Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانتی فراکسیون های مختلف اندام هوایی گیاه گز خوانسار (*Astragalus brachycalyx* Fischer)

امیر سیاهپوش*[1]، فضل اله امرایی**، فرشته گل فخرآبادی**

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً توجه به کشف ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی به منظور استفاده در داروها و صنایع غذایی افزایش پیدا کرده است که اساساً به دلیل مشکلات آنتی‌اکسیدانت های صناعی می باشد. طب سنتی یک قسمت مهم از سیستم درمانی ایران می‌باشد. گیاه *Astragalus brachycalyx* یکی از گیاهان معروف طب سنتی بوده ولی تاکنون مطالعه ای در زمینه اثرات آنتی اکسیدانتی آن انجام نشده است. هدف این مطالعه تعیین و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره های مختلف این گیاه می باشد

روش بررسی: از اندام هوایی گیاه گز خوانسار عصاره تام متانولی، کلروفرمی، پلی فنلی و آبی تهیه شد. به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی از دو روش DPPH و TEAC استفاده گردید. نتایج روش DPPH بصورت IC_{50} و در روش TEAC به صورت عدد TEAC در زمان های مشخص بیان گردید.

یافته ها: در روش DPPH عدد IC_{50} برای عصاره‌های عصاره تام، کلروفرمی، پلی‌فنلی و آبی به ترتیب ۰/۶۲۵، ۰/۸۲۷، ۰/۱۹۳ و ۰/۲۷۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر و در روش TEAC میزان عدد TEAC به دست آمده برای عصاره‌های تام، کلروفرمی، پلی فنلی و آبی در دقیقه ۲، به ترتیب ۱۱/۲۰،۲۲/۲۹، ۱۷/۰۶، ۴۹/۴۲، در دقیقه ۴ به ترتیب ۲۴/۰۷، ۱۲/۳۳، ۱۸/۴۷، ۵۱/۵۶ و در دقیقه ۶ به ترتیب ۲۵/۱۹، ۱۲/۷۶، ۱۸/۷۸، ۵۲/۶۱ میکرومول بر ۱۰۰ گرم ماده خشک گیاه بود.

نتیجه‌گیری: همه عصاره‌ها دارای اثر آنتی‌اکسیدانت در هر دو روش بودند و از بین آنها عصاره پلی‌فنلی بیشترین فعالیت را در روش DPPH و در روش TEAC داشت. بیشترین اثر مربوط به عصاره آبی بوده و عصاره کلروفرمی دارای کمترین اثر در هر دو روش بود. نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌های آبی و پلی‌فنلی دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانتی می باشند.

م ع پ ۱۳۸۹؛۹ (۳): ۲۷۷-۲۷۱

کلید واژگان: گز خوانسار، DPPH، TEAC، آنتی اکسیدانتی

---

* استادیارگروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

** داروساز، عضو مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۱-نویسنده مسوول: Email: amirsiahpoosh@yahoo.com

دریافت مقاله ۱۳۸۷/۹/۱۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۸/۱۲/۱۱ اعلام قبولی: ۱۳۸۸/۱۲/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اکسیداسیون، انتقال الکترون از یک اتم است و یک قسمت از زندگی هوازی و متابولیسم موجودات زنده می باشد. اکسیژن، پذیرنده های الکترون در سیستم انتقال الکترون بوده که در بدن از ATP انرژی تولید می نماید. اکسیژن تحت شرایط خاص ممکن است به صورت تک الکترون درآمده و تولید رادیکال آزاد نماید. زمانی که اکسیژن به صورت تک الکترون در می آید به آن اکسیژن فعال (ROS) می گویند(۱). ROS به لیپیدهای غشاء سلول، پروتئین های بافتی یا آنزیم ها، کربوهیدرات ها و DNA حمله کرده و باعث اکسیداسیون می شوند که نتیجه آن آسیب غشایی، تغییرات در ساختمان پروتئین ها و آسیب DNA است. این آسیب اکسیداتیو به نظر می رسد که عامل پیری و بیماری های پیشرونده مختلفی از قبیل بیمارهای قلبی، کاتاراکت، نارسایی قلب و سرطان است (۲) بدن انسان برای محافظت در برابر رادیکال های آزاد به سیستم های آنتی اکسیدانتی مجهز شده است. این سیستم ها شامل آنتی اکسیدانت های تولید شده در بدن (اندوژن) و آنتی اکسیدانت های موجود در رژیم غذایی (اگزوژن) هستند. به خاطر کارآیی ناقص سیستم های دفاعی اندوژن بدن و وجود بعضی موقعیت های فیزیوپاتولوژیک (مانند کشیدن سیگار، آلودگی هوا، امواج UV، رژیم غذایی حاوی اسیدهای چرب اشباع نشده بالا، التهاب، ایسکمی و غیره) که در آنها ROSها به مقدار فراوان تولید می شوند، آنتی اکسیدانت های غذایی مورد نیاز هستند تا اثرات تجمعی آسیب اکسیداتیو روی بدن را خنثی کنند(۳). اثر آنتی اکسیدانتی ویتامین های A، C، E و ترکیبات پلی فنلی موجود در رژیم غذایی به خوبی ثابت شده است(۴). در دهه گذشته مدارک فراوانی ارائه شده که ترکیبات پلی فنلی گیاهی را به عنوان آنتی اکسیدانت معرفی می نمایند. این ترکیبات که تقریبا درتمام غذاهای گیاهی وجود دارند، اغلب به مقدار فراوان وجود داشته و شامل فنل ها، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، تانن ها و لیگنان ها هستند.

گیاهان جنس آستراگالوس از خانواده پروانه واران (Papilionaceae)، دارای بیش از ۹۰۰ گونه گیاه علفی یک ساله و چند ساله در ایران بوده که اغلب آنها انحصاری ایران می باشند. این گیاهان دارای اثرات فارماکولوژی متعدد از قبیل تقویت کننده سیستم ایمنی بدن (۵)، ضد سرطان (۶)، ضد دیابت (۷)، ضد آنفلوانزا (۸) می باشد. گز خوانسار (*Astragalus brachycalyx* Fischer) که با نام گز انگبین نیز معرف می باشد از جمله گیاهان بسیار معروف این جنس بوده که در ایران استفاده زیاد داشته ولی تاکنون مطالعات چندانی بر روی آن صورت نگرفته است. تحقیق حاضر به بررسی اثرات آنتی اکسیدانت فراکسیون های مختلف این گیاه می پردازد.

روش بررسی

مواد:

Trolox
6-hydroxy-2, 5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
ABTS
2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
TPTZ
2,4,6-tripyridyl-s-triazine
DPPH
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

از شرکت سیگما و بقیه مواد مورد نیاز از شرکت مرک خریداری گردید.

تهیه نمونه گیاهی: اندام های هوایی گیاهان *Astragalus brachycalyx* از رویشگاه های طبیعی آنها در دره بازافت واقع در استان چهار محال و بختیاری و در فصل بهار جمع آوری گردید و بعد از خشک کردن در سایه از آنها جهت آزمایش ها استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه عصاره: جهت تهیه عصاره تام متانولی ابتدا ۱۰۰ گرم پودرگیاه از اندام های هوایی خشک شده گیاه تهیه و سپس از روش خیساندن در متانول (به مدت ۴۸ ساعت) جهت استخراج عصاره استفاده گردید. برای تهیه عصاره‌های کلرفرمی و پلی‌فنلی، ابتدا از ۱۰۰ گرم پودر گیاه به روش خیساندن عصاره متانولی تهیه گردید. بعد از تغلیظ و توسط کلرفرم دکانته گردیده و دو فاز آبی و کلرفرمی استخراج گردید. هر دو فاز آبی (که میزان ترکیبات فلاونوییدی آن بالا می باشد) و کلرفرمی با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ گردیدند. برای تهیه عصاره آبی از روش خیساندن استفاده گردید(۹).

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی:

روش DPPH: در این روش میزان ۳/۹ میلی لیتر از DPPH استوک ساخته شده داخل کوت ریخته و جذب توسط Uv-Vis Shimadzu spectrophotometer درطول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره اضافه و جذب آن در ۵۱۵ نانومتر، ابتدا هریک دقیقه تا دقیقه ۱۰، سپس هر ۳ دقیقه تا دقیقه ۳۰ خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله $I(\%) = (A_0 - A_s)/A_0 \times 100$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل(حاوی همه اجزا واکنش گر بدون نمونه) و A_s جذب نمونه بود. نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدانت که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید(۱۰).

روش TEAC:

(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity):

برای تهیه رادیکال ABTS، ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی مول تهیه شد. به این محلول ABTS، پتاسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی مول درمحلول برسد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. در این مدت از مولکول ABTS، رادیکال کاتیون ABTS تولید شد.۲۰ میکرولیتر از نمونه ها را با پیپتور برداشته و با ۲ میلی لیتر از محلول $ABTS^{\bullet+}$ در کوت مخلوط نموده، سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر در زمان های ۲، ۴ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط کردن خوانده شد. نتایج به صورت عدد TEAC (قدرت مهار رادیکال ABTS نمونه ها براساس استاندارد Trolox) بیان گردید (۱۱).

تست ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت Mean± SD گزارش گردیده و IC_{50} ها از نمودار خطی با ضریب رگرسیون بالای ۰/۹ تهیه گردید.

یافته ها

نتایج روش DPPH: درصد مهار رادیکال DPPH در تمامی عصاره ها وابسته به غلظت بوده و ترتیب اثر در ماکزیمم مقدار جذب به صورت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر> ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر > ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بوده و بین درصد مهار رادیکال تمام غلظت ها و شاهد اختلاف معناداری وجود داشت($P<۰/۰۵$). IC50 برای عصاره تام، کلرفرمی، پلی فنلی و آبی در نمودار ۱ آورده شده است.

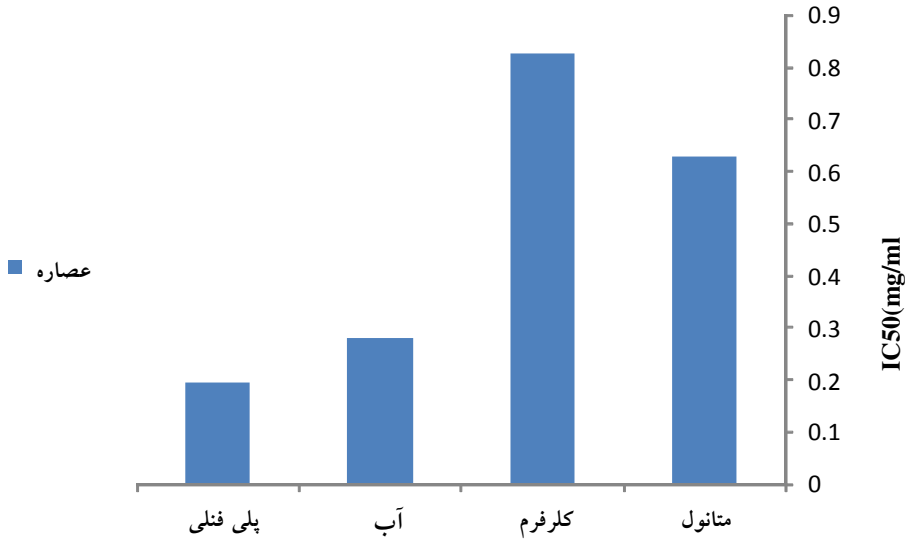
نتایج روش TEAC: عدد TEAC محاسبه گردیده در دقایق ۲، ۴ و ۶ در جدول ۱ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه بین فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره های مختلف بر اساس عدد TEAC در دقایق ۲، ۴ و ۶

	عدد TEAC (معادل میکرو مول Trolox بر ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه)		
عصاره	**دقیقه ۲**	**دقیقه ۴**	**دقیقه ۶**
متانولی	۲۲/۲۹	۲۴/۰۷	۲۵/۱۹
کلرفرمی	۱۱/۲۰	۱۲/۳۳	۱۲/۷۶
آبی	۴۹/۴۲	۵۱/۵۶	۵۲/۶۱
پلی فنلی	۱۷/۰۶	۱۸/۰۴۷	۱۸/۷۸



نمودار ۱: مقایسه Ic50 عصاره های مختلف گیاه *A. brachycalyx*

بحث

با مقایسه IC_{50} بدست آمده برای تست DPPH ترتیب اثر بخشی به صورت پلی فنلی، آبی، متانولی و کلرفرمی می باشد. ترکیبات پلی فنلی دارای اثرات آنتی اکسیدانتی قوی در محیط *Invitro* و Invivo می باشند (۱۳،۱۲). ولی میزان قدرت آنتی اکسیدانتی آنها با توجه به ساختار ترکیبات متفاوت است (۱۴). این گیاه حاوی مقادیر بالایی پلی ساکارید (مان) بوده و دارای موارد مصرف متنوعی در طب سنتی ایران می باشد. پلی ساکاریدها در عصاره آبی محلول بوده و دارای اثرات آنتی اکسیدانتی می باشند (۱۵). عصاره متانولی و عصاره کلرفرمی دارای اثرات ضعیف تر بوده که می تواند به دلیل عدم وجود این دو دسته ترکیبات مهم در این عصاره ها باشد. در مطالعه ای که

www.SID.ir

Archive of SID

ادیگوزل و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام داده اند IC50 ذکر شده برای گونه های مختلف جنس آستراگالوس را بین ۶۸.۸ تا ۴۰۰.۶ میکروگرم بر میلی لیتر ذکر نموده و بعضی از گونه ها نیز فاقد اثر بخشی بوده اند. در این مطالعه عصاره هگزانی، اثرات ضعیف تری داشته که آن را به کاهش حلالیت ترکیبات وارد شده در عصاره هگزانی در متانول دانسته اند(۱۶).

مقایسه عدد TEAC عصاره های مختلف نشان می دهد که ترتیب اثر بخشی در دقایق مختلف مشابه بوده و به صورت عصاره آبی> عصاره متانولی>عصاره پلی فنلی > عصاره کلرفرمی می باشد. تفاوت در اثر بخشی عصاره ها به دلیل تفاوت در نوع رادیکال آزاد مورد استفاده و شرایط تست می باشد و به منظور جمع بندی مناسب باید چندین تست آنتی اکسیدانتی بر روی نمونه ها انجام گیرد(۱۷). عدد TEAC که به طور مرسوم در مطالعات گوناگون مورد استفاده قرار می گیرد، وابسته به میزان عصاره حاصله می باشد. لذا اختلاف می تواند به علت تفاوت در میزان وزنی عصاره حاصله باشد. با حذف این فاکتور و محاسبه عدد TEAC برای هر عصاره، میزان عدد TEAC تغییر نموده و پتانسیل عصاره برای مهار رادیکال محاسبه می گردد. با این تغییر، اثر بخشی به صورت عصاره آبی> عصاره پلی فنلی> عصاره متانولی> عصاره کلرفرمی می گردد. با این توجه در این مطالعه نیز عصاره آبی و پلی فنلی دارای تاثیراتی بهتر نسبت به بقیه عصاره ها می باشند. در مطالعه ای میزان عدد TEAC برای گونه *A.glycyphyllos* ۱۶۵/۳ ذکر گردیده است(۱۸). در مطالعه انجام توسط تاواها و همکاران بر روی عصاره متانولی و آبی دو گونه گون نشان داده شده که عصاره آبی دارای عدد TEAC پایین تری نسبت به عصاره متانولی می باشد و عدد TEAC برای عصاره آبی و متانولی *A.berytheus* و *A. peregrinus* به ترتیب ۴۳/۹، ۶۳/۲، ۳۸/۷ و ۵۳/۹ ذکر گردیده است(۱۹).

نتیجه گیری

گیاه *A. brachgycalyx* دارای اثرات آنتی اکسیدانتی بهتری نسبت بعضی گونه های مطالعه شده دارد و در بین عصاره ها، عصاره آبی و پلی فنلی دارای اثرات آنتی اکسیدانتی بهتری می باشند.

قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به خاطر تصویب و تامین اعتبار این پژوهش سپاسگزاری می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1-Pietta P. Flavonoids as Antioxidant. J Nat Pro 2000;63:1035-42.
2-Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. J Carcinogen2006;5:14.
3-Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 1999;37(9-10):949-62.
4-Adom KK, Liu RH. Antioxidant activity of grains. J Agric Food Chem 2002, 50(21):6182–7.
5-Cho WC, Leung KN. In vitro and in vivo immunomodulating and immunorestorative effects of Astragalus membranaceus. J Ethnopharmacol 2007;113(1):132-41.
6-Auyeung KK, Cho CH, Ko JK. A novel anticancer effect of Astragalus saponins: Transcriptional activation of NSAID-activated gene. Int J Cancer 2009;125(5):1082-91.
7-Chao M, Zou D, Zhang Y, Chen Y, Wang M, Wu H, et al. Improving insulin resistance with traditional Chinese medicine in type 2 diabetic patients. Endocrine 2009;36(2):268-74.
8-Ko HC, Wei BL, Chiou WF. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. J Ethnopharmacol 2006;107(2):205-10.
9-Ghasemi N, Moatar F, Mohagheghzadeh A. Introduction. Iranian Herbal pharmacopoeia. 2003; 1-33.
10-Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci Technol 1995;28(1):25-30.
11-Zuluetaa A, Estevea MJ, Frígola A. ORAC and TEAC next term assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 2009;114(1):310-6.
12-Atawodi SE, Atawodi JC, Idakwo GA, Pfundstein B, Haubner R, Wurtele G, et al. Polyphenol omposition and antioxidant potential of Hibiscus esculentus L. fruit cultivated in Nigeria. J Med Food 2009;12(6):1316-20.
13-Luczaj W, Zapora E, Szczepanski M, Wnuczko K, Skrzydlewska E. Polyphenols action against oxidative stress formation in endothelial cells. Acta Pol Pharm 2009;66(6):617-24.
14-Silva MM, Santos MR, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. Free Radic Res 2002;36(11):1219-27.
15-Hu T, Liu D, Chen Y, Wu J, Wang S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from Undaria pinnitafida in vitro. Int J Biol Macromol 2010;46(2):193-8.
16-Adiguzel A, Sokmen M, Ozkan H, Agar G, Gulluce M, Sahin F. invitro antimicrobial and antioxidant activities of methanol and hexan extract of astragalus species growing in the eastern anatolia region of turkey. Turk J Biol 2009;33:65-71.
17-Frankel EN, Meyyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J. Sci. Food Agric 2000;80(13):1925-41.
18-Goðevac D, Zdunic G, Savikin K, Vajs V, Menkovic N. Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. Fitoterapia 2008;79(3):185-7.
19-Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemi 2007;104(4):1372-8.

www.SID.ir

Archive of SID

Antioxidant Activity of Aerial Parts of Varius Extracts of *Asteragalus Brachycalyx*

SiahpooshA[*1], Amraee F[2], GolFakhr Abadi F[2]

[1]Department of Pharmacognosy, Herbal Medicine Research Center, [2]Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: There has been an increasing interest for antioxidant compounds use in preventive medicine and food industry, mainly due to several drawbacks of synthetic compounds. Traditional herbal medicine plays an important part in Iranian healthcare system. *Astragalus brachycalyx* (Gaz angabin) has been used in traditional medicine and its antioxidant effects have not been studied previously. The aim of this study was to determine and compare antioxidant activity of various extracts of aerial parts of this herb.

Subjects and Methods: Four extracts (methanol, chloroform, polyphenols, aqueous) were prepared from aerial parts of *A.brachycalyx.* DPPH and TEAC assays were used for the antioxidant activity. The results of DPPH and TEAC assays were expressed as IC_{50} and TEAC values at individual time points.

Results: The IC_{50} values of methanolic, chloroformic, polyphenolic and aqueous extracts were 0.625, 0.827, 0.193, 0.279 mg/ml, respectively. The TEAC values of the extracts at 2, 4 and 6 min reaction were 22. 29, 11.20, 17.06, 49.42; 24.07, 12.33, 18.47, 51.56; 25.19, 12.76, 18.78, 52.61 µmol Trolox equivalents/100 g DW.

Conclusion: All extracts had antioxidant activity as measured by both methods. The polyphenolic extract was found to have maximum activity in DPPH assay, while in TEAC assay, the aqueous extract showed maximum activity and chloroformic extract had minimum antioxidant effects. The results showed that polyphenolic and aqueous extracts had better activities in antioxidant assays.
Sci Med J 2010; 9(3):271-277

Keywords: *Astragalus brachycalyx*, DPPH, TEAC, Antioxidant.

Received: Dec 2, 2008 **Revised: Mar 2, 2010** **Accepted: Mar 9, 2010**

[*]Corresponding author email: amirsiahpoosh@yahoo.com

www.SID.ir