مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۱۷۱-۱۶۵
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.133796.2365
Archive of SID

مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی عصاره الکلی و آبی برگ *Vitis vinifera* در شرایط آزمایشگاهی

مژگان صادقی[1*] ابوالفضل کامکار[2]

۱) دانش آموخته دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۳ دی ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۲ اسفند ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: کاهش اثرات زیان بخش رادیکال‌های آزاد، در سامانه‌های غذایی و بیولوژیکی، توسط آنتی اکسیدان‌ها امری مهم تلقی می‌شود لذا تأمین ذخایر آنتی اکسیدانی که بتواند بهداشت و ایمنی جامعه را دربر داشته باشد ضروری بنظر می‌رسد. **هدف:** این تحقیق جهت بررسی اثر آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی عصاره‌های الکلی و آبی برگ انگور در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. **روش کار:** گیاه برگ انگور با استفاده از حلال‌های آب مقطر، اتانول و متانول عصاره گیری شد و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش‌های DPPH و بتاکاروتن لینولئیک اسید محاسبه شد و میزان ترکیبات فنولی تام و فلاوونوئید تام هم در مورد همه ی عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** میزان IC۵۰ در آزمون DPPH به ترتیب در عصاره‌های آبی ، اتانولی و متانولی (۰/۷۱۴±۷۱/۹۰ µg/ml ، ۰/۴۸۱±۴۶/۶۶ و ۰/۳۱۸±۳۷/۳۸) و ٪ مهار رادیکال آزاد در آزمون بتاکاروتن لینولئیک اسید به ترتیب (۱/۸۴±۸۶/۵۱ ، ۱/۳۰±۹۷/۰۸و ۱/۲۷±۸۸/۲۰) بود و مقادیر BHT در آزمون DPPH برابر با ۰/۰۰۰±۱۳/۵۸ µg/ml و در آزمون لینولئیک اسید ۰/۶۲±۹۴/۵۶ بود. ترکیبات فنولی کل (۱/۳۹ mg/g ۱۵۸/۰۲ ، ۱/۵۵±/۶۰ ۲۰۱و ۲/۲۶±۱۸۰/۱۹) و ترکیبات فلاوونوئید کل (۱/۶۴±۳۷/۱۶ ، ۰/۸۳±۵۴/۷۴ و ۰/۱۸±۴۶/۰۷) محاسبه شد. همانطور که مشاهده می‌شود در همه ی آزمون‌ها به ترتیب عصاره اتانولی و بعد عصاره متانولی و آبی بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را به خود اختصاص دادند. **نتیجه‌گیری‌نهایی:** به نظر می‌رسد که عصاره اتانولی برگ انگور می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی و ارزان قیمت در صنعت غذایی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: عصاره برگ انگور، آنتی اکسیدان، بتاکاروتن، لینولئیک اسید، فلاوونوئید

مقدمه

چربی‌ها وروغن‌ها ترکیبات با ارزشی هستند که به عنوان منبع فشرده‌ای از انرژی محسوب می‌شوند. این گروه بخش مهمی از رژیم غذایی را تشکیل می‌دهند ودر بسیاری از فرآورده‌های غذایی به عنوان ماده اولیه کاربرد ویژه‌ای دارند. این ترکیبات درحضور نور، اکسیژن، یون‌های فلزی، آنزیم ها، حرارت بالاو مدت نگهداری طولانی ازطریق واکنش تجزیه‌ای دچار فساد می‌شوند که مهمترین واکنش اکسیداسیون می‌باشد. تولید رادیکال‌های آزاد با درجه غیراشباعیت روغن‌ها ارتباط مستقیمی دارد. رادیکال‌های آزاد شده در سامانه‌های غذایی باعث اکسیداسیون خودبه خودی و تولید ترکیبات نامطلوب می‌شوند که این امر نه تنها سلامت مصرف کننده را به خطر می‌اندازد بلکه سبب کاهش کیفیت تغذیه‌ای ، ایجاد بو، طعم نامطبوع و در نتیجه تندی و بدطعمی غذا می‌شود(۶). همچنین در سامانه‌های زیستی رادیکال‌های آزاد باعث بروز بسیاری از بیماریها خصوصا سرطان می‌شوند. اثر زیان بخش رادیکال‌های آزاد را می‌توان توسط آنتی اکسیدان‌ها کاهش داد. آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن فعال جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب ویا مرگ سلولی می‌شوند(۳). آنتی اکسیدان‌های مصنوعی BHA (بوتیلات هیدروکسی آنیزول) و BHT (بوتیلات هیدروکسی تولوئن) برای جلوگیری از اکسیداسیون و افزایش ماندگاری استفاده می‌شوند اما به علت سرطان زایی و اثرات سمی که دارند، استفاده ازاین‌ها توصیه نمی شود. همچنین در فرآورده‌های غذایی به دلیل خطرات بهداشتی تابع مقررات سختی بوده، لذا تحقیق در مورد آنتی اکسیدان‌های طبیعی به عنوان جایگزین احتمالی آنتی اکسیدان‌های مصنوعی لازم است(۶). امروزه استفاده از گیاهان و ترکیبات ویژه آن‌ها به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، مورد بررسی قرار گرفته است. برگ انگور با نام علمی *Vitis vinifera* و نام انگلیسی Grape leaf در خانواده انگورسانان قرار دارد.انگور می‌تواند در اغلب خاک‌ها رشد کرده و محصول بدهد. حساسیت بخصوصی نداشته و اغلب محدودیت‌های معمول خاک، شوری و قلیائیت نسبی را به خوبی تحمل می‌کند. همچنین در برابر آهک خاک حساس نبوده و حتی در خاک هایی که حاوی بیش از ۵۰٪ آهک است به خوبی رشد می‌نماید، اما بایستی تا حدامکان از خاک‌های سنگین فاقد زهکشی و خاک‌های قلیایی همراه با نمک فراوان پرهیز نمود. خاک‌های عمیق با زهکشی مناسب و هوموس فراوان برای رشد انگور مناسبند(۹). ترکیب شیمیایی برگ انگور دارای ساکارز، اینوزیت، مواد نشاسته‌ای و تعدادی اسیدهای آلی است(۹). از خواص درمانی برگ انگور می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: برگ انگور در رفع نقرس و زردی موثر

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۱-۳۲۳۶۸۶۴۲ نمابر: ۰۱۱-۳۲۱۹۰۱۶۷ Email: mozhgansadeghi@yahoo.com
www.SID.ir

Archive of SID

است. خاصیت قابض دارد، دم کرده برگ‌های جوان انگور اسهال خونی را برطرف می‌کند. برای خون ریزی‌ها مفید است. استفراغ را برطرف می‌کند. در رفع اختلالات گردش خون در دوره بلوغ و یائسگی موثر است.ژهنگامی که پوست صورت قرمز می‌شود و ملتهب است خوردن دم کرده آن اثر مفیدی دارد. گرد برگ‌های جوان و خشک شده انگور اثر خوبی در رفع خون ریزی‌های رحم و خون آمدن از بینی دارد. از دم کرده برگ انگور می‌توان برای شستشوی چشم در بیماری ورم ملتحمه استفاده کرد. دم کرده برگ انگور برای رفع واریس هم مفید است. همچنین، انگور سبز یا زرد دارای فلاوونوئیدی از خانواده تانن‌ها به نام کاتکین می‌باشد. کاتکین از ابتلا به پوکی استخوان جلوگیری می‌کند زیرا به علت خواص ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی که دارد از استرس اکسیداتیو و التهاب جلوگیری کرده و روند تخریب بافت‌های استخوانی را به تاخیر می‌اندازد (۹). در این تحقیق به منظور ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی برگ انگور از چهار روش ۲و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازین (DPPH)، بتا کاروتن لینولئیک اسید، میزان ترکیبات فنولی کل و فلاوونوئید کل استفاده شد.

مواد و روش کار

مواد گیاهی: برگ انگور سفید بی دانه درتابستان سال ۱۳۹۲ از شهرستان بابل جمع آوری گردید وپس از خشک کردن و پودر کردن تا زمان استفاده در ظرف دربسته و دور از نوردر دمای اتاق نگهداری شد، سپس عمل عصاره گیری به روش خیساندن انجام گرفت و پس از صاف کردن با کاغذ صافی واتمن، در دستگاه روتاری با روش تبخیر در خلا خشک گردید عصاره‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۴ °C در یخچال نگهداری شدند.

مواد شیمیایی: حلال‌های مورد استفاده در آزمایش از جمله اتانول و متانول با درصد خلوص بالا و مواد شیمیایی نظیر کلروفرم، سدیم کربنات، گالیک اسید، آلومینیوم کلراید و پتاسیم استات، از شرکت مرک(آلمان) و DPPH، BHT، بتاکاروتن لینولئیک اسید و کوئرستین از شرکت سیگما(آمریکا) خریداری شدند.

بررسی خاصیت آنتی رادیکالی به روش DPPH: در این تست توانایی الکترون دهی توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف با میزان در بی رنگ کردن محلول بنفش ۲ و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل DPPH یا متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این آزمون، رادیکال‌های DPPH با آنتی اکسیدان‌ها واکنش داده و به صورت کاهش یافته درآمده و رنگ آن از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج۵۱۷ nm کاهش می‌یابد. لوله‌های حاوی DPPH و عصاره و متانول را به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و دور از نور انکوبه کرده، سپس میزان جذب نوری در ۵۱۷nm در اسپکتروفتومترخوانده می‌شود. غلظتی از آنتی اکسیدان که موجب می‌شود کاهش رنگ ۵۰٪ نسبت به حاولت اولیه شود، IC۵۰ نامیده می‌شود.

$$IC_{50}=(A\ blank-A\ sample/\ A\ blank)X100$$

میزان جذب نمونه: A sample میزان جذب کنترل منفی: A blank

روند کار در این آزمایش به این صورت بود که از DPPH به عنوان معرف استفاده شد. ۵۰ µL از غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و استاندارد را به ۵ mL محلول ۰/۰۰۴ DPPH ٪ درمتانول اضافه کردیم. پس از ۳۰ min در دمای اتاق و در جایی دور از نور انکوبه شد، جذب نوری نمونه‌ها و استاندارد در مقابل بلانک در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد. در این آزمایش برای هرکدام از عصاره‌ها یک لوله رنگ هم گذاشتیم تا خطا را به صفر برسانیم، لوله رنگ حاوی ۵ mL متانول و ۵۰ µl از عصاره بود. کنترل مثبت یا استاندارد دراین آزمایش BHT بود و کلیه مراحل ۳ بار تکرار شدند. در این آزمایش توانایی الکترون دهی عصاره‌های مختلف با میزان بی رنگ کردن محلول بنفش رنگ DPPH مورد سنجش قرار گرفت. غلظتی از عصاره که دارای درصد مهاری ۵۰ بود توسط نمودار محاسبه شد(۲۷).

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش بی رنگ کردن بتاکاروتن لینولئیک اسید: در این آزمایش ظرفیت آنتی اکسیدانی به وسیله اندازه گیری مهار ترکیبات آلی و دی ان هیدروپرکسید کونژوگه شده که از اکسیداسیون لینولئیک اسید به دست آمده تعیین می‌شود. در این آزمایش بتاکاروتن معرف می‌باشد و با توجه به بی رنگ شدن آن می‌توان به میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پی برد. به این ترتیب که مواد ناشی از اکسیداسیون اسیدلینولئیک با بتا کاروتن واکنش داده و سبب کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۴۹۰ nm کاهش می‌یابد. در این آزمایش ۰/۵ mg بتاکاروتن را در ۱ ml کلروفرم حل کردیم سپس با ۲۵ µl لینولئیک اسید مخلوط کرده و بعد ۲۰۰ mg از توئین ۴۰ اضافه کردیم. با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و پس از حدود نیم ساعت به ماده خشک شده ۱۰۰ ml آب مقطر اکسیژن دار (۳۰ min تحت فشار ۱۰۰ ml/min) اضافه کرده وآن را به شدت تکان داده تا حل شد. برای تهیه محلول عصاره‌ها و BHT با غلظت ۲ g/L از هرکدام جداگانه ۰/۰۱ g رداشته و با ۵ ml اتانول به حجم رساندیم. در این آزمایش در هر کدام از لوله‌های تست، استاندارد، BHT و رنگ مقادیر زیر به کار رفت:

لوله تست: ۲/ ۵ ml استوک بتاکاروتن لینولئیک اسید + ۳۵۰ µl از هرکدام از عصاره‌های تهیه شده در اتانول

لوله BHT: ۲/۵ ml استوک بتاکاروتن لینولئیک اسید +۳۵۰ µl BHT در اتانول

لوله بلانک: ۲/۵ ml استوک بتاکاروتن لینولئیک اسید + ۳۵۰ µl اتانول

لوله رنگ: ۳۵۰ µl از هرکدام از عصاره‌های تهیه شده در اتانول +۲/۵ ml اتانول

یکبار در ۴۹۰ nm در مقابل بلانک خواندیم و بار دیگر پس از ۴۸ h انکوبه کردن در دمای اتاق و دور از نور دوباره جذب نوری را خواندیم و نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

را یادداشت کردیم. همه مراحل آزمایش دوبار تکرار داشت(۲۷).

آزمایش تعیین ترکیبات فنولی: در این آزمایش مقدار ترکیبات فنولی کل بر پایه ی رنگ سنجی ماده فولین- سیوکالتو انجام می‌شود، که بر اساس واکنش بین عصاره، استاندارد (گالیک اسید) با معرف فولین و کاهش رنگ آن، پس از نیم ساعت جذب نوری عصاره‌ها و استاندارد درطول موج ۷۶۵ nm خوانده می‌شود.

(g) عصاره / (mg) استاندارد= مقدار فنول کل

روش آزمایش به این صورت بود که۰/۵ ml از هرکدام از عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی (۱۰ mg/ml) را برداشته و با ۲/۵ ml معرف فولین-سیوکالتیو N ۰/۲ مخلوط کرده و پس از ۵ min به آن ۲ ml سدیم کربنات ۷۵ g/l اضافه کردیم، سپس به مدت دو ساعت در دمای اتاق و دور از نورانکوبه کرده و جذب نوری را در طول موج ۷۶۵ nm خواندیم. از یک لوله جذب رنگ هم برای هرکدام از عصاره‌ها استفاده شد. عصاره اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. آزمایش‌ها ۳بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد(۱۹).

آزمایش تعیین ترکیبات فلاوونوئیدی: دراین آزمایش تعیین ترکیبات فلاوونوئید بر پایه رنگ سنجی کلرید آلومینیوم می‌باشد که براساس واکنش بین عصاره‌ها، استاندارد کوئرستین با معرف کلرید آلومینیوم و کاهش رنگ آن، پس از نیم ساعت جذب نوری درطول موج ۴۱۵ nm خوانده شد.

(g)عصاره/(mg)استاندارد=مقدار فلاوونوئید کل

روند آزمایش به این صورت بود که ۰/۵ ml از عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی (۱۰ mg/ml) را با ۱/۵ ml متانول مخلوط کرده سپس ml ۰/۱ آلومینیوم کلراید به آن اضافه کرده و بعد از آن ۰/۱ ml پتاسیم استات و در آخر ۲/۸ ml آب مقطراضافه کردیم. به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و دور از نور انکوبه کرده سپس جذب نوری را در طول موج ۴۱۵ nm درمقابل بلانک خواندیم. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین نتایج، گزارش شد(۲۱).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمونANOVA، با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. تمامی نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار(Mean±SD)گزارش شد.

نتایج

حذف رادیکال‌های آزاد به روش DPPH: آنتی اکسیدان‌ها با رادیکال DPPH واکنش داده و آن را کمرنگ یا بی رنگ می‌کنند. میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی اکسیدانی نمونه رابطه مستقیم دارد. با افزایش غلظت ترکیبات فنلی یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات فنلی فعالیت مهار رادیکالی اسانس یا عصاره افزایش پیدا می‌کنند. همانطور که در آزمایش مشاهده کردیم، با افزایش غلظت عصاره‌ها مهار رادیکالی با قدرت بیشتری

جدول ۱. اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ انگور و BHT در مهار رادیکال آزاد DPPH. داده‌های نشان داده شده با حرف غیر مشترک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند.

نمونه	IC۵۰ µg/ ml ± SD
عصاره اتانولی	۳۷/۳۸±۰/۳۱۸ [a]
عصاره متانولی	۴۶/۶۶± ۰/۴۸۱ [b]
عصاره آبی	۷۱/۹۰± ۰/۷۱۴ [c]
BHT	۱۳/۵۸±۰/۰۰۰ [d]

جدول ۲. درصد بازداری عصاره‌های آبی ، اتانولی و متانولی برگ انگور وBHT از اکسیداسیون لینولئیک اسید. داده‌های نشان داده شده با حروف غیر مشترک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند.

نمونه	SD ± درصد
عصاره اتانولی	۹۷/۰۸±۱/۳۰ [a]
عصاره متانولی	۸۸/۲۰±۱/۲۷ [db]
عصاره آبی	۸۴/۵۱±۱/۸۴ [dc]
BHT	۹۴/۵۶± ۰/۶۲

صورت گرفت. غلظتی از عصاره را که ۵۰٪ رادیکال را مهار می‌کند IC۵۰ می‌نامند که با استاندارد مقایسه می‌شود. هرچه مقدار IC۵۰ بیشتر باشد، فعالیت آنتی اکسیدان در حذف رادیکال آزاد کمتر است. در اینجا توانایی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی به ترتیب ۷۱/۹۰±۰/۷۱۴ ،۴۶/۶۶±۰/۴۸۱ ،۳۷/۳۸±۰/۳۱۸ µg/ml می‌باشد. قدرت مهار رادیکال آزاد BHT µg/ml ۱۳/۵۸±۰/۰۰۰ بود که بالاتر از قدرت مهار عصاره‌های برگ انگور بود. در میان عصاره‌ها هم، بالاترین فعالیت به ترتیب مربوط به عصاره‌های اتانولی و متانولی بود. در این آزمون BHT به صورت معنی‌داری بهتر از بقیه عمل نموده و در بین عصاره‌ها نیز به صورت معنی‌داری عصاره اتانولی بهتر از عصاره متانولی و عصاره متانولی بهتر از عصاره آبی عمل نموده است.

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی با بی رنگ شدن بتاکاروتن: در این آمایش بتاکاروتن -لینولئیک اسید در غیاب آنتی اکسیدان‌ها سریع بی رنگ می‌شود که به علت اکسیداسیون بتاکاروتن و لینولئیک اسید و تشکیل رادیکال آزاد است.رادیکال آزاد لینولئیک اسید پس از جدا شدن اتم هیدروژن توسط مولکول‌های فوق العاده غیر اشباع بتا کاروتن ایجاد می‌گردد، متعاقب آن خود بتا کاروتن نیز اکسیده شده و تا حدودی تجزیه می‌شود و رنگ نارنجی آن از بین می‌رود که این رویداد توسط اسپکتروفتومتر قابل ارزیابی می‌باشد. در این سیستم در غلظت ۲ g/L درصد اثر مهاری توسط عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی به ترتیب ۹۷/۰۸±۱/۳۰، ۸۸/۲۰±۱/۲۷، ۸۴/۵۱±۱/۸۴ و ۸۶ درصد اثر مهاری BHT ۹۴/۵۶±۰/۶۲ به دست آمد. در آزمایش ما در بین عصاره‌های مختلف، عصاره اتانولی بهتر از بقیه عمل نموده ولی در این مورد تفاوت معنی‌داری بین عملکرد عصاره اتانولی با BHT وجود ندارد. بین عصاره آبی و متانولی هم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳ . میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها بر حسب استاندارد اسید گالیک. داده‌های نشان داده شده با حروف غیر مشترک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند.

ترکیبات فنولی	mg/g ± SD
عصاره اتانولی	۲۰۱/۶۰±۱/۳۹ [a]
عصاره متانولی	۱۸۰/۱۹±۲/۲۶ [b]
عصاره آبی	۱۵۸/۰۲± ۱/۳۹ [c]

جدول ۴. میزان ترکیبات فلاوونوئید عصاره‌ها بر اساس استاندارد کوئرستین. داده‌های نشان داده شده با حروف غیر مشترک با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند.

ترکیبات فلاوونوئید	mg/g ± SD
عصاره اتانولی	۵۴/۷۴±۰/۸۳ [a]
عصاره متانولی	۴۶/۰۷±۰/۱۸ [b]
عصاره آبی	۳۷/۱۶±۱/۶۴ [c]

ارزیابی میزان ترکیبات فنولی: محتوی تام فنولیک بر اساس روش رنگ سنجی ماده فولین- سیوکالتیو که معرف ما در اینجا بود انجام گرفت. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی به کار رفت و میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل، عصاره گرم در اسیدگالیک میلی‌گرم گزارش شد. در این تست میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی به ترتیب mg /g ۱/۳۹±۲۰۱/۶۰، ۲/۲۶±۱۸۰/۱۹ و ۱/۳۹ ±۱۵۸/۰۲ عصاره اسیدگالیک به دست آمد. در آزمایش ما، عصاره آبی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است و این مسئله در مورد عصاره آبی و متانولی هم صادق است. عصاره متانولی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است.

ارزیابی میزان ترکیبات فلاوونوئیدی: این آزمایش بر اساس روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم می‌باشد که معرف است. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار گرفته شد و میزان تام فلاوونوئید بر اساس میزان معادل، عصاره گرم در کوئرستین میلی گرم گزارش شد. در این تست میزان ترکیبات فلاوونوئید عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی به ترتیب ۰/۸۳±۵۴/۷۴، ۰/۱۸±۴۶/۰۷ و ۱/۶۴±۳۷/۱۶ عصاره گرم در میلی‌گرم کوئرستین به دست آمد. در آزمایش ما، عصاره آبی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است و این مسئله در مورد عصاره آبی و متانولی هم صادق است. عصاره متانولی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است.

بحث

حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH: فاکتور IC۵۰ نسبت معکوسی با فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. بدیهی است که هرچه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی عصاره بیشتر می‌باشد. در آزمایش ما BHT بهتر از بقیه عمل نموده و در بین عصاره‌ها عصاره اتانولی بیشترین و عصاره آبی کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود.

Salmanian و همکاران در سال ۲۰۱۳، گزارش کردند که BHT فعایت ضد رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره متانولی میوه ولیک داشت، اما فعالیت ضد رادیکالی آن در غلظت‌های بالاتر کمتر بود و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری داشت(۱۹). که از این نظر به مشابه آزمایش ما بود که BHT به صورت معنی‌داری فعالیت آنتی رادیکالی بالاتری نسبت به عصاره متانولی، اتانولی و آبی داشت. Kamkar و همکاران در سال ۲۰۱۰، عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره‌های الکلی دو گیاه زیره سبز و بلغست را مورد بررسی قرار دادند که با توجه به نتایج به دست آمده، IC۵۰ عصاره متانولی به طور معنی‌داری در هر دو گیاه بیشتر از عصاره اتانولی بود (۲۱). Amiriدر سال ۲۰۰۹، عصاره متانولی گیاه مریم گلی را مورد بررسی قرار که IC۵۰ عصاره متانولی و BHT به ترتیب µg/ml ۳۲/۳ و µg/ml ۱۹/۲ بود(۱). Eghdami و همکاران در سال ۲۰۱۰، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی و آبی گیاه بومادران را با روش DPPH اندازه‌گیری کرده و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی را بیشتر از عصاره آبی اعلام کردند(۴). در این بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی بود، که مشابه آزمایش ما می‌باشد. در مطالعه Rawat و همکاران در سال ۲۰۱۰، که بر روی خواص آنتی اکسیدانی عصاره دو گونه مختلف میوه Myrica انجام شد، خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره *M.rubra* بیشتر از *M.esculenta* گزارش شد(۱۷). Razali و همکاران در سال ۲۰۰۸، با استفاده از آزمون DPPH اعلام کردند که عصاره متانولی گیاه *Anacardium occidentale* دارای بیشترین خاصیت آنتی رادیکالی بود(۱۸). Oke و همکاران در سال ۲۰۰۸، IC۵۰ عصاره متانولی گیاه Satureja Cuneifolia را معادل µg/ml ۲۶ گزارش کردند(۱۵).

اثر مهاری عصاره‌ها در برابر اکسیداسیون لینولئیک اسید: اثر مهاری عصاره روی اکسیداسیون لینولئیک اسید با آزمایش بتاکاروتن- لینولئیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و این اثر مهاری در مورد نمونه‌های مورد آزمایش به درصد بیان شده است. در آزمایش ما در بین عصاره‌های مختلف، عصاره اتانولی بهتر از بقیه عمل نموده ولی در این مورد تفاوت معنی‌داری بین عملکرد عصاره اتانولی با BHT وجود ندارد. بین عصاره آبی و متانولی هم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

Kamkar و همکاران در سال ۲۰۱۲، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های الکلی و آبی گیاه پونه را به روش بتاکاروتن-لینولئیک اسید بررسی کرده و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در عصاره اتانولی گزارش کردند(۱۳). Kamkar و همکاران در سال ۲۰۱۰، در مطالعه‌ای دیگر بر روی گیاه Mentha pulegium درصد مهاری عصاره‌های متانولی و آبی را به ترتیب ۶۰/۳۸ و ۶۷/ ۹۱٪ گزارش کردند که در این پژوهش ظرفیت مهاری عصاره آبی حتی بالاتر از BHT بود(۱۴). Amiri

www.SID.ir

Archive of SID

در سال ۲۰۱۰، خواص آنتی اکسیدانی گیاه کلپوره شرقی را به کمک آزمون بتاکاروتن-لینولئیک اسید مورد بررسی قرار داده و مقادیر ۹۵/۲۱ ٪ را اعلام کردند که نشان دهنده عملکرد BHTبرای عصاره متانولی و ۹۴/۹ ٪ را برای مشابه عصاره متانولی و استاندارد بود(۲). Oke و همکاران درسال ۲۰۰۸، اثر مهاری عصاره متانولی گیاه *Satureja coneifulia* را مورد بررسی قرار داده که برابر ۹۵/۲ ٪ بود(۱۵). Gollues و همکاران در سال ۲۰۰۷، روی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه Mentha longoifolia با غلظت mg/L ۲ مطالعه کرده و اثر مهاری آن را ۲۴ ٪ اعلام کردند که نشان داد خاصیت آنتی اکسیدانی ضعیفی دارد(۸).

مقادیر فنولی و فلاوونوئیدی کل در عصاره ها: به طور کلی از بین متابولیت‌های ثانویه گیاهان ترکیبات فنولی به ویژه پلی فنل‌ها به لحاظ اعمال فیزیولوژیک و آثار بهداشتی-درمانی اهمیت ویژه‌ای دارند. مهمترین پلی فنل‌ها به گروه فلاوونوئیدها تعلق دارد. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی عصاره‌های گیاهی از نظر محتویات فلاوونوئیدی و فنلی انجام شده است. در آزمایش ما، عصاره آبی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است و این مسئله در مورد عصاره آبی و متانولی هم صادق است. عصاره متانولی به صورت معنی‌داری دارای ترکیبات فنلی کمتری نسبت به عصاره اتانولی است. همچنین عصاره آبی به صورت معنی‌داری حاوی مقادیر کمتری فلاوونوئید نسبت به عصاره اتانولی و متانولی است. عصاره اتانولی هم به طور معنی‌دارای ترکیبات فلاوونوئیدی بیشتری نسبت به بقیه است.

Sherafati و همکاران در سال ۲۰۱۱، میزان ترکیبات فنولی عصاره اتانولی مغز گردو راmg/g ۱۲/۲۵±۲۸۵ ومیزان ترکیبات فلاونوئید کل راmg/g ۱۴/۱۷±۳۶۵ اعلام کردند(۲۰). Gharekhani و همکاران در سال ۲۰۱۰، عصاره آبی و متانولی گیاه گزنه را از نظرمیزان ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید مورد بررسی قرار دادند، در این مطالعه نشان داده شد که میزان ترکیبات فنل و فلاوونوئید در عصاره آبی بیشتر از عصاره متانولی بود(۷). Jamshidi و همکاران در سال ۲۰۱۰، عصاره متانولی چند گیاه بومی مازندران را از نظرمیزان ترکیبات فلاوونوئید و فنلی مورد بررسی قرار دادند، در این مطالعه آن‌ها نشان دادند که ارتباط مناسبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات پلی فنلی گیاه وجود دارد(۱۰). Eghdami و همکاران در سال۲۰۱۲، محتوای تام فنولی و فلاوونوئیدی گیاه بومادران را اندازه گیری کرده و مقادیر به دست آمده فنولی و فلاوونوئیدی را در عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی اعلام کردند(۴)، که از این نظر مشابه آزمایش ما است. Kamaliroosta و همکاران در سال ۲۰۱۱، عصاره دارچین را به کمک حلال متانول و استون استخراج کردند و مقدار کل ترکیبات فنولی را با روش فولین-سیوکالتیواندازه گیری کردند. بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره استونی استخراج شده به روش حلال سرد بود(۱۱). Patel در سال ۲۰۱۰، عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه نیلی وحشی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که محتوی فنلی و فلاوونوئید عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی است که مطابق با نتیجه آزمایش ما می‌باشد(۱۶). Rawat و همکاران در سال ۲۰۱۰، ترکیبات فلاوونوئید عصاره *M.rubra* را بیشتر از *M.esculenta* گزارش کردند (۱۷). El-beshbishy و همکاران در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ای بر روی عصاره اتانولی Curcumin عصاره اتانولی هسته انگور و عصاره متانولی گیاه Nigella sativa انجام داده و در بین این سه گیاه مختلف ، کمترین میزان ترکیبات فنولی را با mg/g ۵/۲±۰/۰۶ مربوط به عصاره اتانولی هسته انگور اعلام کردند(۵).

براساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و فلاوونوئید و قدرت آنتی اکسیدانی گیاه وجود دارد. دانشمندان معتقدند که ترکیبات قوی آنتی اکسیدانی موجود در قسمت هوایی گیاه مثل فلاوونوئیدها، ترپنوئید و پلی فنل‌ها قابلیت انحلال بیشتری در آب نسبت به حلال‌های دیگر دارند. طبق بررسی انجام شده در این تحقیق نظر به اینکه عصاره‌های برگ انگور به ویژه عصاره اتانولی، دارای اثرآنتی اکسیدانی قوی می‌باشد و دارای مواد فلاوونوئیدی زیادی است، در نتیجه پس از آزمایش‌های تکمیلی و بهینه کردن شرایط می‌توان به عنوان جایگزینی برای مواد آنتی اکسیدان مصنوعی در صنایع غذایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

1. Amiri, H. (2009) Identify ingredients and Antioxidant Effects of essential oil and methanol extract of *Salivia multicaulis* Vahl. J Med Plt. 8: 111-117.
2. Amiri, H. (2010) Antioxidant activity of essential oil and methanolic extract of *Teucrium orientale* L. J Pharmaceut Res. 4: 417-423.
3. Benize, I.F.F. (1996) Lipid peroxidation : A review of causes, consequence, Measurement and dietary influences. INT J Food Sci. 47: 233-261.
4. Eghdami, A., Sadeghi, F. (2010) Determination of total phenolic and flavonoid contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea Millefolium*. Org Chem J. 2: 81-84.
5. El-Beshbishy, H.A., Mohamadian, A.M., Abdel-Naim, A.B. (2009) In Vitro Evaluation of the antioxidant activities of Grape seed (*Vitis Vinif-*

www.SID.ir

Archive of SID

era) Extract, blackseed (*Nigella Sativa*) Extract and Curcumin. J Med Sci. 4: 23-35.

6. Estevez, M., Cava, R. (2006) Effectivness of Rosemary essential oil as inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effecs in different types of frankfurters. Meat Sci. 72: 348-356.
7. Gharekhani, M., Ghorbani, M., Ebrahimzadeh, M.A., Jafari, S.M., Sadeghi, A.R. (2010) Compare different methods of phenolic and flavonoid Compounds extraction from *Urtica dioica*. J Med Plt. 26: 389.
8. Gollues, M., Adiguzel, A., Ozken, H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and methanol extract from *Mentha longifolia*. Food Chem. 103: 1449-1456.
9. Jalili marandi, R. (2007) Small fruits,iran-orumieh, Publishing Jahad daneshgahi Orumieh. (1st ed.). Orumieh, Iran. p.111.
10. Jamshidi, M., Ahmadi, H.R., Rezazadeh, Sh., Fathi, F., Mazanderani, M. (2010) Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plants of Mazandaran province. J Med Plt. 9: 34.
11. Kamaliroosta, L., Ghavami, M., Gharachurlu, M., Azizinezhad, R. (2011) Cinnamon extract and assessment it' s effect on the stability of Sunflower oil. J Nut Sci. 1: 13-22.
12. Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A.H., Mohammadian, M. (2010) Evaluate the performance of the antioxidant extract water, methanol and ethanol *Cuminum ciminum* and *Cardaria darba* in vitro. J Med Sci. 2: 37-45.
13. Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A., Jebelli Javan, A., Sadeghi, T., Zeagham Monfared, M.M. (2012) In vitro evaluation of antioxidant activity of Iranian *Mentha longifolia* essential oil and extracts. J Med Plt. 11: 185-194.
14. Kamkar, A., Jebelli, A., Asadi, F., kamalinejad, M. (2010) The antioxidant effect of Iranian *Mentha pulegium* extract and essensial oil in sunflower oil. Food and chemical toxicology. J Med Plt. 48: 1796-1800.
15. Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. (2008) Essential oil composition ,antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cunefolia* ten. Food Chem. 112: 874-879.
16. Patel, A. (2010) Estimation of flavonoid ,polyphenolic content and in-vitro antioxidant capacity of *Tephrosia purpurea* L. Pharma Sci. 1: 66-77.
17. Rawat, S., Jugran, A., Giri Lati, D., Bhatt, I.S., Rawal, R. (2010) Assessment of antioxidant properties in fruits of *Myrica esculenta*: A popular wild edible species in Indian Himalayan Region. Food Chem. 1: 1-8.
18. Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S., Abdul Aziz, A. (2008) Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Annacardium occidentale*). Food Chem. 111: 38-44.
19. Salmanian, Sh., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M. (2013) Evaluate the anti radical, antioxidant activity and flavonoid composition of *Crataegus elburensis*. J Nut Sci. 1:177-185.
20. Sharafati chaleshtori, R., Sharafati chaleshtori, F., Rafieian kopaei, M., Ashrafi, K. (2011) Determination Total phenols and antimicrobial effects of ethanol extract of walnut. J Med Sci. 4: 525-532.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Research. 73,2:165-171,2018 *Original Article*

Study of Antioxidant and Antiradical Activity of Alcoholic and Aqueous Extract of Grape Leaves in Vitro

Sadeghi Afrakati, M.[1*], Kamkar, A.[2]

[1]*Graduated From the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 24 December 2017, Accepted 13 March 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Reducing the detrimental effects of free radicals, in biological and food systems by antioxidants is important, thus providing antioxidants is necessary in community health and food safety. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to determine antioxidant and antiradical activity of alcoholic and aqueous extract of Grape leaves in vitro. **METHODS:** Grape leaves were extracted using the solvents: distilled water, ethanol and methanol and the antioxidant activities were measured by DPPH, β-carotene-linoleic acid, total phenolic compounds and total flavonoid compounds assays. **RESULTS:** IC50 for DPPH radical-scavenging activity in water, ethanol and methanol extracts were (71.90±0.714, 37.38±0.318 and 46.66±0.481µg/ml) and also the percentage of inhibition free radicals in β-carotene-linoleic acid were (86.51±1.84, 97.08±1.30 and 88.20±1.27). These parameters for BHT in DPPH test and β-carotene linoleic acid test are 13.58±0.000 µg/ml and 94.56±0.62 %. Total phenolic compounds and flavonoid compounds were calculated (158.02±1.39, 201.60±1.55 and 180.19±2.26 mg/g) and (37/16±1.64, 54.74±0.83 and 46.07±0.18 mg/g). According to the results in this study, the highest radical scavenging effect was observed in ethanol, then methanol extract and water extract had the lowest activity. **CONCLUSIONS:** It seems the ethanolic extract could be considered as a cheap, easily accessible and potential source of natural antioxidants for food and pharmaceutical purposes.

Keyword: Grape Leaf Extract-Anti Oxidant- β-Carotene Linoleic Acid- Flavonoid

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The effect of water, ethanol and methanol grape leaves and BHT in DPPH radical scavenging. Different superscript letters indicate significant differences between the means.

Table 2. Percentage inhibition of water, ethanol and methanol grape leaves extracts and BHT in oxidation of linoleic acid. Different superscript letters indicate significant differences between the means.

Table 3. The phenolic compounds in the extracts according to Gallic acid as a standard. Different superscript letters indicate significant differences between the means.

Table 4. The flavonoid compounds in the extracts according to Querstine as a standard. Different superscript letters indicate significant differences between the means.

***Corresponding author's email: mozhgansadeghi@yahoo.com, Tel: 011-32368642, Fax: 011-32190167**
www.SID.ir