# بررسی اثرات بیولوژیکی عصاره برگ و ترکیب فنل گلیکوزید آربوتین گیاه تلکا (*Pyrus biossieriana* Buhse)

**محمد آزادبخت[1*]، آندرو مارستون[2]، کورت هاستتمن[3]، محمد رمضانی[4]، مریم جهرمی‌مقدم[5]**

۱- دانشیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- دانشیار فارماکوگنوزی فیتوشیمی، انیستیتو فارماکوگنوزی دانشکده علوم، دانشگاه لوزان (سوئیس)

۳- استاد فارماکوگنوزی فیتوشیمی، انیستیتو فارماکوگنوزی دانشکده علوم، دانشگاه لوزان (سوئیس)

٤- دانشیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

٥- دکتر داروساز، دانشکده داروسازی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*آدرس مکاتبه: ساری، صندوق‌پستی: ٨٦١ – ٤٨١٧٥، دانشکده داروسازی، تلفن: ٣٢٥٩٨٠٢ (٠١٥١)

نمابر: ٣٢٥٤٠٦٠ (٠١٥١)

پست الکترونیک: Azadbakhtm@yahoo.com

## چکیده

**گیاه تلکا (*Pyrus biossieriana* Buhse) در جنگل‌های شمال ایران به فراوانی یافت می‌شود. دمگل، برگ‌ها و پوست برخی از گیاهان جنس Pyrus حاوی مقادیری از یک فنل گلیکوزید به نام آربوتین می‌باشد. آربوتین در بسیاری از گیاهان از جمله تیره‌های Saxiferagaceae، Ericaceae، Rosaceae، Compositae و ... یافت می‌شود. از آربوتین برای ضدعفونی کردن مجاری ادراری و به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت و ضدآفتاب استفاده به عمل می‌آورند. این ماده دیورتیک و قاعده‌آور است. در این مطالعه، اثر ضدباکتری باسیلوس سوبتیلیس، ضد قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کلادوسپوریوم کوکومریکوم، ضدلارو *Aedes aegypti*، آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌کولین استراز عصاره‌های متانولی، دی‌کلرومتانی و آربوتین مورد بررسی قرار گرفته و ترکیب فنل گلیکوزید آربوتین در آن شناسایی و تعیین مقدار گردید. اثرات بیولوژیکی به روش بیواتوگرافی مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی آربوتین به روشهای TLC و HPLC و تعیین مقدار آربوتین به روش‌های HPLC و اسپکتروفتومتری انجام شد. نتایج نشان داد که از حلال دی‌کلرومتان ۴/۴۲ درصد و از حلال متانول ۲۲/۰۴ درصد عصاره خشک به‌دست آمد. عصاره متانولی دارای اثرات ضد قارچ، آنتی‌اکسیدانت و ضدلارو است. عصاره دی‌کلرومتانی نیز دارای اثرات ضدباکتری، آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌کولین استراز و آربوتین دارای اثرات ضد قارچ و آنتی‌اکسیدانت است. در روش TLCیک ترکیب با $R_f$ = ۰/۴ در عصاره متانولی برگ تلکا مشابه با $R_f$ آربوتین استاندارد بود. با روش HPLC وجود آربوتین در Rt = ۵/۴۳ در عصاره متانولی برگ گیاه تلکا شناسایی شد. میزان آربوتین در برگ گیاه تلکا به روش HPLC، ۷/۰۰۹ درصد و به روش اسپکتروفتومتری ۷/۰۴۴۵ درصد اندازه‌گیری شد. آربوتین در گیاهان اوا اورسی (۱۵ – ۴ درصد) و گونه‌های قره‌قاط (۷ – ۰/۴ درصد) وجود دارد. از آنجایی‌که گیاه اوا اورسی در ایران وجود ندارد، بنابراین گیاه تلکا با توجه به مقدار بالای آربوتین و همچنین فراوانی و پراکندگی زیاد آن در شمال ایران می‌تواند به عنوان منبع غنی آربوتین مورد استفاده قرار گیرد.**

**گل‌واژگان: تلکا، آربوتین، اثرات بیولوژیک، ضدباکتری، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدانت، آنتی‌کولین استراز**

## مقدمه

درخت تلکا با نام علمی *Pyrus boissieriana* Buhse از خانواده Rosaceae درجنگل‌های شمال ایران از ارسباران و آستارا تا گرگان به فراوانی پراکنده است. ارتفاع این درخت ۵ متر و برگ آن تخم‌مرغی گرد با انتهایی کند است، ولی این انتها در برگ‌های جوان کمی کشیده است. روی برگ صاف و براق و دارای رنگ سبز روشن است. 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 (Arbutin) می‌باشد [۲].

آربوتین در بعضی از گیاهان تیره‌های Saxiferagaceae، Rosaceae، Ericaceae، Compositae و... یافت می‌شود [۳]. از گیاهان حاوی آربوتین برای ضدعفونی کردن مجاری ادراری در عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده می‌شود. آربوتین اثر آنتی‌اکسیدانت و ضدآفتاب دارد. به عنوان عامل سفید کننده (Whitting agent) در فرمولاسیون اشکال دارویی موضعی محافظ در برابر تابش‌های شدید اشعه uv به‌کار برده می‌شود [٤]. آربوتین دیورتیک است. میوه‌های تازه جنس Pyrus در انسان در مصرف خوراکی فعالیت ضدتوموری و فعالیت ضدجهش ژنی در برابر باکتری سالمونلا تیفی موریوم نشان داده‌اند [٥].

مهمترین منبع سرشار شناخته شده از آربوتین در دنیا گیاه انگور خرس (*Arctostaphylos uva-ursi*) از خانواده Ericaceae می‌باشد که در ایران موجود نیست. طبق فارماکوپه ژاپن، میزان مشتقات هیدروکینون که آربوتین نیز از مشتقات هیدروکینون است، در این گیاه نباید کمتر از ۷ درصد باشد [٦]. از عصاره این گیاه به‌عنوان ضدعفونی‌کننده مجاری ادراری در التهابات متوسط مجاری ادراری و صفرا، همچون سیستیت و دیس اوریا استفاده می‌شود [۷].

در این تحقیق، با توجه به خصوصیات برجسته فنل گلیکوزید آربوتین و موارد کاربردی آن در پزشکی و داروسازی، اثرات بیولوژیکی عصاره برگ یک گیاه بومی ایران به نام تلکا و آربوتین مورد بررسی قرار گرفته و ترکیب آربوتین در آن شناسایی و تعیین مقدار گردید.

## مواد و روش‌ها

اتیل استات، هگزان، کلروفرم، دی‌کلرومتان، متانل، متیل‌تیازولیل تترازولیوم کلراید (MTT)، نیستاتین، کلرامفنیکل، دی‌فنیل – ۱ – پیکریل هیدرازیل (DPPH)، دی متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت مرک، باکتری باسیلوس سوبتیلس (ATCC 6633) از شرکت سیگما، قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کلادوسپوریوم کوکومریکوم، تخم لارو *Aedes aegypti* (باسیل سوییس)، روتنون از سیگما، صفحات TLC (سیلیکا $٦٠GF_{254}$) شرکت مرک، دستگاه‌های HPLC (مدل Knauer، با شناساگر uv در ۲۸٦nm، نوع ستون Eurospher – $C_{18}$، فاز متحرک متانول – آب ۱–۹، روش کار: ایزوکراتیک با سرعت ۱ml/min)، اسپکتروفتومتر (مدل Genesis 2)، لیوفیلیزر (مدل Zirbusآلمان).

**تهیه گیاه و تایید علمی**: در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۱ برگهای درخت تلکا از ارتفاعات ۱۲۰۰ متری جنگل‌های نکا در استان مازندران جمع‌آوری شد و نام علمی آن مورد تایید قرار گرفت. سپس نمونه هرباریومی آن در واحد فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی ساری تهیه گردید.

### روش تهیه عصاره

٤٠٤ گرم پودر برگ خشک شده در هوا و نیتروژن مایع گیاه تلکا سه بار و هربار با ۲۰۰۰ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان در مدت ٢٤ ساعت در دمای معمولی و با تکان دادن (روی شیکر) خیسانده شد. در پایان روز سوم تفاله باقیمانده، با متانل و با روش مشابه استخراج گردید. عصاره‌های

دی‌کلرومتانی هر یک جداگانه با یکدیگر مخلوط شدند و تحت خلا در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه تبخیرکننده در خلا دوار تا سر حد خشک شدن تغلیظ شد. سپس هر یک از عصاره‌ها لیوفیلیزه گردید.

## بررسی اثرات بیولوژیکی هر یک از عصاره‌ها و آربوتین

جهت بررسی اثرات بیولوژیکی هر یک از عصاره‌ها و آربوتین از روش بیواتوگرافی روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، که روشی ساده و سریع است، استفاده شد.

١٠٠mg/ml از هر یک از عصاره‌ها و ١٠mg/ml محلول متانولی آربوتین روی صفحات TLC کاشته شد. برای عصاره‌های دی کلرومتانی از فاز متحرک اتیل‌استات – هگزان (١:١) و برای عصاره‌های متانولی و آربوتین از فاز متحرک کلروفرم – متانل – آب به نسبت ٦٥:٣٥:٥ استفاده شد. پس از حرکت فاز متحرک به میزان ١٥ سانتی‌متر، کروماتوگرام‌ها جهت برداشت کامل حلال خشک شدند [١١، ١٠، ٩، ٨].

### الف) بررسی اثر ضدباکتری باسیلوس سوبتیلیس

مایع تلقیح باکتری باسیلوس سوبتیلیس (تقریباً $١٠^{٧}$ سلول در میلی‌متر) در مالت آگار روی صفحات کروماتوگرافی پخش شد. پس از رسوب یافتن محیط کشت به‌صورت یک لایه نازک (تقریباً به ضخامت ١ میلی‌متر)، صفحات در دمای ٣٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. سپس محلول متیل تیازولیل تترازولیوم کلراید (MTT) روی صفحات اسپری شد. ترکیبات و فراکسیون‌های فعال به‌صورت لکه‌های سفید روی صفحات TLC مشخص شدند. از کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### ب) بررسی اثرات ضد قارچ

برای بررسی اثر ضد کاندیدا آلبیکنس، مشابه روش بررسی اثر ضدباکتری عمل شد. ترکیبات و فراکسیون‌های فعال به‌صورت لکه‌های روشن روی صفحات با زمینه ارغوانی مشخص گشتند. از نیستاتین به‌عنوان ترکیب مرجع استفاده شد.

برای اثر ضدکلادوسپوریوم کوکومریکوم، پس از اسپری سوسپانسیون کونیدی قارچ، صفحات کروماتوگرافی به مدت سه روز در دمای معمولی (اطاق) در جعبه‌های پلی‌استیرن و در محیط مرطوب انکوبه گشتند. ترکیبات و فراکسیون‌های فعال به‌صورت لکه‌های روشن روی صفحه با زمینه تیره ظاهر شدند.

### ج) بررسی اثر ضدلارو

برای اثر ضدلارو (*Aedes aegypti*)، عصاره‌های دی‌کلرومتانی و متانلی به میزان ٥٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ترکیب آربوتین به میزان ١٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) حل شدند. ٠/١ میلی‌لیتر محلول مذکور به ٩/٩ میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش مدرج اضافه گردید.

تخم‌های لارو به مدت ٢٤ ساعت در ظرف حاوی آب رودخانه انکوبه شدند. پس از ٢٤ ساعت، ٢٠ لارو به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید.

لوله‌ها در محیط تاریک و در دمای ٢٨ – ٢٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. پس از ٢٤ ساعت، وضعیت مرگ لاروها مورد مشاهده قرار گرفت. هر یک از آزمایش‌ها دوبار تکرار شد. از روتنون به‌عنوان ترکیب مرجع استفاده گردید.

### د) بررسی اثر آنتی‌اکسیدانت

برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانت، محلول ٢ درصد ٢ و ٢- دی‌فنیل – ١ – پیکریل هیدرازیل (DPPH) در متانل روی صفحات کروماتوگرافی اسپری شد. پس از حدود ٣٠ دقیقه، ترکیبات و فراکسیون‌های فعال به‌صورت لکه‌های روشن در روی صفحه با زمینه ارغوانی مشاهده گشتند. از بتاکاروتن به‌عنوان ترکیب مرجع استفاده شد.

**ه) بررسی اثر آنتی‌کولین استراز**

۱۰۰۰u آنزیم استیل کولین استراز در ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر تریس – هیدروکلراید ۰/۰۵ مولار در pH ۷/۸ حل شد. ۱۵۰ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی به منظور پایدار کردن آنزیم در طی بیواسی به محلول اضافه شد و محلول استوک در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد .صفحه TLC با محلول استوک آنزیم اسپری و خشک گردید. برای انکوبه کردن آنزیم، صفحه کروماتوگرافی در یک تانک پلاستیکی حاوی مقدار کمی آب قرار داده شد به‌طوری‌که آب نمی‌توانست به‌طور مستقیم با صفحه تماس داشته باشد اما محیط مرطوب می‌شد. روی تانک پوشانده شد و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. آنزیم تحت این شرایط به‌طور رضایت‌بخشی پایدار بود. ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲۵ درصد ۱- نفتیل استات در اتانل و ٤۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲۵ درصد فاست بلوسالت با هم مخلوط و روی صفحه TLC اسپری شد. ترکیبات و فراکسیون‌های فعال، در طی ۲ – ۱ دقیقه لکه‌های ارغوانی ایجاد نمودند. از آتروپین به‌عنوان ترکیب مرجع استفاده شد.

**شناسایی و تعیین مقدار آربوتین در برگ‌تلکا**

برای شناسایی آربوتین در برگ گیاه تلکا از روش‌های TLC و HPLC استفاده شد. در روش TLC از فاز متحرک اتیل‌استات – متانل – آب (۱۰-۱۳/۵-۱۰۰) و معرف برلین بلو (پتاسیم هگزاسیانوفرات و فریک کلراید) استفاده شد. در روش HPLC، زمان بازداری آربوتین در تزریق ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد آربوتین و سطح زیر منحنی آن تعیین شد. سپس ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاه تزریق گردید. جهت اطمینان در تزریق جداگانه، ۲۰ میکرولیتر محلول عصاره حاوی استاندارد آربوتین تزریق گردید.

جهت تعیین مقدار به روش HPLC، نمودار بیرلامبرت از تزریق‌های مقادیر استاندارد آربوتین تهیه شد و مقدار آربوتین با تزریق جداگانه عصاره و استفاده از نمودار مذکور به‌دست آمد. جهت تعیین مقدار به روش اسپکتروفتومتری از واکنش امرسون استفاده گردید [١٤، ١٣، ١٢].

## نتایج

از ٤۰٤ گرم برگ خشک گیاه تلکا به ترتیب ۱۷/۸۸ و ۸۹/۰۵ گرم عصاره‌های دی‌کلرومتانی و متانلی به‌دست آمد. به عبارت دیگر میزان عصاره خشک دی‌کلرومتانی ٤/٤۲ درصد و متانلی ۲۲/۰٤ درصد بود. نتایج بررسی اثرات بیولوژیکی عصاره‌ها و آربوتین در جدول شماره ۱ ارایه شده است.

در شناسایی آربوتین به روش TLC، ترکیبی با $R_f$ مشابه با $R_f$ آربوتین استاندارد (۰/٤)، و در روش HPLC، زمان بازداری (R.T.) آربوتین ٥/٤۳ ملاحظه شد. میزان آربوتین در برگ گیاه تلکا به روش HPLC، ۷/۰۰۹ ارزیابی گردید ولی در روش اسپکتروفتومتری به میزان ۷/۰٤٤٥ به‌دست آمد.

## بحث

بر اساس نتایج جدول شماره ۱، عصاره متانلی برگ گیاه تلکا دارای اثرات ضدقارچ (ضدکاندیدا و کلادوسپوریوم)، آنتی‌اکسیدانت و ضدلارو است، ولی اثرات ضد باکتری و آنتی کولین استراز نداشته است. عصاره دی کلرومتانی دارای اثرات ضد باکتری (باسیلوس سوبتیلیس)، آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌کولین استراز است. از طرفی آربوتین نیز دارای اثرات ضدقارچ و آنتی اکسیدانت بوده است. با توجه به این تحقیق (با توجه $R_f$ ترکیبات فعال)، یکی از ترکیبات که عامل اثرات عصاره متانلی برگ گیاه تلکا است، ترکیب فنل‌گلیکوزید آربوتین است. همچنین ترکیبات متعددی در برگ گیاه تلکا دارای اثر آنتی‌اکسیدانت هستند که این ترکیبات هم در فراکسیون

**جدول شماره ۱ – نتایج اثرات بیولوژیکی عصاره برگ گیاه تلکا و آربوتین**

| اثرات بیولوژیک موردمطالعه | ضد قارچ کاندیدا | | ضدقارچ کلادوسپوریوم | | ضدباکتری باسیلوس | | آنتی‌اکسیدانت | | ضد لارو | | آنتی‌کولین استراز | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نمونه | $R_f$ ترکیب | اثر | $R_f$ ترکیب | اثر | $R_f$ ترکیب | اثر | $R_f$ ترکیب | اثر | غلظت PPM | اثر | $R_f$ ترکیب | اثر |
| عصاره‌متانولی | ۰/۴۰<br>۰/۶۵ | + | ۰/۴۰<br>۰/۶۵ | + | – | – | ۰/۲۵، ۰/۱، ۰/۴<br>۰/۳، ۰/۷ | ++ | ۵۰۰ | + | – | – |
| عصاره دی‌کلرومتانی | – | – | – | – | ۰/۲۰، ۰/۴۰ | ++ | ۰/۳، ۰/۶، ۰/۷ | + | – | – | ۰/۳ | ++ |
| آربوتین | ۰/۴۰ | + | ۰/۴۰ | + | – | – | ۰/۴۰ | + | – | – | – | – |

قطبی (متانلی) و هم در فراکسیون غیر قطبی (دی کلرومتانی) موجود می‌باشند.

از آربوتین به منظور ضدعفونی کردن مجاری ادراری در عفونت‌های دستگاه ادراری استفاده می‌شود. عمل باکتریواستاتیک آن در ادرار قلیایی، مربوط به هیدروکینون گلوکورونید و هیدروکینون سولفات تشکیل شده در بدن از آربوتین است. حداکثر اثرات ضدعفونی‌کنندگی آن ٤ – ٣ ساعت بعد از مصرف است [١٦، ١٥]. همچنین آربوتین اثر آنتی‌اکسیدانت و ضدآفتاب دارد و با مهار سنتز ملانین سبب سفیدکردن پوست می‌شود. بنابراین به عنوان عامل سفیدکننده در فرمولاسیون اشکال دارویی موضعی محافظ دربرابر تابش‌های شدید اشعه UV به‌کار برده می‌شود. آربوتین برای چشم و پوست حساسیت‌زا نمی‌باشد [٤].

آربوتین دیورتیک است. میوه‌های تازه جنس Pyrus در انسان در مصرف خوراکی فعالیت ضدتوموری و یک فعالیت ضد جهش ژنی در برابر باکتری سالمونلا تیفی موریوم نشان داده‌اند [٥]. با توجه به خصوصیات برجسته این ماده و موارد کاربردی آن در پزشکی و داروسازی، گیاه تلکا می‌تواند به عنوان منبع ارزشمندی از آربوتین استفاده شود. میزان آربوتین موجود در برگ گیاه تلکا از برگ گیاه *Arctostaphilos uva-ursi*، ١٥–٤ درصد کمتر ولی از برگ گیاهان *Pyrus piraster*، ٣/٣٨ درصد، *Pyrus amigdaliformis*، ٤/٠٥ درصد و *Vaccinium vitis*، ٧ درصد بیشتر است و می‌تواند به عنوان یک منبع غنی آربوتین معرفی گردد [١٥،١٧،١٨].

تفاوت مقدار آربوتین به روش HPLC (معادل ٧/٠٠٩ درصد) و روش اسپکتروفتومتری (٧/٠٤٤٥ درصد) به این دلیل است که در روش اسپکتروفتومتری سایر مشتقات هیدروکینونی موجود در برگ گیاه نیز تعیین مقدار می‌شوند، لذا میزان ٧/٠٠٩ درصد و تعیین مقدار آربوتین به روش HPLC دقیق‌تر می‌باشد.

## منابع


۱. ثابتی حبیب‌الله. *جنگل‌ها، درختان ودرختچه‌های ایران*. انتشارات دانشگاه یزد.۱۳۷۳، صفحه ۲-۵۶۱.

**2.** Petricic J, Apostolski R and Srepel B. The leaf of the wild pear-tree as an arbutinic herb. *Farmacevtski Vestnik Ljubljana J.* 1981; 32: 107-10.

**3.** Lubsandorzhieva PB, Zhigzhitov BS, Dargaeva ZhG and Nagaslaeva LA. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.). *Pharmaceutical Chemistry J.* 2000; 34: 261-4.

**4.** Couteau C, Coifard L. Photostability determination of arbutin, a vegetable whitening agent. *Farmaco J.* 2000; 55: 410-3.

**5.** Bilia AR, Rubio M, Alvarez M, Morelli I and Gonzalez M. New benzyl alcohol glycosides from Pyrus bourgaeana. *Planta Medica J.* 1994; 60: 569-71.

**6.** *The Japanese Phasrmacopoeia*. 13th ed. Ministry of Health and welfare. Tokyo. 1997, p:525.

**7.** Blumental M. *The complete German commission E monographs*. Amrican Botanical Council. Austin. 1998, pp: 224-5.

**8.** Hamburger M, Cordell GA. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. J. *Nat. Prod.* 1987; 50: 19-22.

**9.** Homas AL, Fuchs A. Direct bioautography on thin- layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr*. 1970; 51: 327- 9.

**10.** Marston A, Maillard M, Hostettmann K. Search for antifungal, molluscicidal, and larvicidal compounds from African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1993; 38: 215-23.

**11.** Marston A, Kissling J and Hostetmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinestrase and butyrylcholinestrase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*. 2002; 13: 51 –4.

**12.** Sticher O, Soldati F and Lehmann D. HPLC separation and quantitive determination of arbutin, methyl arbutin, hydroquinone and hydroquinone monomethylether in Arctostaphylos, Bergenia, Callena and Vaccinium species. *Planta Medica J.* 1994; 60: 569-71.

**13.** Wagner H, Bladt S. *Plant drugs analysis*. 2nd ed. Springer – verlag. Berlin. 1996, pp: 247-53.

۱۴. قاسمی دهکردی نصرالله، طالب امیرمهدی. *استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص*. انتشارات چوگان با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۸۰، صفحات ۸-۸۵.

**15.** Stambergova A, Supcikova M and 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: 179-82.

**16.** Harborne JB. *Phytochemical methods*. 3th ed. Chapman and Hall. 1998, pp: 46-7.

**17.** Schieber A, Keller P and Carle R. Determination of phrnolic asids and flavonoids of apple and pear by HPLC. *J. Chromatography*. 2001; 910: 265-73.

**18.** Sun H, Wang X, Huang R and Yuan C. Determinatiom of arbutin in the herbs of Vaccinium vitis-idea by HPLC. *Zhongguo-zhong-yao-za-zhi*. 1997; 22: p 555.