

بررسی فعالیت ضداکسایشی و جاروب کنندگی رادیکال در برگ، ساقه و بذر *Asperugo procumbens L.* از خانواده گل گاوزبان

هاجر موحدی نژاد*، رضا حیدری و رشید جامعی

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۸

چکیده

در این مطالعه، فعالیت ضداکسایشی و ضدرادیکالی عصاره‌های متانولی برگ، ساقه و بذر گیاه *Asperugo procumbens L.* (خانواده گل گاوزبان) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور محتوای فنولی کل با روش فولین-سیوکالتو تعیین شد. قدرت احیای عصاره‌ها، فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکالها (DPPH، نیتريت، هیدروژن پراکسید و سوپراکسید) و فعالیت کلات‌کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله نشان داد که عصاره بذر با بیشترین محتوای فنولی، از بیشترین قدرت احیاکنندگی و ظرفیت جاروب‌کنندگی رادیکالهای آزاد برخوردار بود. سنجش فعالیت شکستگی زنجیر، سرعت حذف رادیکال را توسط عصاره‌های مختلف نشان داد. رابطه معنی دار آماری بین محتوای فنول و فعالیت کلات‌کنندگی آهن یافت نشد. با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که بذر گیاه فوق‌الذکر منبع خوبی از ضداکساینده‌های طبیعی است و می‌توان از آن به منظور جلوگیری از اثرات تخریبی رادیکالهای آزاد استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *Asperugo procumbens L.*، ضداکساینده، ضدرادیکال، محتوای فنول، بذر

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۴۱۴۳۴۵۳، پست الکترونیکی: hmovahedh@ymail.com

مقدمه

در سالهای اخیر به دنبال اثبات رابطه بین تنش اکسایشی و بیماریهای انسان، توجه رو به رشدی در مورد مکملهای غذایی و ترکیبات حاوی خواص ضداکسایشی ایجاد شده است (۲۸). این ترکیبات به مهار بسیاری از واکنشهای اکسیداسیون که توسط رادیکالهای آزاد مثل سوپراکسید، هیدروکسیل و پراکسی‌نیتريت ایجاد می‌شوند، کمک کرده و باعث آهسته کردن و یا مهار توسعه بیماریها می‌شوند (۲۹). به نظر می‌رسد تنفس هوازی نرمال، ماکروفاژها و پراکسیزومها منابع درون زای اصلی بسیاری از اکسیدانهای تولید شده توسط سلولها باشند. منابع برون زای رادیکالهای آزاد شامل استعمال توتون، پرتودهی یونیزان، حلالهای آلی و حشره‌کشها می‌باشد (۱۴ و ۳۹). رادیکالهای آزاد می‌توانند موجب پراکسیداسیون لیپیدی در غذاها شوند که

منجر به تخریب آنها می‌شود (۲۶ و ۱۵). اما اکسیداسیون تنها روی لیپیدها اثر نمی‌گذارد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیز انواع گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) ممکن است موجب آسیب DNA شوند که می‌تواند منجر به جهش گردد (۸ و ۱۴). به عبارت دیگر تولید رادیکالهای آزاد در سلولها و بافتهای بدن در ارتباط با بروز بسیاری از بیماریهای ایام پیری است (۳۱). ترکیبات ضداکسایشی براساس مکانیسم واکنش آنها، اغلب به دو گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند: الف) ضداکساینده‌های شکننده زنجیر رادیکالها ب) ضداکساینده‌های مهارکننده. ضداکساینده‌های گروه اول، رادیکالهای آزاد واکنش‌پذیر مثل هیدروکسیل را از طریق واکنش انتقال اتم هیدروژن بین هیدروکسیل و ضداکساینده‌ها، به مولکولهای پایدار تبدیل می‌کنند. در

بررسی خواص ضداکسایشی و جاروب‌کنندگی رادیکال در آنهاست.

مواد و روشها

نمونه‌ها از دره شهدا واقع در مسیر جاده ارومیه- اشنویه جمع‌آوری شدند. نمونه شاهد با کد هرباریومی ۱۳۶۹ در مؤسسه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی موجود است. اندامهای مختلف گیاه (ساقه، برگ، بذر) بعد از تفکیک و شستشو با آب مقطر در دمای اتاق خشک شدند و سپس به صورت پودری ریز درآمدند. ۳ گرم از پودرهای حاصل به کمک حلال متانول (۵۰ میلی‌لیتر) و دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره‌های حاصل پس از سانتریفیوژ در دور ۴۰۰۰، صاف و برای انجام آزمایشات مختلف در ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل: میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره‌های متانولی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو و طبق روش (1984) orwiths تعیین شد (۱۶). ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین-سیوکالتو ده برابر رقیق شده، ۱ میلی‌لیتر از سدیم بیکربنات (۲۰۰ گرم در لیتر) و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه جذب در ۷۳۰ نانومتر توسط دستگاه طیف نوسنج (مدل WPA S2100) ساخت کشور انگلیس خوانده شد. مخلوطی از آب و شناساگرها به عنوان نمونه شاهد و تانیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد.

تعیین قدرت احیاکنندگی: قدرت احیاکنندگی عصاره‌های متانولی ساقه، برگ و بذر طبق روش (1986) Oyaizu اندازه‌گیری شد (۲۵). ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با ۱/۲۵ میلی‌لیتر پتاسیم فریسیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰۰ گرم در لیتر) به مخلوط اضافه و در دور ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه

نتیجه واکنشهای زنجیره‌ای اتواکسیداسیون بین رادیکالهای آزاد و مولکولهای سلولی به اتمام می‌رسد. دسته دوم، واکنش مهار اکسیداسیون را هم از طریق تبدیل پیش سازهای ROS به گونه‌های غیرفعال و هم از طریق مهار واکنش اکسیداسیون انجام می‌دهند. این گروه شامل ضداکساینده‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. ضداکساینده‌های غیرآنزیمی شامل: مهارکننده‌های آنزیمهای اکسیداتیو و شلاته‌کننده‌های فلزی هستند (۲۴). گزارشات اخیر دلالت بر وجود یک ارتباط معکوس بین رژیمهای غذایی شامل غذاهای غنی از ضداکساینده و بروز بیماریهای انسانی دارد (۲۳). بنابراین دریافت ترکیبات ضداکساینده از طریق رژیم غذایی مهم است. خانواده گل-گاوزبان (Boraginaceae) شامل ۱۰۰ جنس و ۲۰۰۰ گونه گیاهی در نواحی گرمسیری و معتدل است (۲۷). برخی از گیاهان این خانواده در طب سنتی ایران از جایگاهی ویژه برخوردارند. گیاه *Asperugo procumbens L.* از این خانواده، گیاهی است علفی و یکساله، پوشیده از کرکهای زبر نوک قلابی با ساقه‌های منشعب که معمولاً به صورت گسترده روی زمین قرار دارد. *A. procumbens L.* که خاص منطقه ایران و تورانی می‌باشد به صورت علف هرز در همه جا پراکنده است. در کشور ایران، این گیاه تقریباً در تمام نواحی شمال، شمال‌غرب، مرکز، شمال‌شرق، شرق، جنوب و جنوب‌شرقی گزارش شده است (۲۱). گل، ساقه، برگ و ریشه اغلب گیاهان تیره بوراژیناسه دارای اثرات درمانی هستند. ارزش دارویی اجزای مختلف گیاهان به ترکیبات فیتوشیمیایی آنها بستگی دارد. مهم‌ترین این ترکیبات آلکالوئیدها، تاننها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی هستند (۳۴). از آنجایی که در بروز اکثر بیماریها، گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارند، بررسی تأثیر ترکیبات فنولی به منظور حذف و جمع‌آوری این ترکیبات موضوعی درخور توجه است. هدف از این تحقیق، تعیین و مقایسه محتوای فنولی ساقه، برگ و بذر گیاه مذکور و

شکستگی زنجیر در ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. سرعت واکنش طبق فرمول $Abs_0^3 - Abs_0^3 = -3kt$ محاسبه شد. K نشان‌دهنده سرعت شکستگی رادیکال است. Abs_0 مقدار جذب اولیه و Abs مقدار جذب در افزایش زمان (t) است. فعالیت ضداکسایشی به صورت $\Delta Abs/min/mg$ وزن خشک گزارش شد.

اندازه گیری فعالیت جاروب کنندگی رادیکال نیتريت: میزان مهار رادیکال اکسید نیتريك با استفاده از واکنش Griess Illosvoy (1964) تعیین شد (۱۳). مخلوط واکنش (۳ میلی‌لیتر) حاوی ۲ میلی‌لیتر سدیم نیتروپروسید (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین به همراه عصاره مورد نظر (۰/۵ میلی‌لیتر) به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با ۱ میلی‌لیتر از سولفانلیک اسید (۰/۳۳ درصد در گلاسیال استیک اسید ۲۰ درصد) مخلوط شد و اجازه داده شد تا به مدت ۵ دقیقه باقی بماند. سپس ۱ میلی‌لیتر از نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلرید (۰/۱ درصد) به آن اضافه شده و مخلوط گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. یک صورتی پخش شده در محلول تشکیل شد. جذب این محلول در ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهار از فرمول زیر به دست آمد.

$$A_{blank} - A_{sample} \times 100 / A_{sample}$$

اندازه گیری فعالیت جاروب کنندگی رادیکال پراکسید هیدروژن: برای مشخص کردن قدرت جمع‌آوری هیدروژن پراکسید توسط عصاره‌های گیاه مورد نظر از روش Ruch (1989) با کمی تغییر استفاده شد (۳۰). ۱۰ میکرولیتر از عصاره در ۳/۴ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH: ۷/۴) حل شد سپس با ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ۴۳ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید (تهیه شده در همان بافر) مخلوط شد. این فعالیت توسط خواندن میزان جذب در ۲۳۰ نانومتر از مخلوط های واکنش اندازه‌گیری شد. درصد جاروب‌کنندگی طبق فرمول زیر محاسبه شد.

سانتریفیوژ شد. ۱/۲۵ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (۱ گرم در لیتر) ترکیب شد. سپس جذب در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. افزایش جذب مخلوط واکنش دلالت بر افزایش قدرت احیاء دارد.

اندازه‌گیری فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال DPPH:

میزان جاروب‌کنندگی رادیکال پایدار DPPH (۲،۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل) به کمک روشهای (2000) Burits و Cuendet (1997) تعیین شد (۹،۷). ۲۵ میکرولیتر از عصاره‌ها به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در اثر حل کردن DPPH در متانول، رنگ بنفش تیره ایجاد شد. رادیکالهای DPPH با ضداکسایندهای موجود در عصاره‌ها، واکنش داده و به شکل پایدار DPPH درمی‌آیند، در نتیجه رنگ آن از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و میزان جذب نیز کاهش می‌یابد. هر چه مقدار جذب خوانده شده بعد از ۳۰ دقیقه، بیشتر باشد، فعالیت ضداکسایندهای موجود در عصاره در حذف رادیکال آزاد کمتر بوده است. بنابراین مقدار DPPH باقی‌مانده رابطه معکوس با فعالیت مهارکنندگی ضداکسایندها دارد (۲۱). درصد فعالیت جاروب‌کنندگی عصاره‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$1 - (A_{sample}/A_{blank}) \times 100$$

A_{sample} نشانگر جذب همراه با نمونه و A_{blank} نشانگر جذب بدون نمونه می‌باشد.

تعیین فعالیت شکستگی زنجیر: فعالیت شکستگی زنجیر

عصاره‌های متانولی با استفاده از معرف DPPH و روش Brand-Williams (1995) همراه با اندکی تغییر، اندازه‌گیری شد (۶). ۱۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی 6×10^{-5} مولار DPPH ترکیب شد. بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق در تاریکی، سرعت

$$(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

اندازه‌گیری ظرفیت جمع‌آوری رادیکالهای

سوپراکسید: برای سنجش میزان جاروب‌کنندگی رادیکال سوپراکسید توسط عصاره‌های متانولی از روش Jing (1995) و Zhao و سیستم اتواکسیداسیون پیروگالول استفاده شد (۱۸). پیروگالول در شرایط قلیایی به سرعت اتواکسید شده و آنیونهای سوپراکسید آزاد را تولید می‌کند. این آنیونها نیز باعث تسریع روند اتواکسیداسیون می‌شوند. با این وجود به دلیل افزودن بعضی جمع‌کننده‌ها یا ضداکساینده‌ها، آنیونهای سوپراکسید از محیط جمع شده در نتیجه اتواکسیداسیون انجام نخواهد شد. مقدار ۹ میلی‌لیتر از محلول بافر تریس - HCl (pH: ۸/۲)، ۵۰ میلی‌مولار) در درون لوله آزمایش ریخته شد و لوله آزمایش در حمام آب گرم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. حجمی به میزان ۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول (۴۵ mM) پیروگالول در ۱۰ میلی‌مولار از HCl) که آن نیز در دمای اتاق از قبل انکوبه شده بود به لوله آزمایش بالا اضافه و مخلوط شد. مخلوط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه انکوبه شد و بعد یک قطره اسکوربیک اسید به آن اضافه گردید. جذب در ۴۲۰ نانومتر که به عنوان A_0 مشخص شد، بعد از ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد که این مقدار بر سرعت اکسیداسیون پیروگالول اشاره دارد. سرعت اکسیداسیون A_1 توسط روش بالا اندازه‌گیری گردید و این بار غلظت معینی از عصاره به درون محلول بافر تریس - HCl اضافه شد. مقدار A_2 نیز توسط روش بالا اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که محلول پیروگالول به درون محلول بافر تریس - HCl اضافه نشد. درصد جمع‌آوری رادیکالهای سوپراکسید طبق فرمول زیر به دست آمد.

$$[A_0 - (A_1 - A_2)] \times 100 / A_0$$

اندازه‌گیری فعالیت کلات‌کنندگی آهن: فعالیت کلات‌کنندگی Fe^{2+} عصاره‌ها طبق روش Decker (1990) و Welch اندازه‌گیری شد (۱۰). ۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۳/۷

میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. سپس این ترکیب با ۰/۱ میلی‌لیتر $FeCl_2$ (۲ میلی‌مولار) و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین (۵ میلی‌مولار) به مدت ۱۰ دقیقه وارد واکنش شد. جذب در ۵۶۲ نانومتر خوانده شد (۱۳). فروزین در حضور Fe^{2+} تشکیل کمپلکس می‌دهد. عوامل کلاته‌کننده منجر به تخریب این کمپلکس می‌شوند. نشانه این امر، کاهش شدت رنگ قرمز اولیه کمپلکس است. بنابراین با کاهش شدت رنگ، می‌توان فعالیت کلات‌کنندگی، ترکیبات موجود را سنجید (۳). فعالیت کلات‌کنندگی نمونه‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$[1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}})] \times 100 = \text{فعالیت کلات‌کنندگی}$$

آنالیز آماری: تمام سنجشها در سه تکرار انجام شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) میانگین بیان شده‌اند. اختلاف بین اندامهای گیاه با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح احتمال آماری ۵ درصد ($P < 0.05$) آنالیز گردید. برای تنظیم جدول از نرم افزار SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

بسیاری از ترکیبات فنولی و هیدروکینونها، دارای فعالیتهای ضداکسایشی هستند (۱۷). بنابراین میزان ترکیبات فنولی و اثر ضداکسایشی آنها در گیاه *A. procumbens L.* مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۱ محتوای فنولی کل عصاره‌های متانولی ساقه، برگ و بذر را نشان می‌دهد. در بین اندامهای مختلف، محتوای فنول کل بذر، از همه بیشتر است. روشهای مختلفی جهت اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی وجود دارد. اما روش به کار رفته در این تحقیق یکی از روشهای پرکاربرد می‌باشد. در این سنجش، احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} در حضور عصاره‌های متانولی بررسی شد. از آنجایی که ظرفیت احیایی ترکیبات می‌تواند به عنوان یک شاخص معین از فعالیتهای ضداکسایشی بالقوه آنها باشد (۲۰)، لذا می‌توان گفت که عصاره بذر در بین

اندامهای بررسی شده (با بیشترین محتوای فنولی) حاوی الکترون نقش دارند (جدول ۱).
ترکیبات احیاکننده بیشتر یا مؤثری است که در انتقال

جدول ۱ - مقایسه محتوای فنولی، قدرت احیاکنندگی، فعالیت ضداکسایشی، فعالیت ضدرادیکالی و فعالیت کلات کنندگی آهن در سه اندام مختلف

Asperugo procumbens L.

اندام ها	محتوای فنول کل (میلی گرم تانیک اسید)	قدرت احیاکنندگی (جذب در nmV ^{۰۰})	فعالیت شکستگی زنجر -Abs ⁻³ /min/mg	درصد مهار DPPH
ساقه	۱۲/۶۷ ± ۰/۵۶ ^c	۰/۲۸۴ ± ۰/۰۸۴ ^c	۰/۰۱۵۰ ± ۰/۰۰۱۵ ^c	۲۷/۳۸ ± ۰/۳۴ ^c
برگ	۲۲/۵۵ ± ۰/۴۱ ^b	۰/۴۳۲ ± ۰/۰۰۵۴ ^b	۰/۰۲۱۷ ± ۰/۰۰۳۴ ^{bc}	۳۷/۲۷ ± ۱/۳۳ ^b
بذر	۲۸/۲۴ ± ۰/۴۴ ^a	۰/۶۴۰ ± ۰/۰۰۵۱ ^a	۰/۰۴۵۳ ± ۰/۰۰۶۰ ^a	۶۷/۱۷ ± ۲/۸۳ ^a
میانگین کل	۲۱/۱۵ ± ۲/۲۸	۰/۵۵۲ ± ۰/۰۵۱۷	۰/۰۲۷۳ ± ۰/۰۰۵۰	۴۳/۹۴ ± ۶/۰۴
اندام ها	درصد جاروب کنندگی سوپر اکسید	درصد جاروب کنندگی نیتریت	درصد جاروب کنندگی پراکسید	درصد کلات کنندگی آهن
ساقه	۴۹/۶۹۴ ± ۱/۹۳۵ ^c	۳۵/۹۴۸ ± ۲/۴۰۲ ^{bc}	۱۵/۴۵ ± ۲/۲۷ ^c	۸/۳ ± ۰/۹۸۱ ^a
برگ	۷۱/۱۲۰ ± ۲/۲۳۸ ^{ab}	۵۳/۴۰۸ ± ۱/۷۴ ^{ab}	۲۶/۸۲ ± ۲/۰۶ ^{bc}	۶/۴۶ ± ۰/۴۳۷ ^a
بذر	۷۸/۵۴۷ ± ۱/۷۷۶ ^a	۶۷/۷۴ ± ۱۰/۶۲۷ ^a	۴۷/۲۲ ± ۵/۱۲ ^a	۷/۱۰ ± ۰/۸۰۲ ^a
میانگین کل	۶۶/۴۵۴ ± ۴/۴۳۷	۵۲/۳۶۵ ± ۵/۵۹۱	۲۹/۸۳ ± ۴/۹۵	۷/۲۸ ± ۰/۴۷۱

مقادیر نشان دهنده میانگین سه تکرار به همراه انحراف معیار هستند (Mean ± SE, n=3). P<0.05.

حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری در بین اندامهاست.

عصاره متانولی بذر، قدرت احیاکنندگی بیشتری را از خود نشان داد. وجود رابطه مثبت بین قدرت احیاکنندگی و میزان ترکیبات فنولی کل ($R^2 = 0.9289$) و از سوی دیگر وجود همین رابطه بین فعالیت شکستگی زنجر و میزان ترکیبات فنولی ($R^2 = 0.8986$) تأیید دوباره ای بر این مطلب است که ترکیبات فنولی حاضر در عصاره‌های مورد مطالعه، به طور مستقیم در واکنشهای ضداکسایشی شرکت داشته‌اند. Amarowicz و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضداکسایشی عصاره گیاه لوبیای adzuki و اجزای این عصاره را بررسی کرده و نشان دادند که قدرت احیاکنندگی عصاره فنولی این گیاه و اجزای آن وابسته به ترکیبات فنولی و نوع آنهاست (۴). در پژوهش جدیدی که بر روی برخی از گیاهان دارویی انجام گرفته است، میزان ترکیبات فنولی اندام هوایی *Alkanna tinctoria* از خانواده گل

به لحاظ ماهیت ترمودینامیکی، سنجش پتانسیل احیاء هیچ گونه اطلاعاتی در مورد سرعت واکنش به دست نمی‌دهد، بلکه تنها برای بررسی توانایی ترکیبات احیاکننده در تحریک انتقال الکترون مناسب است، اما اندازه‌گیری فعالیت شکستگی زنجر، سرعت نابودی رادیکال را تحت تأثیر ضداکساینده‌های انتقال‌دهنده الکترون و دهنده هیدروژن تعیین می‌کند (۲۲). بنابراین اندازه‌گیری این شاخصها در کنار هم، روش جالبی برای تخمین ظرفیت ضداکسایشی یک ترکیب به حساب می‌آید. میزان فعالیت شکستگی زنجر در عصاره‌های متانولی بذر به تبعیت از محتوای فنولی، بیشتر از عصاره‌های دو اندام دیگر بود. بین سرعت نابودی رادیکال در عصاره‌های برگ و ساقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۱). میزان ترکیبات فنولی موجود در بذر دو برابر بیشتر از ساقه بود. به همان نسبت

گاوزبان، ۱۱/۵۷ میلی‌گرم گالیک اسید در وزن خشک گزارش شده است (۳۳). Assimopoulou و همکاران در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسیده بودند که ریشه همین گیاه از فعالیت ضداکسایشی قابل توجهی برخوردار است (۵). درصد مهار رادیکال DPPH در بین سه اندام مذکور متفاوت بود. این مقدار در مورد عصاره بذر ۶۷/۱۷ درصد و برای عصاره ساقه ۲۷/۳۸ درصد گزارش شد. بین نتیجه این سنجش و محتوای فنولی کل، رابطه مستقیمی مشاهده گردید ($R^2 = 0.9961$). به عبارت دیگر عصاره بذر متناسب با میزان ترکیبات فنولی، رادیکال DPPH موجود در محیط را با سرعت بیشتری حذف کرد. همان گونه که جدول ۱ نشان می‌دهد، بین درصد ظرفیت جمع‌آوری رادیکال سوپراکسید در برگ و بذر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. اثر مهارکنندگی عصاره ساقه بر اتواکسیداسیون پیروگالول، متناسب با محتوای فنولی آن، ضعیف بود. رادیکال هیدروژن پراکسید در شروع اکسیداسیون لپید فعالیت ضعیفی از خود نشان می‌دهد، اما پتانسیل آن در تولید رادیکالهایی مانند رادیکال هیدروکسیل بسیار بالاست (۳۵). بین فعالیت جمع‌آوری هیدروژن پراکسید ساقه و برگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. با این وجود به تبعیت از محتوای فنولی، عصاره بذر فعالیت جمع‌آوری رادیکال هیدروژن پراکسید بیشتری را از خود نشان داد. نیتریک اکسید یکی از رادیکالهای آزاد در محیط *In vivo* است و نقش مهمی در عملکردهای فیزیولوژیکی ایفا می‌نماید. اما همین رادیکال می‌تواند در بروز بیماریهای التهابی نیز نقش داشته باشد (۳۷). این نیتریک اکسید از سدیم نیتروپروسید حاصل شد که با اکسیژن جهت تشکیل نیتريت واکنش می‌دهد. رقابت جمع‌کننده‌های نیتریک اکسید با اکسیژن منجر به محصولات احیایی نیتریک اکسید می‌شود (۱۹) و (۳۶). همچون سایر رادیکالها، میانگین درصد ظرفیت جمع‌آوری رادیکال نیتريت در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مورد نیز عصاره بذر فعالیت بیشتری را در مقایسه با عصاره ساقه از خود نشان داد. با مقایسه درصد ظرفیت

جمع‌آوری چهار رادیکال بررسی شده، می‌توان نتیجه گرفت که ظرفیت جمع‌آوری رادیکالهای چهارگانه در عصاره بذر نسبت به عصاره‌های برگ و ساقه بیشتر است. این نشان می‌دهد که پلی فنولهای موجود در عصاره‌های متانولی بذر می‌توانند مسئول اثرات مفید عصاره آن در جمع‌آوری رادیکالهای آزاد باشند. شواهد نشان می‌دهد که افزایش مصرف ضداکساینده‌های غذایی یا میوه‌ها یا سبزیجات با خواص ضداکسایشی موجب بهبود کیفیت زندگی یا به تأخیر انداختن شروع یا کاهش خطر ابتلا به بیماریهای انحصاطی مرتبط با پیری است (۳۵). ترکیبات فنولی علاوه بر ویژگی ضداکسایشی، قادر به کلات کردن فلزات کمیاب نیز هستند (۳۸). نتایج به دست آمده از سنجش کلات‌کنندگی آهن نشان داد که بین فعالیت کلات‌کنندگی آهن عصاره‌های ساقه، برگ و بذر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. Ebrahimzadeh و همکاران در سال ۲۰۰۸ محتوای فنول، محتوای فلاونوئید و فعالیت کلات‌کنندگی آهن برخی از گیاهان دارویی ایران را بررسی کرده و نشان دادند که علی‌رغم وجود برخی روابط مستقیم و مثبت در بین سه فاکتور بررسی شده در تعدادی از گیاهان، عصاره حاصل از *Zea mays*، با محتوای فنول و فلاونوئید بالا، فعالیت کلات‌کنندگی بسیار ضعیفی را از خود نشان می‌دهد. اما عصاره *Pistacia lentiscus* با محتوای فنول و فلاونوئید پایین، فعالیت کلات‌کنندگی خوبی دارد (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد که فعالیت کلات‌کنندگی عصاره‌های برگ، ساقه و بذر گیاه مذکور، الزاماً به محتوای پلی‌فنولی موجود در آنها وابسته نبوده و می‌تواند به ماهیت ترکیبات فنولی بستگی داشته باشد.

هیچ ضداکساینده خاصی نمی‌تواند به منظور مقابله با اکسیداسیون همه مکانیسمهای ضداکسایشی ممکن را نشان دهد. در واقع انواع واکنشهای مربوط به رادیکال آزاد که می‌توانند به وسیله یک ضداکساینده خنثی شوند در تعیین استفاده از ضداکساینده‌ها مهم است (۳۲). بسیاری از ترکیبات ضداکسایشی مصنوعی دارای اثرات سمی یا

رادیکالهای سوپراکسید، نیتريت و DPPH نشان داد. با توجه به این امر، امکان استفاده از ترکیبات مفید آن در کاهش سطوح استرسهای اکسیداتیو و آهسته کردن یا مهار بیماریها وجود دارد. البته به منظور استفاده از این عصارهها در ترکیبات غذایی، باید متانول را با حلالهای بی ضرر جایگزین کرد. این امر مستلزم بررسی بیشتر بر روی روشهای استخراج، جداسازی و شناسایی ترکیبات ضداکسایشی موجود در آن است.

سرطانی هستند که این امر موجب توجه به سمت ضداکسایندهای طبیعی شده است و ترکیبات فنولیک نیز (به عنوان عضوی از خانواده ضداکسایندهای طبیعی) مستقیماً در فعالیتهای ضداکسایشی شرکت می نمایند (۱۱). در این مطالعه با توجه به امکانات موجود آزمایشگاهی، مشخص شد که عصارههای فنولی ساقه، برگ و بذر گیاه *A. procumbens L.* دارای فعالیت ضداکسایشی می باشند. عصاره بذر، فعالیت جمع آوری کنندگی خوبی را نسبت به

منابع

- ۱- قهرمان، ا.، ۱۳۷۳. کورموفیت های ایران (سیستماتیک گیاهی). مرکز نشر دانشگاهی، تهران، جلد سوم، ۷۶۸ صفحه
- ۲- خاتم ساز، م.، ۱۳۸۱. فلور ایران، شماره ۳۹، تیره گل گاوزبان (Boraginaceae). مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، ۵۰۴ صفحه
- 3- Aboul-Enein, AM., El Baz, Fk., El-Baroty, GS., Youssef, AM., Abd El-BakyHH, 2003. Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. J. Med. Sci, 3:87-98.
- 4- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., and Troszynska, A., 2008. Antioxidant activity of adzuki bean and its fraction. J. Food Lipids. 15:119-136.
- 5- Assimopoulou, A.N., Boskou, D., Papageorgiou, V.P., 2003. Antioxidant activities of alkanin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates. J. Food Chem. 87:433-438.
- 6- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate the antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie, 28:25-30.
- 7- Burits, M., and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 14:323-328.
- 8- Cakir, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yildirim, A., Kufrevio, Glu Ol., 2006. Antioxidant activities of the extracts and compounds of *Teucrium orientale L. var. orientale*. Turk. J. Chem, 30:1-12.
- 9- Cuendet, M., Hostettmann, K., and Potterat, O., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea dlumei*. Helvetica chimica Acta, 80:1144-1152.
- 10- Decker, E. A., and Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agr & Food Chem, 38:674-677.
- 11- Duh, PD., Tu, YY., Yen, Gc., 1999. Antioxidant activity of aqueous extract of harnjyur (*Chrysanthemum morifolium Romat*). Ledensm wiss Technol, 32:269-277.
- 12- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African J. Biotech, 7(18):3188-3192.
- 13- Garrat, DC., 1964. The quantitative analysis of drugs. Chapman and Hall Ltd, Japan, 3:456-458.
- 14- Guisin, L., Oktay, M., kirecci, E., and Kufrevioglu, O.L., 2003. Screening of antioxidants and antimicrobial activities of anise (*pimpinella anisum L.*) seed extracts. Food chem, 83:371-382.
- 15- Gulsin, L., Taasu, oguz M., Oktay, M., Beydemir, S., Kufrevioglu, O., 2004. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary Sage (*Salvia Sclarea L.*). Turk J. Agric For, 28:25-33.
- 16- Horwitz, W., 1984. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Washington, D.C.:AOAC.
- 17- Huang, M.T., Ho, C.T., Tee, C.Y., 1992. In Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. Antioxidants and Cancer Prevention. ACS:Washington, 402.
- 18- Jing, T.Y., and Zhao, X.Y., 1995. The improved pyrogallol method by using terminating agent for superoxide dismutase measurement. Progress Biochem & Biophy, 22:84-86.

- 19- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefai, MT., Sekaki, A., Gardes-Albert, M., 1994. Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extracts EGb 761. *Methods Enzymol*, 234:462-475.
- 20- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, SP., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric Chem Food*, 43:1813-1817.
- 21- Molyneux PH. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 26:211-219
- 22- Nicoli, M.C., Toniolo, R., Anese, M., 2004. Relationship between redox potential and chain-breaking activity of model systems and foods. *Food Chem*, 88:79-83.
- 23- Olukemi, OA., Olukemi IO., Oluwatoyin, SM., Austin, AO., Mansurat, LB., Olufunmilola, TI., 2005. Antioxidant activity of Nigerian dietary species. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 4(6):1086-1093.
- 24- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, EK., Prior, RL., Huang, D., 2002. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *J. Agric. Food Chem*, 50:2772-2777.
- 25- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese J. of Nutrition*, 44:307-315.
- 26- Pada Saha, B., Bandyopadhyay A, Mukherjee, PK., 2006. *Cytisus Scoparius* Link-A natural antioxidant. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:8.
- 27- Papageorgiou, VP., Assimopoulou, AN., Couladouros, EA., Hepworth, D., Nicolaou KC., 1999. The chemistry and biology of alkannin and shikonin and related naphthazarin natural products. *Angew Chem Int Edn*, 38:5000-5029.
- 28- Pfannhauser, W., Fenwick, G.R., Khokhar, S., 2001. *Biologically active phytochemicals in food*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. pp:448-452.
- 29- Rose, WM., Creighton, MO., Stewart, DHPJ, Sanwal, M., Trevithick, GR., 1982. In vivo effects of vitamin E on cataractogenesis in diabetic rats. *Can J. Ophthalmol*, 17:61-66.
- 30- Ruch, R.J., Cheng, S.T., and Klauring, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10:1003-1008.
- 31- Sanchez-Moreno, C., Cao, G., OU, B., Prior, RL., 2003. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem*, 51:4889-4896.
- 32- Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.S., Lachence, P.A., Ho, C.T., and Rosen, R.T., 2002. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus Batsch*). *J. of Agric and Food Chem*, 50:2459-2463.
- 33- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S., 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(1):102-106.
- 34- Shariff, ZU., 2001. *Modern herbal therapy for common ailments*. Nature Pharamcy Series Vol. 1, PP. 9-84. Spectrum Books Ltd., Ibadan, Nigeria in Association with Safari Books Ltd. UK.
- 35- Siriwardhana, S.S.K.W. and Shahidi, F., 2002. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. *J. of American Oil Chem*, 79(9):903-908.
- 36- Sundararajan, R., Ahamed HaJa, N., Venkatesan, K., Mukherjee, K., Padasaha, B., Bandyopadhyay, A., and Mukherjee, P.K., 2006. *Cytisus scoparius* a natural antioxidant, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:8-10.
- 37- Tsuda, T., Kato, Y., Osawa, T., 2000. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 484:207-210.
- 38- Wang, B.J., Lien Y.H., and Yu, Z.R., 2004. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food chemistry*, 86:237-243.
- 39- Wu, X., Beecher, GR., Hoiden, JM., Haytowitz, DB., Gebhardt, SE., Prior, RL. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52:4026-4037.

The study of antioxidant and radical scavenging activities of leaves, stem and seeds of *Asperugo procumbens* L.

Movahedinejad H., Heidari R. and Jamei R.

Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of IRAN

Abstract

In this study, the antioxidant and antiradical activity of the methanolic extracts of leaves, stem and seeds of *Asperugo procumbens* L. (Boraginaceae) were investigated. Total phenolic content, reducing power, scavenging capacity for (DPPH, nitrit, hydrogen peroxide and superoxide) radicals, iron chelating activity and the rate of radical decay were evaluated in extracts. Extract of seeds, with the highest phenolic content, showed the highest reducing power and free radical scavenging capacities. Chain-breaking activity measurement allows the rate of the radical decay to be determined. No correlation was found between phenol content of the extracts and their chelating activity. Regarding to the results, it seems that the seeds of *A. procumbens* L. are good source of natural antioxidants and could be used to prevent free-radical-induced deleterious effects.

Keywords: *Asperugo procumbens* L, Antioxidant, Antiradical, Phenolic content, Seed

Archive of SID