

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۸، ۱۴۸-۱۳۷

بررسی اثر آنتی اکسیدانی چهارگونه گیاهی زولنگ، چوچاخ، تلکا و خرمندی در مدل برون تن

سید محمد نبوی^۱، سیدفاضل نبوی^۱، محمدعلی ابراهیمزاده^۲، بهمن اسلامی^۳

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۱/۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۳/۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: تلکا، خرمندی، چوچاخ و زولنگ از جمله گیاهان بومی ناحیه شمال ایران می باشند که جایگاه ویژه ای در سبد غذایی مردم منطقه دارند. میوه خرمندی و تلکا مصرف خوراکی دارد و برگ چوچاخ و زولنگ نیز به عنوان سبزی در تهیه غذاهای محلی به کار می رود. هدف این مطالعه سنجش اثر آنتی اکسیدانی عصاره متانولی با بهره گیری از شش روش متفاوت برون تنی بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی اثر آنتی اکسیدانی با بهره گیری از روش های به دام اندازی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل، نیتریک اکساید، هیدروژن پراکسید، لینولئیک اسید، قدرت احیاء کنندگی و شلاته کنندگی یون آهن مورد مطالعه قرار گرفت. محتوای فنلی و فلاونوئیدی با بهره گیری از روش رنگ سنجی فولین سیوکالتیو و روش آلومینیوم کلراید سنجیده شد.

یافته ها: غلظت مهار ۵۰٪ در روش به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل بدین ترتیب بود: عصاره چوچاخ < عصاره زولنگ < عصاره خرمندی < عصاره تلکا. عصاره های چوچاخ و زولنگ فعالیت بهتری را در مدل به دام اندازی نیتریک اکساید و هم چنین در مدل احیا آهن از خود نشان دادند که قابل مقایسه با ویتامین ث بود ($p < 0.05$).
نتیجه گیری: عصاره های متانولی گیاه زولنگ و برگ چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر نمونه های مورد مطالعه نشان دادند که احتمالاً ناشی از محتوای بالای فنل و فلاونوئید موجود در آنها بوده است.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، چوچاخ، زولنگ، تلکا، خرمندی

۱- محقق، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- (نویسنده مسؤول) دانشیار گروه آموزشی شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تلفن: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۱، دورنگار: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۴، پست الکترونیکی: zedeh20@yahoo.com

۳- استادیار گروه آموزشی سیستماتیک گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر

مقدمه

مصرف آنتی اکسیدانت های طبیعی هم چون میوه ها و سبزی های موجود در رژیم غذایی، نقش مثبتی را در حفظ وضعیت سلامت بدن انسان ایفا می کند [۱]. تولید منظم و کنترل شده اکسیژن فعال موجب پایداری هموستازی اکسایش- کاهش می گردد که این امری ضروری برای حفظ سلامت فیزیولوژیکی ارگانیسم های زنده است [۲]. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم توازن میان تولید اکسیژن فعال و خنثی شدن آن توسط سازوکارهای آنتی اکسیدانی، عامل ایجاد بسیاری از بیماری ها نظیر پیری، انواع سرطان و بی نظمی های نورو دژنراتیو هم چون آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می باشد [۳]. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی برای جلوگیری از فرآیندهای آسیبزا ناشی از تولید بیش از حد اکسیژن فعال و پیشگیری از ابتلا به بیماری های فوق، مهم و حیاتی است [۴]. ظرفیت آنتی اکسیدانی به عنوان پارامتری برای سنجش ارزش مواد غذایی مختلف، گیاهان و ترکیبات آن ها به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد. به تازگی و پس از اثبات سرطانزا بودن آنتی اکسیدان های سنتزی [۵]، جستجو برای یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی اهمیت بسیار زیادی یافته است. بخش فنلی و فلاونوئیدی گیاهان، آنتی اکسیدان های قوی در محیط برون تن هستند [۶]. فلاونوئیدها هر چند که ترکیباتی مغذی نیستند ولی تأثیر مثبتی بر حفظ سلامتی بدن دارند. پژوهش های بسیار زیادی درباره فعالیت آنتی اکسیدانی، به دام اندازی رادیکال آزاد، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهشی این ترکیبات صورت گرفته است. مهم ترین خصلت فلاونوئیدها نقش آن ها در پیشگیری از بیماری های قلبی عروقی است [۷]. جنس بوقناق عضوی از خانواده چتریان است که

نزدیک به ۹ گونه در سرتاسر ایران دارد [۸]. اعضا این جنس دارای محتوای بالایی از استیلن، فلاونوئیدها، کومارین ها و تریترین ساپونین ها هستند [۹]. در طب سنتی گونه های متفاوت از این جنس برای درمان دردهای مزمن، ادم، التهاب مجاری تنفسی، عفونت های ادراری، مار گزیدگی و التیام زخم ها استفاده می شوند [۱۰]. چوچاخ (*Eryngium caucasicum*) یکی از مهم ترین گونه های جنس بوقناق در شمال ایران است که از آن به عنوان سبزی صحرایی استفاده می شود [۱۱]. جنس زولنگ عضوی از خانواده چتریان است و در ایران گونه ای چند ساله به نام *Froriepia subpinnata* دارد که در مناطق شمالی ایران می روید. در اوایل بهار مردم منطقه از برگ آن که اغلب گسترده روی زمین است به عنوان سبزی صحرایی استفاده می کنند [۱۲]. جنس گلابی عضوی از تیره گل سرخ است که ۱۱ گونه درختی و درختچه ای خودرو در ایران دارد. تلکا *Pyrus boissieriana* به طور گسترده ای در جنگل های شمال کشور می روید و میوه آن مصرف خوراکی دارد [۸]. جنس خرمنندی عضوی از خانواده *Ebenaceae* است که یک گونه خودرو جنگلی به نام *Diospyros lotus* دارد که به فراوانی در جنگل های شمال می روید و میوه اش مصرف خوراکی دارد [۸]. با توجه به فراوانی بسیار زیاد و کاربرد این گیاهان در غذاهای بومی و سنتی، این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاهان مذکور با بهره گیری از شش روش متفاوت صورت گرفت.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی: فروزین، دی فنیل پیکریل هیدرازیل، تری کلرو استیک اسید، لینولئیک اسید، پتاسیم فری سیانید از شرکت سیگما و بوتیل هیدروکسی آنیسول،

ویتامین ث، سولفانیل آمید، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، هیدروژن پراکساید و کلرید آهن (III) از شرکت مرک تهیه شد. سایر ترکیبات و حلال ها نیز با خلوص آزمایشگاهی خریداری شدند.

جمع آوری گیاه و عصاره گیری: مطالعه حاضر به شکل تجربی انجام شد. بدین منظور اندام هوایی گیاه زولنگ و برگ گیاه چوپاخ قبل از مرحله گل دهی در فروردین ۸۶ و میوه تلکا و خرمندی در اواخر پاییز ۱۳۸۶ از منطقه خزرآباد ساری (روستای پنبه چوله) با تأیید دکتر بهمن اسلامی تهیه و جمع آوری شد. بخش های گیاهان در سایه در مجاورت هوا خشک و سپس پودر شدند. به منظور عصاره گیری از متانول استفاده شد. ۲۰۰ گرم از پودر خشک شده هر گیاه با ۲ لیتر متانول مخلوط شده و پس از ۲۴ ساعت صاف گردید. عمل استخراج در هر مورد ۳ بار تکرار شد. حلال ها در خلاء تبخیر شدند.

اندازه گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدهای عصاره ها: محتوای تام فنلی با استفاده از واکنشگر فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال مخلوط شده، پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب مخلوط ۲ ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Double Beam, Perkin Elmer, USA) در مقابل بلانک قرائت شد. اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. محتوای تام فنلی بر اساس میزان معادل «میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره» گزارش شد [۱۳]. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش

گردید. برای سنجش میزان فلاونوئید، از معرف آلومینیم کلرید استفاده شد. به ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی گرم کوئرتستین در گرم عصاره» گزارش گردید [۱۳]. آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن ها گزارش شد.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد: رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد به کار رفت [۱۴]. غلظت های مختلف از هر عصاره با هم حجم خود از محلول متانولی دی فنیل پیکریل هیدرازیل (۱۰۰ میکرو مولار) مخلوط شده و پس از هم زدن، به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. جذب مخلوط در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش گردید. بر اساس اطلاعات حاصل، غلظت مهار عصاره از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت عصاره به دست آمد. ویتامین ث، کوئرتستین و بوتیل هیدروکسی آنیسول به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد.

بررسی قدرت احیاء کنندگی: احیاء آهن (III) اغلب به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون دهی به کار می رود. این مساله سازوکار مهمی را در فرآیند اکسیداسیون ترکیبات فنلی تشکیل می دهد [۱۵]. اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی عصاره ها با روش Yen و Chen انجام شد

[۱۶]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۸۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در آب با ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH = ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۰/۱ مخلوط شد. مجموعه در دمای ۵۰ درجه برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۲/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به عنوان متوقف کننده واکنش، مجموعه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۲/۵ میلی لیتر از محلول بالای با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول کلرید آهن ۰/۱٪ مخلوط شده و آن گاه جذب مجموعه در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن ها گزارش گردید. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاء کنندگی (آنتی اکسیدانی) می باشد. ویتامین ث به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد.

فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید:

نیتریک اکساید دارای کارکردهای سلولی فراوانی از جمله تنظیم رشد سلول و چرخه سلولی، تمایز، آپاپتوزیس و همچنین نقش های فیزیولوژیکی بسیاری هم چون تنظیم فشار خون، لخته شدن خون، انعطاف سیناپسی می باشد. بسیاری از بیماری ها از جمله انواع سوختگی، عفونت ها و آسیب های کبدی منجر به تولید بیش از حد و غیرطبیعی نیتریک اکساید می گردند از این رو حذف نیتریک اکساید اضافه، اثرات سودمندی در حفظ سلامت بدن دارد [۱۷]. یکی از راه کارهای مهم برای کاستن از تولید بیش از حد نیتریک اکساید، بهره گیری از مهارکننده های نیتریک اکساید است. کوئرستین یک فلاونوئید طبیعی است که به منظور مهار نیتریک اکساید استفاده می گردد اما اثر سرطان زایی آن گزارش شده است [۱۸]. از این رو جستجو

برای یافتن منابع امن تر با منشأ خوراکی افزایش یافته است. این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد واکنش شده و یون نیتريت تولید می نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می گیرد. به دام اندازی نیتریک اکساید با رقابت نمودن با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتريت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی مولار) در بافر فسفات با غلظت های مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند مخلوط گردید. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره گیاه (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان کنترل به کار گرفته شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱٪، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱٪ در اسید فسفریک ۲٪) اضافه شد. جذب مخلوط در طول موج ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن ها گزارش گردید. کوئرستین به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد [۱۴].

فعالیت شلاته کنندگی آهن (II): غذاها عموماً حاوی فلزات واسطه می باشند و یا در حین فرآیند تولید به آن آلوده می شوند. عناصر واسطه دو ظرفیتی نقش مهمی را به عنوان کاتالیزور در فرآیندهای اکسیداتیو ایفا می کنند که منجر به تشکیل رادیکال های هیدروکسیل و واکنش های تخریبی هیدروپراکساید از طریق پدیده فنتون می شوند [۱۴]. این مراحل می تواند با شلاته شدن یون آهن به تأخیر افتاده یا غیرفعال گردد. اندازه گیری قدرت

شلاته‌کنندگی آهن با روش Diniz انجام شد [۱۹]. به ۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۰/۲-۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن (II) و ۱ میلی‌لیتر از محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شده و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن - فروزین، با کمک فرمول:

$$\times 100 = \frac{\text{جذب عصاره} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب عصاره}}$$

محاسبه گردید. EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) به عنوان کنترل به کار رفت و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بر حسب اکی والان Na_2EDTA در گرم عصاره بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Feric Thiocyanate) FTC: چربی‌های غشاء غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که آن‌ها را مستعد شرکت در فرآیندهای اکسیداتیو می‌نماید. در این خصوص به ویژه می‌توان به اسید لینولئیک و اسید آراشیدونیک اشاره نمود که هدف پراکسیده شدن چربی‌ها می‌باشند [۲۰]. مهار پراکسیده شدن چربی‌ها به کمک آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است به علت فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد باشد. یون سوپراکسید به طور غیرمستقیم آغازگر پراکسیده شدن چربی‌ها است زیرا آنیون سوپر اکسید به عنوان پیش ساز اکسیژن نوزاد و رادیکال هیدروکسیل عمل می‌کند. رادیکال‌های هیدروکسیل موجب کاهش اتم‌های هیدروژن از غشاء چربی می‌گردند. این اتم‌ها منجر به پراکسیده شدن چربی‌ها می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در مقابل اکسیداسیون اسیدلینولئیک با روش FTC مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. به ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره (با غلظت

۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در ۴ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه، ۱/۴ میلی‌لیتر محلول اسید لینولئیک (۰/۲/۵۱) حجمی/حجمی در اتانول مطلق اضافه گردید. سپس ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷) و ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه شد. مجموعه در لوله درب‌دار قرار داده شد و در تاریکی در دمای ۴۰ درجه نگهداری گردید. به ۰/۱ میلی‌لیتر از این محلول ۹/۷ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درجه و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آمونیوم تیو سیانات ۳۰ درصد وزنی/حجمی، اضافه شد. ۳ دقیقه پس از افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن (II) در اسید کلریدریک ۳/۵٪، جذب مجموعه در طول موج ۵۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شده و بر این اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به شکل درصد مهار) بر مبنای فرمول زیر محاسبه شد.

$[(\text{افزایش جذب کنترل} / \text{افزایش جذب نمونه}) - 1] \times 100$ عمل سنجش هر ۲۴ ساعت، تا روزی که جذب کنترل به حداکثر مقدار خود برسد انجام پذیرفت. بر اساس اطلاعات به دست آمده، غلظت مهار ۵۰٪ عصاره‌ها محاسبه شد. ویتامین ث و بوتیل هیدروکسی آنیسول به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه استفاده شدند.

به دام‌اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید: توانایی عصاره‌ها در به دام‌اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید بر طبق روش Ruch تعیین شد [۲۱]. محلول ۴۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در بافر فسفات (pH=۷/۴) تهیه گردید. غلظت هیدروژن پراکسید به وسیله سنجش میزان جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. عصاره‌ها (در غلظت ۱-۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در متانول به ۰/۶ میلی‌لیتر محلول ۴۰ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید اضافه می‌شود. پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۲۳۰

نانومتر در مقابل بلانک (شامل بافر فسفات بدون هیدروژن پراکسید) قرائت شد. درصد مهار هیدروژن پراکسید توسط عصاره‌ها و ترکیبات استاندارد بر طبق معادله زیر به دست می‌آید:

$$\text{جذب عصاره} - \text{جذب کنترل} \times 100 = \text{جذب عصاره}$$

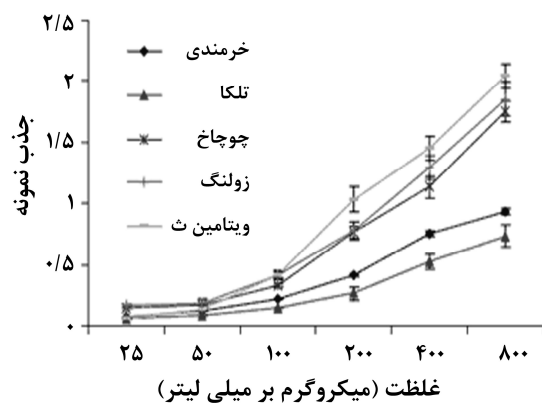
از کوئرستین و ویتامین ث به عنوان استاندارد استفاده شد. **آنالیز آماری:** تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر غلظت مهار ۵۰٪ از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید: محتوای تام فنلی با روش فولین سیوکالتیو به صورت اکی‌والان گالیک‌اسید در گرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد محاسبه شد (جدول ۱). محتوای فلاونوئید نیز به صورت اکی‌والان میلی گرم کوئرستین در گرم پودر عصاره‌ها گزارش شد (جدول ۱). عصاره زولنگ به طور قابل ملاحظه‌ای دارای مقادیر بالاتری از فنل تام و فلاونوئید نسبت به سایر عصاره‌ها بود. فنل‌ها و ترکیبات پلی فنلی، مانند فلاونوئیدها، به طور گسترده در محصولات غذایی یافت می‌شوند و نشان داده شده که فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارند [۲۲]. میزان فنل تام و فلاونوئید در این تحقیق شاید فعالیت آنتی اکسیدانی موجود در عصاره‌های تهیه شده از گیاهان را توجیه نماید.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد: مدل به دام اندازی رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل به طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۳]. در این تحقیق مشخص شد که فعالیت به دام اندازی رادیکال در تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظت مهار ۵۰٪ (IC_{50}) عصاره‌ها و نیز ویتامین ث، کوئرستین و بوتیل هیدروکسی آنیسول به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در جدول ۱ موجود می‌باشد.

قدرت احیاء کنندگی: نمودار ۱ منحنی غلظت- پاسخ را در عصاره‌ها نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که قدرت احیاء کنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های متفاوت در قدرت احیاء کنندگی وجود داشت ($p < 0.001$).



نمودار ۱- قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های متانولی: افزایش در جذب نمونه‌ها بیان گر قدرت احیاء کنندگی می‌باشد

عصاره‌های زولنگ و چوچاخ قدرت احیاء کنندگی بهتری نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان دادند. اثر این عصاره‌ها قابل مقایسه با ویتامین ث بود ($p < 0.05$). از آن جا که قابلیت احیاء کنندگی عصاره‌های زولنگ و چوچاخ بسیار بالا بود می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها با

کمک اهداء الکترون موجب پایان واکنش‌های زنجیره‌ای می‌گردند.

سنجش میزان فعالیت شلاته کنندگی آهن (II): نتایج نشان داد که تمام عصاره‌ها فعالیت ضعیف اتصال به آهن را دارا می‌باشند. غلظت مهار ۵۰٪ برای شلاته کنندگی آهن (II) برای عصاره‌های متانولی خرمندی و تلکا به

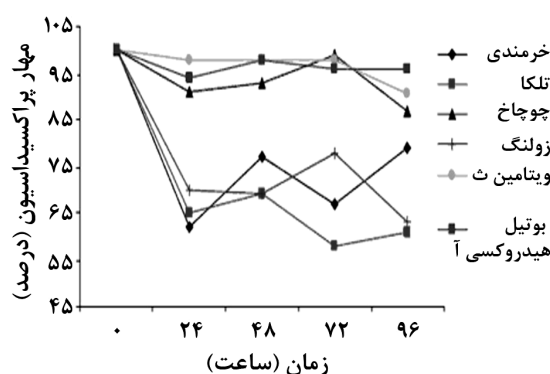
ترتیب 0.04 ± 0.93 و 0.19 ± 0.38 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. عصاره زولنگ و عصاره چوچاخ به ترتیب ۱۳٪ و ۴۲٪ بازدارندگی را در غلظت ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر از خود نشان دادند. اتیلندی آمین تتر استیک اسید فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد ($IC_{50} = 18$ میکروگرم بر میلی لیتر).

جدول ۱- اثر به دام اندازی نیتریک اکساید و دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و نیز محتوای تام فنل و فلاونوئید عصاره‌ها

نمونه	اثر به دام اندازی نیتریک اکساید IC_{50} (میلی گرم بر میلی لیتر)	فعالیت به دام اندازی DPPH IC_{50} (میکروگرم بر میلی لیتر)	محتوای تام فنلی ^۱	محتوای فلاونوئید ^۲
میوه خرمندی	۵٪ مهار کنندگی در غلظت ۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر	1450 ± 30	10.2 ± 0.9	2.1 ± 0.5
میوه تلکا	0.85 ± 0.17	3000 ± 40	15.8 ± 0.19	3.6 ± 0.07
اندام هوایی زولنگ	0.41 ± 0.11	420 ± 30	75.7 ± 0.24	35.2 ± 0.26
برگ چوچاخ	0.27 ± 0.008	270 ± 20	62.3 ± 0.21	25.3 ± 0.19
کوئرستین	0.17	5.28 ± 0.43		
ویتامین ث		5.05 ± 0.12		
بوتیل هیدروکسی آنیسول		53.96 ± 2.13		

۱- اکی والان میلی گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره

۲- اکی والان میلی گرم کوئرستین در گرم پودر عصاره



نمودار ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی (لینولئیک اسید) عصاره‌ها در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر

به دام اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید: عصاره‌ها فعالیت وابسته به غلظت را در به دام اندازی رادیکال

فعالیت آنتی اکسیدانی (لینولئیک اسید): نمودار ۲ فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها را در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر نشان می‌دهد. واکنش مهار پراکسیداسیون عصاره چوچاخ از ۹۳٪ (در ۲۴ ساعت) تا ۹۹٪ (در ساعت ۷۲) به دست آمد. عصاره خرمندی، تلکا و زولنگ فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیفی را از خود نشان دادند. اختلاف معنی داری بین فعالیت این عصاره‌ها وجود داشت ($p < 0.001$). عصاره چوچاخ الگوی همانند ویتامین ث در زمان‌های متفاوت انکوباسیون از خود نشان داد ($p < 0.05$).

هیدروژن پراکسید از خود نشان دادند. غلظت مهار ۵۰٪ در به دام اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید به این ترتیب بود: میوه تلکا ($0/17 \pm 0/01$) < عصاره زولنگ ($0/81 \pm 0/03$) < میوه خرمندی ($1/01 \pm 0/08$) < عصاره چوچاخ ($3/1 \pm 0/07$) میلی گرم بر میلی لیتر. غلظت مهار ۵۰٪ برای ویتامین ث و کوئرستین به ترتیب $21/4 \pm 0/12$ و $52 \pm 11/3$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. گرچه هیدروژن پراکسید به خودی خود خیلی واکنش پذیر نیست اما با افزایش رادیکال هیدروکسیل در سلول باعث ایجاد سایتوتوکسیسیتی می گردد. بنابراین حذف هیدروژن پراکسید در سیستم های غذایی بسیار پر اهمیت است [۲۱].

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده میزان فنل و فلاونوئید در گیاه زولنگ بیش از سایر عصاره های مورد آزمایش بود. رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرآیندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیباتی که چنین قابلیت دارند به عنوان آنتی اکسیدان مطرح می گردند. در این روش عصاره چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره ها از خود نشان داد. بر پایه IC_{50} به دست آمده، عصاره چوچاخ بیش از ۱۱ برابر فعالیت بهتری را نسبت به عصاره میوه تلکا از خود ارائه داد. سنجش قدرت احیاء کنندگی (آنتی اکسیدان) در نمونه ها، ناشی از احیاء آهن (III) به آهن (II) با اهداء الکترون می باشد. میزان کمپلکس آهن با اندازه گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاء کنندگی می باشد. بر اساس

نتایج به دست آمده عصاره های زولنگ و چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره ها از خود نشان دادند که کاملاً قابل مقایسه با ویتامین ث بود ($p < 0/05$). این مطلب حاکی از آن است که برای رسیدن به یک قدرت احیاء کنندگی، غلظت مورد نیاز از این عصاره ها معادل همان غلظت از ویتامین ث است. از آن جا که قابلیت احیاء کنندگی عصاره چوچاخ و زولنگ بسیار بالا بود می توان نتیجه گرفت که این عصاره ها با کمک اهدا الکترون موجب ختم واکنش های زنجیره ای می شوند. علاوه بر اکسیژن فعال، نیتریک اکساید در حالات پاتولوژیک دیگر مانند التهاب و سرطان نیز نقش دارد. گیاه یا محصولات گیاهی که بتوانند با تشکیل نیتریک اکساید مقابله کنند می توانند به عنوان یک جایگاه در مهار بیماری مورد توجه قرار گیرند. علاوه بر آن فعالیت به دام اندازی این ترکیب می تواند برای توقف در واکنش های زنجیره ای ناشی از تولید بیش از حد نیتریک اکساید در سیستم سلامت انسان به کار گرفته شود [۲۴]. عصاره چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره ها از خود نشان داد که خود توجیهی بر اثر ضد التهابی این گیاه است [۱۰]. عناصر واسطه، مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکال های آزاد از پراکسیدها را براساس واکنش های فنتون دارا می باشند که می تواند موجب بیماری های قلبی عروقی در انسان گردد [۲۵]. از آن جا که آهن (II) می تواند موجب تولید اکسی رادیکال ها و پراکسیده شدن چربی ها شود، کاهش غلظت آن در واکنش های فنتون به نحوی ایجاد نوعی حفاظ در مقابل تخریب اکسیداتیو خواهد بود. اندازه گیری قدرت شلاته کنندگی آهن (II) بر مبنای روش Diniz صورت پذیرفت [۱۹]. در این روش از توان فروزین در تشکیل کمپلکس با آهن (II) بهره می برند. در حضور سایر

خنثی می‌کنند. در این تست میوه تلکا فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان داد. الگوی مهار پراکسیداسیون عصاره چوپاخ مشابه ویتامین ث و بوتیل هیدروکسی آنیسول بود.

نتیجه‌گیری

عصاره‌های متانولی هر چهار گیاه در تمامی شش مدل مورد مطالعه، سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. بر اساس نتایج کار، عصاره متانولی برگ چوپاخ و اندام هوایی زولنگ فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری داشتند. لذا با توجه به بومی و خوراکی بودن گیاهان مورد استفاده در این تحقیق می‌توان از آنها به عنوان منبعی غنی و در دسترس از آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع غذایی و داروسازی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و در آزمایشگاه این مرکز انجام شده است که بدین‌وسیله از زحمات و همکاری ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

شلاته‌کننده‌ها، تشکیل کمپلکس فروزین - آهن (II) کاهش یافته که منجر به کاهش رنگ قرمز ناشی از تشکیل کمپلکس خواهد شد. در این روش، هم اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید و هم عصاره با تشکیل کمپلکس فروزین - آهن (II) تداخل کرده، که نشان می‌دهد عصاره دارای اثر شلاته‌کنندگی بوده و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته می‌کند. جذب کمپلکس فروزین - آهن (II)، در این تحقیق به شکل وابسته به دوز، کاهش می‌یابد. در واقع میزان فعالیت با افزایش غلظت از ۰/۲ تا ۳/۲ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش می‌یابد. عامل شلاته‌کننده به عنوان آنتی‌اکسیدان نوع دوم مطرح است چرا که باعث کاهش پتانسیل اکسایش-کاهش می‌گردد. در نتیجه باعث پایدار شدن شکل اکسید شده یون‌های فلزی می‌گردد [۲۶]. عصاره تلکا فعالیت بسیار بهتری را در مقایسه با سایر عصاره‌ها از خود نشان داد. توانایی به دام‌اندازی رادیکال هیدروژن پر اکسید عصاره‌ها را می‌توان به ترکیبات فنولی آن نسبت داد که با اهداء الکترون به رادیکال هیدروژن پر اکسید آن را به آب

References

- [1] Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136: 113-26.
- [2] Ames SN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-22.
- [3] Ebrahimzadeh MA, Hosseinimehr SJ, Hamidinia A, Jafari M. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana

- fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline* 2008; 1: 7-14.
- [4] Chen J, Wanming D, Zhang D, Liu Q, Kang J. Water soluble antioxidants improve the antioxidant and anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. *Pharmazie* 2005; 60: 57-61.
- [5] Zhou M, Chen Y, Ouyang Q, Liu SX, Pang ZJ. Reduction of the oxidative injury to the rabbits with established atherosclerosis by protein bound polysaccharide from *Coriolus vesicolor*. *Am J Chin Med* 2000; 28: 239-49.
- [6] Wang H, Cao G and Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 1996; 44(3): 701-5.
- [7] Meltzer HM, Malterud KE. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scand J Nutr* 1997; 41(2): 50-7.
- [8] Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plants names, Farhang Moaser , Tehran , IRAN. 2006. [Farsi]
- [9] Erdelmeier CAJ, Sticher O. A cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. *Phytochem* 1986; 25: 741-3.
- [10] Küpeli E, Kartal M, Aslan S, Yesilada E. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 32-7.
- [11] Khoshbakht K, Hammer K, Pistrick K. *Eryngium caucasicum* Trautv. Cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). *Genet resour crop ev* 2007; 54(2): 445-8.
- [12] Akhane H. Notes on the flora of Iran: 4. Two new records and synopsis of the new data on Iranian Cruciferae since *Flora Iranica*. *Candollea* 2003; 58(2): 369-85.
- [13] Ordon˜ez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem* 2006; 97: 452-8.
- [14] Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk J Biol* 2008; 32: 43-9.
- [15] Yildirim A, Mavi A, Kara A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agri Food Chem* 2001 ;49: 4083-9.
- [16] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their

- antimutagenicity. *J Agri Food Chem* 1995; 43(1): 27-32.
- [17] Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 903-13.
- [18] Dunnik JK, Hailey JR. Toxicity and Carcinogenicity Studies of Quercetin, a Natural Component of Foods. *Toxicol Sci* 1992; 19(3): 423-31.
- [19] Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 161-9.
- [20] Yu LL. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agri Food Chem* 2001; 49(7): 3452-6.
- [21] Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea *Carcinogenesis* 1989; 10: 1003-8.
- [22] Van Acker SABE, van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavanoids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20(3): 331-42.
- [23] Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS & Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 2003; 73: 167-79.
- [24] Moncada A, Palmer RMJ & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
- [25] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- [26] Gordon MH. The mechanism of antioxidant action in vitro. In BJB Hudson (Ed.), Food antioxidants. London: Elsevier Applied Science. 1990; pp: 1-18.

In Vitro Antioxidant Activity of *Pyrus Boissieriana*, *Diospyros Lotus*, *Eryngium Caucasicum* and *Froriepia Subpinnata*

S.M Nabavi¹, S.F. Nabavi¹, M.A. Ebrahimzadeh², B. Eslami³

Received: 02/11/08

Sent for Revision: 25/01/09

Received Revised Manuscript: 25/05/09

Accepted: 08/06/09

Background and Objectives: *Pyrus boissieriana*, *Diospyros lotus*, *Eryngium caucasicum*, *Froriepia subpinnata* are native to Northern part of Iran and are widely used in local foods. *Diospyros lotus* fruits are used in preparation of jams. *E. caucasicum* and *F. subpinnata* also used as wild herbs in local foods.

Materials and Methods: In this Experimental study, the antioxidant activity of methanolic extract of *Pyrus boissieriana*, *Diospyros lotus*, *Eryngium caucasicum*, *Froriepia subpinnata* were determined with 6 invitro assay include DPPH, nitric oxide, H₂O₂ radicals scavenging, linoleic acid, reducing power and iron ion chelating activity. Total phenolic and flavonoid compounds of extract was measured by Folin Ciocalteu and AlCl₃ assays.

Results: IC₅₀ in DPPH method was in order : *E. caucasicum* > *F. subpinnata* > *D. lotus* > and *P. boissieriana* mg ml⁻¹, respectively. The extracts showed weak nitric oxide-scavenging activity. The *E. caucasicum* and *F. subpinnata* extracts were better than others respectively. The *F. subpinnata* and *E. caucasicum* had shown better reducing power than other extract that was comparable with Vit C (p<0.05).

Conclusion: *F. subpinnata* aerial parts and *E. caucasicum* leaves had higher total phenolic and flavonoid contents than others, which may be the result of higher total phenolic and flavonoid contents of them.

Keywords: Antioxidant, *Eryngium. Caucasicum*, *Froriepia. Subpinnata*, *Pyrus boissieriana. lotus*

Funding: This research was funded by a grant from the research council of Mazandaran University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Mazandaran University of Medical Sciences approved the study.

1- Researcher, Pharmaceutical Sciences Research Center, University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran

2- Associate Prof. Dept of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran

(Corresponding Author) Tel: (0151) 3543081, Fax: (0151) 3543084, E-mail: zadeh20@yahoo.com

3- Assistante Prof., Dept. of Plant Systematic, Islamic Azad University of Ghaemshahr, Iran