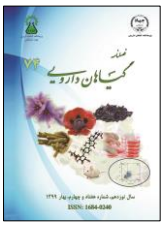
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۴): ۱۷۷-۱۹۱

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

# بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گل‌های انار (*Punica granatum* L.) و اسید اورسولیک خالص شده از آن بر روی سلول‌های ملانوما B16f10

**فاطمه شریفیان[۱]، سیدعباس میرجلیلی[۲،*]، محمد فضیلتی[۲]، الهه پورعزیزی[۳]، سعید حبیب‌اللهی[۴]**

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، ایران

[۲] مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

[۳] گروه بیوشیمی، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف‌آباد، ایران

[۴] دانشکده شیمی، دانشگاه پیام‌نور، ایران

**اطلاعات مقاله**

*گل‌واژگان:*
گل انار
استخراج اسید اورسولیک
ملانوما
MTT

**چکیده**

**مقدمه:** ملانوما خطرناک‌ترین نوع سرطان پوست است و بیشترین سرعت رشد را در میان انواع سرطان‌ها داراست. اسید اورسولیک یکی از تری‌ترپنوئیدهای پنتاسیکلیک شناخته شده است که به طور گسترده در گیاهان دارویی از جمله گل انار وجود دارد. **هدف:** مطالعه حاضر به بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره اتانولی گل‌های انار و همچنین اسید اورسولیک خالص‌شده از آن بر سلول‌های ملانوما موشی B16f10 می‌پردازد. **روش بررسی:** خالص‌سازی اسید اورسولیک از گل‌های انار، با استفاده از عصاره‌گیری با کمک اولتراسوند و به دنبال آن فلش کروماتوگرافی فاز نرمال انجام شد. ساختار شیمیایی اسید اورسولیک خالص‌شده به‌وسیله کروماتوگرافی گازی جفت شده با اسپکتروسکوپی جرمی (GC-MS)، طیف‌سنجی مادون‌قرمز (IR) و $^1$H-NMR تأیید شد. سپس اثر عصاره اتانولی گل‌های انار و همچنین اسید اورسولیک خالص شده از آن در مهار تکثیر سلول‌های ملانوما موشی B16f10با استفاده از روش MTT انجام شد. **نتایج:** نتایج این مطالعه استخراج و خالص‌سازی موفق و پربازده اسید اورسولیک از گل‌های انار را توسط این روش فلش نشان داد. بعد از یک بار فلش کروماتوگرافی، درصد خلوص اسید اورسولیک بیش از ۹۷ درصد و مقدار محصول ۰/۱ درصد پودر خشک گل انار بود. تیمار سلول‌های B16f10 با عصاره اتانولی گل‌های انار و اسید اورسولیک خالص‌شده از آن، فعالیت ضدتکثیری معنی‌داری را بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد. این فعالیت مهاری از عصاره گل‌های انار به‌صورت وابسته به غلظت و زمان مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق حاکی از ارزشمند بودن عصاره گل‌های انار و اسید اورسولیک خالص‌شده از آن در پیشگیری و درمان ملانوما می‌باشد.

*مخففها:* UA، اسید اورسولیک؛ NMR، رزونانس مغناطیسی هسته؛ TLC، کروماتوگرافی لایه نازک؛ HPLC، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا؛ GC-MS، کروماتوگرافی گازی جفت شده با اسپکتروسکوپی جرمی؛ IR، مادون قرمز.

* نویسنده مسؤول: a.mirjalili@areeo.ac.ir

**تاریخ دریافت:** ۷ شهریور ۱۳۹۷؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۰ اسفند ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۷ فروردین ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.74.177

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]

[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]

[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

**۱. مقدمه**

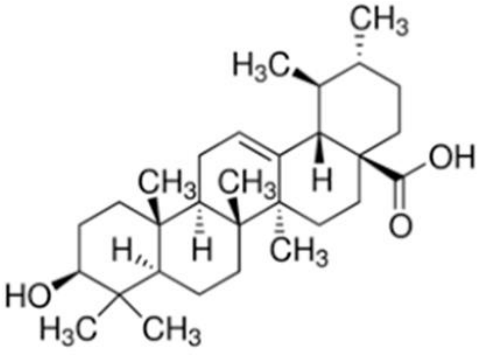
سرطان پوست به عنوان یکی از رایج‌ترین نوع سرطان در سرتاسر جهان است که تقریباً نیمی از جمعیت سرطانی‌ها در میان سفیدپوستان را به خود اختصاص داده است [۲، ۱]. در میان انواع مهم سرطان پوست، ملانوما کشنده‌ترین نوع آن است چون لایه‌های عمیق‌تر پوست را تحت تأثیر قرار می دهد و بیشترین توان را برای پخش شدن به دیگر بافت‌ها دارد [۳]. در طول سال‌های پیش در سرتاسر جهان آمار تعداد افراد مبتلابه ملانوما و مرگ و میر ناشی از آن بیش از همه‌ی انواع دیگر سرطان‌ها بوده است [۴]. به نظر می‌رسد که ریسک فاکتور محیطی برجسته برای گسترش ملانوما قرارگیری طولانی مدت در معرض نور خورشید باشد. اشعه UV، رادیکال‌های آزاد مضر تولید می‌کند که باعث آسیب به DNA می‌شود [۶، ۵]. در سال‌های آینده سرطان‌های پوست می‌توانند به عنوان یک مشکل مهم در سلامت عمومی جامعه مطرح باشند. بنابراین مطالعه سرطان پوست به صورت *in vitro* (به طور ویژه رده‌های سلولی ملانوما)، و کاهش وقوع آن بوسیله همه راه‌های ممکن حائز اهمیت زیادی است. گیاهان دارویی به‌عنوان یک منبع مؤثر و مطمئن عوامل ضدسرطان، نقش مهمی ایفا می‌کنند. ۶۰ درصد عوامل ضدسرطانی که امروزه استفاده می‌شوند از منابع طبیعی مثل گیاهان به دست آمده‌اند [۷].

انار با نام علمی (*Punica granatum* L.) متعلق به خانواده *Punicaceae* یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که به طور گسترده در طب مردم بسیاری از فرهنگ‌ها استفاده می‌شود [۸]. درخت انار بومی ایران است و از زمان‌های قدیم در منطقه‌ی مدیترانه‌ای آسیا، آفریقا و اروپا کاشت می‌شود [۹]. انار ازجمله محصولاتی است که به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه باارزش در بخش‌های مختلف خود مانند میوه، دانه، پوست میوه، برگ‌ها، گل‌ها، پوست درخت و ریشه‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هر کدام از این بخش‌ها دارای فعالیت فارماکولوژیکی قابل‌توجهی هستند [۱۱، ۱۰]. گل‌های انار به‌طور گسترده در سیستم طب یونانی، چینی و هندی استفاده می‌شود. گل‌های انار یک داروی ضددیابت سنتی بی‌همتا هستند، عصاره آن خونریزی را قطع می‌کند و به عنوان درمانی برای ورم گوش میانی است. گل‌های انار همچنین برای درمان اسهال‌های مزمن بویژه در کودکان و برای درمان موی در حال سفید شدن در مردان جوان در طب سنتی چین استفاده می‌شود. گل‌های انار به‌عنوان ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروس، مقوی نیروی جنسی در مردان و به عنوان درمان برای برونشیت، اسهال، مشکلات گوارشی، زخم‌های عفونی پوستی و دیابت در متون پزشکی یونانی استفاده می‌شده است [۱۳، ۱۲، ۱۰]. قسمت‌های مختلف گل انار دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی و حمایت علیه آسیب اکسیداتیو به مولکول‌های DNA می‌باشند. تعدادی آنتی‌اکسیدان نیرومند از گل‌های انار جداسازی و تأثیر آنها نیز تأیید شده است [۱۴، ۱۳]. گل‌های انار حاوی متابولیت‌های ثانویه متنوعی می‌باشند. فراوان‌ترین آن‌ها پلی‌فنل‌ها هستند که شامل گالیک اسید، الاژیک اسید و اتیل برویفولین – کربوکسیلات است. در درجه دوم تری‌ترپن‌ها هستند که شامل اولئانولیک اسید، اورسولیک اسید، ماسلینیک اسید و آسیاتیک اسید است. هر یک از این ترکیبات فعالیت‌های بیولوژیک و فارماکولوژیک قابل‌توجهی نشان داده‌اند [۱۴]. اسید اورسولیک (3β-hydroxy-12-urs-12-en-28-oic acid; UA) (شکل ۱) به عنوان یک هیدروکسی پنتاسیکلیک تری‌ترپن اسید، ترکیب تشکیل‌دهنده برخی از گیاهان دارویی و ترکیب اصلی پوشش حفاظتی موم مانند موجود روی پوست میوه‌های مختلف شامل انواع سیب‌ها، گلابی‌ها، زیتون‌ها، آلوها، انجیرها و قره قاط است [۱۶، ۱۵]. برای مدت‌زمان زیادی تصور می‌شد که این ترکیب ازنظر بیولوژیکی غیرفعال است. درحالی‌که در سال‌های اخیر به علت تأثیرات فارماکولوژیک اسید اورسولیک به همراه سمیت کم آن توجه زیادی به طرف این ماده جلب شده است [۱۷]. برای اسیداورسولیک فعالیت‌های فارماکولوژیکی مثل ضدآلرژی [۱۸]، حفاظت‌کنندگی از قلب [۱۹]، ضدمیکروبی [۲۱،



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

۲۰]، تنظیم‌کننده دستگاه ایمنی [۱۶]، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان [۱۱، ۱۰]، ضدتومور [۲۳، ۲۲]، ضدزخم [۲۴]، ضدالتهاب و ضددرد [۲۵] گزارش‌شده است. مطالعات فراوانی ثابت کرده‌اند که اسید اورسولیک آپوپتوز را در بسیاری از انواع سلول‌های سرطانی شامل سلول‌های سرطان خون، سرطان کولون، سرطان سینه، سرطان ریه و سرطان پروستات القاء می‌کند [۲۶، ۲۵، ۱۶]. فعالیت ضدالتهابی، ضدتکثیری، ضدمتاستازی، ضدرگ‌زایی و القاکننده‌ی آپوپتوز از اسید اورسولیک در مدل‌های سرطان در شرایط *in vivo* و *in vitro* گزارش شده است [۲۸، ۲۷]. انبوه مطالعات بر روی مکانیسم اثر این ترکیب نشان می‌دهد که اثر ضدسرطانی اسید اورسولیک به علت توانایی این ترکیب در القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، پیشگیری از تشکیل تومور و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی است. از اینرو با توجه به اهمیت گیاه انار و با توجه به وجود ترکیب اسید اورسولیک در گل‌های درخت انار و اهمیت آن به عنوان یک ترکیب بسیار سودمند برای سنتز طیف وسیعی از مولکول‌های زیست فعال جدید و پتانسیل عظیم این ترکیب برای استفاده به عنوان یک داروی ضدالتهاب و ضدسرطان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی گل‌های انار و همچنین اسید اورسولیک خالص شده از آن بر روی رده سلولی ملانوما موشی B16f10 انجام شد.



**شکل ۱.** ساختار اسید اورسولیک

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲.۱. *جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری*

گل‌های انار، رقم آلک زودرس، در بهار سال ۱۳۹۵ از درختان کلکسیون باغ انار مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان، به طور تصادفی از روی شاخه‌ها جمع‌آوری شدند. گل‌های کامل بوسیله یک آون به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت دو روز در ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند [۱۳]. گل‌های خشک شده سپس توسط یک آسیاب پودر شدند.

جهت تهیه عصاره، پودر گل‌های خشک شده انار به نسبت ml/g ۲۰:۱ با حلال اتانول ۹۰ درصد مخلوط شد. سپس عصاره‌گیری به کمک دستگاه اولتراسونیک در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد [۱۵، ۱۳].

### ۲.۲. *خالص‌سازی اسید اورسولیک توسط روش فلش کروماتوگرافی فاز نرمال*

طبق روش عصاره‌گیری ذکر شده در قسمت قبل، مقدار ۶۰ گرم پودر خشک گل با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد به کمک دستگاه اولترا سونیک و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵۰ دقیقه عصاره‌گیری شد. سپس مخلوط حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره به دست آمده به کمک دستگاه روتاری، تحت خلاء و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره خام حاصل (۱۲ گرم) برای جداسازی اسید اورسولیک بر روی ژل سیلیکا در ستون کروماتوگرافی استفاده شد.

در کروماتوگرافی ستونی مهم‌ترین نقطه شروع پیدا کردن یک فاز متحرک مناسب است که بتواند به‌طور مؤثر جداسازی خوبی را برای ترکیبات هدف ایجاد کند. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بهترین روش برای انتخاب فاز متحرک برای ستون‌های سیلیکاژل می‌باشد. در این تحقیق چندین سیستم حلال دوتایی شامل اتیل استات /متانول (۳۰: ۲ V/V) (۳۰: ۵ V/V)، کلروفرم /متانول (۳۰: ۱ V/V) (۳۰: ۲ V/V)، دی کلرومتان /متانول (۲ V/V:



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

۳۰) (V/V ۵ :۳۰)، اتیل‌استات /هگزان (V/V ۵ :۱) (V/V ۳ :۱) (V/V ۲:۴) (V/V ۲:۳) (V/V ۳:۳)، اتانول /هگزان ( V/V ۱:۳) (V/V ۲:۳) (V/V ۲:۴) برای جداسازی اسید اورسولیک توسط TLC آزمون شد.

کروماتوگرافی ستونی فلش در یک ستون شیشه‌ایی به ابعاد (۵۰ mm×۳۰۰ میلی‌متر) که برای این کار طراحی شده بود، انجام شد. ستون با حلال دی‌کلرومتان پر شد و سیلیکاژل (۱۷۰ گرم با سایز ذرات ۶۳-۴۰ mμ) حل‌شده در دی کلرومتان، به تدریج به داخل ستون منتقل شد. حلال داخل ستون تا رسیدن به سطح سیلیکاژل از ستون خارج شد. پس از آماده شدن ستون ۱۲ گرم عصاره خام بر روی ستون ریخته شد. شستشوی ستون با فاز متحرک دی کلرومتان/ متانول (V/V ۲ :۳۰) انجام شد. سیستم فلش کروماتوگرافی با جریان پیوسته‌ای از نیتروژن با یک سرعت جریان ۰/۵ in./min پمپ شد. ۱۰ فرکشن با حجم ۵۰ ml از زیر ستون جمع‌آوری شد و توسط دستگاه HPLC آنالیز شد (ستون Venusil MP C18، فاز متحرک متانول و M ۰/۱ بافر فسفات (۱۰: ۹۰ ,pH=3)، سرعت جریان ml/min ۰/۹، طول‌موج آشکارساز ۲۱۰ nm). فرکشن‌هایی که حاوی اسید اورسولیک بودند به هم ملحق شدند و توسط روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و تحت خلاء تغلیظ شدند. بر روی اسید اورسولیک به دست آمده چندین مرتبه فرآیند تبلور مجدد با متانول انجام شد تا ناخالصی‌های باقی مانده نیز حذف شوند و بلورهای بی‌شکل و سفید رنگ اسید اورسولیک حاصل شوند.

### ۳.۲. *تعیین درصد خلوص اسید اورسولیک خالص شده*

مقدار دقیقی از اسید اورسولیک استاندارد (سیگما با درصد خلوص ۹۴ درصد) و اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار (پس از فرآیند تبلور مجدد) وزن شد و در مقدار مناسبی متانول جهت به دست آمدن غلظت مشخص ۴۰۰ µg/ml در هر مورد، حل شد. محلول‌های حاصل پس از عبور از فیلتر غشایی µm ۰/۴۵ جهت آنالیز به دستگاه HPLC تزریق شد. سپس سطح زیر پیک حاصل از تزریق محلول ۴۰۰ µg/ml اسید اورسولیک استاندارد با درصد خلوص مشخص ۹۴ درصد با سطح زیر پیک حاصل از محلول ۴۰۰ µg/ml اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار مقایسه و درنهایت درصد خلوص اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار به دست آمد.

### ۴.۲. *شناسایی اسید اورسولیک خالص شده*

ساختار شیمیایی اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار بوسیله‌ی کروماتوگرافی گازی جفت شده با اسپکتروسکوپی جرمی (GC-MS)، طیف سنجی مادون‌قرمز (IR) و $^1$H-NMR تأیید شد. طیف IR (Infrared) با استفاده از دستگاه Jasco 4200 FT-IR (ژاپن) و توسط قرص‌های آماده‌شده از KBr به همراه اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار، گرفته شد. طیف Mass از اسید اورسولیک خالص‌شده با استفاده از دستگاه GC MS- QP5050 Shimadzu (ژاپن) به دست آمد. همچنین طیف $^1$H-NMR با حلال $CDCL_3$ و توسط دستگاه اسپکترومتر Bruker Ultrashield 400 MHz (آلمان) گرفته شد.

### ۵.۲. *ارزیابی عملکرد سمیت سلولی*

جهت بررسی فعالیت ضدسرطانی عصاره گل انار و اسید اورسولیک خالص شده از آن، رده سلولی ملانوما موشی B16f10 از مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی دانشگاه اصفهان خریداری شد و به منظور انجام آزمایشات بعدی در محیط کشت DMEM (حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی) و تحت شرایط استاندارد انکوباتور (۵ درصد $CO_2$، ۹۰ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) کشت داده شد. بعد از انجام سه بار پاساژ، سلول‌ها به روش آنزیمی و با استفاده از تریپسین از ته فلاسک‌ها جدا شدند و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

توده‌ی سلولی حاصل به صورت سوسپانسیون تهیه شد و بر روی لام نئوبار و توسط میکروسکوپ معکوس شمارش سلولی انجام گرفت. بر طبق این شمارش، سلول‌ها درون پلیت ۹۶ خانه‌ای کف صاف (ویژه کشت سلول) به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد و حجم نهایی هر چاهک با محیط کشت کامل به ۱۸۰ µl رسانده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کاملاً به سطح چاهک بچسبند. پس از طی زمان ۲۴ ساعت، تیمار سلول‌های هر چاهک با غلظت‌های مختلف ساخته شده از عصاره گل انار (µg/ml ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۵۰) و اسید اورسولیک خالص‌شده از گل انار (µM ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۰) انجام گرفت. برای هر غلظت سه چاهک و برای هر نوع تیمار سه چاهک کنترل منفی (بدون اضافه کردن عصاره و یا اسید اورسولیک) در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با $CO_2$ ۵ درصد قرار گرفتند. بعد از طی زمان انکوباسیون پلیت‌ها جهت بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره و اسید اورسولیک خالص‌شده از آن با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شدند. این آزمون بر اساس توانایی سلول‌های زنده برای کاهش نمک زرد رنگ MTT [۳- (۴ و ۵- دی‌متیل‌تیازول -۲- ایل)- ۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید] به رسوب غیرمحلول آبی رنگ فرمازان می‌باشد. جذب این ترکیب پس از حل شدن در ۵۷۰-۵۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. پس از طی زمان انکوباسیون (۴۸ و ۷۲ ساعت)، پلیت مورد نظر را از داخل انکوباتور بیرون آورده و به همه‌ی چاهک‌ها ۲۰ µl از محلول MTT اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس به آرامی محیط رویی را برداشته و ۱۰۰ µl DMSO (dimethyl solfoxide) به چاهک‌ها اضافه و پیپتاژ شد تا کریستال‌های فرمازان حل شود. میزان جذب نوری (OD) رنگ آبی فرمازان در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza reader خوانده شد. به منظور تبدیل جذب نور به درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر استفاده شد و درصد حیات سلول‌ها در مورد هر غلظت، پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد [۵۸].

$$\text{درصد بقاء} = \frac{\text{متوسط جذب نوری نمونه}}{\text{متوسط جذب نوری کنترل}} \times ۱۰۰$$

*۲.۶. آنالیز آماری*

آنالیز آماری نتایج تجربی در این تحقیق توسط نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) انجام شد.

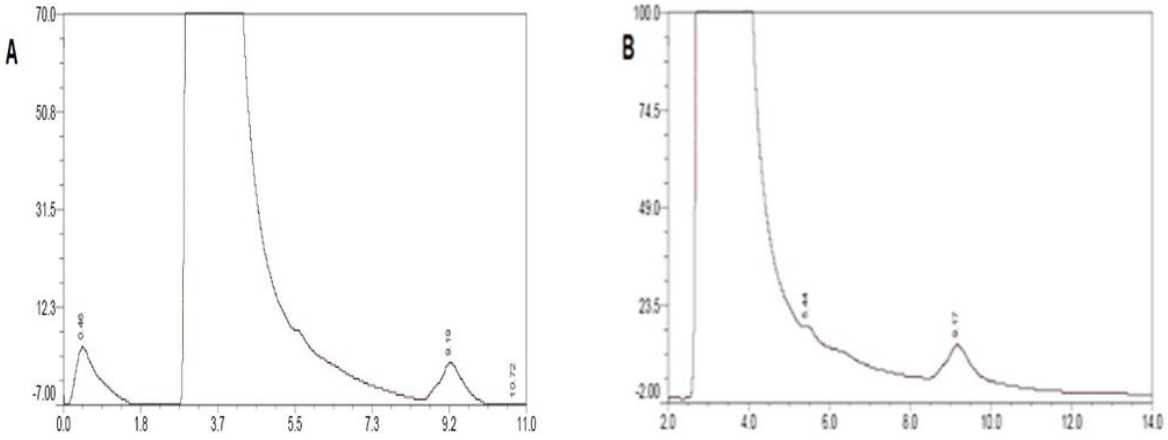
## ۳. نتایج

ستون کروماتوگرافی فلش (Flash column chromatography) یک روش جداسازی سریع، کارآمد و اقتصادی برای جداسازی محصولات طبیعی از عصاره‌های گیاهی مختلف فراهم می‌کند. این روش می‌تواند با فشار کم، سرعت جریان بالایی را ایجاد کند و تحت شرایط کروماتوگرافی مناسب، در یک زمان کوتاه، جداسازی خوبی را فراهم می‌کند. در تعیین شرایط یک تجربه کروماتوگرافی باید به ماهیت فاز مایع (حلال) مصرفی توجه کرد. بهترین حلال انتخابی، حلالی است که بیشترین فاصله را در باندها ایجاد کند. چون احتمالاً بهترین حلال در اثر تجربه به دست می‌آید، گاهی راحت‌تر است که در انتخاب حلال برای کروماتوگرافی ستونی از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) استفاده شود. در این تحقیق چندین سیستم حلال دوتایی برای جداسازی اسید اورسولیک توسط TLC آزموده شد. حلالی انتخاب شد که جداسازی خوبی را ایجاد کرد و ترکیب مورد نظر را تا Rf = ۰/۳۵ بر روی کاغذ TLC حرکت داد [۳۰، ۲۹]. بهترین جداسازی اسید اورسولیک بر روی کاغذهای TLC با حلال دی کلرومتان/متانول (۳۰:۲ V/V) به دست آمد. با استفاده از این فاز متحرک و تحت شرایط مناسب کروماتوگرافی، ۶۲ mg اسید اورسولیک از عصاره خام حاصل از ۶۰ گرم پودر خشک گل انار توسط یک بار فلش کروماتوگرافی بر روی سیلیکاژل



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

و متعاقب آن چندین بار فرآیند تبلور مجدد به دست آمد. درصد خلوص اسید اورسولیک به دست آمده، توسط دستگاه HPLC بیش از ۹۷ درصد به دست آمد (شکل ۲). زمان مصرفی برای جداسازی اسید اورسولیک در این روش تنها ۲۵ دقیقه بود.




**شکل ۲.** کروماتوگرام HPLC اسید اورسولیک. A: اسید اورسولیک استاندارد (غلظت ۴۰۰ µg/ml) B: اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار (غلظت ۴۰۰ µg/ml)

ساختار شیمیایی اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار بوسیله کروماتوگرافی گازی جفت شده با اسپکتروسکوپی جرمی (GC-MS)، طیف سنجی مادون‌قرمز (IR) و $^1$H-NMR تأیید شد. اسید اورسولیک به صورت یک جامد سفید رنگ و بی‌شکل با مشخصات زیر به دست آمد:

IR (KBr, cm$^{-1}$): 3420 (OH alcohol), 2923 (OH acid), 2850, 1649 (CO), 1465, 1385, 1099, 1038; Mass spectra: m/z: 239, 197, 183, 43; $^1$H NMR (400MHz, $CDCL_3$): δ5.40 (m, 1H, H-12), δ3.63 (m, 1H, H-3), δ2.2 (d, 1H, H-18), δ2.15-1.17 (m, 22H), δ0.79 - 1.12 (m, 21H, 7Me).

طیف‌های IR، MS و 1H-NMR مربوط به اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار به ترتیب در شکل‌های ۳، ۴ و ۵ آورده شده است. این داده‌های طیفی با داده‌های مربوط به طیف‌سنجی اسید اورسولیک تجاری و همچنین با اطلاعات سایر مقالات قبلی مطابقت دارد [۳۳-۳۱].

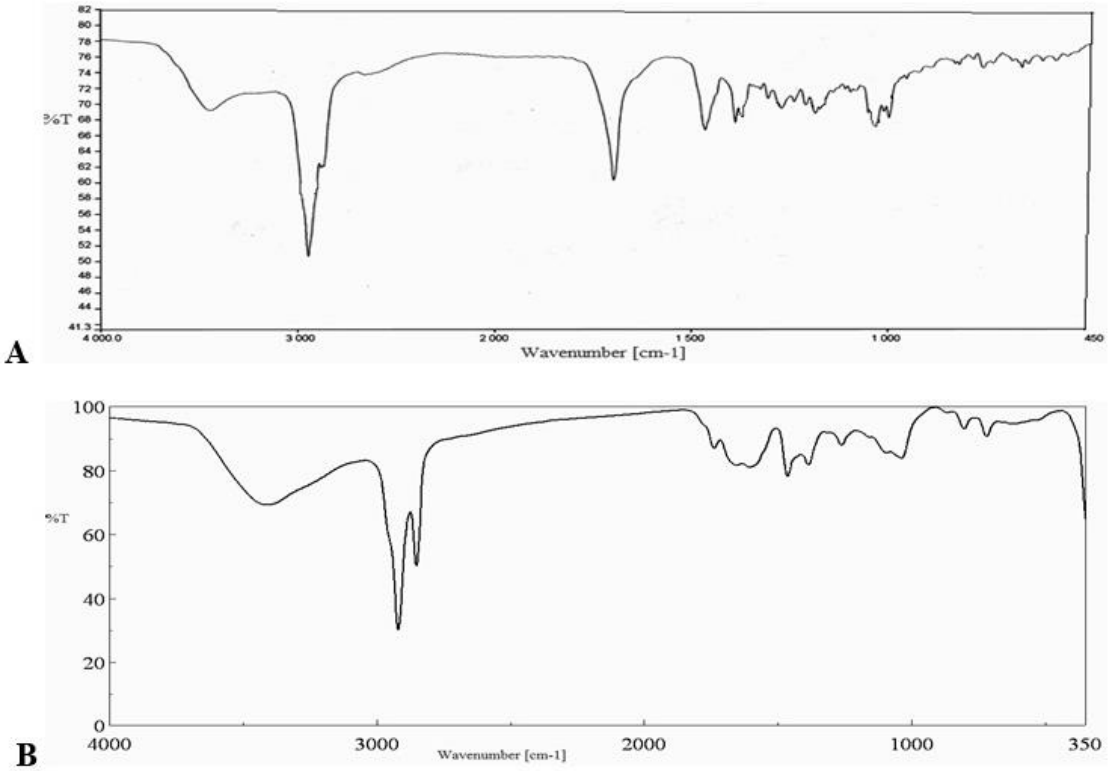
جهت بررسی فعالیت ضدسرطانی عصاره گل انار و اسید اورسولیک خالص شده از آن، سلول‌های سرطانی ملانومای موشی B16f10، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره گل انار (۵۰۰ µg/ml، ۲۵۰، ۱۵۰) و اسید اورسولیک خالص شده از گل انار (۱۰۰ µM، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۰) با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شدند.

شکل ۶ تأثیر غلظت‌های مختلف اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار را پس از طی زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بر روی رشد و تکثیر سلول‌های ملانومای موشی B16f10 نشان می‌دهد. شواهد نشان داد که اسید اورسولیک خالص‌شده یک اثر کاهشی معنی‌داری بر روی رشد و تکثیر سلول‌های ملانوما موشی پس از طی زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل منفی دارد ($P< ۰/۰۵$)، اما این اثر وابسته به غلظت نیست. در زمان ۷۲ ساعت، در غلظت‌های ۲۵ µM - ۱۰ اسید اورسولیک، یک افزایش جزئی در تکثیر سلول‌های ملانوما نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و پس از آن در غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ µM

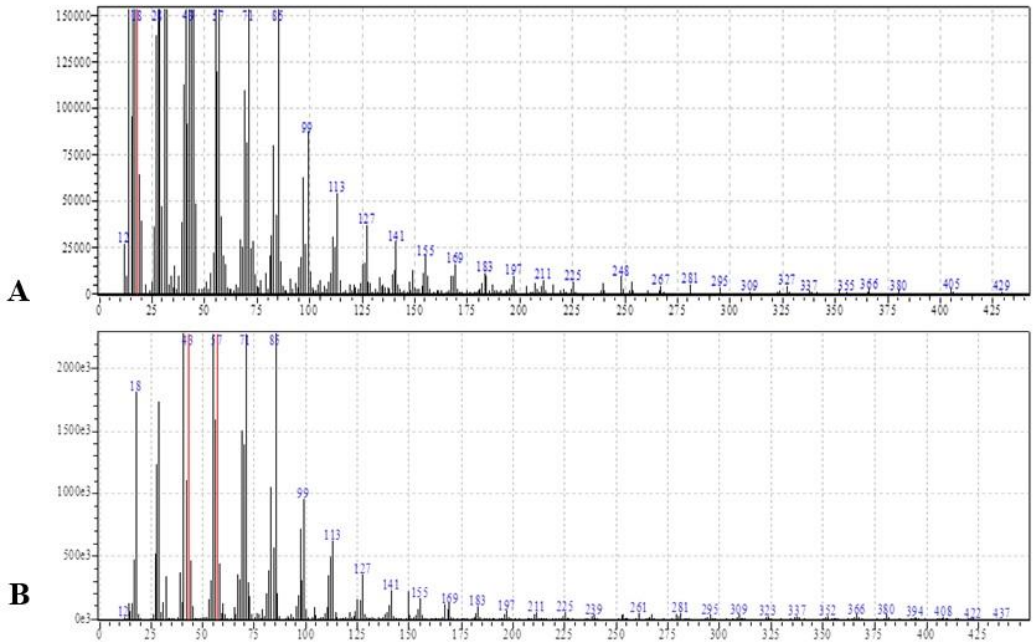


[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

اسید اورسولیک، درصد بقاء سلول‌ها روند کاهشی به خود گرفت به گونه‌ایی که از ۱۰۱ درصد به ۸۷ درصد رسید.



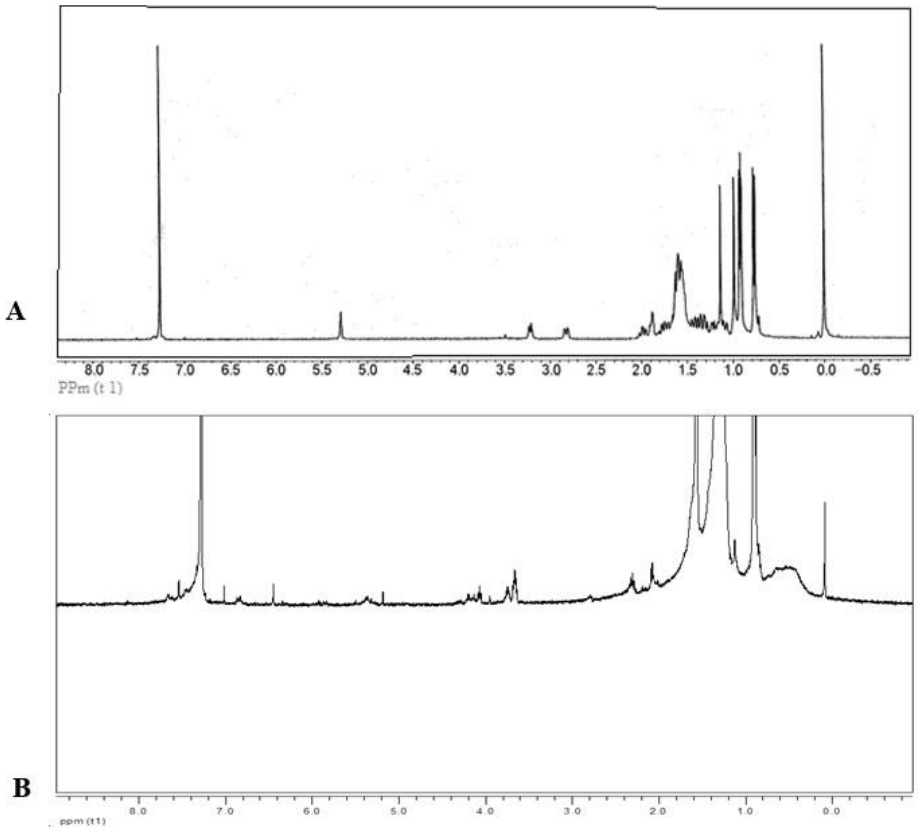

**شکل ۳** . طیف مادون قرمز (IR) اسید اورسولیک. (A) استاندارد اسید اورسولیک، (B) اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار



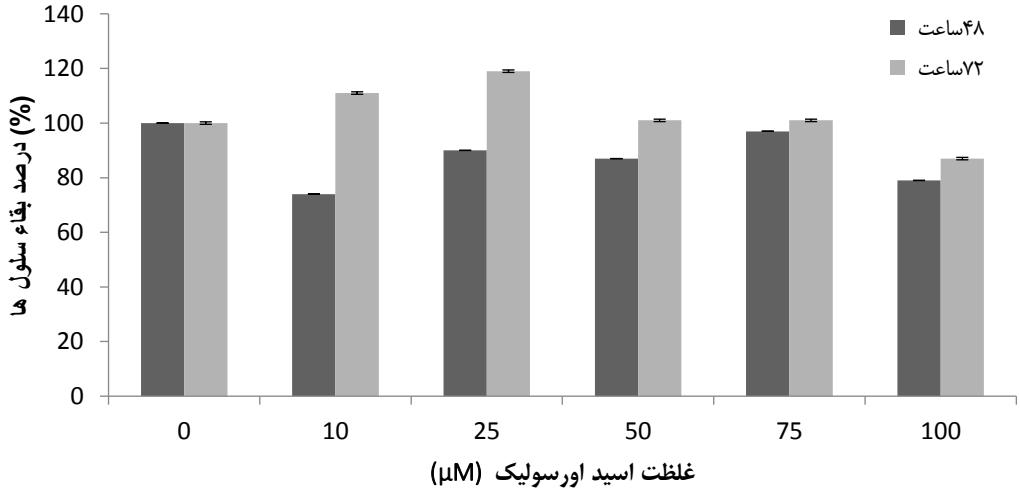

**شکل ۴.** طیف جرمی (MS) اسید اورسولیک. (A) استاندارد اسید اورسولیک، (B) اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]




**شکل ۵.** طیف **1H-NMR** اسید اورسولیک. (**A**) استاندارد اسید اورسولیک، (**B**) اسید اورسولیک خالص شده از گل‌های انار

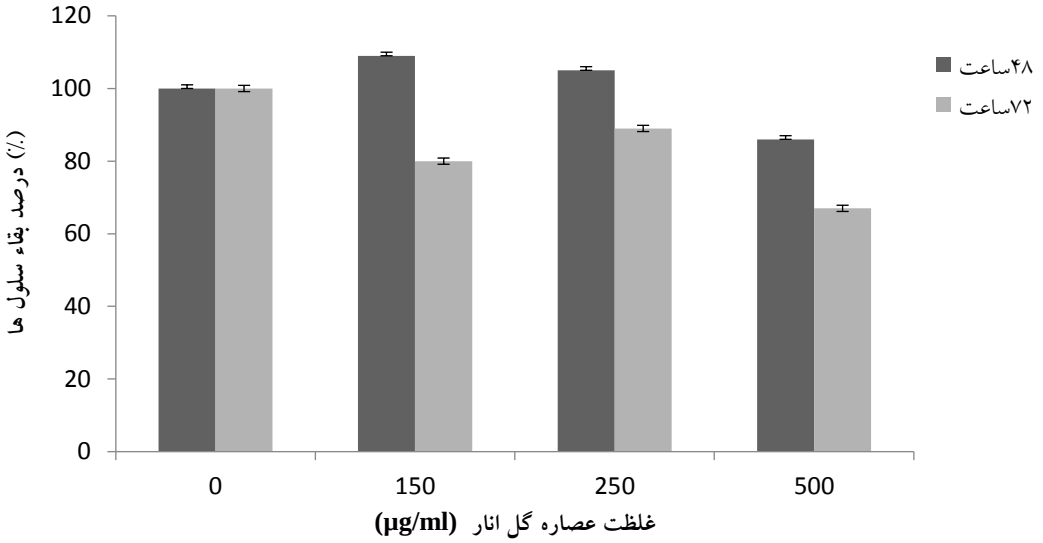



**شکل ۶.** میزان بقاء سلولی (درصد) رده ملانومای موشی B16f10 در مواجهه با غلظت‌های مختلف اسید اورسولیک خالص‌شده از گل‌های انار طی زمان‌های انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج به صورت میانگین (n=۳) ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

شکل ۷ تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل انار را پس از طی زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بر روی رشد و تکثیر سلول‌های ملانوما موشی B16f10 نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که عصاره گل انار بر روی رده سلولی ملانوما موشی دارای اثرات سایتوتوکسیک بارزی است. عصاره گل انار یک اثر مهاری به صورت وابسته به غلظت و زمان‌بر روی سرعت تکثیر سلول‌های ملانوما موشی نشان داد. در زمان ۴۸ ساعت، درصد بقاء سلول‌ها در غلظت‌های ۱۵۰ تا ۵۰۰ µg/ml عصاره، طی یک روند کاهشی از ۱۰۹ به ۱۰۵ درصد و سپس به ۸۶ درصد رسید. این روند کاهشی در رشد و تکثیر سلول‌های ملانوما نسبت به افزایش غلظت عصاره گل انار در زمان ۷۲ ساعت نیز مشاهده شد. به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره از ۱۵۰ تا ۵۰۰ µg/ml درصد بقاء سلول‌ها از ۸۰ به ۸۹ درصد و سپس ۶۷ درصد رسید.




**شکل ۷.** میزان بقاء سلولی (درصد) رده ملانومای موشی **B16f10** در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره گل انار طی زمان‌های انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج به‌صورت میانگین (**n=3**)±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

## ۴. بحث

اسید اورسولیک یکی از تری ترپنوئیدهای پنتاسیکلیک شناخته شده است که به طور گسترده در گیاهان دارویی شامل گل انار وجود دارد. در سال‌های اخیر اسید اورسولیک به علت فعالیت‌های چندجانبه‌ی ضدسرطانی خود توجه زیادی را به سمت خود جلب کرده است. گیاهان دارویی اساس و پایه تقریباً همه درمان‌های دارویی هستند و برای مدت زمان زیادی است که همچنان به عنوان یکی از محبوب‌ترین گزینه‌ها برای درمان و پیشگیری از سرطان در سرتاسر جهان مطرح می‌باشند. در طی پنجاه سال گذشته، اثر ترکیبات فیتوشیمیایی بر مهار رشد سلول‌های سرطانی به همراه درمان‌های شیمیایی یا دیگر درمان‌ها موضوع مطالعات زیادی بوده است [۳۴]. در این مطالعه اثر عصاره اتانولی گل‌های انار و همچنین اسید اورسولیک خالص‌شده از آن در مهار تکثیر سلول‌های ملانوما موشی B16f10 مورد ارزیابی قرار گرفت.

عصاره‌گیری یکی از مراحل اصلی در بازیابی و خالص‌سازی ترکیبات هدف، از گیاهان است. تکنیک‌های عصاره‌گیری سنتی از مواد گیاهی اغلب بر اساس استفاده از گرما و یا تحریک در جهت افزایش سرعت انتقال جرم به حلال می‌باشند. استخراج سنتی‌تری ترپنوئیدها توسط روش‌های غوطه‌ورسازی، هیدرودیستیلاسیون و سوکسله انجام



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

می‌شود [۳۸-۳۵]. این تکنیک‌ها اغلب کارایی کمی دارند. زمان‌بر هستند و نیاز به حجم بالایی از حلال‌های آلی دارند. در سال‌های اخیر، روش‌های استخراج جدیدی مثل عصاره‌گیری به کمک اولتراسوند و یا میکروویو، استخراج مایع با فشار بالا و عصاره‌گیری مایع فوق بحرانی [۴۱-۳۹] باعث افزایش کارایی فرآیند استخراج به همراه کاهش در حجم حلال مصرفی و کاهش در زمان فرآیند استخراج‌شده است.

در این مطالعه یک روش عصاره‌گیری با کمک امواج اولتراسوند برای استخراج اسید اورسولیک از گل‌های انار استفاده شد. Fu و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ایی نشان دادند که اتانول و کلروفرم مؤثرترین حلال‌ها برای استخراج اسید اورسولیک از گل‌های انار هستند [۱۳]. با توجه به اینکه بیشتر حلال‌های آلی شامل متانول، کلروفرم و استون سمی هستند [۴۲] بنابراین ما برای عصاره‌گیری اسید اورسولیک از گل‌های انار، اتانول را به‌عنوان حلال انتخاب کردیم. اگرچه Fan و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که حلالیت اسید اورسولیک در اتانول خالص بالاتر از حلالیت آن در اتانول مخلوط شده با آب است [۴۳]. اما حضور مقداری آب در اتانول می‌تواند فرآیند انتقال جرم را با افزایش در قطبیت حلال افزایش دهد. بنابراین ظرفیت محلول‌سازی حلال بهبود می‌یابد. همچنین وجود مقداری آب در حلال عصاره‌گیری می‌تواند با ایجاد تورم کارآمد در مواد گیاهی باعث افزایش سطح تماس حلال با مواد حل شونده شود [۴۴]. بنابراین به منظور افزایش حلالیت اسید اورسولیک، محتوای آب در حلال عصاره‌گیری باید در حد امکان کم باشد. با توجه به این مطالعات ما اتانول را به صورت ۹۰ درصد برای عصاره‌گیری اسید اورسولیک از گل‌های انار به کار بردیم. سایر پارامترهای عصاره‌گیری عبارت بودند از: نسبت حلال به ماده‌ی خشک گیاهی به صورت (ml/g) ۲۰:۱ و به دنبال آن استخراج اولتراسونیک به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۰ سانتی‌گراد.

اولتراسوند از یک طرف می‌تواند یک عملکرد مکانیکی و ایجاد سوراخ در دیواره سلولی گیاهان را در فرآیند استخراج فراهم کند که این عملکرد در شکست و تجزیه دیواره سلولی گیاهان نقش دارد به طوری که مواد تشکیل‌دهنده‌ی فعال گیاهی در حالت آزاد قرار می‌گیرند و در حلال عصاره‌گیری حل می‌شوند. از طرف دیگر، اولتراسوند حرکت مولکول‌ها را افزایش می‌دهد و باعث برخورد و الحاق سریع‌تر حلال عصاره‌گیری و مواد تشکیل‌دهنده‌ی فعال گیاهی می‌شود [۴۴].

تا به حال چندین روش برای خالص‌سازی اسید اورسولیک از عصاره‌های گیاهی مختلف شامل استفاده از حلال‌های مختلف [۳۳، ۳۲]، کروماتوگرافی ستونی سیلیکاژل [۴۶، ۴۵] و کروماتوگرافی جریان معکوس با سرعت بالا [۴۷] استفاده شده است. در این تحقیق از یک ستون فلش کروماتوگرافی جهت خالص‌سازی اسید اورسولیک از گل‌های انار استفاده شد. کروماتوگرافی ستونی فلش، که به عنوان کروماتوگرافی فشار متوسط نیز شناخته می‌شود، از چندین سال پیش به عنوان جایگزینی برای کروماتوگرافی آرام و اغلب ناکارآمد گرانشی، محبوبیت پیدا کرده است. این روش می‌تواند تحت شرایط مناسب، جداسازی خوبی را در یک زمان کوتاه، با یک سرعت جریان نسبتاً بالا و با فشار کم فراهم کند. ستون فلش کروماتوگرافی قبلاً برای خالص‌سازی بسیاری از ترکیبات استفاده شده است [۵۰-۴۸]. اما تاکنون برای خالص‌سازی اسید اورسولیک گزارش نشده است. بعد از یک بار فلش کروماتوگرافی عصاره خام حاصل از گل‌های انار بر روی سیلیکاژل، درصد خلوص اسید اورسولیک به بیش از ۹۷ درصد رسید و مقدار محصول اسید اورسولیک در این آزمایش به میزان ۰/۱ درصد پودر خشک گل انار به دست آمد.

تیمار سلول‌های ملانوما B16f10 با غلظت‌های مختلف عصاره گل انار اثرات سایتوتوکسیک بارزی را نشان داد. عصاره اتانولی گل انار یک اثر مهاری به صورت وابسته به



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

غلظت و زمان‌بر روی سرعت تکثیر سلول‌های ملانومای موشی نشان داد. در همین رابطه Orgil و همکاران (۲۰۱۴) توانایی مهار تکثیر سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 و پروستات LNCaP را توسط عصاره آبی قسمت‌های مختلف درخت انار بررسی کردند. آنها تأثیر عصاره آبی گل انار با غلظت‌های µg/ml ۵۰۰-۲۵۰-۱۵۰ بر کاهش تکثیر این رده‌های سلولی را گزارش کردند. اما هیچ‌یک از این غلظت‌ها توانایی کاهش تکثیر را تا ۵۰ درصد نداشته است [۵۱]. نتایج ما با نتایج Orgil و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد و تأییدکننده آن است.

نتایج تحقیق ما نشان داد که اسید اورسولیک (در غلظت‌های µM ۱۰۰-۷۵-۵۰-۲۵-۱۰) دارای اثرات مهاری بر رشد و تکثیر سلول‌های ملانوما B16f10 است و این اثر مهاری در ۷۲ ساعت وابسته به غلظت نیز هست. اثرات مؤثر اسید اورسولیک بر روی مهار تکثیر رده سلولی ملانومای موشی B16f10 در چند پژوهش گزارش شده است [۵۳، ۵۲، ۳]. Manu و Kuttan (۲۰۰۸) غلظت‌های µM ۵۰-۲۵-۱۰ از اسید اورسولیک را بر روی سلول‌های B16f10 غیرسمی و غلظت‌های µM ۱۰۰-۷۵ از اسید اورسولیک را به ترتیب با ۷۶ و ۱۰۰ درصد اثر سیتوتوکسیک گزارش کردند. آنها ثابت کردند که اسید اورسولیک، آپوپتوز را بوسیله فعال‌سازی بیان ژن P53 و کاسپاز ۳ ۳ و مهار فعال‌سازی bcl-2 بواسطه‌ی NF-kB در سلول‌های ملانوما B16f10 باعث می‌شود [۵۴]. Harmand و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ی خود اثر ضدتکثیری اسید اورسولیک را بر روی سلول‌های ملانوما انسانی M4Beu ثابت کردند. آنها نشان دادند که اسید اورسولیک توسط بیان بیش از حد Bax، همراه با کم شدن بیان Bcl-2 و متعاقب آن فروپاشی غشاء میتوکندریایی، باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین این مسیر آپوپتوزی توسط آبشار کاسپازی (از طریق کاسپاز -۹) که منجر به فعال‌سازی کاسپاز -۳ (عامل اصلی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی) می‌شود نیز مشخص شده است [۵۵]. Kowalczyk و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی خصوصیات پیشگیرانه‌ی چندین ترکیب شیمیایی گیاهی شامل عصاره هسته انگور، اسید الاژیک و اسید اورسولیک را بر روی مکانیسم مهار سرطان پوست در موش بررسی کردند. آنها دریافتند که اسید اورسولیک باعث کاهش قابل توجهی در ضخامت اپیدرم و درصد موش‌هایی با موتاسیون در کدون ۶۱ از انکوژن Ha-ras می‌شود [۵۶]. Tokuda و همکاران (۱۹۸۶) نیز نشان دادند که اسید اورسولیک به طور مؤثری گسترش تومور را در پوست موش مهار می‌کند و فعالیت آن با یک مهارکننده‌ی گسترش تومور شناخته‌شده به نام اسید رتینوئیک قابل قیاس است [۵۷]. نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات مشابه نشان می‌دهد که عصاره گل‌های انار و اسید اورسولیک خالص‌شده از آن می‌تواند در پیشگیری و درمان ملانوما مورد توجه باشد.

## مشارکت نویسندگان

نویسندگان ف.شریفیان و س.ع.میرجلیلی تحقیق را طراحی نموده و نمونه های گیاهی را تهیه کردند. ف.شریفیان، س.ع.میرجلیلی، م.فضیلتی، الف.پورعزیزی، س.حبیب اللهی تحقیق را انجام داده و داده ها را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. همه ی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کردند.

## تضاد منافع

هیچ تضاد منافعی وجود ندارد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه پیام‌نور برای حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

## منابع


**1.** Giblin AV and Thomas JM. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg*. 2007; 60: 32-40.

**2.** Miller AJ and Mihm MC. Melanoma. *NEJM*. 2006; 355: 51-65.

**3.** Pinon A, Limami Y, Micallef L, Cook-Moreau J, Liagre B, Delage C, Emmanuel Duval R and Simon A. A novel form of melanoma apoptosis resistance: Melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. *Exp. Cell Res*. 2011; 317: 1669-76.

**4.** Harmand PO, Duval R, Liagre B, Jayat-Vignoles C, Beneytout JL, Delage C and Simon A. Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. *Int. J. Oncol.* 2003; 23: 105-12.

**5.** Jhappan C, Noonan FP and Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003; 22: 3099-112.

**6.** Ivry GB, Ogle CA and Shim EK. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol. Surg*. 2006; 32: 481-92.

**7.** Kumar RS, Rajkapoor B and Peruma P. In vitro and in vivo anticancer activity of Indigofera cassioides Rottl. *Ex. DC. Asian Pac. J. Trop. Med*. 2011; 4: 379-85.

**8.** Dadashi S, Mousazadeh M, Emam-Djomeh Z and Mousavi SM. Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A comparative study on biochemical composition and oil physicochemical characteristics. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res*. 2013; 1(4): 351-63.

**9.** Tehranifar A, Zarei M, Nemati Z, Esfandiyari B and Vazifeshenas MR. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci. Hortic*. 2010; 126: 180-5.

**10.** Kaur G, Jabbar Z, Athar M and Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem. Toxico.* 2006; 44: 984-93.

**11.** Zhang L, Yang X, Zhang Y, Wang L and Zhang R. In vitro antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. *Food Bioprod. Process*. 2011; 8(9): 234-40.

**12.** Amjad L and Shafighi M. Evaluation of Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Content in *Punica granatum* var. *Isfahan Malas Flowers. Int. J. Agri. Crop Sci.* 2013; 5: 1133-9.

**13.** Fu Q, Zhang L, Cheng N, Jia M and Zhang Y. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers. *Food Bioprod. Process* 2014; 9(2): 321-3.

**14.** Zhang L, Fu Q and Zhang Y. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chem*. 2011; 127: 1444-9.

**15.** Rao VS, de Melo CL, Queiroz MGR, Lemos TLG, Menezes DB, Melo TS and Santos FA. Ursolic Acid, a Pentacyclic Triterpene from *Sambucus australis*, Prevents Abdominal Adiposity in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Med. Food*. 2011; 14: 1375-82.

**16.** Chen H, Gao Y, Wang A, Zhou X, Zheng Y and Zhou J. Evolution in medicinal Chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Che*. 2015; 92: 648-55.

**17.** Novotny L, Vachalkova A and Biggs D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and




[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

chemopreventive activity. Minireview. *Neoplasma*. 2001; 48: 241-6.

**18.** Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J and Nishino H. Triterpene acids from the leaves of Perilla frutescens and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. Biosci. Biotechnol. *Biochem*. 2004; 68: 85-90.

**19.** Senthil S, Chandramohan G and Pugalendi KV. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int. J. Cardiol*. 2007; 119: 131-33.

**20.** Cunha WR, deMatos GX, Souza MG, Tozatti MG, Andrade e Silva ML, Martins CH, da Silva R and Da Silva Filho AA. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of Miconia ligustroides, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharm. Biol*. 2010; 48: 166-9.

**21.** Ngouela S, Ndjakou BL, Tchamo DN, Zelefack F, Tsamo E and Connolly JD. A prenylated xanthone with antimicrobial activity from the seeds of Symphonia globulifera. *Nat. Prod. Res.* 2005; 19: 23-7.

**22.** Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S and Aggarwal BB. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase2, matrix metallo proteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res*. 2003; 63: 4375-83.

**23.** Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K and Tóthova D. Pentacyclic triterpenoic acids: New chemoprotective compounds minireview. *Neoplasma* 2004; 51: 327-33.

**24.** Ishikawa T, Donatini Rdos S, Diaz IE, Yoshida M, Bacchi EM and Kato ET. Evaluation of gastroprotective activity of Plinia edulis (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 118: 527-9.

**25.** Ikeda Y, Murakami A and Ohigashi H. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory Triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res*. 2008; 52: 26-42.

**26.** Yang YC, Wei MC, Hong SJ, Huang TC and Lee SZ. Development/optimization of a green procedure with ultrasound-assisted improved supercritical carbon dioxide to produce extracts enriched in oleanolic acid and ursolic acid from *Scutellaria barbata* D. *Don. Ind. Crop. Prod.* 2013; 49: 542-53.

**27.** Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BK and Sethi G. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett*. 2012; 320: 158-70.

**28.** Shao JW, Dai YC, Xue JP, Wang JC, Lin FP and Guo YH. In vitro and in vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. 2011; 46: 2652-61.

**29.** Still WC, Kahn M and Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem*. 1978; 43: 2923-5.

**30.** Fair JD and Kormos CM. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *J. Chromatogr. A.* 2008; 1211: 49-54.

**31.** Wu JW, Lee MH, Ho CT and Chang SS. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1982; 59: 339-45.

**32.** Gnoattoa SCB, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Galéra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P and Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from Ilex



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

paraguariensis and derivatives on aromatase inhibition. *Eur. J. Med. Chem*. 2008; 43: 1865-77.

**33.** Suhagia BN, Rathod IS, Ezhava SB and Patel JA Simple Method for the Isolation and Estimation of Ursolic acid in *Alstonia Scholaris* R. *BR. Int. J. Pharmaceut. Sci. Res*. 2013; 4: 2807-11.

**34.** Li Y, Yang F, Zheng W, Hu M, Wang J, Ma S, Deng Y, Luo Y, Ye T and Yin W. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomed. Pharmacother*. 2016; 80: 227-35.

**35.** Cardoso CAL, Vilegas W and Honda NK. Qualitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. *J. Chromatogr. A.* 1998; 808: 264-268.

**36.** Campos Ziegenbein F, Anisen HP and Konig WA. Secondary metabolites from Ganoderma lucidum and Spongiporus leucomallellus. *Phytochem*. 2006; 67: 202-11.

**37.** Janicsak G, Veres K, Kakasy AZ and Mathe I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol*. 2006; 34: 392-6.

**38.** Kalola J and Rajan M. Extraction and TLC Desitometric Determination of Triterpenoid Acids (Arjungenin, Arjunolic Acid) from *Terminalia arjuna* Stem Bark Without Interference of Tannins. *Chromatographia* 2006; 63: 475-81.

**39.** Luque de Castro MD and Luque-Garc JL. Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment, Elsevier, Amsterdam, 2002.

**40.** Henry MC, Yonker CR. Supercritical fluid chromatography, pressurized liquid extraction, and supercritical fluid extraction. *Anal. Chem*. 2006; 78: 3909-16.

**41.** Zhao J, Zhang XQ, Li SP, Yang FQ, Wang YT and Ye WC. Quality evaluation of Ganoderma through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci*. 2009; 29: 2609-15.

**42.** Bernatoniene J, Cizauskaite U, Ivanauskas L, Jakstas V, Kalveniene Z and Kopustinskiene DM. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Ind. Crop. Prod*. 2016; 84: 72-9.

**43.** Fan JP, Kong T, Zhang XH, Zhang L, Tong SH, Tian ZY and Zhu JH. Solubilities of oleanolic acid and ursolic acid in (ethanol + water) mixed solvents from T = (292.2 to 328.2) K. *J. Chem. Thermodyn.* 2012; 47: 372-5.

**44.** Mandal V and Mandal SC. Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: oleanolic acid. Biochem. *Eng. J*. 2010; 5: 63-70.

**45.** Mazumder K, Siwu ERO, Nozaki S, Watanabe Y, Tanaka K and Fukase K. Ursolic acid derivatives from Bangladeshi medicinal plant, *Saurauja roxburghii*: Isolation and cytotoxic activity against A431 and C6 glioma cell lines. *Phytochem. Lett*. 2011; 4(3): 287-91.

**46.** Machado DG, Neis VB, Balen GO, Colla A, Cunha MP, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Prediger RD and Rodrigues ALS. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the



[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

dopaminergic system. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2012; 103: 204-11.
**47.** Frighettoa RTS, Welendorf RM, Nigro EN, Frighetto N and Siani AC. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chem*. 2008; 106: 767-71.
**48.** Yu XX, Wang QW, Xu XJ, Lv WJ, Zhao MQ and Liang ZK. Preparative isolation of Heteroclitin D from Kadsurae Caulis using normal-phase flash chromatography. *J. Pharm. Anal*. 2013; 3: 456-459.
**49.** Wu YJ, Shi QY, Lei HL, Jin Y, Liu XS and Luan LJ. Simple and efficient preparation of 3, 6′-disinapoylsucrose from Polygalae Radix via column chromatographic extraction and reversed-phase flash chromatography. *Sep. Purif. Technol*. 2014; 135: 7-13.
**50.** Huang YY, Liu XF, Liu JZ, Li L, Cui Q, Wang LT, Fu YJ and Luo M. Separation and purification of indigotin and indirubin from *Folium isatidis* extracts using a fast and efficient macroporous resin column followed reversed phase flash chromatography. *J. Taiwan. Inst. Chem. E*. 2016; 67: 61-8.
**51.** Orgil O, Schwartz E, Baruch L, Matityahu I, Mahajna J and Amir R. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT-Food Sci. Technol*. 2014; 58: 571-7.
**52.** Es-saady D, Simon A, Ollier M, Maurizis JC, Chulia AJ and Delage C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Lett*. 1996; 106: 193-7.
**53.** Ye Y, Chou GX, Wang H, Chu JH and Yu ZL. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. *Phytomedicine* 2010; 18: 32-5.
**54.** Manu KA and Kuttan G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-κB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *Int. Immunopharmacol*. 2008; 8: 974-81.
**55.** Harmand PO, Duval R, Delage C and Simon A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int. J. Cancer*. 2005; 114: 1-11.
**56.** Kowalczyk MC, Walaszek Z, Kowalczyk P, Kinjo T, Hanausek M and Slaga TJ. Differential effects of several phytochemicals and their derivatives on murine keratinocytes in vitro and in vivo: implications for skin cancer prevention. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1008-15.
**57.** Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K and Ito Y. Inhibitory effects of Ursolic acid on skin tumor promotion by 12O-Tetradecaniylphorbol-13-Acetate. *Cancer Let*. 1986; 33: 279-85.
**58.** Zaker F. Anti tumoral and differentiation effects of alkaloids of harmine and harmaline on leukaemic cells treated with atra and g-csf. *Razi Journal of Medical Sciences* 2004; 10 (38): 869-75.

How to cite this article: Sharifiyan F, Mirjalili SA, Fazilati M, Poorazizi E, Habibollahi S. Cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and isolated ursolic acid on B16f10 melanoma cells. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 177-191.
doi: 10.29252/jmp.19.74.177

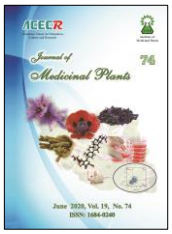
[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]

*J. Med. Plants* 2020; 19(74): 177-191

Institute of Medicinal Plants

**Journal of Medicinal Plants**

Journal homepage: www.jmp.ir



**Research Article**

# Cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and isolated ursolic acid on B16f10 melanoma cells

**Fatemeh Sharifiyan[1], Seyed Abbas Mirjalili[2,*], Mohammad Fazilati[2], Elahe Poorazizi[3], Saeed Habibollahi[4]**

[1] *Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Iran*
[2] *Imam Khomeini Higher Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran*
[3] *Department of Biochemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran*
[4] *Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), Iran*

ARTICLE INFO

*Keywords:*
Isolation of Ursolic acid
Melanoma
MTT
Pomegranate flower

ABSTRACT

**Background:** Melanoma is the most serious form of skin cancer and it has the highest rate of growth among different types of cancers. Ursolic acid (UA), a natural pentacyclic triterpenoid, is a major bioactive compound in several traditional medicinal plants including pomegranate (*Punica granatum* L.) flower. UA has very important biological and pharmacological functions. **Objective:** In this study, cytotoxic effects of ethanol extract of pomegranate flowers and isolated UA against B16f10 mouse melanoma cells were investigated. **Methods:** The isolation of UA from pomegranate flowers was done by using ultrasound-assisted extraction followed by normal-phase flash chromatography. The chemical structure of isolated UA was identified by GC-MS, IR and $^{1}$H-NMR spectra. The ethanol extract of pomegranate flowers and isolated UA were then tested for the cytotoxicity against B16f10 mouse melanoma cell lines. Cell viability was determined using MTT assay. **Results:** Ursolic acid was successfully isolated from pomegranate flowers by using normal-phase flash chromatography. After one flash chromatography run, the purity of UA reached more than 97% with a total yield of 0.1 % of dried pomegranate flower powder. Treatment of B16f10 cells with ethanol extract of pomegranate flowers and isolated UA exhibited significant anti-proliferative activity after incubation for 48 and 72 hours. It was observed for pomegranate flower extract in a concentration and time dependent manner. **Conclusion:** The results suggested that pomegranate flower extract and isolated UA can be encouraging compounds in the prevention and treatment of melanoma.

*Abbreviations:* UA, Ursolic acid; NMR, Nuclear magnetic resonance; TLC, Thin layer chromatography; HPLC, High performance liquid chromatography; GC-MS, Gas chromatography-mass spectrometry; IR, Infrared.

* Corresponding author: a.mirjalili@areeo.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.74.177
Received 29 August 2018; Received in revised form 11 March 2019; Accepted 6 April 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[ Downloaded from jmp.ir on 2026-11-03 ]
[ DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.74.9.7 ]
[ DOI: 10.29252/jmp.19.74.177 ]