مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۸، ۱۴۸-۱۳۷

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

سیدمحمد نبوی[۱]، ، سیدفاضل نبوی[۱]، محمدعلی ابراهیم‌زاده[۲]، بهمن اسلامی[۳]

دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۱/٦ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۳/٤ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: تلکا، خرمندی، چوچاخ و زولنگ از جمله گیاهان بومی ناحیه شمال ایران می‌باشند که جایگاه ویژه‌ای 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 می‌رود. هدف این مطالعه سنجش اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی با بهره‌گیری از شش روش متفاوت برون‌تنی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اثر آنتی‌اکسیدانی با بهره‌گیری از روش‌های به دام اندازی رادیکال آزاد دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل، نیتریک‌اکساید، هیدروژن پراکسید، لینولئیک اسید، قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن مورد مطالعه قرار گرفت. محتوای فنلی و فلاونوئیدی با بهره‌گیری از روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتیو و روش آلومینیوم‌کلراید سنجیده شد.

یافته‌ها: غلظت مهار ۵۰٪ در روش به دام‌اندازی رادیکال‌دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل بدین ترتیب بود: عصاره چوچاخ< عصاره زولنگ > عصاره خرمندی > عصاره تلکا. عصاره‌های چوچاخ و زولنگ فعالیت بهتری را در مدل به دام‌اندازی نیتریک‌اکساید و هم‌چنین در مدل احیا آهن از خود نشان دادند که قابل مقایسه با ویتامین ث بود ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره‌های متانولی گیاه زولنگ و برگ چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر نمونه‌های مورد مطالعه نشان دادند که احتمالاً ناشی از محتوای بالای فنل و فلاونوئید موجود در آن‌ها بوده است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، 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 قائم‌شهر

مقدمه

مصرف آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی هم‌چون میوه‌ها و سبزی‌های موجود در رژیم غذایی، نقش مثبتی را در حفظ وضعیت سلامت بدن انسان ایفا می‌کند [۱]. تولید منظم و کنترل شده اکسیژن فعال موجب پایداری هموستازی اکسایش- کاهش می‌گردد که این امری ضروری برای حفظ سلامت فیزیولوژیکی ارگانیسم‌های زنده است [۲]. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم توازن میان تولید اکسیژن فعال و خنثی شدن آن توسط سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی، عامل ایجاد بسیاری از بیماری‌ها نظیر پیری، انواع سرطان و بی‌نظمی‌های نورو دژنراتیو هم‌چون آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می‌باشد [۳]. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای جلوگیری از فرآیندهای آسیب‌زا ناشی از تولید بیش از حد اکسیژن فعال و پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های فوق، مهم و حیاتی است [۴]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان پارامتری برای سنجش ارزش مواد غذایی مختلف، گیاهان و ترکیبات آن‌ها به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. به تازگی و پس از اثبات سرطان‌زا بودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی [۵]، جستجو برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اهمیت بسیار زیادی یافته است. بخش فنلی و فلاونوئیدی گیاهان، آنتی‌اکسیدان‌های قوی در محیط برون تن هستند [۶]. فلاونوئیدها هر چند که ترکیباتی مغذی نیستند ولی تأثیر مثبتی بر حفظ سلامتی بدن دارند. پژوهش‌های بسیار زیادی درباره فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به دام‌اندازی رادیکال آزاد، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهشی این ترکیبات صورت گرفته است. مهم‌ترین خصلت فلاونوئیدها نقش آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌های 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، کومارین‌ها و تریترپن ساپونین‌ها هستند [۹]. در طب سنتی گونه‌های متفاوت از این جنس برای درمان دردهای مزمن، ادم، التهاب مجاری تنفسی، عفونت‌های ادراری، مار گزیدگی و التیام زخم‌ها استفاده می‌شوند [۱۰]. چوچاخ (*Eryngium caucasicum*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس بوقناق در شمال ایران است که از آن به عنوان سبزی صحرایی استفاده می‌شود [۱۱]. جنس زولنگ عضوی از خانواده چتریان است و در ایران گونه‌ای چند ساله به نام *Froriepia subpinnata* دارد که در مناطق شمالی ایران می‌روید. در اوایل بهار مردم منطقه از برگ آن که اغلب گسترده روی زمین است به عنوان سبزی صحرایی استفاده می‌کنند [۱۲]. جنس گلابی عضوی از تیره گل سرخ است که ۱۱ گونه درختی و درختچه‌ای خودرو در ایران دارد. تلکا *Pyrus boissieriana* به طور گسترده‌ای در جنگل‌های شمال کشور می‌روید و میوه آن مصرف خوراکی دارد [۸]. جنس خرمندی عضوی از خانواده *Ebenaceae* است که یک گونه خودرو جنگلی به نام *Diospyros lotus* دارد که به فراوانی در جنگل‌های شمال می‌روید و میوه‌اش 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 آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاهان مذکور با بهره‌گیری از شش روش متفاوت صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: فروزین، دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل، تری‌کلرو استیک اسید، لینولئیک اسید، پتاسیم فری سیانید از شرکت سیگما و بوتیل هیدروکسی آنیسول،

ویتامین ث، سولفانیل‌آمید، نفتیل‌اتیلن دی‌آمین‌دی هیدروکلراید، اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید، هیدروژن پراکساید و کلرید آهن (III) از شرکت مرک تهیه شد. سایر ترکیبات و حلال‌ها نیز با خلوص آزمایشگاهی خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری: مطالعه حاضر به شکل تجربی انجام شد. بدین منظور اندام هوایی گیاه زولنگ و برگ گیاه چوچاخ قبل از مرحله گل‌دهی 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 جمع‌آوری شد. بخش‌های گیاهان در سایه در مجاورت هوا خشک و سپس پودر شدند. به منظور عصاره‌گیری 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. حلال‌ها در خلاء تبخیر شدند.

اندازه‌گیری محتوای تام‌فنلی و فلاونوئیدهای عصاره‌ها: محتوای تام فنلی با استفاده از واکنشگر فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال مخلوط شده، پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر 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 «میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره» گزارش شد [۱۳]. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید. برای سنجش میزان فلاونوئید، از معرف آلومینیم کلرید استفاده شد. به ۰/۵میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره» گزارش گردید [۱۳]. آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد.

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد: رادیکال پایدار دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد به کار رفت [۱۴]. غلظت‌های 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 آن‌ها گزارش گردید. بر اساس اطلاعات حاصل، غلظت مهار عصاره از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت عصاره به دست آمد. ویتامین ث، کوئرستین و بوتیل هیدروکسی‌آنیسول 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 می‌رود. این مساله سازوکار مهمی را در فرآیند اکسیداسیون ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهد [۱۵]. اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها با روش Yen و Chen انجام شد

[۱۶]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۸۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در آب با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات۰/۲ مولار (pH =۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱٪ مخلوط شد. مجموعه در دمای ۵۰ درجه برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به عنوان متوقف‌کننده واکنش، مجموعه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن ۰/۱٪ مخلوط شده و آن‌گاه جذب مجموعه در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن‌ها گزارش گردید. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاءکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) می‌باشد. ویتامین ث به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد.

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید: نیتریک اکساید دارای کارکردهای سلولی فراوانی از جمله تنظیم رشد سلول و چرخه سلولی، تمایز، آپاپتوزیس و هم‌چنین نقش‌های فیزیولوژیکی بسیاری هم‌چون تنظیم فشار خون، لخته شدن خون، انعطاف سیناپسی می‌باشد. بسیاری از بیماری‌ها از جمله انواع سوختگی، عفونت‌ها و آسیب‌های کبدی منجر به تولید بیش از حد و غیرطبیعی نیتریک اکساید می‌گردند از این رو حذف نیتریک‌اکساید اضافه، اثرات سودمندی در حفظ سلامت بدن دارد [۱۷]. یکی از راه‌کارهای مهم برای کاستن از تولید بیش از حد نیتریک‌اکساید، بهره‌گیری از مهارکننده‌های نیتریک اکساید است. کوئرستین یک فلاونوئید طبیعی است که به منظور مهار نیتریک‌اکساید استفاده می‌گردد اما اثر سرطان‌زایی آن گزارش شده است [۱۸]. از این رو جستجو برای یافتن منابع امن‌تر با منشأ خوراکی افزایش یافته است. این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک‌اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد واکنش شده و یون نیتریت تولید می‌نماید. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می‌گیرد. به دام‌اندازی نیتریک‌اکساید با رقابت نمودن با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظورسدیم نیترو پروساید (۱۰میلی‌مولار) در بافر فسفات با غلظت‌های 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 میلی‌لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱٪، نفتیل‌اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلرید 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 آن‌ها گزارش گردید. کوئرستین به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد [۱۴].

فعالیت شلاته کنندگی آهن (II): غذاها عموماً حاوی فلزات واسطه می‌باشند و یا در حین فرآیند تولید به آن آلوده می‌شوند. عناصر واسطه دو ظرفیتی نقش مهمی را به عنوان کاتالیزور در فرآیندهای اکسیداتیو ایفا می‌کنند که منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تخریبی هیدروپراکساید از طریق پدیده فنتون می‌شوند [۱۴]. این مراحل می‌تواند با شلاته شدن یون آهن به تأخیر افتاده یا غیرفعال گردد. اندازه‌گیری قدرت

شلاته‌کنندگی آهن با روش Diniz انجام شد [۱۹]. به ۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۳/۲-۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲میلی‌مولار کلرید آهن (II) و ۱میلی‌لیتر 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:

$$\frac{\text{جذب عصاره} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب عصاره}} \times ۱۰۰$$

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 FTC (Feric Thiocy Anate): 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 ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در ۴ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه، ۱/۴ میلی‌لیتر محلول اسید لینولئیک (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.

[۱۰۰ × (افزایش جذب کنترل/ افزایش جذب نمونه)] -۱۰۰

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 دام اندازی 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

نـانومتر در مقابـل بلانـک (شـامل بـافر فـسفات بـدون هیدروژن پراکـسید) قرائـت شـد. درصـد مهـار هیـدروژن پراکسید توسط عصاره‌هـا و ترکیبـات اسـتاندارد بـر طبـق معادله زیر به دست می‌آید:

$$\frac{\text{جذب عصاره- جذب کنترل}}{\text{جذب عصاره}} \times ۱۰۰$$

از کوئرستین و ویتامین ث به عنوان استاندارد استفاده شد.

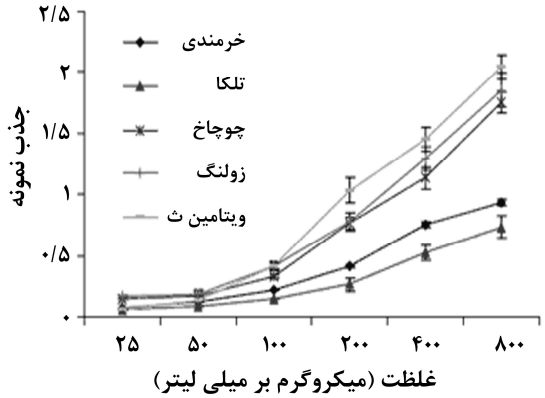
آنالیز آماری: تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکـرار شـده و کلیه اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیـار گـزارش شد. آنالیز واریانس یک سـویه (ANOVA) بـرای مقایـسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال $p<۰/۰۵$ معنـی‌دار در نظـر گرفتـه شـد. مقـادیر غلظـت مهـار ۵۰٪ از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطـه بـه دست آمد.

نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید: محتوای تـام فنلـی بـا روش فولین سیوکالتیو به صورت اکی‌والان گالیک‌اسـید در گـرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد محاسبه شد (جدول ۱). محتوای فلاونوئیـد نیـز بـه صـورت اکـی‌والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر عـصاره‌هـا گـزارش شـد (جدول ۱). عصاره زولنگ به طور قابـل ملاحظـه‌ای دارای مقادیر بـالاتری از فنـل‌تـام و فلاونوئیـد نـسبت بـه سـایر عـصاره‌هـا بـود. فنـل‌هـا و ترکیبـات پلـی‌فنلـی، ماننـد فلاونوئیدها، به طور گسترده در محـصولات غـذایی یافـت می‌شوند و نشان داده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابـل ملاحظه‌ای دارند [۲۲]. میزان فنل‌تام و فلاونوئیـد در ایـن تحقیق شاید فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود درعـصاره‌هـای تهیه شده از گیاهان را توجیه نماید.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد: مدل به دام‌اندازی رادیکال پایدار دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل به طور گـسترده بـرای ارزیـابی توانـایی بـه دام‌انـدازی رادیکـال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۳]. در این تحقیق مشخص شدکه فعالیت بـه دام‌انـدازی رادیکـال در تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش می‌یابـد. غلظـت مهار ۵۰٪(IC_{50}) عصاره‌ها و نیز ویتـامین ث، کوئرسـتین و بوتیل هیدروکسی‌آنیسول به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد در جدول ۱ موجود می‌باشد.

قدرت احیاءکنندگی: نمودار ۱ منحنی غلظـت- پاسـخ را در عصاره‌ها نشان می‌دهد. در این تحقیق مـشخص شـد که قدرت احیاءکنندگی تمام عصاره‌ها بـا افـزایش غلظـت افـزایش مـی‌یابـد. اخـتلاف معنـی‌داری بـین عـصاره‌هـای متفاوت در قدرت احیاءکنندگی وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$).



نمودار ۱- قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های متانولی: افـزایش در جذب نمونه‌ها بیان‌گر قدرت احیاء کنندگی می باشد

عـصاره‌هـای زولنـگ و چوچـاخ قـدرت احیاءکننـدگی بهتری نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان دادند. اثر این عصاره‌ها قابل مقایسه با ویتامین ث بـود ($p<۰/۰۵$). از آن جا که قابلیت احیاءکنندگی عصاره‌های زولنـگ و چوچـاخ بسیار بالا بود می‌توان نتیجه گرفت که ایـن عـصاره‌هـا بـا

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 ۰/۰۴± ۰/۹۳ و ۰/۱۹±۰/۳۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. عصاره زولنگ و عصاره چوچاخ به ترتیب ۱۳٪ و ۴۲٪ بازدارندگی را در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان دادند. اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد (IC_{50} =۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

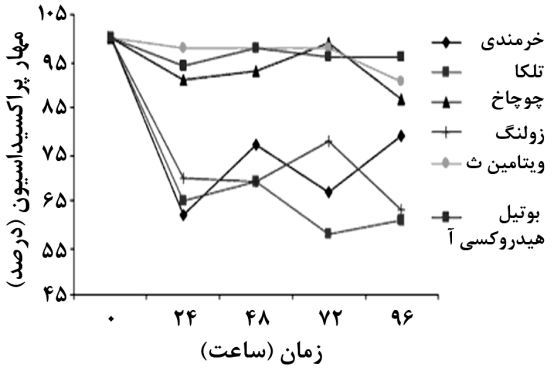
جدول ۱- اثر به دام‌اندازی نیتریک اکساید و دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و نیز محتوای تام فنل و فلاونوئید عصاره‌ها

نمونه	اثر به دام‌اندازی نیتریک اکساید IC_{50} (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	فعالیت به دام‌اندازی DPPH IC_{50} (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	محتوای تام فنلی[1]	محتوای فلاونوئید[2]
میوه خرمندی	۵٪ مهارکنندگی در غلظت۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۴۵۰ ±۳۰	۱۰/۲ ±۰/۹	۲/۱ ± ۰/۰۵
میوه تلکا	۰/۸۵ ±۰/۰۱۷	۳۰۰۰ ± ۴۰	۱۵/۸ ± ۰/۱۹	۳/۶ ± ۰/۰۷
اندام هوایی زولنگ	۰/۴۱ ±۰/۰۱۱	۴۲۰ ±۳۰	۷۵/۷ ± ۰/۲۴	۳۵/۲ ± ۰/۲۶
برگ چوچاخ	۰/۲۷ ± ۰/۰۰۸	۲۷۰ ± ۲۰	۶۲/۳ ± ۰/۲۱	۲۵/۳ ± ۰/۱۹
کوئرستین	۰/۰۱۷	۵/۲۸ ± ۰/۴۳		
ویتامین ث		۵/۰۵ ± ۰/۱۲		
بوتیل هیدروکسی آنیسول		۵۳/۹۶ ± ۲/۱۳		

۱- اکی‌والان میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره

۲- اکی والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر عصاره

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (لینولئیک اسید): نمودار ۲ فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را در غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد. واکنش مهار پراکسیداسیون عصاره چوچاخ از ۹۳ ٪ (در ساعت ۲۴) تا ۹۹٪ (در ساعت ۷۲) به دست آمد. عصاره خرمندی، تلکا و زولنگ فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی را از خود نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت این عصاره‌ها وجود داشت ($p<0/001$). عصاره چوچاخ الگویی همانند ویتامین ث در زمان‌های متفاوت انکوباسیون از خود نشان داد ($p<0/05$).



نمودار ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانتی (لینولئیک اسید) عصاره‌ها در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

به دام‌اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید: عصاره‌ها فعالیت وابسته به غلظت را در به دام‌اندازی رادیکال

هیدروژن پراکسید از خود نشان دادند. غلظت مهار ۵۰٪ در به دام‌اندازی رادیکال هیدروژن پراکسید به این ترتیب بود : میوه تلکا (۰/۰۱±۰/۱۷) < عصاره زولنگ (۰/۰۳±۰/۸۱) < میوه خرمندی (۰/۰۸±۱/۰۱) < عصاره چوچاخ (۰/۰۷±۳/۱) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. غلظت مهار ۵۰٪ برای ویتامین ث و کوئرستین به ترتیب ۰/۱۲±۲۱/۴ و ۱۱/۳±۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. گرچه هیدروژن پراکسید به خودی خود خیلی واکنش‌پذیر نیست اما با افزایش رادیکال هیدروکسیل در سلول باعث ایجاد سایتوتوکسیسیتی می‌گردد. بنابراین حذف هیدروژن پر اکسید در سیستم‌های غذایی بسیار پر اهمیت است [۲۱].

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده میزان فنل و فلاونوئید در گیاه زولنگ بیش از سایر عصاره‌های مورد آزمایش بود. رادیکال دی‌فنیل 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 می‌شود. ترکیباتی که چنین قابلیتی دارند به عنوان آنتی‌اکسیدان مطرح می‌گردند. در این روش عصاره چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره‌ها 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 ارایه داد. سنجش قدرت احیاءکنندگی (آنتی‌اکسیدان) در نمونه‌ها، ناشی از احیاء آهن (III) به آهن (II) با اهداء الکترون می‌باشد. میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاءکنندگی می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده عصاره‌های زولنگ و چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره‌ها 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 احیاءکنندگی، غلظت مورد نیاز از این عصاره‌ها معادل همان غلظت از ویتامین ث است. از آن جا که قابلیت احیاءکنندگی عصاره چوچاخ و زولنگ بسیار بالا بود می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها با کمک اهدا الکترون موجب ختم واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شوند. 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 می‌توانند به عنوان یک جایگاه در مهار بیماری مورد توجه قرار گیرند. علاوه بر آن فعالیت به دام‌اندازی این ترکیب می‌تواند برای توقف در واکنش‌های زنجیره‌ای ناشی از تولید بیش از حد نیتریک‌اکساید در سیستم سلامت انسان به کار گرفته شود [۲۴]. عصاره چوچاخ فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان داد که خود توجیهی بر اثر ضد التهابی این گیاه است [۱۰]. عناصر واسطه، مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکال‌های آزاد از پراکسیدها را براساس واکنش‌های فنتون دارا می‌باشند که می‌تواند موجب بیماری‌های قلبی عروقی در انسان گردد [۲۵]. از آن جا که آهن (II) می‌تواند موجب تولید اکسی‌رادیکال‌ها و پراکسیده شدن چربی‌ها شود، کاهش غلظت آن در واکنش‌های فنتون به نحوی ایجاد نوعی حفاظ در مقابل تخریب اکسیداتیو خواهد بود. اندازه‌گیری قدرت شلاته‌کنندگی آهن (II) بر مبنای روش Diniz صورت پذیرفت [۱۹]. در این روش از توان فروزین در تشکیل کمپلکس با آهن (II) بهره می‌برند. در حضور سایر

شلاته‌کننده‌ها، تشکیل کمپلکس فروزین- آهن (II) کاهش یافته که منجر به کاهش رنگ قرمز ناشی از تشکیل کمپلکس خواهد شد. در این روش، هم اتیلن‌دی‌آمین‌ترا 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 خنثی می‌کنند. در این تست میوه تلکا فعالیت بهتری را نسبت به سایر عصاره‌ها از خود نشان داد. الگوی مهار پراکسیداسیون عصاره چوچاخ مشابه ویتامین ث و بوتیل هیدروکسی آنیسول بود.

نتیجه‌گیری

عصاره‌های متانولی هر چهار گیاه در تمامی‌شش مدل مورد مطالعه، سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. بر اساس نتایج کار، عصاره متانولی برگ چوچاخ 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.

References

[1] Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136: 113-26.

[2] Ames SN, Shigrenaga 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] Akhani 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, lsla 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, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl 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 BJF 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 Nabavi [1], S.F. Nabavi[1], M.A. Ebrahimzadeh[2], B. Eslami[3]

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 widly used in local foods. *Diospyros lotus* fruits are used in prepration 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, H_2O_2 radicals scavenging, linoleic acid, reucing power and iron ion chelating activity. Total phenolic and flavonoid compounds of extract was measured by Folin Ciocalteu and $AlCl_3$ assays.

Results: IC_{50} 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* aeial 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, Pyras 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- Aassociate 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