### مقاله پژوهشي

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره یازدهم، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، ۶۶–۵۵

# بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و اندازه گیری ترکیبات فنلی عصاره های جزئی قارچ درسی اثرات آنتی اکسیدانی و اندازه گیری الافتاری الافتار

فريبا حكماللهي ، حسن رفعتي ، حسين رياحي ، محمدحسين حكيمي ، هاجر حيدري ، فاطمه حقيرالسادات ، مـصطفى عظيمزاده ، عبدالرضا فروتن ، سعيدعلي موسىزاده ،

دريافت مقاله: ٨٩/١٠/١ ارسال مقاله به نويسنده جهت اصلاح: ٨٩/١٢/٣٣ دريافت اصلاحيه از نويسنده: ٩٠/١/٧ پذيرش مقاله: ٩٠/١/١٧

چکیده

**زمینه و هدف**: قارچ Phellinus که انتشار گستردهای در دنیا دارد متعلق به خانواده Hymenochaetacea با بیش از ۳۵۹ گونه با خواص دارویی مختلف میباشد. مطالعه حاضر با توجه به اهمیت موضوع و کمبود تحقیقات پیرامون گونههای Phellinus ایرانی انجام پذیرفت.

مواد و روشها: این مطالعه آزمایشگاهی در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۷ جمع آوری و شناسایی گونه مذکور با استفاده از خصوصیات ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی، روابط میزبانی، پراکنش انجام گرفت. سپس عصاره گیری، جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانتی عصاره متانولی تام و عصارههای فرکشنی (کلروفورمی، بوتانولی و آبی) آن به دو روش تخریب رادیکالهای آزاد DPPH و قدرت آنتی اکسیدانتی کاهش یونهای فریک (Ferric reducing antioxidant power) انجام شد. همچنین مقدار کل ترکیبات فنولی به روش Folin-Ciocalteu سنجیده شدند.

یافتهها: نتایج نشان می دهد که در هر دو آزمون آنتی اکسیدانتی، عصاره متانولی تام و به خصوص جزء بوتانولی آن فعالیت قابل ملاحظه ای در تخریب رادیکالهای آزاد و کاهش یونهای فریک داشته است. غلظتهای مؤثر از عصارههای مختلف (متانولی تام، کلروفورمی، بوتانولی و آبی) که ۵۰٪ رادیکالهای آزاد را تخریب می کنند ( $IC_{50}$ )، به ترتیب 77/.42+7/۹۲، 77/.42+7/۹۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند.

**نتیجه گیری**: نتایج این مطالعه نشان دهنده خواص آنتی اکسیدانی قوی عصاره های مختلف به ویژه عصاره بوتانولی قارچ دارویی *Phellinus torulosus* می باشند. فعالیت آنتی اکسیدانی این قارچ با توجه به سهولت دسترسی و همچنین هزینه بسیار پایین تر در مقایسه با سایر منابع طبیعی و مصنوعی موجود برای مواد آنتی اکسیدانی، قابل توجه بوده و توجیه اقتصادی چشم گیری دارد.

واژههای کلیدی: Phellinus، خواص آنتیاکسیدان، ترکیبات فنولی، قارچهای دارویی، بومی ایران

<sup>1-(</sup>نویسنده مسئول)کارشناسی ارشد گروه آموزشی سیستماتیک گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

تلفن: ۱۳۵۱–۸۲۴۶۸۷۱ دورنگار: ۲۲۴۳۱۶۶۴-۲۱۰، پست الکترونیکی: Fariba\_Hokmollahi@yahoo.com

<sup>2-</sup> استادیار گروه آموزشی مهندسی شیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

<sup>3-</sup> استاد گروه آموزشي دانشكده علوم زيستي، دانشگاه شهيد بهشتي تهران

<sup>4-</sup> استاد گروه آموزشی دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد

<sup>5-</sup> كارشناسي ارشد گروه آموزشي شيمي گياهي، يژوهشكده گياهان دارويي، دانشگاه شهيد بهشتي تهران

<sup>6-</sup> كارشناسي ارشد گروه آموزشي فيزيولوژي گياهي، دانشگاه شهيد بهشتي

<sup>7-</sup> كارشناسي ارشد گروه آموزشي اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران

<sup>8-</sup> دکتری گروه آموزشی قارچ شناسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران

<sup>9-</sup> كارشناسي ارشد گروه آموزشي سيستماتيک گياهي، موسسه تحقيقات جنگل و مرتع پاسند مازندران

#### مقدمه

مهمترین اثر دارویی قارچها و متابولیتهای انها که توجه زیادی را به خود جلب کرده است، خاصیت ضدسرطانی آنهاست. اولین بار Lucas و همکاران در سال ۱۹۵۷ خاصیت ضدسرطانی قارچهای بازیدیومیست را نشان دادند [۱]. داروهای با منشاء قارچی مثل پنیسیلین، گریزئوفولین، آلکالوئیدهای ارگوت و سیکلوسپورین و همچنین داروهای ضدسرطان با منشاء قارچی مثل کریستین، لنتینان و Scizophyllan ترکیبهای مشتق شده از قارچها هستند که برخی از آنها قبل یا در طول شیمی درمانی به طور مؤثری اثرات جانبی این درمانها را کاهش و اثر شیمی درمانی را افزایش می دهند [۲]. علاوه بر این، ترکیبات آنتیاکسیدان مختلفی از قارچهای دارویی جدا شدهاند. سه متابولیت به نامهای interfungins A, B C و که انواعی از ترکیبات رده hispidin را تولید می کنند، از عصاره قارچ (Hymenochaetaceae) عصاره قارچ به دست آمدهاند [۳]. گونههای Phellinus به طور سنتی به عنوان دارو برای درمان انواع بیماریها در چندین کشور آسیایی مورد استفاده قرار می گیرند. در مطالعهای، عصارههای قارچ Phellinus gilvus جهت فعالیتهای آنتیاکسیدانی و ضد سرطان و همچنین اثرات عصاره آبی داغ آن روی ایمنی سلولی موشها توسط Chang و همكاران مورد بررسى قرار گرفت، نتايج تحقيق نشان داد که عصارههای این قارچ به طور قابل ملاحظهای تودههای سرطانی را مهار می کنند. پیش تیمار با عصاره آبی P. gilvus می تواند افزایش میزان کل گلبولهای سفید خون و افزایش نوتروفیلها را مهار کند و ممکن است باعث جلوگیری از التهاب ریوی حاد بیماران بشود. در پژوهشهای دیگری گزارش شده است که P. gilvus

می تواند اثرات کاهش آبسه و چسبیدگی در مدل التهاب صفاق موش و همچنین اثرات بهبود زخمهای پوستی در استفادههای پزشکی را داشته باشد. بنابراین P. gilvus فعالیتهای ضدسرطان وآنتی اکسیدان دارد و همچنین عصاره آبی داغ این قارچ باعث افزایش تکثیر سلولهای طحال و فاگوسیتوز ماکروفاژها می شود [۴].

اثرات آنتیاکسیدانی قـارچهـای Phellinus rimosus و نيز نشان داده شـده اسـت  $[8-\Delta, 7]$ .  $Phellinus \ baumii$ هم اکنون بسیاری از آنتیاکسیدانهای طبیعی از انواعی از مواد گیاهی متفاوت مثل بذرهای روغنی، محصولات حبوبات (غله) و گیاهان معطر و دارویی حاصل می شوند. اثرات آنتیاکسیدانی پلیفنولها در بسیاری سیستمها از مطالعات in vitro نـشان داده شـده اسـت. توانـایی ترکیبهای فنولی برای کلات کردن و کاهش Fe<sup>3+</sup> بـسیار اهمیت دارد و کاربردهای مهمی در صنایع غذایی و دارویی دارند. البته مطالعات بیشتری در مورد ترکیبات فنولی خالص و اثرهای آنتیاکسیدانی و سازوکار اثـر آنهـا در سیستمهای زنده توصیه میشود [۷]. در بسیاری از موارد فنولها و پلیفنولها در فعالیت آنتیاکسیدانی نقش مهمی دارا میباشند، به عنوان مثال دو ترکیب پلیفنولی Phelligridimer A و Inoscavin A از این گروه از قارچها جدا شدهاند [۸]. با توجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچها می توانند منبعی مناسب برای تـأمین این خواسته باشند. تأثیر بالا، هزینـه پـایین و سهولت استفاده درتهیه و مصرف قارچها از مزایای آنها در درمان به شمار می رود.

در سالهای اخیر جمع آوری اطلاعات و تحقیق در زمینه قارچهای دارویی در ایران پیشرفت چشمگیری داشته است، از جمله این تحقیقات میتوان به گزارش و معرفی

بزرگترین قارچ خوراکی با خاصیت دارویی در مراتع ییلاقی استان مازندران [۹]، کشت برخی از قارچهای دارویی (شیتاگه، گنودرما لوسیدم، هریسیوم و پلوروتوس ارینگی) [۱۰]، شناسایی قارچ کنودرما لوسیدم (Basidiomycota) از ایران و بررسی خواص ضدباکتریایی آن [۱۱–۱۱] و همچنین شناسایی و کشت قارچهای دارویی Phellinus و بررسی برخی از خواص ضدباکتریایی آنها اشاره کرد [۱۴–۱۳].

انگیزه جمع آوری و شناسایی قارچ کمبود تحقیقات و اطلاعات اهمیت دارویی این قارچ و نیز کمبود تحقیقات و اطلاعات در زمینه شناسایی و بررسی فعالیتهای بیولوژیکی به ویژه، آنتیاکسیدانی آن نه تنها در کشورمان ایران، بلکه در دنیا بوده است، که زمینه بررسیهای گستردهای را در ابعاد مختلف در ارتباط با این گروه از قارچهای دارویی فراهم میآورد. قارچ دارویی به P. torulosu اثر سم زدایی دارد و همچنین جهت استفاده در درمان بیماریهای کمخونی در طب سنتی چین مورد استفاده قرار می گیرد [۱۵]، اما در مورد خواص آنتیاکسیدانی آن، طبق تحقیق نویسندگان، مورد خواص آنتیاکسیدانی آن، طبق تحقیق نویسندگان، تاکنون یژوهشی گزارش نگردیده است.

هدف از این تحقیق، جمع آوری و شناسایی قارچ دارویی این تحقیق، جمع آوری و شناسایی قارچ دارویی Phellinus torulosus از زیسستگاههای طبیعی آن در مناطق شمالی ایران و بررسی خواص آنتی اکسیدان آن بوده است، همچنین برای درک بهتر علت خاصیت آنتی اکسیدانی این قارچ، مقدار مواد فنولی (ترکیبات آنتی اکسیدانت) نیز ارزیابی گردید.

## مواد و روشها

جمع آوری و شناسایی قارچ دارویی Phellinus torulosus: به منظور انجام مطالعه پژوهشی- کاربردی، نمونههای مختلف این قارچ در تابستان و پائیز سال ۱۳۸۷ از

شهرهای شمالی ایران (از جمله بهشهر، ساری، عباسآباد و نور) از روی گیاه میزبان یعنی درخت انجیلی ( Parrotia persica) که یکی از گیاهان انحصاری کشور ایران می باشد، جمع آوری شدند. در هر مرحله نمونهها به آزمایشگاه قارچشناسی دانشگاه شهید بهشتی منتقل و پس از کدگذاری در پاکتهای کاغذی گذاشته شدند و مورد شناسایی قرار گرفتند. بررسیهای صورت گرفته بر روی نمونهها به ترتیب عبارتند از: ۱- شناسایی گونهها با استفاده از ویژگیهای ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژی فروتینگبادی، ۲- تعیین نقاط پراکندگی، ۳- نام میزبان ۴- اطلاعات هرباریومی نمونهها و ۵- کد هرباریومی آنها. جهت شناسایی نمونهها، ویژگیهای ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی فروتینگبادی مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه ویژگیهای مورد بررسی در نمونهها با کلیدهای شناسایی Larsen & Cobb- 9 Natarajan & Kolandavelu, 2001) (Pulle, همچنین با پایگاه داده Cbs Aphyllophorales (به نشانی اینترنتی: /www.cbs.knaw.nl/databases/ شناسایی شدند [۱۷–۱۶].

عصاره گیری از فروتینگ بادی گونه P. torulosus؛ به منظور تهیه عصاره متانولی تام و عصاره های با قطبیت متفاوت، بر روی ۹۰ گرم از قارچ پودر شده با دستگاه مخلوط کن (Blender) مقدار ۸۰۰ میلی لیتر متانول ۷۵٪ ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در یک ظرف در بسته در دمای آزمایشگاه نگه داری گردید. سپس عصاره حاصل صاف شده و به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار ( Rotary) در فشار کاهش یافته در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تغلیظ گردید تا عصاره متانولی به دست آید.

مقداری از عصاره متانولی خشک برای تهیه عصاره متانولی کنار گذاشته شد و بخش اعظمی از عصاره متانولی خشک در ۶۰ میلی لیتر آب حل شده و طی ۳ بار استخراج و هر بار با اضافه کردن ۲۰ میلیلیتر کلروفرم، برش کلروفورمی به دست آمد. برای بدست آوردن برش بوتانولی، مقدار ۶۰ میلیلیتر n- بوتانول طی ۳ مرتبه (۲۰×۳ میلیلیتر) به بخش آبی باقیمانده اضافه شد. به بخش آبی باقیمانده پس از دو استخراج، برش آبی اطلاق شده و کلیه عصارهها پس از تغلیظ با غلظت ۰/۱ گرم بر میلیلیتر در حلال (به استثنای برش آبی (DMSO) Dimethyl Sulfoxide که در آب حل شد) برای انجام آزمایشهای آنتی اکسیدان مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ساختن عصارههای یکنواخت و کاملاً محلول، دستگاه حمام سونیک مورد استفاده قرار گرفت.

#### بررسى فعاليت آنتى اكسيداني

روش :DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) اثر آنتی اکسیدانی عصارهها با استفاده از روش اندازه گیری كاهش ظرفيت راديكالي ( Radical Scavenging Capacity به کمک DPPH (۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH، ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروههای فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد میباشد. این ترکیب با گرفتن یک الكترون از تركيب آنتى اكسيدان، از رنگ بنفش به سمت زرد تغییر رنگ میدهد. رادیکالهای آزاد موجود در DPPH، در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر-لامبرت پیروی می کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتیاکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و

رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می کند. در این روش برای مقایسه اثر آنتیاکسیدان عصارهها از بوتیل هیدروکسی تولوئن [BHT= tert-Butylated ) BHT (hydroxytoluene) استفاده شد. نمونهها با غلظتهای متفاوت با یک میلیلیتر از محلول ۹۰ میکرومولار DPPH مخلوط شدند و به وسیله متانول ۹۵٪ به حجم ۴ میلیلیتر رسیدند و برای مدت زمان ۶۰ دقیقه در تاریکی تکان داده شدند. جذب محلولهای حاصله و شاهد (حاوی مواد شیمیایی یکسان، به جز نمونه) بعد از این مدت زمان، در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپكتروفوتومتر خوانده شد. درصد RSC بوسيله فرمول زیر محاسبه گردید:

RSC (%) =  $100 \times (A_{blank} - A_{sample}/A_{blank})$ در این فرمول A blank و A sample، به ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه میباشند. فعالیت آنتیاکسیدانی عصارهها به صورت مقدار Express the concentration of the ، IC50 (extract causes 50% inhibition نشان دهنده غلظتی از ترکیب است که باعث ۵۰٪ بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می گردد. این مقدار به وسیله آنالیز همبستگی خطی به دست آمده از مقادیر RSC در غلظتهای مختلف نمونه تعیین شد. همان طور که گفته شد، نتایج به دست آمده با مقدار IC<sub>50</sub> آنتی اکسیدان BHT به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید [۱۸–۱۸].

روش (FRAP ( Ferric reducing antioxidant power) روش FRAP (قدرت آنتیاکسیدانی کاهش یونهای Fe<sup>3+</sup>-TPTZ کاهش اساس (Tripyridyltriazine) زرد رنگ به Fe<sup>2+</sup>-TPTZ آبی رنگ مىباشد. براى تهيه محلول FRAP، ۱۰۰ ميلىليتر بافر استات (۳۰ میلی مول، ۱۰ (ph=۳/۶)، ۱۰ میلیلیتر TPTZ (۱۰ میلیمول در ۴۰ میلیمول اسیدکلریدریک) و ۱۰

میلیلیتر  $Fecl_3$  میلیمول) یعنی به نسبت  $Fecl_3$  میلیلیتر مخلوط می کنیم، این واکنشگر در دمای  $Fecl_3$  مخلوط می کنیم، این واکنشگر در دمای  $Fecl_3$  تهیه می گردد. در غیر سانتی گراد و به صورت  $Fecl_3$  تهیه می گردد. در این این صورت  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$  این  $Fecl_3$  این  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$  است  $Fecl_3$  اوزمایش، واکنشگر حاوی  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$  است  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$  اوزمایش غلظت آنتی اکسیدان  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$  این  $Fecl_3$  و  $Fecl_3$ 

برای انجام این آزمایش ۲ میلیلیتر از محلول FRAP به غلظتهای مختلف از نمونهها افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. سپس جذب محلولهای حاصل در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. در این آزمایش، نتایج بر حسب میکرومول آهن بر گرم خشک عصاره محاسبه و گزارش داده میشود. قدرت آنتی اکسیدانی عصارهها با استفاده از رسم منحنی استاندارد FeSO4.7H2O بررسی میشود.

بدین ترتیب که نمودار جذب بر حسب غلظتهای مختلف از عصارههای مختلف رسم گردید، سپس مقدار عصاره بر حسب میکرولیتر در یک غلظت مشخص (غلظتی که جذب آن در محدوده جذبی منحنی کالیبراسیون قرار گیرد (Y-1) به گرم تبدیل گردید. غلظت مورد نظر از عصاره در معادله جذبی همان عصاره قرار داده می شود و میزان جذب عصاره مورد نظر به دست می آید و پس از آن، در معادله جذبی آهن قرار داده می شود تا غلظت معادل آهن به دست آید [Y].

اندازهگیری مقدار کل ترکیبات فنولی: عموماً برای اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی (TPC) از روش Folin-Ciocalteu استفاده می شود. برای این منظور مقدار ۰/۴ گرم گالیکاسید خشک در ۱۰ میلیلیتر اتانول ۹۶٪ حل شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلیلیتر رسید. بدین ترتیب محلول مادر تهیه شد، که برای رسم منحنی کالیبراسیون مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلیلیتر از محلول مذکور به بالنهای ژوژه ۱۰۰ میلیلیتری منتقل و هر یک با آب مقطر به حجم رسید. این محلولها به ترتیب دارای غلظتهای ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر گالیکاسید بودند. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از عصارههای مختلف قارچها با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، با ۲ میلیلیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Folin-Ciocalteu مخلوط شد. بعد از ۳ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (٪۷)/ به آنها اضافه شد و محلولها به مدت ۲ ساعت تکان داده شدند.

نهایتاً جذب محلولها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی عصارهها با استفاده از منحنی استاندارد گالیکاسید محاسبه شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، معادله خطی منحنی به دست میآید که با قرار دادن مقادیر جذب به دست آمده از عصارهها در این معادله می توان غلظت معادل گالیکاسید از عصارهها را محاسبه کرد. غلظت به دست آمده بر حسب mpp می میباشد. پس از تبدیل mpp به میلی گرم گالیکاسید، نتیجه نهایی بر حسب میلی گرم گالیکاسید بر گرم خشک عصاره گزارش می شود [۲۰].

# آناليز آماري

دادهها با استفاده از آزمونهای کلوموگروف-اسمیرنوف و آنالیز واریانس (برای سه تکرار در قالب طرح كاملاً تصادفي) تجزيه و تحليل شدند. همچنين آزمون چند دامنهای دانکن برای مقایسه میانگین تیمارها در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. كليه آناليزهاي آماري با استفاده از نرم افزار Statistical Analysis System., ) SAS (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA انجام گرفت.

#### نتايج

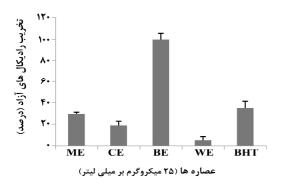
شناسایی جنس و گونه قارچ مورد نظر: با استفاده از روشهای شناسایی مرسوم و نظر اساتید محترم در این زمینه از جنس و گونه قارچ مورد نظر اطمینان حاصل شد و نمونه قارچی جهت تصدیق به کشور فنلاند فرستاده شد، در نهایت کد هرباریومی 114 SBU H 2009 برای این قارچ در نظر گرفته شد (شکل ۱).



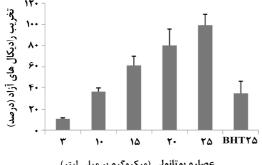
شکل ۱- قارچ Phellinus torulosus روی گیاه میزبان، درخت (Parrotia persica) انجیلی

نتایج بررسی خواص آنتیاکسیدانی به روش تخریب رادیکالهای آزاد DPPH: به منظور بررسی خاصیت آنتیاکسیدان این قارچ، عصاره تام متانولی (ME) و سه

برش با قطبیتهای متفاوت از این عصاره تهیه شدند. این سه برش عبارت بودند از برش کلروفورمی (CE)، برش بوتانولی (BE)، و برش آبی (WE) که به وسیله معرف DPPH مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده به همراه ۳ بار تکرار در نمودارهای ۱ و ۲ و همچنین در جدول ۱ آمده است.



نمودار ۱- میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصارههای مختلف قارچ P. torulosus در آزمایش تخریب رادیکالهای PPPH



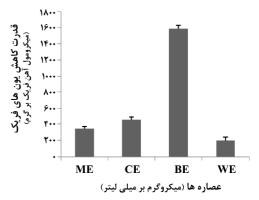
عصاره بوتانولی (میکروگرم بر میلی لیتر)

نمودار ۲- میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر مختلف عصاره بوتانولی قارچ P. torulosus در آزمایش تخریب رادیکالهای **DPPH** 

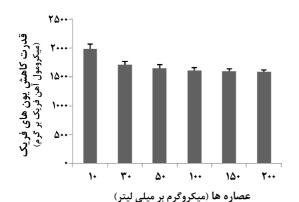
نتایج بررسی خواص آنتیاکسیدانی بـه روش کـاهش یسون هسای فریسک ( Ferric Reducing Antioxidant Power: به منظور بررسی خاصیت آنتی اکسیدان به روش کاهش یونهای فریک، عـصاره تـام متـانولی (ME) و سـه برش با قطبیتهای متفاوت از این عصاره، یعنی برش کلروفورمی (CE)، برش بوتانولی (BE)، و برش آبی (WE) جهت آزمایش FRAP مورد استفاده قرار گرفتند و پـس از

فريبا حكماللهي و همكاران

قرار دادن میزان جذب نمونهها در معادله  $FeSO_4$  غلظت معادل آهن از عصارهها به دست آمد. نتایج بدست آمده به همراه  $\Upsilon$  بار تکرار در نمودارهای  $\Upsilon$  و  $\Upsilon$  و همچنین در جدول  $\Upsilon$  آمده است.



نمودار ۳- :میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصارههای مختلف قارچ P. torulosus در آزمایش قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یونهای فریک



نمودار ۴- میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر متفاوت از عصاره بوتانولی قارچ P. torulosus در آزمایش قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یونهای فریک

Phellinus torulosus جدول ۱- مقادیر  $IC_{50}$  (میکروگرم بر میلی لیتر) و میکرومول آهن فریک بر گرم عصاره قارچ

عصاره	تخریب رادیکالهای آزاد DPPH	قدرت آنتیاکسیدانی کاهش یونهای فریک
	(میکروگرم بر میلیلیتر I $\mathrm{C}_{50}$	( میکرومول آهن فریک بر گرم)
متانولی تام	<b>~•/λ㱕/λ</b> ~	<b>Υ۴</b> Δ/Δ•±•/Λ <b>Υ</b>
برش كلروفورمى	7 <i>P</i> \Y±7\YA	409/44±40/11
برش بوتانولی	11/9A±•/Y۴	1097/7·±٣۵/40
برش آبی	779/8V±7/V8	7 • 1/97±7•/VF
بوتیل هیدروکسی تولوئن(کنترل)	WY/W1	-

هر دو تست آنتی اکسیدانی، عصاره متانولی تام و بخصوص جزء بوتانولی آن فعالیت قابل ملاحظه ای در بخصوص جزء بوتانولی آن فعالیت قابل ملاحظه ای تخریب رادیکالهای آزاد و کاهش یونهای مختلف (متانولی می دهند. غلظتهای مؤثر از عصارههای مختلف (متانولی تام، کلروفورمی، بوتانولی و آبی) که 0.0 رادیکالهای آزاد را تخریب می کنند (1.0)، به ترتیب 0.0 رادیکالهای آزاد را تخریب می کنند (0.0)، به ترتیب 0.0 رادیکالهای آزاد بودند. بررسیهای آماری نشان می دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی

عصاره بوتانولی در مقایسه با عصارههای دیگر و آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری دارد (p<-۰/۰۵). بنابراین این قارچ دارای خواص آنتی اکسیدانی قویی است و مواد فعال در عصاره کل متانول بیشتر در جزء بوتانولی تجمع یافته اند و با افزایش مواد فنولی (ترکیبات شناخته شده آنتی اکسیدانت) در عصارهها به ویژه عصاره بوتانولی،

جدول ۲- مقدار کل ترکیبات فنولی عصارههای قارچ Phellinus torulosus

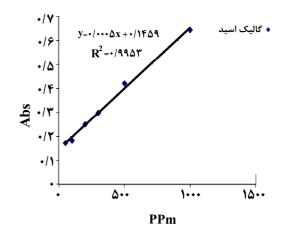
عصاره	مقدار کل ترکیبات فنولی
	(میلی گرم GA بر گرم عصاره)
متانولی تام	て9/1人±7/11
برش كلروفورمى	48/9A±•/77
برش بوتانولی	\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\
برش آبی	<b>ለ/</b> ۵۶±∙/٣٧

#### بحث

فعالیت آنتیاکسیدانی و میزان ترکیبهای فنولی: ویژگیهای اکسیدکنندگی اکسیژن نقش حیاتی در اعمال بيولوژيكي متفاوت مثل استفاده از غذا، انتقال الكترون برای تولید ATP و غیره دارد. در حالی که اکسیژن برای حیات ضروری است، همچنین می تواند باعث اکسید کردن مواد درون سلول شود و نقش تخریب کننده داشته باشد. اکسیژن می تواند به اشکال بسیار فعال مثل رادیکالهای سوپراکسید ( $O2^{-1}$ )، رادیکالهای هیدروکسیل ( $O4^{-1}$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) تبدیل شود و به این صورت مى تواند منجر به استرس اكسيداتيو (Oxidative stress) گردد برای مثال به DNA آسیب برساند، یا این که آنزیمهای ضروری و پروتئینهای ساختاری را تخریب کند. همچنین می تواند واکنشهای زنجیرهای از کنترل خارج شده مثل واکنشهای اتواکسیداسیون و پراکسیداسیون (مثلا پلیمریزاسیون کاتلامینها) را برانگیزد [۲]. ترکیبهای فنولی به روشهای مختلفی میتوانند رادیکالهای آزاد را خنثی کنند. پلی فنولها انواعی از آنتیاکسیدانها هستند که در جلوگیری از بسیاری بیماریها از جمله سرطان نقش دارند، این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات متفاوتی دارند. ترکیبات فنولی خاصیت آنتیاکسیدانی نیز به طور قابل ملاحظهای افزایش مىيابد.

همچنین قدرت آنتیاکسیدانی کاهش یونهای فریک

با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلیلیتر از عصارههای مذکور به ترتیب ۳۴۵/۷۶، ۴۸۱/۲۳، ۱۵۹۲/۳۴ و ۲۰۳/۲۳ میکرومول  $Fe^{2+}/gr$  extract تعیین شدند. بررسیهای آماری نشان میدهد که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بوتانولی در آزمایش FRAP نیز در مقایسه با عصارههای دیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری دارد (p<٠/٠۵). نتایج حاصل از اندازهگیری مقدار کل ترکیبات فنولی قارچ: مقدار کل ترکیبهای فنولی بر اساس مقادیر جذب عصارههای مختلف (WE و BE ،CE ،ME) واکنش داده با معرف Folin-Ciocalteu و مقایسه آن با محلولهای استاندارد گالیک اسید هم ارز به دست آمد (شکل ۲). نتایج این آزمایشها با سه بار تکرار در جدول ۲ آمده است. بالاترین میزان ترکیبهای فنولی در جزء بوتانولی (BE) با مقدار (۷۳/۳۴ mg GA/gr extract) برای گونه P. torulosus مشاهده شد.



شکل ۲- منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه گیری ترکیبات P. torulosus فنولى قارچهاي

دریافت که گاهی بین فعالیت آنتیاکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی رابطه خطی وجود ندارد [۲۲]. البته میزان ترکیبات فنولی این قارچ در مقایسه با میزان این ترکیبات در قارچ P. conchatus جمعآوری شده از ایران با مقدار A۴/A۷ $\pm$ 0/۷۳ میلی گرم GA.gr extract به طور جزئی، کمتر میباشد [۱۴].

## نتيجهگيري

نتایج این مطالعه نشان میدهد که قارچ دارویی Phellinus torulosus دارای خواص آنتی اکسیدانی قویی میباشد و مواد فعال در عصاره کل متانول بیشتر در برش بوتانولی تجمع یافتهاند. این مقدار فعالیت آنتیاکسیدانی با توجه به سهولت دسترسی و همچنین هزینه بسیار پایین تر در مقایسه با سایر منابع طبیعی و مصنوعی موجود برای مواد آنتیاکسیدانی، بسیار مفید بوده و توجیه اقتصادی چشمگیری دارد. به همین دلیل تحقیقات گستردهتر در جهت شناسایی مواد مؤثره موجود در فروتینگ بادی این قارچ در حال انجام میباشد. در نهایت، بررسی جزییات و سازوکار خواص درمانی P. torulosus ایرانی (از قبیل بررسی اثرات ضد قارچی، ضد التهاب، ضد ویروسی، ضدباکتری و به ویژه ضد سرطان از جمله پزوهشهایی است که میتواند در مطالعات پزشکی و یا داروسازی مورد توجه قرار گیرد. در هر صورت با توجه به رویکرد جهانیان به استفاده از منابع زیستی و دوستدار محیط زیست ضرورت استفاده از این قارچ در صنایع غذایی، داروسازی و مصارف پزشکی بسیار احساس می گردد. در این راه شناسایی، جمع آوری و نگهداری از این پتانسیل منابع طبیعی بومی ایران قدم اولیه است که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. شامل ویتامینها، رنگدانهها و فلاونوئیدها، ویژگیهای ضد جهشی و در نتیجه ضدسرطانی و همچنین فعالیت کاهش قند خون را بر عهده دارند [۵]. در این تحقیق، از عصارههای مختلف قارچ P. torulosus جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی و اندازه گیری ترکیبات فنولی کل استفاده شد، ترتیب کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی عصارهها با در نظر گرفتن مقدار IC50 را می توان به صورت زير نمايش داد: BE>ME >CE >WE. در مورد آزمايش قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یونهای فریک هم ترتیب فعالیت عصارهها به همین ترتیب میباشد. جزء بوتانولی عصاره متانولی (BE) که حاوی ترکیبات نیمهقطبی و  $IC_{50}=11/9\Lambda$  قطبی میباشد با داشتن کمترین مقدار میکروگرم بر میلیلیتر در بین عصارهها قوی ترین خاصیت آنتیاکسیدانی را نشان میدهد، که در مقایسه با قارچهای P. rimosus و P. gilvus و P. rimosus ترتیب ۱۳/۳۴ میکروگرم بر میلیلیتر ۶۸/۰ :IC50 نیز، به لحاظ خاصیت آنتی اکسیدآنتی قوی تر می باشد [۴، ۲]. بالاترین مقدار ترکیبات فنولی نیز برای برش (BE) با مقدار ۲۳/۳۴ میلی گرم GA/gr extract مشاهده می شود، بنابراین می تواند بین حضور ترکیبات فنولی و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره همبستگی وجود داشته باشد که این نتیجه گیری با گزارشهای قبلی هم خوانی دارد ۲۱۱]. از طرفی عصاره متانولی این قارچ دارای اثر آنتی اکسیدان بیشتر نسبت به عصاره کلروفورمی می باشد در حالی که میزان ترکیبات فنولی این عصاره کمتر از عصاره كلروفورمي است، بنابراين تنها تركيبات فنولي نیستند که باعث افزایش فعالیت آنتیاکسیدانی عصاره می شوند و قطعا ترکیبات دیگری می توانند دارای خاصیت آنتی اکسیدانی باشند و با دقت در این نتایج می توان استاد گروه شیمی پژوهـشکده گیاهـان و مـواد اولیـه دارویـی، دانشگاه شهید بهشتی که ما را از راهنماییهای ارزنده خویش بهرهمند ساختند تقدیر و تشکر می گردد. همچنین از پیـشنهادهـای مفیـد و تأثیرگـذار داوران محتـرم ایـن مجلـه سپاسگزاری می گردد.

#### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشجویان گرامی خانمها زین شریعتمداری، سمیه کی پور، فاطمه میرزاجانی، نـرگس عابدینی، یونه خلیق، سارا مقدم، زهرا گونانی، فرشته احمـدی و نسیم دلیلیان و همچنین از جناب آقای دکتر پیمان صالحی

#### References

- [1] Lucas EH, Montesono R, Pepper MS, Hafiner M, Sablon E. Tumor inhibitors in Boletus edulis and other holobasidiomycetes. Antibiot Chemother 1957; 7: 1-4.
- [2] Ajith TA, and Janardhanan KK. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. J Clinical Biochemi Nutrition 2007; 40 (3): 157-62.
- [3] Lee IK, Yun BS. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms Inonotus and Phellinus. Bioorganic Med Chem 2007; 15(10): 3309-14.
- [4] Chang ZQ, Hwang MH, Rhee MH, Kim KS, Kim JC, Lee SP, et al. The in vitro anti-platelet, antioxidant and cellular immunity activity of Phellinus gilvus fractional extracts. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24(2): 181-7.

- [5] Shon MY, Kim TH, Sung NJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of Phellinus baumii (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. Food Chem 2003; 82(4): 593-7.
- [6] Sheena TA, Ajith A, Mathew T, Janardhanan KK. Antibacterial activity of three macrofungi, Ganoderma lucidum, Navesporus floccose and Phellinus rimosus occurring in south Pharmaceutical Biology 2003; 41(8): 564-7.
- [7] Jittawan Kubola, Sirithon Siriamornpun. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (Momordica charantia L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. Food Chemistry 2008; 110(4): 881-90.
- [8] Shun YM, Wen YH, Yong CY, Jian GS. Two Benzyl Dihydroflavones from Phellinus igniarius. Chinese Chem Lette 2003; 14(8): 810-3.
- [9] Mossazade SA. Report and introduce of the biggest edible mushroom with medicinal effect on

Mazandaran province. The abstracts from the first national research of rangelands management 2002; 114. [Farsi]

- [10] Sargazi F. Collection of some medicinal mushroom (shitakae, *Ganoderma lucidum & Pleurotus eryngii*) and investigation of biological and chemical effects of *Ganoderma lucidum*. Tehran: University of Shahid Beheshti. 2007; 125. [Farsi]
- [11] Keypour S. Identification of Ganoderma lucidum (Basidiomycota) from Iran and investigation of antibacterial effects. Tehran: University of Shahid Beheshti 2008; 64. [Farsi]
- [12] Keypour S, Riahi H, Moradali MF, Rafati H. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) from Iran. *Int J Medicinal Mushrooms* 2008; 10(4): 345-9.
- [13] Riahi H, Hokmollahi F, Hakimi MH, Rafati H, Mosazadeh SA. Collection and identification of three medicinal Phellinus Quel. species from Hycanian province, north of Iran. Proceeding of the 5th International Medicinal Mushroom Conference 2009; 48-55.
- [14] Hokmollahi F, Rafati H, Riahi H, Hakimi MH, Aliahmadi A, Hedari H, et al. Collection and identification of a medicinal mushroom, *Phellinus* conchatus from Iran and investigation the antibacterial activity of total methanol extract and fractional extracts. *J Shaheed Sadoghi Univ Med Sci* 2011; 18(6): 521-30.

- [15] Dai YC, Zhou LW, Cui BK. Chen YQ, Decock C. Current advances in Phellinus sensu lato: medicinal species, functions, metabolites and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87(5): 1587–93.
- [16] Natarajan K, Kolandavelu K. Resupinate Aphyllophorales of Tamil Nadu, India. Centre for advanced study in Botany, University of Madras. 1998; 133.
- [17] Larsen MJ, Cobb-Poulle LA. Phellinus (Hymenochaetaceae). A survey of the world taxa. Synop Fung 1990; 3(1): 206.
- [18] Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. Longifolia. Food Chem* 2007; 103(4): 1449-56.
- [19] Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem* 2004; 52(9): 2485-9.
- [20] Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enology Viticulture 1977; 28(1): 49-55.
- [21] Pourmorad F, Hosseinimehr SJ and Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J Biotechnology* 2006; 5(11): 1142-5.
- [22] Fathi F. Chemical assessment and Evaluation of antioxidant and antibacterial effects of the essence and extracts from two Salvia species. Tehran,

Medicinal plants research institute, university of

Shaheed Beheshti 2006; 144. [Farsi].

## Investigation of the Antioxidant Activities and Determination of the Phenol Content of Fractional Extracts of Iranian Medicinal Mushroom Phellinus torulosus

F. Hokmollahi<sup>1</sup>, H. Rafati<sup>2</sup>, H. Riahi<sup>3</sup>, M.H. Hakimi<sup>4</sup>, H. Heydari<sup>5</sup>, F. Haghirosadat<sup>6</sup>, M. Azimzade<sup>7</sup>, A.R. Frotan<sup>8</sup>, S.A. Mossazade<sup>9</sup>

Received: 22/12/2010 Sent for Revision: 14/03/2011 Received Revised Manuscript: 27/03/2011 Accepted: 06/04/2011 Background and Objectives: Phellinus Ouel is a large and widely distributed genus of the family Hymenochaetaceae under the class of Basidiomycetes with more than 359 species. Due to their great medicinal effects and lack of investigation on Iranian species, this study was performed.

Materials and Methods: In this laboratory study, the macro- and micro-morphological properties of the species were determined using the total methanol extract and it's fractional extracts (chloroform, butanol and water extracts). The antioxidant assays were then performed. The radical scavenging capacity of fractional extracts of this fungus were evaluated by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity and Ferric reducing-antioxidant power assays. Also, the total phenol content of each extract was measured using Folin-Ciocalteau method.

**Results:** The results indicated that the total methanol extract showed a significant antioxidant activity. Further fractionation indicated that the butanol fraction had a stronger activity than the total methanolic extract in both antioxidant assays. The effective concentrations of the different extracts (total methanol, chloroform, butanol and water), for scavenging of 50% of generated radicals (IC<sub>50</sub>), was 30.87±0.83, 87.22±7.92, 11.98±0.74 and 229.67±2.76 μg/ml, respectively.

Conclusion: The results showed that different extracts, especially butanol extract have high antioxidant activities which indicate the presence of active components in this fraction. Considering these great antioxidant effects and its low expense, it is recommended to use this fungus in more clinical trial researches and drug manufacturing industry.

Key words: Phellinus, Antioxidant effects, Phenolic compounds, Medicinal mushroom, Native of Iran

Funding: This research was founded by Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran.

Conflict of interest: None declared. Ethical approval: None declared.

How to cite this article: Hokmollahi F, Rafati H, Riahi H, Hakimi MH, Heydari H, Haghirosadat F, et al. Investigation of the Antioxidant Activities and Determination of the Phenol Content of Fractional Extracts of Iranian Medicinal Mushroom Phellinus torulosus. J Rafsanjan Univ Med Sci 2011; 57-66. [Farsi]

<sup>1-</sup> Department of Biological Sciences, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran (Corresponding Author) Tel: (0351) 8246872, Fax: (021) 22431664, E mail: Fariba Hokmollahi@yahoo.com

<sup>2-</sup> Medicinal plants research institute, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>3-</sup> Department of Biological Sciences, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>4-</sup> Faculty of Natural Resource, Yazd University, Yazd, Iran

<sup>5-</sup> Medicinal plants research institute, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>6-</sup> Department of Biological Sciences, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>7-</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>8-</sup> Plant Protection Dept. Agricultural and Natural Resources, Reserch Center of Mazandaran, Sari, Iran

<sup>9-</sup> Research institute of forest and rangelands, Mazandaran, Iran