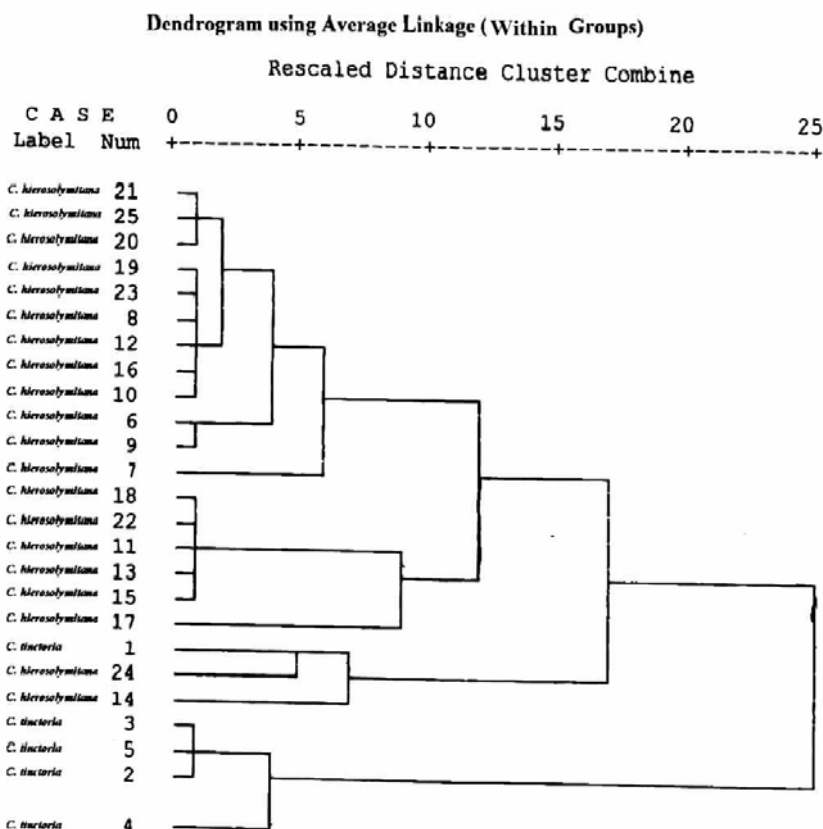
جدول شماره ۳- واریانس کل در آنالیز PCA برای ترکیبات فلاونوئیدی ۲۵ جمعیت مورد مطالعه از گونه‌های *Chrozophora* در استان مرکزی

توضیح واریانس کل

مؤلفه‌ها	ارزش اولیه مؤلفه‌ها			حاصل مقادیر مجذور داده‌ها			چرخش مقادیر مجذور داده‌ها		
	کل	واریانس %	کل %	تراکم	واریانس %	کل %	کل %	واریانس %	کل %
۱	۳/۹۱۹	۴۸/۹۸۹	۴۸/۹۸۹	۳/۹۱۹	۴۸/۹۸۹	۴۸/۹۸۹	۳/۸۱۳	۴۷/۶۶۲	۴۷/۶۶۲
۲	۲/۰۵۱	۲۵/۶۳۵	۷۴/۶۲۴	۲/۰۵۱	۲۵/۶۳۵	۷۴/۶۲۴	۲/۱۵۷	۲۶/۹۶۲	۷۴/۶۲۴
۳	۰/۹۹۹	۱۲/۴۸۶	۸۷/۱۱۰						
۴	۰/۷۰۳	۸/۷۹۰	۹۵/۹۰۰						
۵	۰/۱۷۶	۲/۲۰۴	۹۸/۱۰۴						
۶	۰/۱۲۴	۱/۵۴۹	۹۹/۶۵۳						
۷	۰/۰۲۸	۰/۳۴۷	۱۰۰/۰۰۰						
۸	۰/۰۲۱	۰/۰۰۷	۱۰۰/۰۰۰						

توجه: روش آنالیز: روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA (Principal Component Analysis)





شکل شماره ۱- دندروگرام حاصل از آنالیز PCA بر اساس اطلاعات حاصل از مطالعه فلاونوئیدها با استفاده از نرم افزار SPSS به روش Within Group. ویژگی‌های کدگذاری شده: ۰- (عدم وجود فلاونوئید)، ۱ ± (وجود یا عدم وجود فلاونوئید)، ۲+ (وجود فلاونوئید)، ۳++ (غلظت فلاونوئید کم)، ۴+++ (غلظت فلاونوئید متوسط)، ۵++++ (غلظت فلاونوئید زیاد)، ۶+++++ (غلظت فلاونوئید خیلی زیاد).

نتایج

بحث

در جدول شماره ۱ فهرست جمعیت‌های جمع‌آوری شده جنس *Chrozophora* از نقاط مختلف استان مرکزی و تراکم و نوع فلاونوئیدهای موجود در برگ جمعیت‌های مذکور به روش TLC و 2-DPC ذکر شده است. جدول شماره ۲ ارتباط دو ترکیب از تست PCA و فلاونوئیدهای جمعیت‌های مورد مطالعه جنس *Chrozophora* در استان مرکزی را نشان می‌دهد. جدول شماره ۳ کل واریانس ترکیبات فلاونوئیدی مورد مطالعه از جمعیت‌ها را در PCA نشان داده است. داده‌های فلاونوئیدی به سه روش آنالیز کلاستر، آنالیز شدند، ولی روش within group بهترین آنالیز را نشان داد.

مطالعات فیتوشیمیایی خانواده Euphorbiaceae می‌تواند در بررسی روابط سیستماتیک این خانواده بسیار مفید باشد [۱۰]. مطالعات زیادی در زمینه تأثیر فلاونوئیدها در شیمیوتاکسونومی جنس‌ها و خانواده‌های گیاهی صورت گرفته است. Mues و Zinsmeister در سال ۱۹۸۸ تنوع ترکیبات فنلیک را در خزه‌ها و هپاتیک‌ها مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر فلاونوئید بین دو زیر خانواده *Marchantiidae* و *Jungermanniidae* وجود دارد [۳۲]. مطالعات شیمیوتاکسونومی در مورد سرخس‌ها نیز توسط Harbone در سال ۱۹۸۶ گرفت [۳۲]. در مطالعات



دیگر فلاونوئیدهای ۲۸ گونه از خانواده Polygonaceae مورد آنالیز قرار گرفتند [۳۳]. همچنین در سال ۱۹۸۸ محتویات فلاونوئیدی برگ‌های ۲۵ گونه از جنس *Avena* (Poaceae) توسط Saleh و همکاران او مورد بررسی قرار گرفت [۳۴]. بر اساس مطالعاتی که Harborne و همکارانش در سال ۱۹۸۶ انجام دادند گونه‌های *Triticum* دیپلوئید، بر اساس حضور یا عدم حضور دی - C - گلیکوزیل فلاون (Di-C-glycosylflavones) به دو گروه تقسیم شدند [۳۵]. Moore و Giannasi در سال ۱۹۹۴ جنس *Vitis* را با توجه به نوع فلاونوئیدها به سه گروه تقسیم کردند [۳۶]. این مطالعات کاربرد فلاونوئیدها را برای رده‌بندی جنس‌ها و گونه‌های گیاهان به اثبات می‌رساند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در برگ همه جمعیت‌های *Chrozophora* مورد مطالعه فلاونوئید وجود دارد. فلاونوئیدهای موجود در گونه *C. hierosolymitana* کوئرستین و آپی جنین و در گونه *C. tinctoria* کوئرستین، آپی جنین و روتین می‌باشند. حضور و یا عدم حضور روتین این دو گونه را از هم متمایز می‌کند. نتایج حاصل از آنالیز PCA صفات مورد مطالعه فیتوشیمی (جدول شماره‌های ۲ و ۳) نشان داد که دو فاکتور اول (فلاون - C و C/O گلیکوزید (Flavone-c-& c/o-glycosides) و روتین) ۷۵ درصد کل واریانس را شامل می‌شوند. مؤلفه اول که ۴۷ درصد کل واریانس را در برمی‌گیرد، با صفات وجود یا عدم وجود روتین، غلظت روتین و تعداد فلاون سولفات‌ها ارتباط معنی‌دار مثبت را نشان می‌دهد. مؤلفه دوم که ۲۶ درصد کل واریانس را توجیه می‌کند با وجود یا عدم وجود غلظت کوئرستین ارتباط معنی‌دار مثبت و با تعداد آگلیکون‌ها (Aglycone) ارتباط معنی‌دار منفی را نشان می‌دهد ($p \geq 0.05$). فلاونوئیدهای برگ یک ویژگی مورد استفاده در روابط بین تاگزونهاست. بیوسنتز، توزیع و تجمع فلاونوئیدها تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف مانند اشعه UV، خشکی، درجه حرارت پایین و سرمازدگی، آسیب‌دیدگی، پاتوژن‌ها، استرس‌های غذایی و سایر عوامل



محیطی متغیر است [۳۷، ۳۸]. جمعیت‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان مرکزی به علت شرایط مختلف محیطی تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر غلظت و نوع فلاونوئیدها نشان دادند. بررسی دندروگرام حاصل از آنالیز PCA (شکل شماره ۱) نشان داد که دو خوشه (Clade) اصلی وجود دارد که جمعیت‌های ۲ و ۳ و ۵ و ۴ (گونه *C. tinctoria*) به علت وجود فلاونوئید روتین از خوشه دوم جدا می‌شوند. در خوشه اول جمعیت ۴ با حضور غلظت زیاد روتین و کوئرستین از سایر جمعیت‌های موجود در این خوشه مجزا می‌شود. در خوشه دوم غلظت زیاد کوئرستین، جمعیت‌های ۱ و ۲۴ و ۱۴ را از خوشه خواهری آن متمایز می‌کند. این صفت همچنین در جدایی جمعیت ۱۴ از جمعیت ۲۴ و ۱ مؤثر است. خوشه شامل جمعیت‌های ۱۷، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۲۲ و ۱۸ از خوشه خواهریش توسط تعداد فلاون سولفات‌ها (Flavonoid sulphate) مجزا می‌شود. عامل جداکننده جمعیت ۱۷ از سایر جمعیت‌های موجود در این خوشه تعداد کل فلاونوئیدها است. جمعیت‌های ۶ و ۹ به دلیل تفاوت در غلظت آپی جنین از خوشه خواهری مجزا شده و عامل متمایز کننده خوشه دارای جمعیت‌های ۱۰، ۱۶، ۱۲، ۸، ۲۳، ۱۹ از خوشه خواهری تعداد فلاون - C و C/O گلیکوزید می‌باشد. ضروری است که در تحقیقات آینده فلاونوئیدهای همه گونه‌های جنس *Chrozophora* موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفته و همچنین با استفاده از کروماتوگرافی تدارکی (PPC) (Preparative Paper Chromatography)، کروماتوگرافی مایع با تشخیص بالا (HPLC) (High Performance Liquid Chromatography) و نیز روش‌های HPLC با Diode Array Detection (HPLC/DAD)، تیدرولیز اسیدی قندها و APCI LC-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) به بررسی دقیق‌تر فلاونوئیدها پرداخته شود.

1. Carneiro-Tores DS, Santos FAR and Giulietti AM. A tribe Euphorbieae dumort (Euphorbiaceae) na chapada diamantina. Bahia. Brasil: palinologia e implicacoes taxonomicas. *Polibotanica* 2002; 13: 83 – 96.
2. Shu S ,Huaxing Q and Gilbert M. Chrozophora Neker ex A. Jussieu, Euphorb. Gen. 27. [“Crotophora”]. Nom. Cons, China. 2008; 11: 223 - 4.
3. Mobayen S. Iran Vegetation (Vascular Plant Flora). Tehran University Publications. No. 1500/2, 1979; 2: 85- 152.
4. Delazar A, Talischi B, Nazemiyeh H, Rezazadeh H, Nahar L, Sarker SD. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from Chrozophora tinctoria (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian J. Pharmacol.* 2006; 16 (3): 286 - 90.
5. GRIN Database. Germplasm Resources Information Network. National Germplasm Resources Laboratory. Beltsville. Maryland. Available online at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?400209>, 2007.
6. Rechinger KH and Schiman-Czeika H. Ephurbiaceae in flora Iranica, 1963. No. 6 - Graz.
7. Ghahreman A. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Botany Department, 1993, No. 158 Code 005 003 001.
8. Karimi H. A dictionary of Iran's vegetation plants, Tehran: Parcham Publisher, 2002.
9. Jones SB and Luchsinger AE. Plant Systematics, London: McGraw-Hill, 1987.
10. Simpson MG and Levin GA. Pollen ultra-structure of the biovulate Euphorbiaceae. *Int. J. Plant Sci.* 1994; 155: 313 – 41.
11. Noori M. Characterization of the Iranian species of Sophora and Ammodendron (Leguminosae- Sophoreae). PhD Thesis, University of London and Royal Botanic Gardens. Kew. UK, 2002.
12. Middleton EJ. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Med. and Biol.* 1998; 439: 175 – 82.
13. Robles C, Greff S, Pasqualini V, Garzino S, Bousquet-Melou A, Fernandez C, Korboulewsky N and Bonin G. Phenols and flavonoids in Aleppo pine needles asbioindicators of air pollution. *J. Environ Quality* 2003; 32: 2265 – 71.
14. Williams CA and Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. The Royal Society of Chemistry. 2004, pp: 539 – 73.
15. Parr AJ and Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. the Science of Food and Agri.* 2000; 80: 985 – 1012.
16. Yilmaz Y and Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science and Technol.* 2004; 2: 15422 – 33.
17. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environ Chem. Letters* 2006; 4 (3): 147 – 57.
18. Field TS ,Lee DW and Holbrook NM. Why leaves turn red in autumn? The role of anthocyanins in senescing leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physiol.* 2001; 127: 566 – 74.
19. Abdel-Sattar EA. A Pharmacognostical Study of *Chrozophora plicata* (Vahl.) Growing in Egypt. MSc thesis. Faculty of Pharmacy. Cairo University. Cairo Egypt, 1985.
20. Hashim OK, Abouzaid MM ,Abdelgalil FM and Saleh NAM. The flavonoids of Egyptian Chrozophora species. *Biochem. Syst. Ecol.* 1990; 18: 151 - 2.
21. Mohamed KS. Phenylpropanoid glucosides from Chrozophora oblique. *Phytochem.* 2001; 58: 615 - 8.



22. Talischi B, Modarresi M, Bamdad Moghadam S, Asnaashari S, Nazemiyeh H, Rezazadeh H and Delazar A. Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Chrozophora tinctoria* and Identification of Two O - Glycoside Flavons Isolated from it. In: First Seminar of Medicinal and Natural Products Chemistry Shiraz. Iran, 2005.
23. Shi XH, Liu YQ and Kong LY. Studies on the flavones in of *Chrozophora sabulosa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2006; 31 (5): 395 - 7.
24. Vassallo A, Cioffi G, De Simone F, Braca A, Sanogo R, Vanella A, Russo A and De Tommasi N. New flavonoid glycosides from *Chrozophora senegalensis* and their antioxidant activity. *Nat. Product Commun*. 2006; 1 (12): 1089 - 95.
25. Hawas UW. Antioxidant activity of brocchlin carboxylic acid and its methyl ester from *Chrozophora brocchiana*. *Natural Product Res*. 2007; 21 (7): 632 - 40.
26. Harborne JB and Turner BL. Plant Chemosystematics. London: Academic Press. 1984.
27. Jegtvig S. Quercetin. Medical Review Bord. Nutrition. 2008 (<http://nutrition.about.com>).
28. Moskaug J, Carlsen H, Myhrstand M and Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr*. 2005; 81: 277S - 83S.
29. Geraets L, Haegens A, Brauers K, Haydock J, Vernooij J, Wouters E, Bast A and Hageman G. Inhibition of LPS-induced pulmonary inflammation by specific flavonoids. *Biochem. and Biophys Res. Commun*. 2009; 382: 598 - 603.
30. Mabry TJ, Markham KR and Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin: Springer Verlag. 1970.
31. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. London: Academic Press. 1982.
32. Mues R. and Zinsmeister HD. The chemotaxonomy of phenolic compounds in Bryophytes. *J. Hattori Bot. Lab*. 1988; 64: 109 - 41.
33. Harborne JB and Turner BL. Plant Chemosystematics. London: Academic Press, 1984.
34. Saleh AM, Nozzolillo C and Altosaar I. Flavonoid variations in *Avena* species. *Biochem. Syst. Ecol*. 1988; 16: 597 - 9.
35. Harborne JB, Heywood VH and Chen XY. Separation of ostericum from *Angelica* on the basis of leaf and mericarp flavonoids. *Biochem. Syst. Ecol*. 1986; 14: 81 - 3.
36. Moore MO and Giannasi DE. Foliar flavonoids of eastern North American *Vitis* (Vitaceae) north of Mexico. *Pl. Syst. Evol*. 1994; 193: 21 - 36.
37. Carvalho I. S, Cavaco T, Carvalho LM and Duque P. Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) leaves. *Food Chem*. 2009; doi: 10. 1016.
38. Guo J, Han W and Wang M. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis. A review, *African J. Biotech*. 2008; Vol. 7 (25): 4966 - 72.

