مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، خرداد ۱۳۹۳، ۲۶۶-۲۴۹

مقایسه محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی سنبله‌ای (*Scutellaria Pinnatifida*) در شمال ایران

عذرا صبورا[۱]، الهام احمدی[۲]، امینه زینالی[۳]، میترا پارسا[۳]

دریافت مقاله:۹۱/۰۵/۲۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۹۲/۰۷/۱۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۹۲/۰۹/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: اسیدهای فنولیک، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی حفاظت‌کننده سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو هستند که با به دام انداختن و مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در سلامت گیاهان و جانوران ایفا می‌نمایند. در این پژوهش، محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی Scutellaria pinnatifida، به منظور بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، تعیین شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی از پودر خشک اندام هوایی دو جمعیت دیزین و کجور در اتانول ۸۰ ٪، متانول ۸۰٪، آب و اتیل‌استات به دو روش خیساندن و کاربرد امواج فراصوت عصاره‌گیری شد. سپس محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با روش‌های اسپکتروفتومتری سنجش گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با دو روش سنجش ظرفیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و سفیدشدگی در سیستم بتاکاروتن/ لینولئیک اسید ارزیابی شد. آنالیز آماری داده‌ها به کمک تجزیه واریانس یک طرفه و دو طرفه (ANOVA) برای مقایسه میانگین‌های داده‌های مختلف انجام شد.

یافته‌ها: بالاترین مقدار فنل و فلاونوئید تام (به ترتیب ۱۷ و ۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در عصاره اندام هوایی جمعیت کجور از طریق عصاره‌گیری اتانولی به روش خیساندن حاصل شد. در حالی‌که در جمعیت دیزین، محتوای ترکیبات فوق با روش عصاره‌گیری مشابه بسیار کمتر بود (به ترتیب ۵/۶ و ۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک). میزان IC_{50} عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی جمعیت کجور حدود ۱/۲-۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. محتوای فنلی و فلاونوئیدی این سه عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از عصاره‌های اتیل‌استاتی بود. به استثنای عصاره‌های آبی تهیه شده به روش خیساندن، ظرفیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌های مختلف جمعیت دیزین، به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از جمعیت کجور بود. نتایج حاصل از سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی این دو جمعیت در آزمون سیستم بتاکاروتن/لینولئیک اسید نشان داد که بالاترین درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها توسط عصاره‌های آبی آماده شده به کمک امواج فراصوت ایجاد شده بود (به ترتیب ۹۳٪و ۵۰٪ بازدارندگی توسط عصاره جمعیت‌های کجور و دیزین).

نتیجه‌گیری: اختلاف میانگین‌های ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام عصاره‌ها تحت تأثیر سه عامل جمعیت، روش استخراج و نوع حلال، معنی‌دار بود. بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جمعیت کجور مشاهده شد که در روش DPPH مربوط به عصاره متانولی (حاصل از روش خیساندن) و در روش مهار پراکسیداسیون لیپید مربوط به عصاره آبی (حاصل از کاربرد امواج فراصوت) بود.

واژه‌های کلیدی: روش عصاره‌گیری، سنجش فنل، سنجش فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گیاه بشقابی سنبله‌ای

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
تلفن: ۸۸۰۵۸۹۱۲-۰۲۱، دورنگار: ۸۸۰۵۸۹۱۲-۰۲۱، پست الکترونیکی: azrasaboora1034@gmail.com
۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳- مربی گروه آموزشی زیست‌شناسی گیاهی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی واحد دانشگاهی شهید بهشتی، تهران، ایران

مقدمه

گیاه بشقابی از جنس Scutellaria و خانواده نعنائیان (Lamiaceae) شامل ۳۵۰ گونه است، که عموماً با نام انگلیسی skullcaps شناخته می‌شود [۱]. اغلب این گیاهان، علفی و چند ساله هستند و در اقلیم‌های معتدل و کوهستان‌های گرمسیری اروپا، آمریکا و شرق آسیا رشد می‌کنند [۲]. طول آن‌ها بین ۱۰۰-۵ سانتی‌متر متغیر است اما تعداد کمی از آن‌ها نیز به شکل درختچه‌ای و برخی نیز آبزی هستند. ساقه‌ها چهار وجهی دارای برگ‌های متقابل و گل‌ها دارای دو لب بالا و پایین می‌باشند. این جنس به راحتی از طریق شکل بشقاب مانند غلاف یا کاسه گل قابل شناسایی است [۳].

جنس Scutellaria دارای ۲۲ گونه در ایران می‌باشد که ۱۰ گونه آن بومی ایران است، بقیه علاوه بر ایران در شمال سوریه، عراق، آناتولی، قفقاز، ترکمنستان و افغانستان نیز می‌رویند [۵-۴]. گیاهان این جنس به طور گسترده و برای سالیان متمادی در طب سنتی به صورت چای و دارو مورد استفاده قرار گرفته‌اند، همچنین از ریشه‌های Scutellaria baicalensis برای درمان ذات‌الریه، اسهال خونی، زکام و عفونت روده نیز استفاده شده است [۶، ۳].

شناخت ترکیبات شیمیایی جنس Scutellaria از سال ۱۸۸۹ مورد توجه بوده است ولی بر اساس تحقیق Xiaofei و همکاران و نتایج Zeng و همکارش، اسکوتلارین توسط Goldschmiedt و Lerner به عنوان اولین ترکیب فلاونوئیدی در سال ۱۹۱۰ از گیاه Scutellaria altissima تخلیص گردید [۷، ۳]. سپس در تحقیقات بعدی جداسازی و شناسایی ۲۹۵ ترکیب شیمیایی دیگر از ۳۵ گونه مختلف این جنس گزارش شد [۳]. این ترکیبات شیمیایی که تاکنون در گیاهان جنس Scutellaria شناسایی شده‌اند شامل فنولیک اسیدها، ایریدوئیدها، کومارین‌ها، دی و تری‌ترپن‌ها، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها می‌باشند [۸]. ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانوی گیاهان هستند که از هسته‌های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده‌اند و به فنل‌های ساده، فنولیک اسیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، استیلبن‌ها، تانن‌های متراکم (پروسیانیدین‌ها)، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها تقسیم می‌شوند [۹]. این ترکیبات به‌دلیل خصوصیات ردوکس خود می‌توانند به عنوان عوامل کاهنده (دهنده‌های پروتون) در پاکسازی اکسیژن یکتایی (o_i) دخالت کرده و به دلیل ساختار شیمیایی متنوع، تفاوت‌هایی را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهند [۱۱-۹]. فلاونوئیدها از ترکیبات پلی‌فنلی با وزن مولکولی کم و دارای اسکلت دی‌فنیل‌پروپان ($C_6C_3C_6$)، گروه بزرگی از این متابولیت‌های ثانوی هستند که تقریباً در همه گیاهان وجود دارند و معمولاً در ۶ زیر گروه اصلی فلاونول‌ها، فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، فلاونون‌ها، فلاوانول‌ها و آنتوسیانیدین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. تعداد و موقعیت گروه‌های OH– فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۹].

گونه‌های Scutellaria دارای مقادیر قابل توجهی از فلاونوئیدها هستند که مسئول فعالیت زیستی این جنس می‌باشند. تاکنون بیش از ۶۰ نوع فلاونوئید از گونه‌های مختلف Scutellaria شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها اپی‌ژنین، وگونین، بایکالئین، اسکوتلارین، وگونوزید، اینکریزین و بایکالین است [۱۳-۱۲].

یکی از گونه‌های اسکوتلاریا در ایران A Hamilt S.Pinnatifida می‌باشد که با نام فارسی «بشقابی سنبله‌ای» شناخته شده است [۱۴]. این گیاه در مناطق مختلف ایران و در جنگل‌های انبوه، بیشه‌ها، در سواحل دریاچه‌ها و رودخانه‌ها رشد می‌کند [۱۵، ۵]، گیاهی پایا، در قاعده چوبی شده، دارای برگ‌هایی با دندانه‌های شانه‌ای عمیق یا کم عمق با تقسیمات خطی و گل‌های ارغوانی، قهوه‌ای-زرد و لب پایینی جام آن در سطح فوقانی زرد رنگ است و موسم گلدهی آن اردیبهشت و خرداد می‌باشد [۵-۴]. در مورد خصوصیات فیتوشیمیایی، خواص دارویی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سایر خصوصیات دیگر این گیاه در ایران اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. طی بررسی فیتوشیمیایی عصاره دی کلرومتانی ریشه S. pinnatifida محمدی و همکاران برای اولین بار وجود دو ترکیب Skullcapflavone II و Wogonin را به عنوان ترکیبات اصلی فلاونوئیدهای ریشه این گیاه گزارش کردند [۱۶]. گزارش Ghannadi و همکارش در مورد روغن‌های فرار گیاه S. pinnatifida زیر گونه alpine (جمع‌آوری شده از استان خراسان) نشان داد که حدود ۰/۲٪ اندام هوایی این گیاه را روغن‌های فرار تشکیل می‌دهد و در ۹۳/۸٪ عصاره فوق ۳۰ ترکیب شناسایی شده بود [۱۷]. در نمونه‌های S. pinnatifida, Arth et Hamilt. جمع‌آوری شده از منطقه توچال در استان تهران، روغن‌های فرار شامل ۲۹ ترکیب مختلف بودند که حدود ۰/۰۷٪ اندام هوایی و بیش از ۹۶٪ روغن‌های فرار کل گیاه را تشکیل می‌داد [۱۸].

رادیکال‌های آزاد در تداوم حیات موجودات زنده دارای نقش‌های مثبت و منفی زیادی هستند، به عنوان مثال رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) باعث اکسیداسیون مولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند که این مسئله باعث آسیب‌های گسترده به سلول و مرگ آن می‌شود. همچنین، از نقش‌های مثبت رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توان به نقش آن‌ها در راه‌اندازی مسیرهای علامت‌دهی سلول، بیان ژن و تنظیم فعالیت گوانیلات سیکلاز در سلول‌ها اشاره کرد. از طرف دیگر گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن به صورت کاملاً مشخص خواص فیزیکی- شیمیایی و ایمونولوژیکی سوپر اکسید دیسموتاز را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش صدمات اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شوند [۱۹]. هیدروپراکسیدها، از جمله مهم‌ترین فرآورده‌های اکسیداسیون خود به خودی لیپیدها بوده که فاقد طعم و بو هستند ولی فرآورده‌های حاصل از تجزیه آن‌ها نظیر آلدئیدها و کتون‌ها می‌توانند تأثیر زیادی روی طعم و بوی مواد غذایی داشته باشند، از اینرو به منظور تأخیر و یا مهار اکسیداسیون مواد غذایی معمولاً از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌گردد. با اضافه کردن آن‌ها کیفیت ماده غذایی حفظ شده و طول عمر نگهداری آن‌ها نیز افزایش می‌یابد. کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در بعضی از کشورها به دلیل اثرات نامطلوبی که روی سلامتی افراد می‌گذارند، محدود شده است. امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که از گیاهان و ادویه‌جات بدست می‌آیند به خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی و اثرات مفید آن‌ها روی سلامتی انسان به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۲۱-۲۰].

گونه‌های مختلف خانواده نعنائیان حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی متنوعی هستند و اغلب بین محتوای این ترکیبات و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گونه‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. بنابراین سنجش کمّی ترکیبات ذکر شده، راه خوبی برای برآورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها

است. آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است محلول در آب (قطبی)، محلول در چربی (غیرقطبی) و یا متصل به دیواره‌های سلول باشند [۲۲]. بهینه‌سازی روش استخراج و حلال‌های مورد استفاده که باعث جداسازی نوع خاصی از ترکیبات شیمیایی می‌گردد یک عامل تعیین کننده و تأثیرگذار در اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی است. از آن‌جا که عصاره‌های خام تهیه شده از بافت‌های گیاهی حاوی ترکیبات شیمیایی متنوعی هستند، معمولاً در ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی از چند روش مختلف استفاده می‌شود. اندازه‌گیری محتوای فنلی تام با معرف فولین- سیوکالتو (Folin – Ciocalteu) یک ارزیابی کلی از محتوای ترکیبات فنلی تام عصاره‌ها را فراهم می‌سازد، ولی نتیجه حاصل منحصر به محتوای پلی‌فنل‌ها نبوده، ممکن است برخی از ترکیبات دیگر نیز با این معرف واکنش دهند و در نتیجه میزان ترکیبات فنلی بیشتر از حد واقعی برآورد شود [۲۳]. علاوه بر این، ترکیبات فنلی مختلف در این سنجش، به طور متفاوتی پاسخ می‌دهند که بستگی به تعداد گروه‌های فنلی مختلف آن‌ها دارد و مقدار فنل تام لزوماً منطبق بر غلظت کل آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره نیست [۲۴]. بنابراین با توجه به معایب این روش، عصاره‌های گیاهی از طریق روش‌های مکمل دیگر نظیر تعیین درصد سفید شدگی بتاکاروتن که به نوعی معرف میزان پراکسیداسیون لیپیدها و ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی است، نیز ارزیابی می‌شود.

این مطالعه جهت مقایسه محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اندام هوایی دو جمعیت Scutellaria pinnatifida از ارتفاعات دیزین و روستای کجور انجام گرفته است. برخلاف منطقه دیزین که در بخشی کوهستانی، در شمال کوه‌های تهران واقع شده و دارای آب و هوایی سرد است، منطقه کجور بین دو دره چالوس و هراز در ارتفاعات پست‌تر با بارندگی زیاد و آب و هوایی معتدل و مرطوب قرار دارد. از آن‌جا که در بسیاری از گیاهان بین محتوای ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد، طی عصاره‌گیری با چهار نوع حلال مختلف (قطبی و غیرقطبی) ابتدا اثر حلال مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام دو جمعیت سنجیده شد و سپس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های فوق با استفاده از آزمون‌های تعیین درصد مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط ۲و۲ دی فنیل۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و سیستم بتا کاروتن/ لینولئیک اسید محاسبه گردید. عصاره خام گیاهان حاوی طیف گسترده‌ای از مواد مختلف است و در بسیاری از روش‌های عصاره‌گیری از حلال‌هایی استفاده می شود که از نظر میزان قطبیت متفاوت هستند. بنابراین انتخاب حلال مناسب باید بر حسب قطبیت و تنوع ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه و نیز غلظت ماده استخراج شده، صورت گیرد. اهداف این پژوهش عبارتند از: ۱- تعیین بهترین حلال و روش عصاره‌گیری که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را فراهم کند ۲- تعیین ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو جمعیت مورد بررسی با محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن‌ها.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی به روش زیر انجام شد:

تهیه عصاره: اندام هوایی S. pinnatifida از دو جمعیت کجور (استان مازندران، ایران) و دیزین (استان تهران، ایران) در تابستان سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه بلافاصله در سایه خشک شدند. عصاره این

گیاه از سرشاخه‌ها و برگ‌های آن طبق روش Lin و همکاران با اندکی تغییرات تهیه شد [۲۵]. بدین ترتیب که از ۰/۱ گرم پودر خشک در ۱۰ میلی‌لیتر حلال با دو روش مختلف کاربرد امواج فراصوت و خیساندن عصاره‌گیری شد. حلال‌های مورد استفاده یکی از محلول‌های رایج برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شامل متانول ۸۰٪، اتانول ۸۰٪، آب و اتیل‌استات است که در مقالات متعدد به آن‌ها اشاره شده است. در روش اول استخراج، مخلوط نمونه و حلال در دمای اتاق در یک حمام اولتراسونیک به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با قدرت MHz ۴۰ قرار گرفتند، سپس ۶ ساعت مخلوط فوق خیسانده شد. در روش دوم، مخلوط نمونه و حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر خیسانده شد [۲۵]. سپس تمام عصاره‌ها در هر دو روش با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱، صاف و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g×۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جهت سنجش‌های بعدی استفاده گردید.

سنجش محتوای ترکیبات فنلی تام: محتوای ترکیبات فنلی تام بر اساس تجربه‌های Marinova و همکاران با استفاده از معرف فولین- سیوکالتو به قرار زیر اندازه‌گیری شد [۲۶]: به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف یا محلول استاندارد گالیک اسید (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۰میلی‌گرم در لیتر)، ۱/۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتو (رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۵) اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ۷٪ و ۰/۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و۹۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. محتوای ترکیبات فنلی تام عصاره‌ها بر حسب mg gallic acid equivalents (GAE) /g shoot dry weight محاسبه گردید.

سنجش محتوای فلاونوئیدی تام: محتوای فلاونوئیدی بر اساس روش Beketove و همکاران به صورت زیر سنجیده شد [۲۷]: به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف یا محلول استاندارد کوئرسیتین (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۰) میلی گرم در لیتر مخلوط ۴/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪ و ۰/۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۳۳٪، اضافه و به خوبی مخلوط گردید و جذب آن بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی در ۴۱۴ نانومتر خوانده شد. محتوای ترکیبات فلاونوئیدی تام عصاره‌ها بر حسب mg quercetin equivalents (QE) /g shoot dry weight محاسبه گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH): ۲و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش می‌باشد که با احیاء شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات موجود در عصاره‌های مختلف با اندازه‌گیری میزان کاهش جذب نوری محلول حاوی DPPH مورد سنجش قرار می‌گیرد. فعالیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH بر اساس تجربیات Akowuah و همکاران اندازه‌گیری شد [۲۸]. حجم‌های مختلفی از عصاره (۳۵۰ - ۱۵۰ میکرولیتر) با متانول مطلق به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۴٪ DPPH در متانول اضافه و خوب مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.

درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I\% = [(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank})] \times 100$$

در این فرمول، I%، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، A_{blank} میزان جذب نوری کنترل منفی را که فاقد عصاره بود و A_{sample} میزان جذب نوری نمونه با غلظت‌های مختلف عصاره را بیان می‌کند. غلظتی از عصاره‌ها که باعث ۵۰٪ مهارکنندگی می‌شد را به عنوان IC_{50} در نظر می‌گیرند. در این آزمایش، به عنوان کنترل مثبت، از آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش تعیین درصد مهارکنندگی پراکسیداسیون: در این روش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به میزان جلوگیری از پراکسیداسیون لینولئیک اسید مورد سنجش قرار می‌گیرد [۲۹]. بتاکاروتن با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در کلروفرم حل شد، سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. آنگاه با روش تبخیر در خلاء، کلروفرم جدا و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع شده از اکسیژن (۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) همراه با تکان شدید به آن اضافه شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق و ۳۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های مختلف (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم پودر خشک در یک میلی‌لیتر حلال) به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. تمامی این مراحل در مورد BHT (شاهد مثبت) و متانول مطلق (شاهد منفی) نیز تکرار شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق و در تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از مقایسه جذب نوری نمونه‌ها با زمان صفر و میزان پایداری رنگ زرد بتا کاروتن محاسبه گردید.

آنالیز آماری: تمام آزمایش‌ها در قالب طرح آماری بلوک‌های خرد شده انجام شد. داده‌های مربوط به سنجش هر یک از صفات توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی نتایج و مقایسه میانگین‌های عصاره‌های مختلف از آزمون تجزیه واریانس دو طرفه استفاده شد. پس از تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها، گروه‌بندی آن‌ها به کمک تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح $p<۰/۰۵$ صورت گرفت. تمام آزمایش‌ها برای هر نمونه گیاهی ۳ بار تکرار شد.

نتایج

تجزیه واریانس دو طرفه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری محتوای دو ترکیب شیمیایی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با دو روش سنجش شده در عصاره‌های اندام هوایی نظیر S.pinnatifida نشان داد که اثر تک‌تک عوامل نوع جمعیت، نوع حلال و روش عصاره‌گیری که در جدول ۱ با علایم اختصاری A، B و C نشان داده شده است و همچنین، اثر متقابل هر سه عامل (A×B×C) روی میانگین‌های محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، با هر دو روش، اختلاف معنی‌داری را در سطح $p<۰/۰۱$ پدید می‌آورد (جدول ۱). تنها مورد استثناء، با بررسی عامل روش عصاره‌گیری به دست آمد که نشان داد تفاوت بین میانگین‌های محتوای ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها و بین میانگین IC_{50} آن‌ها (غلظت مؤثر برای ۵۰٪ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار نیست (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه نتایج حاصل از بررسی تأثیر متقابل سه عامل جمعیت، نوع حلال و روش عصاره‌گیری روی اختلاف میانگین‌های محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اثر آنتی‌اکسیدانی (مقدار IC_{50} و درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها) عصاره S. pinnatifida به کمک آنالیز واریانس دو طرفه

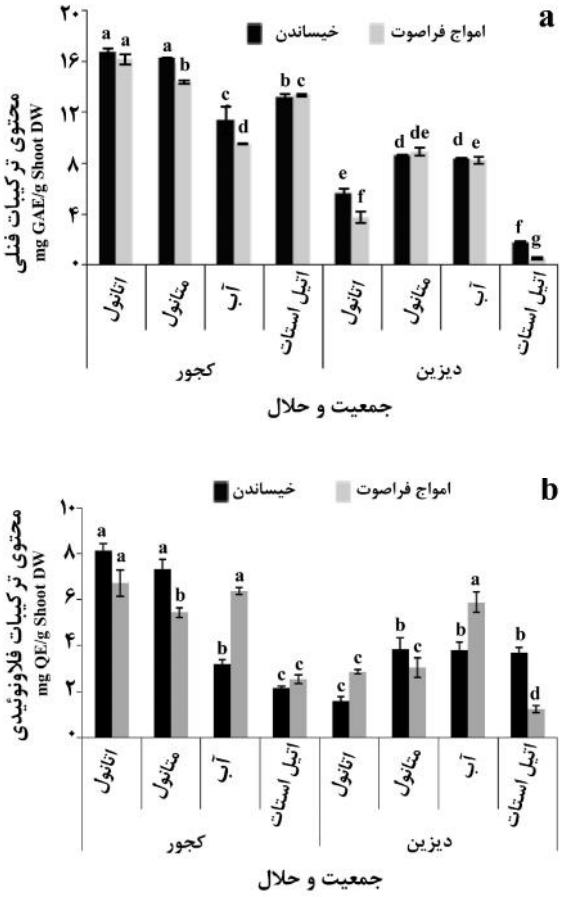
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		محتوای ترکیبات فنلی (mg GAE/g shoot DW)	محتوای ترکیبات فلاونوئیدی (mg QE/g Shoot DW)	IC_{50} (mg/ml)	بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها (٪)
نوع جمعیت (A)	۱	۷۹۲/۴۴ **	۴۷/۸ **	۲۵۸/۳ **	۶۷۱/۷ **
نوع حلال (B)	۳	۴۹/۹۶ **	۱۷/۶ **	۱۷/۴ **	۹۱۲۷/۵ **
روش عصاره‌گیری(C)	۱	۹/۳۳ **	ns۰	ns۰	۷۰۱/۶ **
(A) × (B)	۳	۶۷/۳۷ **	۱۹/۹ **	۲۷/۷ **	۲۲۲۴/۹ **
(A) × (C)	۱	ns۰/۲۱	ns۰	۸۹/۴ **	۰/۱ **
(B) × (C)	۳	ns۰/۲۳	۹/۵ **	۴۱/۵ **	ns۱۲۳۱/۵
(A) × (B) × (C)	۳	۲/۷۰ **	۴/۳ **	۳۶/۳ **	۹/۴ **
خطا	۳۲	۰/۰۴	۰/۳	۰/۰۱	۳/۱
کل	۴۷				

***** و * به ترتیب نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۵$ و ns معرف عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد. حروف A، B و C به ترتیب معرف اثر نوع جمعیت، حلال و روش‌های عصاره‌گیری هستند.***

نمودار ۱a نشان می‌دهد که محتوای ترکیبات فنلی موجود در اندام هوایی جمعیت کجور نسبت به دیزین بیشتر بود. در جمعیت کجور اثر حلال‌های اتانولی و متانولی در استخراج ترکیبات فنلی تقریباً مشابه بود (۱۴/۳۶-۱۶/۷۰mg GAE/g shoot DW) ولی در جمعیت دیزین این دو حلال تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (با اتانول۵/۶ mg GAE/g shoot DW- ۳/۷ و با متانول ۸/۸ mg GAE/g shoot DW- ۸/۶)، برعکس استخراج با آب و متانول نتایج تقریباً مشابهی پدید آورد. در جمعیت کجور، حلال اتیل‌استات کارآیی خوبی برای استخراج ترکیبات فنلی داشت (۱۳/۳ mg GAE/g shoot DW) که نسبت به استخراج با حلال‌های هیدروالکلی ۱۷-۵٪ کارآیی کمتری را نشان داد، ولی در جمعیت دیزین نتایج متفاوتی مشاهده شد و کمترین استخراج ترکیبات فنلی را به دنبال داشت (۱/۷-۰/۵ mg GAE/g shoot DW) که نسبت به متانول ۸۰٪ کمتر بود.

همچنین، در نمودار شماره ۱b محتوای ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از اندام هوایی دو جمعیت S.pinnatifida توسط ۴ نوع سیستم حلالی مختلف نشان داده شده است. عصاره‌های (اتانولی، متانولی و آبی) اندام هوایی کجور بالاترین محتوای فلاونوئیدی را دارا بودند. در جمعیت کجور حلال‌های اتانولی و متانولی در هر دو روش عصاره‌گیری، کارآیی بالایی را نشان دادند. میزان استخراج این ترکیبات طی کاربرد امواج فراصوت نسبت به روش خیساندن حدود ۲۰٪ کمتر بود (در روش خیساندن ۸/۱-۷/۳ mg QE/g Shoot DW و در روش کاربرد امواج فراصوت ۶/۷-۵/۴ mg QE/g Shoot DW). در جمعیت کجور، کمترین استخراج ترکیبات فلاونوئیدی با هر دو

روش عصاره‌گیری توسط اتیل‌استات به دست آمد (۲/۱-۲/۵mg QE/g Shoot DW).

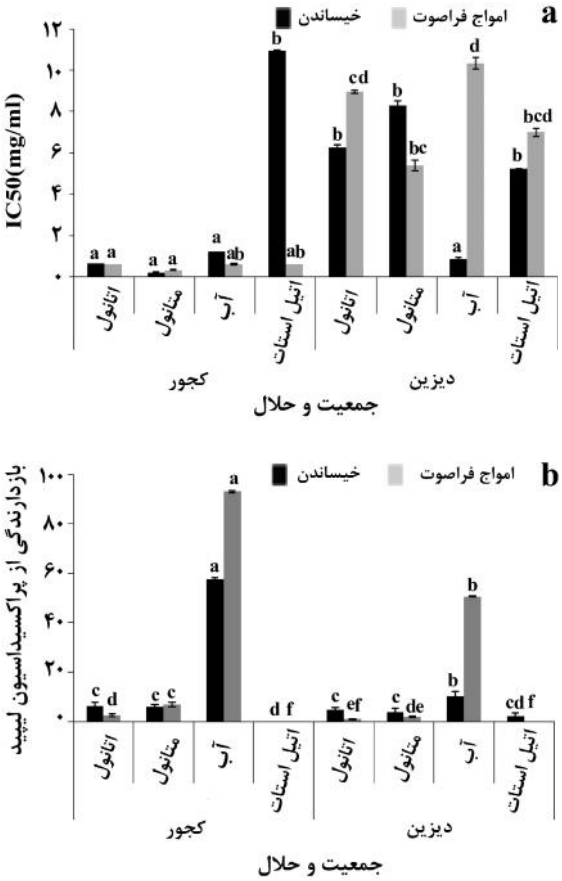


نمودار ۱- مقایسه محتوای ترکیبات فنلی تام (a) و فلاونوئید تام (b) عصاره اندام هوایی دو جمعیت S. pinnatifida تهیه شده با دو روش عصاره‌گیری مختلف (گالیک اسید (در نمودار a) و کوئرسیتین (در نمودار b) به ترتیب به عنوان استاندارد ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی استفاده شدند). داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها در هر روش عصاره‌گیری به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده است و حروف یکسان در هر روش نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0/05$ می‌باشد.

در جمعیت دیزین عصاره‌گیری با آب و متانول مقدار قابل توجهی از ترکیبات فلاونوئیدی را جداسازی نمود (به ترتیب ۳/۷-۳/۸ mg QE/g Shoot DW در روش خیساندن و ۳-۵/۸ mg QE/g Shoot DW با کاربرد امواج فراصوت). برخلاف جمعیت کجور که با اتانول بالاترین میزان استخراج ترکیبات فلاونوئیدی حاصل شده بود، در جمعیت دیزین این حلال کارآیی بسیار کمتری را نشان داد (۱/۶-۲/۸ mg QE/g Shoot DW).

مقایسه دو روش عصاره‌گیری در این جمعیت نشان داد که استخراج این مواد توسط اتیل‌استات با روش خیساندن بهتر از روش کاربرد امواج فراصوت صورت گرفته بود (۳/۷ mg QE/g Shoot DW در مقابل ۱/۲ mg QE/g Shoot DW) (نمودار ۱b).

نتایج حاصل از بررسی ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و توانایی بازدارندگی پراکسیداسیون لیپیدها توسط عصاره‌های مختلف در نمودارهای ۲ و ۳ خلاصه شده است. مقایسه نتایج در نمودار ۲a نشان می‌دهد که در جمعیت کجور مقدار ماده لازم برای مهار ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود، به عبارت دیگر برای ایجاد قدرت آنتی‌اکسیدانی، معادل عصاره اندام هوایی کجور باید به طور متوسط ۸ برابر، عصاره بیشتری از جمعیت دیزین مصرف می‌شد. مقایسه میانگین‌های IC_{50} حاصل از روش DPPH نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌های اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های جمعیت کجور در سطح $p<0/05$ وجود ندارد (۱/۲-۰/۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، به استثنای عصاره اتیل‌استاتی که از طریق خیساندن به دست آمده بود (۱۰/۹میلی‌گرم در میلی‌لیتر). در حالی‌که در جمعیت دیزین IC_{50} اندام هوایی که با اتانول، متانول و اتیل‌استات عصاره‌گیری شده بودند بین ۸/۹- ۵/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تغییر کرد. در جمعیت دیزین، عصاره‌گیری آبی اندام هوایی با دو روش، نتایج کاملاً متفاوتی آشکار شد (۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با روش خیساندن و۱۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با روش کاربرد امواج فراصوت) (نمودار ۲a).

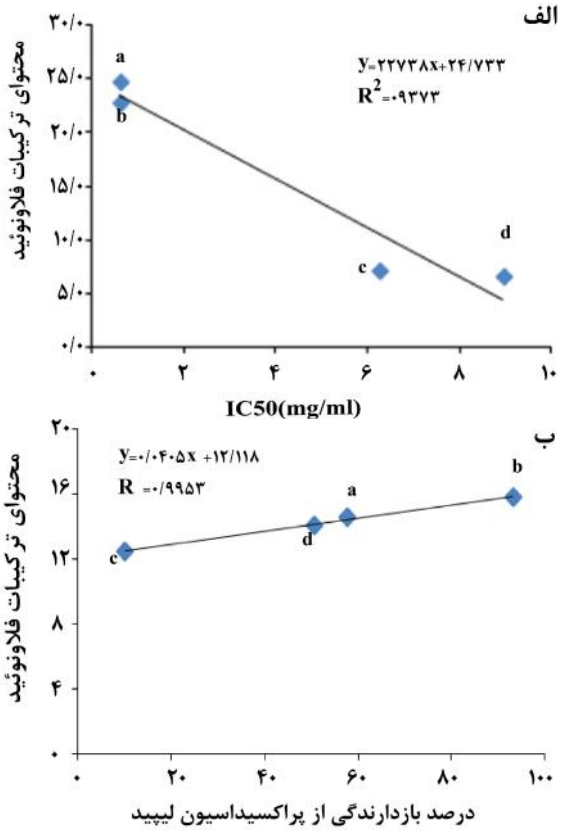


نمودار ۲- مقایسه غلظت موثر برای ایجاد ۵۰٪ بازدارندگی (IC_{50}) از فعالیت رادیکال‌های آزاد DPPH (a) و درصد ممانعت از ایجاد هیدروپراکسیدهای لینولئیک اسید (b) توسط عصاره اندام هوایی دو جمعیت S. pinnatifida، طی دو روش متفاوت عصاره گیری (BHT به عنوان استاندارد استفاده شده بود). داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها در هر روش عصاره‌گیری با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده است و حروف یکسان در هر روش نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از طریق تعیین ظرفیت بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها، بین عصاره آبی و سایر عصاره‌های دو جمعیت کجور و دیزین اختلاف معنی‌داری را در سطح $p<۰/۰۱$ نشان دادند (نمودار ۲b). عصاره آبی جمعیت کجور با روش خیساندن و کاربرد امواج فراصوت به ترتیب ۵۷/۷٪ و ۹۳/۲٪ بازدارندگی و جمعیت دیزین به ترتیب ۱۰/۲٪ و ۵۰/۶٪ بازدارندگی را نشان دادند. به نظر می‌رسد این عصاره‌ها نسبت به عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های دیگر، مقدار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر بیشتری را استخراج کرده بودند، در حالی‌که درصد بازدارندگی عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های دیگر در گستره ۶/۸-۰/۸ محدود شده بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتیل‌استاتی در هر دو جمعیت با روش لینولئیک اسید/ بتا کاروتن نزدیک به صفر بود. استفاده از دو روش استخراج، تفاوت معنی‌داری را بین جمعیت‌ها نشان نداد (نمودار ۲b).

برای این که ارتباط بین محتوای فنل و فلاونوئید عصاره‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مشخص گردد، همبستگی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی (به عنوان یک حلال مناسب) و مجموع محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آن تعیین شد (نمودار ۳-الف، سمت راست). نتایج به دست آمده از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط این عصاره‌ها همبستگی بالایی (R^2=۰/۹۴) را بین محتوای فنل و فلاونوئید تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نشان داد. همان‌طور که در نمودار ۳ الف مشاهده می‌شود، هرچه مقدار این ترکیبات در عصاره‌ها بیشتر می‌گردد اثر مهاری بیشتری را اعمال نموده، مقدار IC_{50} کمتر یا بعبارت بهتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود (همبستگی مثبت بین محتوای فنل و فلاونوئید عصاره‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها). در روش تعیین درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها از آن‌جا که عصاره آبی توان آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده شدیدی را نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داده بود، همبستگی بین مجموع محتوای فنل و فلاونوئید تام این عصاره‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۳ب (سمت چپ) دیده می‌شود علاوه بر همبستگی مثبتی که

به خوبی بین مجموع محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها دیده می‌شود (R^2=۰/۹۹)، تفاوت بین کارآیی روش‌های استخراج نیز نمایان است که احتمالاً ناشی از تغییر در مقدار و یا تغییر در نوع برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر می باشد.



نمودار ۳- همبستگی بین مجموع محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام نمونه‌ها با ارزش IC_{50} عصاره‌های اتانولی (الف) و درصد بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها توسط عصاره‌های آبی (ب). نمونه‌ها به ترتیب عبارتند از: عصاره اندام هوایی S. pinnatifida جمعیت کجور به روش خیساندن (a) و امواج فراصوت (b)، جمعیت دیزین به روش خیساندن (c) و امواج فراصوت (d).

بحث

عوامل متعددی می‌تواند بر میزان استخراج ترکیبات فنلی تأثیرگذار باشد مانند، مراحل آماده‌سازی گیاه (نحوه خشک کردن، زمان و دمای عصاره‌گیری)، نمونه گیاهی (نوع گونه، جمعیت، اندام مورد استفاده، مرحله نمو)، شرایط محیطی گیاه (ساختار خاک، شرایط اقلیمی، تنش‌ها) و روش‌های سنجش ترکیبات فنلی [۳۰]. نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز بیانگر نقش مؤثر جایگاه رویش گیاه با توجه به خصوصیات اکولوژیکی و آب و هوایی متفاوت آن‌ها، روی انباشتگی متابولیت‌های ثانوی بود. به طوری که با توجه به تشابه نمونه‌ها از نظر نوع گونه، حلال‌ها و روش‌های استخراج، محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی تام اندام هوایی جمعیت دیزین تقریباً نصف نمونه‌های مشابه در جمعیت کجور بود. تفاوت‌های موجود از نظر ارتفاع منطقه رویش، تغییرات دمای شبانه روزی محیط، تغییر شدت تابش پرتوهای خورشیدی و میزان بارندگی سالانه می‌تواند از علل تفاوت مشاهده شده در مورد سنتز و تجمع ترکیبات گیاهان جمع آوری شده از این مناطق باشد. gohari و همکاران با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی از گیاهان دارویی از جمله *Scutellaria tournefortii* و تعدادی از گونه‌های خانواده نعنائیان گزارش کردند که ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌ها بسته به منطقه جغرافیایی، نوع بافت و زمان برداشت گیاه متفاوت می باشد [۳۱]. بنابراین با توجه به خواص دارویی گیاه *S. pinnatifida*، مقایسه ترکیبات موثر سنجیده شده در اندام هوایی این دو جمعیت و بررسی تغییرات آن‌ها در شرایط آب و هوایی متفاوت، امری ضروری است.

مقایسه روش‌های استخراج (خیساندن و کاربرد امواج فراصوت) در اکثر عصاره‌های *S. pinnatifida* از نظر محتوای فنلی، نتایج کمابیش یکسانی را نشان داد اما در رابطه با استخراج ترکیبات فلاونوئیدی آن بسته به نوع حلال استفاده شده برای استخراج نتایج متفاوتی در دو

جمعیت مورد مطالعه دیده شد. به طور مثال عصاره‌های آبی تهیه شده با کاربرد امواج فراصوت در هر دو جمعیت، محتوای فلاونوئیدی بالایی داشتند، در حالی که کاربرد امواج فراصوت در عصاره‌های هیدروالکلی نسبت به روش خیساندن به نسبت کمتری این مواد را از بافت‌ها استخراج کرده بود و تفاوت بین روش‌ها در عصاره‌های آبی جمعیت کجور و دیزین و عصاره اتیل‌استاتی جمعیت دیزین کاملاً شاخص بود. این مسئله می‌تواند ناشی از تأثیر قدرت نفوذ این حلال‌ها در بافت‌های گیاهی و تفاوت میزان حلالیت انواع مختلف فلاونوئیدها در این حلال‌ها باشد. همچنین، احتمالاً تفاوت در جایگاه‌های زیر سلولی ذخیره‌سازی فلاونوئیدها در این مسئله دخالت دارد.

در روش کاربرد امواج فراصوت، IC_{50} عصاره اتیل‌استاتی جمعیت کجور *S. pinnatifida* مشابه عصاره اتانولی آن بود (۰/۶میلی‌گرم در میلی‌لیتر). این یافته‌ها مشابه نتایج Chirikova و همکاران در مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی *S. baicalensis* بود، آن‌ها بیان کردند مقدار IC_{50} عصاره اتیل‌استاتی و اتانولی تقریباً مشابه (۰/۰۳-۰/۰۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اما کمتر از IC_{50} عصاره آبی آن (۰/۸میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود [۳۲]. استفاده از اتیل‌استات با توجه به نوع جمعیت نتایج کاملاً متفاوتی را پدید آورد، این حلال در جمعیت کجور نسبت به دیزین عملکرد بهتری داشت که معرف تفاوت نوع ترکیبات یا غلظت مواد مؤثره در این دو جمعیت بود. عدم کارآیی اتیل‌استات در استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی جمعیت دیزین با نتایج Lin و همکاران مطابقت دارد [۲۵]. تحقیقات آن‌ها روی گونه دیگری از این گیاه به نام *S. Radix* کمترین میزان استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را توسط حلال‌های اتیل‌استاتی و استونی نشان داد در حالی که عصاره‌گیری با متانول خالص و متانول ۷۰٪ که با کاربرد امواج فراصوت همراه با شیکر انجام شده بود، نشان دهنده‌ی ارجحیت این روش نسبت به روش پرکولاسیون و نفوذ بهتر حلال بود، به طوری که افزایش قطبیت حلال می‌توانست بر عملکرد پایین حلال غلبه کند و در نتیجه میزان استخراج را افزایش دهد.

مطالعات قبلی روی ۲۸ فرآورده گیاهی شامل دانه‌های روغنی، دانه‌های غلات و گیاهان دارویی نشان داده است که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی آن‌ها وجود دارد [۳۳]. در این مطالعه نیز اغلب عصاره‌های تهیه شده از دو جمعیت، همبستگی بالایی بین محتوای فنلی نمونه‌ها و ارزش IC_{50} آن‌ها نشان دادند. این پدیده به خصوص در جمعیت کجور به وضوح مشخص بود به نحوی که با استفاده از حلال‌های هیدروالکلی (متانول و اتانول ۸۰٪) مقدار ماده مورد نیاز برای حذف ۵۰٪ از رادیکال‌های DPPH به حداقل می‌رسید، این عصاره‌ها میزان بالایی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در خود حل نموده بودند. برعکس در نتیجه محتوای پایین ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره اتیل‌استاتی تهیه شده با روش خیساندن، لازم بود غلظت‌های بالاتری از این عصاره برای ایجاد ۵۰٪ بازدارندگی فعالیت رادیکال‌های آزاد مورد استفاده قرار گیرد. در حالی‌که عصاره‌گیری نمونه‌های جمعیت کجور با روش امواج فراصوت علیرغم تشابه محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌ها در هر دو روش استخراج، میزان IC_{50} آن‌ها به شدت کاهش یافته بود. این پدیده به خوبی تأثیر روش عصاره‌گیری از مواد گیاهی و رابطه آن را با خواص آنتی‌اکسیدانی و دارویی آن‌ها نشان می‌دهد. طی عصاره‌گیری سازوکارهای مختلفی منجر به از هم

گسیختگی ساختار سلولی بافت‌های گیاهی می‌گردد و نتایج متفاوتی را از نظر انتشار و آزاد شدن این ترکیبات در حلال‌های مورد استفاده برای عصاره‌گیری ایجاد می‌نماید [۳۶-۳۴]. در گونه‌های مختلف جنس *Scutellaria* بیش از ۱۶۰ ترکیب فلاونوئیدی از گروه فلاونول‌ها، فلاونون‌ها، فلاوان‌ها، فلاونونول‌ها، بی‌فلاونوئیدها، فلاونولیگنان‌ها و چالکون‌ها شناسایی شده است [۳]. فلاونول‌های آگلیکونی مثل کوئرسیتین، مریستین و کامفرول دارای چندین گروه هیدروکسیل هستند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نسبت به انواع گلیکوزیدی آن‌ها مثل روتین، مریسیترین و آستراگالین نشان می‌دهند [۳۷]. بنابراین بسته به نوع روش عصاره‌گیری و حلال مورد استفاده، میزان استخراج مواد مؤثره در جمعیت‌های بشقابی سنبله‌ای ممکن است کاهش یا افزایش یابد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز به تبع آن کمتر یا بیشتر شود. همان‌طور که نتایج نشان داد نوع حلال تأثیر بسزایی در میزان استخراج ترکیبات مؤثره گیاه داشت (نمودار ۱). در هر دو جمعیت مورد بررسی، حلال‌های قطبی به کار رفته مانند اتانول، متانول و آب توانایی بیشتری برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی داشتند. با توجه به این که عصاره‌های مذکور قدرت زیادی در پاکسازی رادیکال‌های آزاد داشتند اما استفاده از اتیل‌استات با قطبیت کمتر نسبت به سه حلال قبلی کارآیی کمتری را جهت استخراج ترکیبات فنلی جمعیت دیزین و ترکیبات فلاونوئیدی اندام هوایی هر دو جمعیت *S. pinnatifida* نشان داد. ارجحیت حلال‌های هیدروالکلی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ناشی از حضور اشکال گلیکوزیدی و قطبی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی حل شده در این حلال‌ها باشد که در خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه فوق نقش مؤثری دارند.

معمولاً ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پس از سنتز در نتیجه پیوند با قندها در یک یا چند جایگاه مخصوص به صورت محلول در آمده و در واکوئل‌ها ذخیره می‌گردند [۳۸].

اندازه‌گیری میزان فنل تام عصاره اتیل‌استاتی در جمعیت کجور نسبت به عصاره آبی بالاتر بود ولی درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره آبی بیشتر از عصاره اتیل‌استاتی بود. این مسئله شاید به دلیل قدرت حلالیت متفاوت حلال برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با قطبیت‌های مختلف باشد [۴۰-۳۹]. نتایج بدست آمده در این پژوهش با تحقیقات Senol و همکاران مطابقت دارد [۴۱]. آن‌ها با بررسی ۳۳ گونه از جنس *Scutellaria* که بومی ترکیه بودند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر عصاره اتیل‌استاتی را نسبت به عصاره متانولی اثبات کردند. در گزارش ذکر شده درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره متانولی *S. hastifolia* در غلظت‌های ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۵۵/۷۸±۰/۲۱ و ۸۹/۹۲±۰/۴۲ و در عصاره اتیل‌استاتی به ترتیب ۲۳/۶۲±۰/۷ و ۳۵/۸۳±۰/۲۹ بود. همچنین درصد مهار رادیکال‌های آزاد عصاره متانولی *S. galericulata* در همین غلظت‌ها به ترتیب ۲۸/۵۲±۰/۵۳ و ۴۴/۱۶±۰/۴۲ و در عصاره اتیل‌استاتی آن به ترتیب ۱۱/۸۴±۰/۰۸ و ۱۴/۱۵±۰/۲۴ بود، که در مجموع اهمیت کمتر کاربرد اتیل‌استات را برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان *Scutellaria* اثبات می‌کند.

نتایج نشان داد که عصاره آبی دارای حداکثر و عصاره اتیل‌استاتی دارای حداقل قدرت بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها بود. شناسایی اجزاء موجود در عصاره‌های آبی می‌تواند نقش و هویت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جداسازی شده را بهتر آشکار نماید. به

احتمال زیاد ترکیبات موجود در این عصاره بسیار آبدوست هستند. نتایج Finotti و همکارش نیز نشان داد که فلاون‌ها و فلاونول‌ها و مشتقات گلیکوزیله آن‌ها در محیط آبدوست دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر از محیط‌های آبگریز هستند [۳۸]. آن‌ها نتیجه گرفتند که برخی از این مولکول‌ها در محیط قطبی اغلب به صورت یون‌هایی با خاصیت اسیدی بیشتر در می‌آیند که نسبت به یون‌های هیدروکسیل آب پایدارترند. پایداری اشکال رزونانس این ترکیبات نقش مهمی در خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ایفا می‌نماید. همچنین رنگ زرد عصاره‌های آبی می‌تواند ناشی از حضور کاروتنوئیدهای محلول در آب باشد که معمولاً آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند. همچنان که عصاره‌های آبی زعفران که حاوی انواع کروسین‌های محلول در آب است، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهند [۴۲].

نتیجه‌گیری

تفاوت‌های مشاهده شده در خواص عصاره‌های اندام هوایی دو جمعیت *S. pinnatifida* نشانه تفاوت در قدرت انحلال انواع فنل‌ها و فلاونوئیدهای آن‌ها در ۴ حلال انتخاب شده و در واقع تفاوت و تنوع ساختار شیمیایی ترکیبات فوق در دو جمعیت مورد بررسی بود. ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه با استفاده از رادیکال‌های آزاد DPPH روشی آسان، سریع و دقیق برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های آبدوست آن‌ها بود. پایین بودن ارزش IC_{50} عصاره‌های آبدوست، اهمیت محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی *S. pinnatifida* را خاطر نشان ساخت. محتوای ترکیبات فنلی تمام عصاره‌های تهیه شده از جمعیت دیزین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها کمتر از عصاره‌های مشابه در جمعیت کجور بود. محتوای فلاونوئیدی هر دو جمعیت، تحت تأثیر روش عصاره‌گیری و نوع حلال تفاوت‌های معنی‌داری را آشکار ساختند. حلال‌های هیدروالکلی نسبت به دو حلال دیگر (آب و اتیل استات) مقدار بیشتری از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بافت‌ها را استخراج کرده بودند. در جمعیت کجور، خیساندن روش بهتری برای استخراج بود، محتوای بالای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این عصاره‌ها با قدرت بالای پاکسازی رادیکال‌های آزاد DPPH و مهار پراکسیداسیون لیپیدها هم‌خوانی داشت. همچنین، کاربرد امواج فراصوت برای تهیه عصاره‌های آبی در هر دو جمعیت به طور محسوسی مقدار فلاونوئیدهای محلول را افزایش داده بود که انعکاس آن در افزایش خاصیت بازدارندگی از پراکسیداسیون لیپیدها، نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فوق را به خوبی اثبات می کرد. این پدیده از آن‌جا حائز اهمیت است که عصاره‌های آبی فاقد آثار سوء ناشی از حضور حلال‌های سمی و خطرناک نظیر متانول و اتانول هستند و به راحتی در صنایع غذایی، دارویی و نوشیدنی‌ها قابل استفاده می‌باشند. در حالی که عصاره‌های هیدروالکلی بیشتر برای مصارف غیر خوراکی (مصرف در پمادها و استعمال خارجی) می‌تواند کاربرد داشته باشد. بنابراین برای دستیابی به حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه بشقابی سنبله‌ای، باید با توجه به نوع جمعیت و نوع بهره‌برداری، از روش استخراج و حلال مناسب استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی و گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهرا که امکانات و هزینه لازم برای اجرای طرح فوق را فراهم نمودند قدردانی و تشکر می گردد. همچنین، از پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی واحد دانشگاه شهید بهشتی جهت جمع‌آوری و تهیه گیاه قدردانی می‌گردد.

References

[1] Willis JC. A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns, 7th ed, revised by H. K. Airy Shaw, Cambridge (Eng): Cambridge University Press. 1966; p:1214.

[2] Bruno M, Piozzi F, Maggio AM, Simmonds MSJ. Antifeedant activity of neoclerodane diterpenoids from two Sicilian species of *Scutellaria*. *Biochem System and Ecol* 2002; 30: 793-9.

[3] Xiaofei S, Xirui H, Xiaoying H, Maoxing L, Zhang R, Fan P, et al. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical Review. *Ethnopharmacol* 2010; 128: 279-313.

[4] Ghahreman A, Attar F. *Biodiversity of Plant Species in Iran*. Iran: Tehran University; 1999. [Farsi]

[5] Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plants Names, Tehran: Farhang Moa′ser publisher. 1996; 497-9. [Farsi]

[6] Jiangsu New Medical College, editor. Dictionary of Chinese Materia Medical. Science and Technology Press of Shanghai, Shanghai (in Chinese), 1977.

[7] Zeng GF, Chen ZL. Studies on the flavonoids of the Chinese traditional medicine V: the chemical compounds of the genus *Scutellaria*. *Yao Xue Xue Bao* 1957; 1: 47.

[8] Malikov VM, Yuldashev MP. *Journal of Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 2002; 5: 385–409. In: Chirikova NK, Olennikov DN, Tankhaeva LM. Pharmacognostic Study of Aerial Parts of Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *Russian Bioorganic Chemistry* 2010; 36 (7): 909-14.

[9] Karaman S, Tutem E, Bas-Kan KS, Apak R. comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chem* 2010; 120: 1201-9.

[10] Parikka K. antioxidative long chain alkylresorcinols: synthesis and deuterium labeling of bioactive compounds present in whole grains. *Academic dissertation.* Thesis presented in Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Helsinki, Finland. 2007.

[11] Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, mohammad M, El-Elimat T. antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem* 2007; 104: 1372-8.

[12] Han J, Ye M, Xu M, Sun J, Wang B, Guo D. Characterisation of flavonoids in traditional Chinese herbal medicine Huang-qin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatography* B 2007; 848: 355-62.

[13] Horvath C, Martos P, Saxena P. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot

tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* georgi) using high performance liquid chromatography with diode-array mass spectrometric detection. *Chromat_ography* A 2005; 1062: 199-207.

[14] Sanandaji S, Mozaffarian V. Studies of flora in Saral area: Kurdistan-Iran. *Taxonomy Biosystematics* 2010; 2(3(4)): 59-84. [Farsi]

[15] Rechinger KH. Flora Iranica, 150. Akademische Druck. Verlagsanstalt, Graz, Austria. 1982, pp: 2, 48: 78.

[16] Huang W, Lee A, Yang C. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxy flavonoids of Scutellaria baicalensis georgi. *Bioscience Biotechnology* 2006; 70: 2371-80.

[17] Ghannadi A, Mehregan I. Essential oil of one of the Iranian Skullcaps. *Z. Naturforsch A Biosciences* 2003; 58: 316-8. [Farsi]

[18] Mirza M, Najafpoor Navaii M, Dini M. Identification and Investigation chemical composition of essential oil *Scutellaria pinnatifida* Arth.et Hamilt. *Medicinal and Aromatic Plants of Iran* 2004; 4: 417-23. [Farsi]

[19] Bektas T, Dimitra D, Atalay S, Munevver S, Moschos P. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extract of *Saliva tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem* 2005; 90: 333-40.

[20] Andreja H, Majda H, Zeljko K, Davorin B. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food* chemi 2000; 71(2): 229-33.

[21] Amonrat T, Soottawat B, Wonnop V, Eric A, Decker C. The effect of antioxidants on the quality changes of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle during frozen storage. *Journal Food Science and Technology* 2008; 41(1): 161-9.

[22] Prakash A, Rigelhof F, Miller E. Antioxidant activity.2001; Available from: http://www._ medallionlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf. (Accessed 11 May 2012).

[23] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agriculture and Food Chemistry* 2005; 53(10): 4290-302.

[24] Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 2007; 104(4): 1372-8.

[25] Lin M, Tsai M, Wen K. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellaria Radix*. *Chromatog_ raphy A* 1999; 830: 387-95.

[26] Marinova D, Ribarova F, Atanassaova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits

and vegetables. *J Univ Chem Technol Metallurgy* 2005; 40 (3): 255-60.

[27] Beketov EV, Pakhomov VPP, Nesterova OV. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. *J Pharmaceutical Chem* 2005; 39(6): 33-5.

[28] Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical scavenging activity. *Food Chem* 2005; 93: 311-7.

[29] Depkevicius A, Venskutonis R, Beek TA, Linssen JPH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedure from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Sci Food Agriculture* 1998; 77: 140-6.

[30] Moraes de souza R A, Oldoni TLC, Regitano D, Arce MAB, Alencar SM. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia Tecnololia de Alimentos* 2008; 6(1): 41-7.

[31] Gohari AR, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Ajani Y, Hadjiakhoondi A. Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP assay. *Medicinal Plants* 2011; 10: 54-60. [Farsi]

[32] Chirikova NK, Olennikov DN, Tankhaeva LM. Pharmacognostic study of aerial parts of Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *Russian Bioorganic Chem* 2010; 36(7): 909-14.

[33] Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Agricultural and Food Chem*1998; 46 (10): 4113-7.

[34] Rice Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996; 20 (7): 933-56.

[35] Lien EJ, Ren SJ, Bui HYH, Wang RB. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biol Med* 1999; 26 (3-4): 285-94.

[36] Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J Agricultural Food Chem* 2002; 50 (3): 468-72.

[37] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; 74: 2157-84.

[38] Finotti E, Di Majo D. Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung/Food* 2003; 47 (3): 186-7.

[39] Julkunen-Tiito R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows, methods for the analysis of certain phenolics. *Agricultural and Food Chem* 1985; 33(2): 213-7.

[40] Marinova EM, Yanishlieva N. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family

[42] Hosseinzadeh H, Shamsaie F, Mehri S. Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safrana. *Pharmacognosy Magazine* 2009; 5(20): 419-24. [Farsi]

Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem* 1997; 58(3): 245-8.

[41] Şenol FS, Orhan I, Yilmaz G, iek M, Şener B. Acetylcholin esterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and Chem Toxicol* 2010; 48: 781-8.

Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in *Scutellaria pinnatifida* in Two NorthIranian Populations

A. Saboura[1], A. Ahmadi [2]A. Zeynali, [3]M.Parsa[3]

Received:11/08/2012 Sent for Revision:09/10/2013 Received Revised Manuscript:11/12/2013 Accepted:03/03/2014

Background and Objective: Phenolic acids, polyphenols and flavonoids are antioxidant compounds, which act as cell protective factors against oxidative stress by trapping and inhibition of free radicals, play an important role in plants and animals health. In this research, in order to optimize extraction of antioxidant compounds, phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of *Scutellaria pinnatifida* aerial part were determined.

Materials and Methods: Dried powder of aerial part from two populations, Dizin and Kojur, was extracted with ethanol 80%, methanol 80%, water and ethyl acetate, by two soaking and sonication methods. Then, the contents of total phenolic and flavonoid compounds were assayed by spectrophotometric methods. Antioxidant activity of the extracts were analyzed by two tests: free radical scavenging activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and bleaching β-carotene in linoleic acid system. Statistical analysis of the data was performed by One-way and two-way ANOVA to compare the means.

Results: The highest content of total phenol and flavonoid (8 and 24 mg/g Shoot dry weight, respectively) was obtained by soaking method and ethanolic extraction in Kojur population. While in Dizin population with the same extraction techniques, the contents of the mentioned compounds were at very low levels (5.6 and 1.6 mg/g DW, respectively). IC_{50} value of the ethanolic, methanolic and aqueous extracts were estimated about 0.1- 1.2 mg/ml in the Kojur population. The phenolic and flavonoid contents of these extracts were significantly higher than ethyl acetate extracts. With the exception of aqueous extract prepared by soaking, scavenging capacity of DPPH free radicals by different extracts of Dizin population was considerably lower than the Kojour population. The antioxidant assay results obtained from beta-carotene-linoleic acid test showed that the highest inhibition percentage of lipid peroxidation resulted from aqueous extracts prepared by ultrasonic waves (respectively 93% and 50% inhibition by extracts of the Kojour and Dizin populations).

Conclusion: The means of total phenolic and flavonoid contents of the extracts were significantly different under the influence of three factors: population, extraction method and solvent. The highest antioxidant activity was observed in Kojur population: by soaking methanolic extraction method in DPPH test or by sonicate aqueous extraction method in the inhibition of lipid peroxidation test.

Key word: Antioxidant Activity, Extraction Method, Phenolic and Flavonoid Assay, *Scutellaria pinnatifida*

Funding: This research was funded by Alzahra University, Tehran, Iran.

Conflict of interest: None declared.

How to cite this article: Saboura A, Ahmadi A, Zeynali A, Parsa M. Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in *Scutellaria pinnatifida* in Two NorthIranian Populations. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(3): 249-66. Farsi

1- Assistant Prof., Dept. of Plant Science, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
(Corresponding Author) Tel: (021) 88058912, Fax: (021) 88058912, Email: azrasaboora1034@gmail.com
2- MSc Dept. of Plant Science, Faculty of Biological Science, Alzahra university, Tehran, Iran
3- Academic Member, Dept., of Biology, Institute of Applied Science Faculty of the University Jihad, Shahid Beheshti University,Tehran, Iran