فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۳، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۷۲-۵۹ (۱۳۸٦)

بررسی اثر آنتی اکسیدان اسانس میوه و سرشاخه *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* بر روی سیستم‌های اکسیداتیو

صدیقه عسگری[۱]، احمد امامی[۲]، محمد رضا شمس اردکانی[۳]، غلامعلی نادری[۱]، ساناز اصلانی[٤]، تقی کشر[٤] و آتوسا آیرین[٤]

۱- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق، پست الکترونیک: s_asgari@ crc.mui.ac.ir
۲-استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی
۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی
٤- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی

چکیده

امروزه عدم تعادل سیستم آنتی اکسیدان و اکسیدان به عنوان عامل ایجاد بسیاری از بیماریها از جمله آترواسکلروز، سرطانها و پیری شناخته شده‌است. در این مطالعه اثرات آنتی اکسیدان سه غلظت متفاوت از هر یک از اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه *Juniperus excelsa* subsp *excelsa* بر روی چند سیستم اکسیداتیو (همولیز گلبولهای قرمز، اکسیداسیون LDL، گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین و نیز پراکسیداسیون لینولئیک اسید) مورد بررسی قرار گرفته‌است. نتایج نشان می‌دهد که: ۱) اسانس‌های مورد بررسی به خوبی گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین را مهار نموده‌است. ۲) اکسیداسیون LDL در حضور غلظتهای مختلف اسانس سرشاخه گیاه به خوبی مهار شده‌است، در صورتیکه اسانس میوه در غلظتهای مورد مطالعه تأثیری بر اکسیداسیون LDL نداشته‌است. ۳) اکسیداسیون لینولئیک اسید در حضور اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه به خوبی مهار گردیده و میزان مهار با افزایش زمان انکوباسیون رابطه مستقیم نشان داد. ٤) اسانس‌های مورد مطالعه، در غلظت کم، همولیز گلبولهای قرمز را مهار و در غلظت‌های بیشتر تسریع نموده و در مورد این سیستم بیشتر خاصیت پراکسیدان داشته‌اند. به طور خلاصه نتایج نشان می‌دهد که اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه در غلظتهای اندک به خوبی توانسته‌است بر چند سیستم اکسیداتیو مؤثر و خاصیت آنتی اکسیدان بروز دهد، هرچند موجب همولیز برون‌تن (*in vitro*) گلبولهای قرمز شده‌است. بنابراین مطالعه بر روی تأثیر این گیاه بر برخی از بیماریها از جمله آترواسکلروز و دیابت می‌تواند حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، *Juniperus*، همولیز گلبول قرمز، اکسیداسیون LDL، انسولین، هموگلوبین.

مقدمه

خسارت‌های ناشی از واکنش‌های اکسیداتیو به DNA، پروتئین و سایر مولکول‌ها می‌تواند باعث پیشرفت و تشدید بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، پیری، کاتاراکت، خونریزی کبدی و ایدز گردد (Cross & Jones, 1991; Leuke & Rankin, 1990). هم چنین رادیکال‌های آزاد در مکانیسم عمل برخی از آنزیم‌های هم دار سیتوکروم شرکت می‌کنند.

در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای چرب غیر اشباع تغییر شکل می‌دهند و سیالیت و پتانسیل غشای لیپیدی کاهش یافته و منجر به تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود. همچنین پراکسیداسیون لیپیدها بر آنزیم‌های غشایی تأثیر

Archive of SID
www.SID.ir

گذاشته و در روند انتقال یونها و رهاسازی مواد داخل سلولی تغییر بوجود می‌آورد و متابولیت‌های سیتوتوکسیک بدست آمده از پراکسیداسیون لیپیدی موجب اکسیداسیون LDL می‌گردد که این امر در پاتوژنز آترواسکلروز نقش مهمی دارد. روغنهای فراری که خاصیت آنتی‌اکسیدان داشته باشند به دلیل لیپوفیل بودن نقش ویژه‌ای در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها داشته که می‌توانند در درمان و پیشگیری از آترواسکلروز مؤثر باشند. تاکنون تأثیر آنتی‌اکسیدان بسیاری از اسانس‌ها مشخص شده‌است (Agric & Bucar, 2000; Burtis & Asres, 2001; Burtis & Bucar, 2000).

Juniperus excelsa M. Bieb. subsp. *excelsa* درختی تک پایه می‌باشد که در کشورهای ناحیه بالکان، ترکیه، سوریه، لبنان، گرجستان، ارمنستان، آذربایجان، ترکمنستان، ایران و کناره‌های واقع در نواحی شمال شرقی دریای سیاه از قفقاز تا کریمه به صورت خودرو یافت می‌گردد (Farjon, 1992). این گیاه در زبان فارسی به نام اردوج خوانده می‌شود (ثابتی، ۱۳۵۵؛ اسدی، ۱۳۷۶؛ Parsa, 1949).

درخت مذکور گیاهی دارویی‌است و جهت درمان دیسمنوره (Hooper & Field, 1937)، سرفه (Yesilada *et al.*, 1995)، برونشیت و سرماخوردگی (Fujita *et al.*, 1995) یرقان و سل (Muhammad *et al.*, 1992) و نیز به عنوان قاعده‌آور (Jochile, 1979) مورداستفاده قرار می‌گیرد. در مورد گیاه مذکور برخی بررسیها منتشر گردیده‌است (Adams, 1990; Topcu *et al.*, 2005). در این مطالعه اثرات اسانس گیاه *Juniperus excelsa* بر روی سیستمهای اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفته‌است.

مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی در تاریخ ۲۶ آبان ۱۳۷۹ از جزیره اسلامی (استان آذربایجان شرقی) جمع‌آوری شده پس از شناسایی در هرباریوم باغ ملی گیاه شناسی ایران (واقع در تهران) نگهداری گردیدند. جهت جلوگیری از بروز تغییرات نامطلوب نمونه‌های جمع‌آوری شده تا هنگام اجرای آزمایش‌ها در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند (Adams *et al.*, 1984).

استخراج اسانس

اسانس موجود در برگ و میوه گیاه به طور جداگانه و بااستفاده از روش تقطیر با بخار آب و طی مدت ٤ ساعت‌استخراج گردید. جهت‌استخراج اسانس از ۵۰۰ گرم برگ و ۵۰۰ گرم میوه گیاه‌استفاده شد. در مرحله بعد روغن‌های‌استخراج شده توسط سدیم سولفات ایندر، آبگیری شد و میزان اسانس موجود در هر نمونه محاسبه گردید.

تجزیه اسانس بااستفاده از روش گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS)

جهت این امر از دستگاه GC/MS مدل Hewlett Packard 6890 واجد ستون HP-5 با مشخصات (30m X o.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Agilent HP, USA) متصل به طیف سنج جرمی مدل Hewlett-Pakared 8890 مجهز به کتابخانه طیف‌های جرمی Wiley-275استفاده گردید. دمای ستون بین ٦٠ تا ۲۷۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بوده که در هر دقیقه هم ١٤ درجه سانتی‌گراد به دمای آن افزوده می‌شد. دمای انژکتور ۲۵۵ درجه سانتی‌گراد، حجم تزریق ۰/۱ میکرولیتر، نسبت split ۱ به ۵۰، گاز حامل هلیم دارای سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه بوده، پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و حیطه جرم mui ۳۰۰- ۳۰ بود (Adams, 1995).

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش‌های برون تن (in vitro) بر روی لینولئیک اسید

تهیه امولسیون لینولئیک اسید

جهت انجام آزمایش بر روی لینولئیک اسید ابتدا امولسیون ۰/۰۱ مولار از آن تهیه شد. برای این کار مقدار ۱۵۵ میکرولیتر لینولئیک اسید همراه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲٪ توین ۲۰ ، با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک ۴۰ kHz قرار داده شد. امولسیون تهیه شده تا ۴۵ روز پایداراست (Farag *et al.*, 1989).

خنثی سازی امولسیون لینولئیک اسید

امولسیون تهیه شده به وسیله محلول ۱ نرمال KOH به pH=۷ رسانده شد و توسط بافر پتاسیم فسفات دارای pH=۷ به حجم ۷۵ میلی‌لیتر رسید (Valenzual *et al.*, 1986).

تعیین میزان مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید توسط اسانس‌ها

آزمایش‌های مربوط به تأثیر اسانس میوه و سرشاخه گیاه بر اکسیداسیون لینولئیک اسید در مورد هر یک از اندامها در سه غلظت انجام شده‌است. بدین منظور در ابتدااستوک ۲۰۰۰ ppm هر یک از اسانس‌ها ساخته شد و سپس مقادیر ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر از آن در لوله‌های آزمایش ریخته شد. همچنین در هر مورد آزمایش‌ها مقابل گروه کنترل که فاقد اسانس بود انجام پذیرفت.

ابتدا در تمام لوله‌ها ۱/۵ میلی‌لیتر از امولسیون لینولئیک اسید خنثی شده و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم دی هیدروژن فسفات با pH=۷ ریخته شد . لوله‌های آزمایش شامل مقادیر مشخصی از اسانس مورد نظر بود. به تمام لوله‌ها مقداری از محلول $FeSO_4$ افزوده شد تا حدی که غلظت نهایی Fe^{2+} در هر لوله به ۵۰۰ میکرومولار رسید. $FeSO_4$ سبب پراکسیداسیون لینولئیک اسید می‌شود.

لوله‌های آزمایش به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ ° C انکوبه گردیدند. میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید از طریق اندازه‌گیری میزان تشکیل دی ان کونژوگه در طول موج ۲۳۳ نانومتر تعیین گردید (Valenzual *et al.*, 1986). برای این کار ۰/۵ میلی‌لیتر از محتویات هر لوله با ۱ میلی‌لیتر اتانل ۶۰° رقیق شده و جذب آن در طول موج ۲۳۳ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. این کار هر ۱ ساعت یکبار انجام شد.

تعیین اثر بر میزان گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین

خون از افراد داوطلب سالم تهیه و از EDTA به عنوان ماده ضد انعقاداستفاده گردید. گلبول‌های قرمز سه بار با محلول NaCl (۰/۱۴ M) شسته شد و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز لیز شده با ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۰۱۸ مولار دارای pH= ۷/۴ و نیز ۰/۵ میلی‌لیتر CCl_4 مخلوط گردیده و قسمت لیز شده بااستفاده از سانتریفیوژ جدا گشت و لایه فوقانی جدا و غلظت هموگلوبین با روش Drabkin تعیین گردید (Burtis & Ashwood, 1994; Vankampen & Zijlstra, 1965).

انسولین گاوی نرمال (۱۰۰ Iu/ml) از کارخانه Lilly خریداری گردید. سپس با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر از بافرفسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/۴ به صورت محلول آماده شد. درصد گلیکوزیلاسیون هموگلوبین و انسولین در حضور غلظت‌های مختلف از هر اسانس بررسی شد. کلیه آزمایش‌ها به صورت سه تایی در برابر گروه شاهد

Archive of SID
www.SID.ir

که فاقد هرگونه اسانس بود انجام شد (Buriis & Ashwood, 1994; Asgary *et al*., 2002)

آزمایش‌های برون تن بر گلبول‌های قرمز

الف) تهیه سوسپانسیون گلبولی

خون افراد داوطلب سالم در لوله هپارینه جمع‌آوری و بعد گلبول‌های قرمز موجود در آنها توسط سانتریفیوژ از پلاسما جدا گشته و سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، در طی آخرین مرحله شستشو، سلولها با دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سلولهای متراکم به دست آمد. از هر اسانس امولسیون ppm ۲۰۰۰ در توئین ۰/۲٪ و آب دیونیزه بااستفاده از دستگاه اولتراسونیک (kHz ٤٠) تهیه شد.

ب) همولیز گلبول‌های قرمز

در ابتدا حجم‌های ٤٠،٥٠ و ٦٠ میکرولیتر از هر اسانس در غلظت ppm۲۰۰۰ در لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس به هر لوله ۰/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول اضافه شد. پس از مخلوط کردن با یک میلی‌لیتر AAPH (۲۵ میلی‌مولار) لوله‌ها ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Rpm ۳۰۰۰) گردید و جذب محلول فوقانی در ٥٤٠ نانومتر که بیانگر میزان همولیزاست بااستفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو قرائت گردید (Koga *et al*., 1998).

تعیین مهار اکسیداسیون LDL

LDL موجود در سرم افراد سالم بااستفاده از دستگاه سانتریفیوژ جدا گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در بافر فسفات سالین (pH=۷/٤ و ۰/۱ مولار) دیالیز گردید و پس از دیالیز میزان پروتئین آن با روش لوری تعیین مقدار گردید. سپس جذب نوری بدست آمده از پراکسیداسیون لیپیدی (conjucateddienes) در زمان‌های مختلف و در طول ۲۱۰ دقیقه بااستفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-3100 در حضور Cu^{2+} در طول موج ۲۳٤nm بدست آمد (Regnstrom *et al*., 1992).

تأثیرغلظت‌های مختلف از هر اسانس و نیز ویتامین C بر میزان تغییرات این جذب در حضور Cu^{2+} در همان طول موج مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

سرشاخه‌های گیاه حاوی ۱/۳۲ درصد (حجمی/ وزنی) و میوه آن واجد ۱/۱٦ درصد (حجمی/ وزنی) اسانس بود. در اسانس بدست آمده از سرشاخه‌های گیاه ۵۷ و در میوه آن ۲۸ ترکیب شناسایی گردید.

همان گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌است مهمترین ترکیب موجود در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه گیاه آلفا- پی نن بود که مقدار آن در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه به ترتیب ۳۲/۳ و ٤۷/٦ درصد بود. مونوترپن‌های هیدروکربنی موجود در اسانس بدست آمده از سرشاخه‌ها و میوه گیاه به ترتیب ٤۷/۸ و ٦۱ درصد و میزان مونوترپن‌های اکسیژنه موجود در آنها به ترتیب ۳/۸ و ۱/٤ درصد بود. میزان سزکویی‌ترپن‌های هیدروکربن در اسانس‌های بدست آمده از سرشاخه و میوه گیاه به ترتیب ۲۲/۲ و ۱۰/۵ درصد بود، حال آنکه مقدار سزکویی ترپن‌های اکسیژنه در اندامهای مذکور به ترتیب ۱٤/۸ و ۱۳/٦ درصد بودند. اسانس بدست آمده از سرشاخه‌ها واجد ۲/٤ درصد ترکیبهای متفرقه بود، حال آنکه اسانس بدست آمده از

Archive of SID
www.SID.ir

میوه گیاه عاری از مواد مذکور بود. به طور کلی ۹۰ درصد ترکیبهای موجود در اسانس سرشاخه و ۸۶/۵ درصد ترکیبهای موجود در اسانس میوه مورد شناسایی قرار گرفتند.

- همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود اسانس‌های بدست آمده از قسمتهای مختلف میوه و سرشاخه گیاه اردوج به خوبی توانسته‌است گلیکوزیلاسیون هموگلوبین را حتی تا مقادیر بیش از ۶۰٪ مهار نماید.
- گلیکوزیلاسیون انسولین نیز توسط غلظت‌های مختلف اسانس میوه و سرشاخه اردوج تقریبا ۵۰٪ کاهش یافته‌است (شکل ۲).
- شکل ۳ اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه اردوج را بر همولیز گلبول‌های قرمز نشان می‌دهد. مقادیر ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر ازاستوک ppm ۲۰۰۰ مورد مطالعه قرار گرفته‌است. اسانس میوه اردوج در حجم ۵۰ میکرولیتر به میزان ۵۱/۸۳٪ همولیز گلبول‌های قرمز را مهار نموده‌است در صورتی که اسانس میوه در دو غلظت دیگر و اسانس سرشاخه در تمامی غلظت‌ها همولیز گلبول‌های قرمز را تسریع کرده‌است و اثر پراکسیدان بسیار قوی داشته‌است.
- شکل‌های ۴ و ۵ اثرات حجم‌های مختلف (۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر) ازاستوک ppm۲۰۰۰ اسانس بدست آمده از سرشاخه و میوه گیاه اردوج را بر اکسیداسیون LDL در مقابل ویتامین C نشان داده‌است. اسانس بدست آمده از سرشاخه در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه خاصیت آنتی اکسیدان داشته‌است و میزان آن بیش از ویتامین C بوده‌است، ولی اسانس میوه این گیاه تأثیری بر اکسیداسیون LDL نداشته‌است.
- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه بر روی اکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعت‌های مختلف در شکل ۶ آمده‌است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد اسانس بدست آمده از سرشاخه این گیاه در حجم ۵۰ میکرولیتر بیشترین تأثیر را بر اکسیداسیون لینولئیک اسید داشته‌است. می‌توان گفت میزان مهار با مدت زمان انکوباسیون رابطه مستقیم داشته‌است. اسانس بدست آمده از میوه گیاه نیز در حجم ۵۰ میکرولیتر بیشترین تأثیر را داشته‌است و با افزایش زمان انکوباسیون درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک افزایش یافته‌است.

بحث

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داده‌است که اسانس بدست آمده از میوه و سرشاخه گیاه دارای اثرات آنتی‌اکسیدان قابل ملاحظه‌ای بر اکسیداسیون LDL و اکسیداسیون لینولئیک اسید وگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های انسولین و هموگلوبین داشته، در حالی که به صورت برون‌تن موجب تسریع همولیز گلبول‌های قرمز شده و در این سیستم خاصیت پراکسیدان داشته‌است.

در مطالعه‌ای که بر روی *Juniperus procera* انجام شده‌است خواص آنتی‌اکسیدان آن به اثبات رسیده‌است (Burtis *et al.*, 2001). مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدان *Juniperus chinensis* با روش اندازه‌گیری ایجاد پراکسیداسیون توسط ۱،۱-دی فنیل-۲ پیکریل هیدرازیل (DPPH) نیز نشان داده‌است که این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان بسیار قوی‌است (Lim *et al.*, 2002). در صورتی که *Juniperus osteosperma* در همین سیستم

Archive of SID

www.SID.ir

دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان نبوده‌است (Acuna *et al.*, 2002). همچنین مطالعه انجام شده بر روی عصاره آبکی و اتانولی بدست آمده از میوه *Juniperus Communis* نشان داده‌است که غلظت‌های متفاوت هر دو عصاره به خوبی توانسته‌است خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر روی سیستم لینولئیک اسید داشته باشد (Mahfuz *et al.*, 2005).

آنچه مشخص‌است آنتی‌اکسیدانها در شرایط مختلف و غلظت‌های مختلف می‌توانند اثرات متفاوت آنتی‌اکسیدان و پراکسیدان داشته باشند. مطالعات نشان می‌دهد ویتامین E می‌تواند در حضور پراکسیدازها یک پراکسیدان در اکسیداسیون LDL باشد (Parthasarathy *et al.*, 1999). همچنین ویتامین E در بعضی غلظت‌ها اثر آنتی‌اکسیدان و در بعضی غلظت‌های دیگر اثرات پراکسیدان دارد. یعنی در غلظت‌های بالا نقش آنتی‌اکسیدان داشته و در غلظت‌های پایین به عنوان پراکسیدان عمل می‌کند(Machlin & Bendich, 1987; Mohr *et al.*, 1992). ویتامین C نیز خواص آنتی‌اکسیدان خود را در غلظت‌های ۱۰۰-۶۰ میکرومولار بروز می‌دهد و درکمتر یا بیشتر از این مقادیر خواص پراکسیدان دارد (Stait & Leake, 1994). به نظر می‌رسد بین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدان اسانس، اجزاء شیمیایی و غلظت آنها رابطه وجود دارد (Farag *et al.*, 1989).

در روغن‌های فرار بدست آمده از سرشاخه و میوه *J. excelsa* subsp *excelsa* به ترتیب ۵۷ و ۲۸ ترکیب شناسایی شده‌است و در هر دو مورد مهمترین جزء آلفا پینن (به ترتیب ۳۲/۳ و ٤٧/٦ درصد در اسانس سرشاخه و میوه) بوده‌است. درحالی که مهمترین جزء اسانس همین گیاه که در یونان رویش داشته‌است سدرول (۲۸/۱ درصد) و آلفا-پینن (۲۲/۵ درصد) و لیمونن (۲۲/۷ درصد) بوده‌است (Ruberto & Baratta, 2000). محققین هندی در برگ گیاه ٦٣ ترکیب یافتند که مهمترین آنها سابینن(٣٦/١ درصد) و سدرول (٢٦/٨ درصد) بوده‌است. بر اساس بررسی‌های محققان ترک، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس بدست آمده از میوه گیاه مذکور آلفا-پینن (٣٤/٠ درصد) و سدرول (۱۲/۳ درصد) بوده‌است. در اسانس برگ گیاه نیز همین امر صادق بوده و مهمترین اجزاء آن شامل آلفا پینن (۲۹/۷ درصد) و سدرول (۲۵/۳ درصد) بوده‌اند (Topcu *et al.*, 2005).

با توجه به مطالعات محققان ایتالیایی در مورد اثر آنتی اکسیدان برخی از مونوترپن‌ها، سزکویی‌ترپن‌ها و دیگر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها به نظر می‌رسد که عمده ترکیب موجود در اسانس‌های مورد بررسی در مقاله حاضر یعنی آلفا-پینن جزء آنتی اکسیدان‌های ضعیف به شمار می‌آید و میزان آنتی اکسیدان‌های قوی یعنی ترکیباتی از قبیل آلفا-ترپینن، گاما-ترپینن و ترپینئول در اسانس‌های مورد بررسی چندان زیاد نمی‌باشد. این در حالی‌است که میزان دیگر آنتی‌اکسیدان‌های ضعیف یعنی ترکیباتی از قبیل فنشول، کامفر، بورنئول و کاریوفیلین نیز در اسانس‌های مورد بررسی پایین‌است (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد اسانس گیاه مورد نظر در بیشتر سیستم‌ها توانسته‌است خاصیت آنتی‌اکسیدان داشته باشد و در مورد سیستم گلبول قرمز بایستی این اثر در غلظت‌های دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- درصد اجزاء موجود در اسانس بدست آمده از سرشاخه و میوه *Juniperus excelsa* subsp *excelsa*

ردیف	ترکیب	*RI	اسانس میوه (٪)	اسانس برگ (٪)
۱	tricyclene	۹۲۷	۰/۲	–
۲	α-pinene	۹۳۹	۳۲/۳	۴۷/۶
۳	camphene	۹۵۳	۰/۹	–
۴	verbenene	۹۶۷	۰/۱	–
۵	sabinene	۹۷۶	۰/۴	–
۶	β-pinene	۹۸۰	۲/۲	۲/۷
۷	myrcene	۹۹۱	۳/۰	۵/۱
۸	δ-3-carene	۱۰۱۱	۱/۷	–
۹	α-terpinene	۱۰۲۰	۰/۱	۰/۱
۱۰	ρ-cymene	۱۰۲۶	۰/۴	–
۱۱	limonene	۱۰۳۱	۲/۸	۲/۶
۱۲	(Z)-β-ocimene	۱۰۴۱	۰/۱	–
۱۳	γ-terpinene	۱۰۶۳	۰/۹	۱/۱
۱۴	terpinolene	۱۰۸۸	۱/۷	۱/۸
۱۵	isoamyl-2-methylbutyrate	۱۱۰۵	۰/۱	–
۱۶	fenchol	۱۱۱۴	۰/۱	–
۱۷	3-methyl-3-butenyl isovalerate	۱۱۱۷	۰/۲	–
۱۸	α-campholenal	۱۱۲۵	۰/۳	–
۱۹	trans-pinocarveol	۱۱۳۸	۰/۲	–
۲۰	trans-verbenol	۱۱۴۰	۰/۱	–
۲۱	camphor	۱۱۴۳	۰/۷	۰/۲
۲۲	pinocarvone	۱۱۶۴	۰/۱	–
۲۳	borneol	۱۱۶۷	۰/۱	–
۲۴	isopinocamphone	۱۱۷۵	۰/۲	۰/۲
۲۵	terpinen-4-ol	۱۱۷۷	–	۰/۱
۲۶	myrtenol	۱۱۹۴	۰/۱	–
۲۷	verbenone	۱۲۰۴	۱/۰	–
۲۸	hexyl pentanoate	۱۲۴۳	۱/۰	–
۲۹	bornyl acetate	۱۲۸۶	–	۰/۹
۳۰	(2E,4Z)-decadienal	۱۲۹۱	۰/۸	–
۳۱	(2E,4E)-decadienal	۱۳۱۴	۰/۳	–
۳۲	delta-elemene	۱۳۳۹	۰/۸	۰/۵

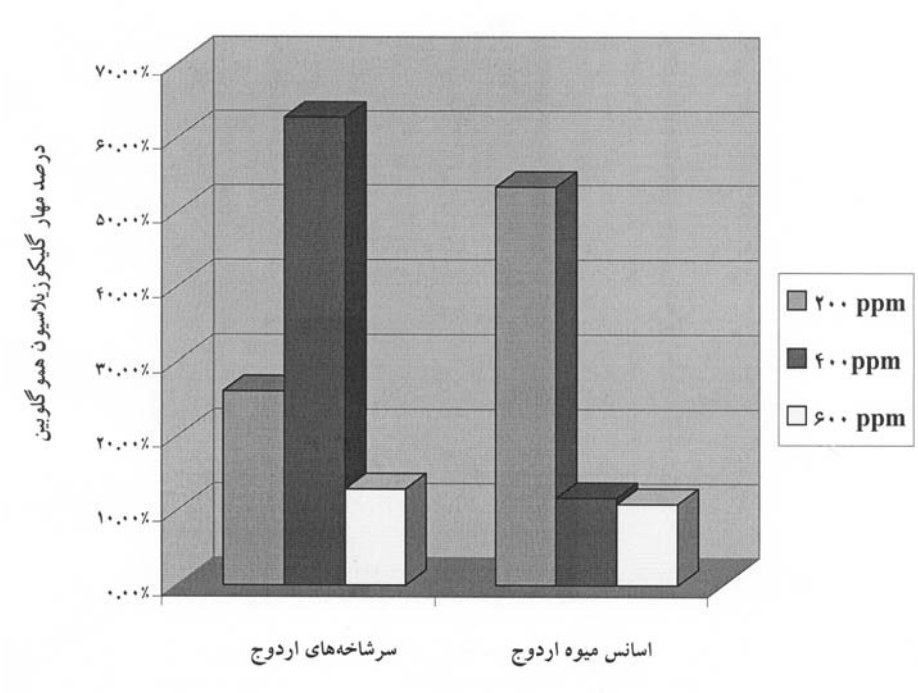
Archive of SID

www.SID.ir

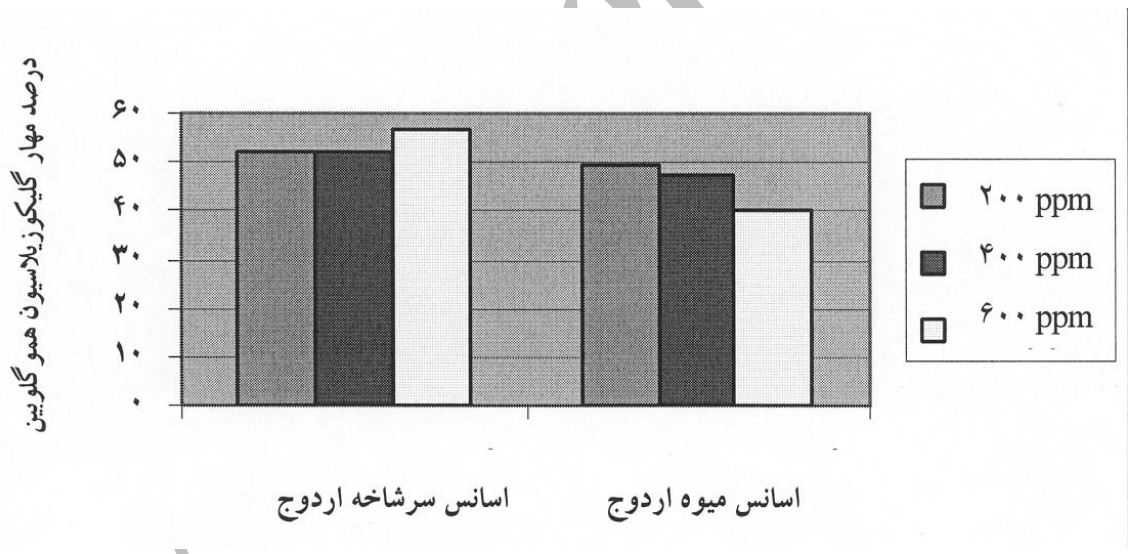
٣٣	α-copaene	١٣٧٥	٠/١	–
٣٤	β-elemene	١٣٩١	٣/٧	٠/٤
٣٥	isocaryophyllene	١٤٠٤	٢/٦	٠/١
٣٦	α-amorphene	١٤١٥	١/٤	١/٥
٣٧	β-caryophyllene	١٤٢١	٠/٢	١/٠
٣٨	widdrene	١٤٣٢	١/٠	–
٣٩	γ-elemene	١٤٣٤	٠/٣	٠/٨
٤٠	α-humulene	١٤٥٤	٠/٧	–
٤١	(E)-β-farnesene	١٤٥٨	٠/٣	٠/٤
٤٢	γ-muurolene	١٤٧٧	٠/٤	–
٤٣	germacrene D	١٤٨٠	٠/٤	٠/٩
٤٤	β-selinene	١٤٨٥	٠/٤	–
٤٥	δ-selinene	١٤٩١	١/٠	–
٤٦	α-muurolene	١٤٩٩	٠/٤	٠/٢
٤٧	cuparene	١٥٠٢	٠/٦	–
٤٨	β-bisabolene	١٥١٠	٢/٩	٠/٢
٤٩	γ-cadinene	١٥١٤	٢/٢	–
٥٠	δ-cadinene	١٥٢٤	٠/٨	٠/٧
٥١	(E)-γ-bisabolene	١٥٣٣	٠/٦	٠/٦
٥٢	α-cadinene	١٥٣٩	٠/٤	–
٥٣	selina-3, 7(11) diene	١٥٤٣	٠/٥	–
٥٤	elemol	١٥٤٩	٠/٣	٠/٥
٥٥	germacrene b	١٥٥٦	٠/٤	٣/٢
٥٦	cedrol	١٦٠١	١٣/١	١٢/٠
٥٧	T-cadinol	١٦٤٢	٠/٦	٠/٥
٥٨	β-eudecmol	١٦٥١	٠/٢	–
٥٩	α-cadinol	١٦٥٣	٠/٦	٠/٦
	Monoterpene hydrocarbons		٤٧/٨	٦١/٠
	Oxygenated monoterpenes		٣/٨	١/٤
	Sesquiterpene hydrocarbons		٢٢/٢	١٠/٥
	Oxygenated sesquiterpenes		١٤/٨	١٣/٦
	Miscellaneous compounds		٢/٤	–
	Total identified		٩٠/٠	٨٦/٥

* شاخص بازداری بااستفاده از ستون موئین HP-5 تعیین شده‌است.

Archive of SID
www.SID.ir

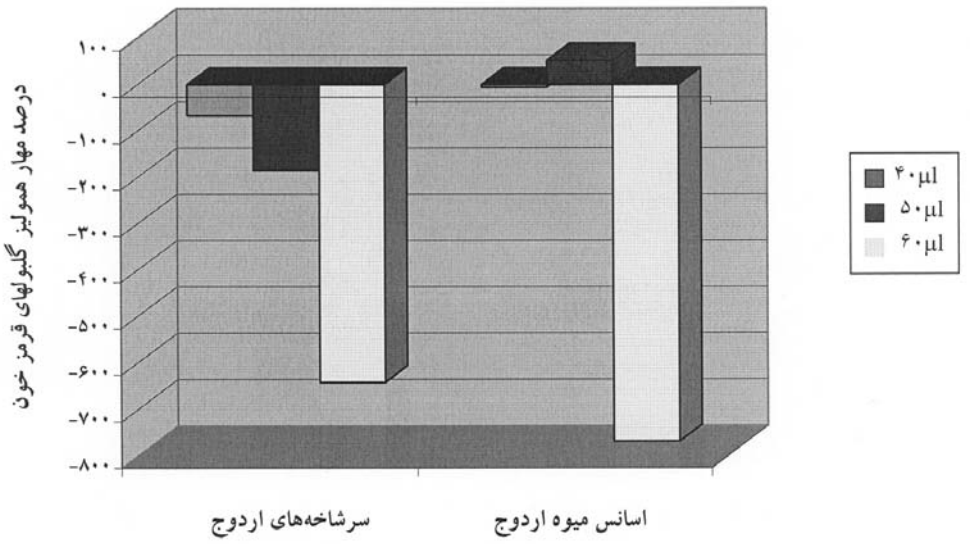


شکل ۱- اثر اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان مهار گلیکوزیلاسیون هموگلوبین

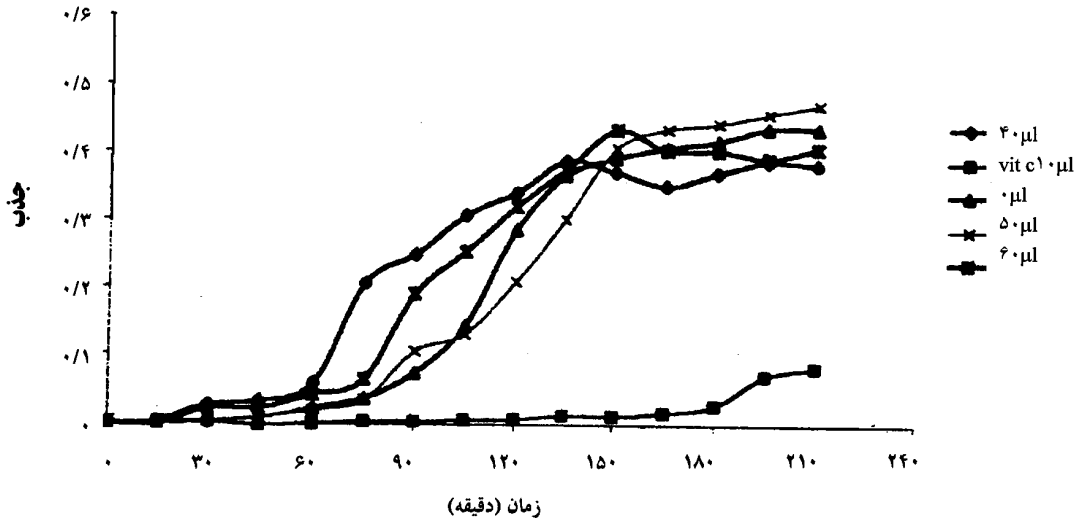


شکل ۲- اثر اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان مهار گلیکوزیلاسیون انسولین

www.SID.ir

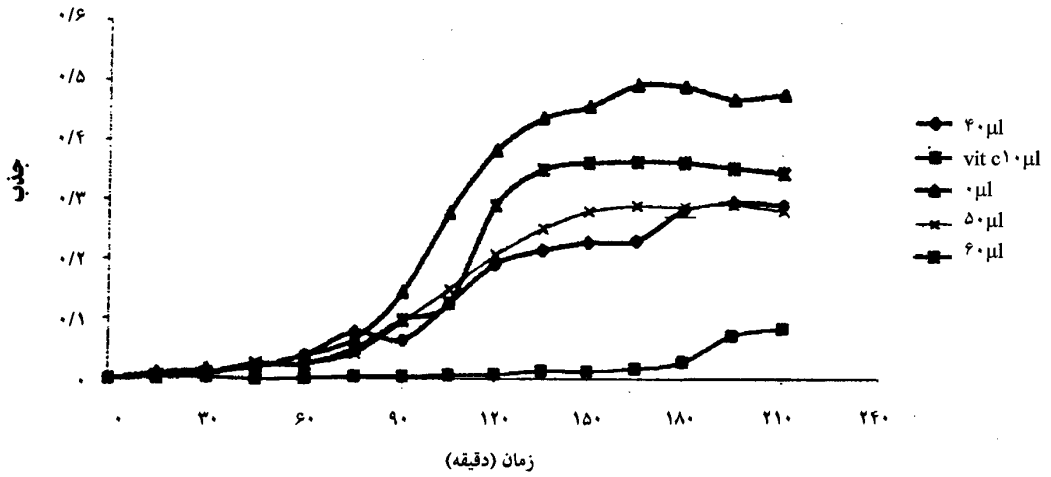


شکل ۳- اثر حجمهای مختلف از اسانس میوه و سرشاخه اردوج در غلظت ppm ۲۰۰۰ بر همولیز گلبولهای قرمز خون

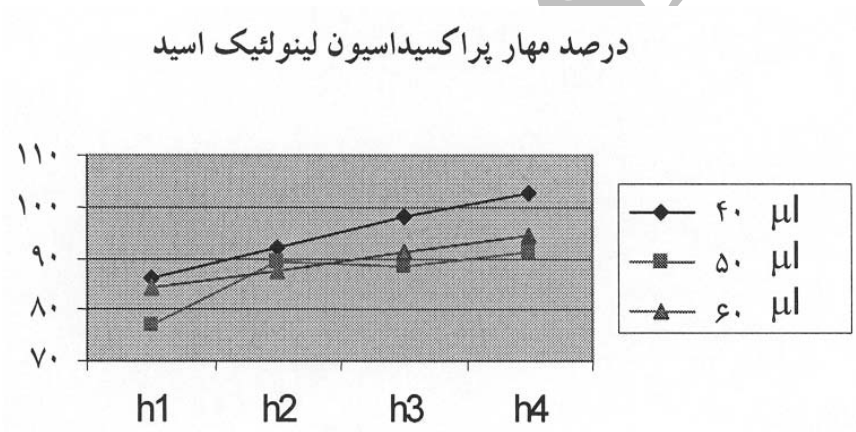


شکل ٤- اثر مقادیر مختلف اسانس سرشاخه اردوج در غلظت ppm ۲۰۰۰ و ویتامین C (غلظت نهایی 100 µl) بر اکسیداسیون LDL

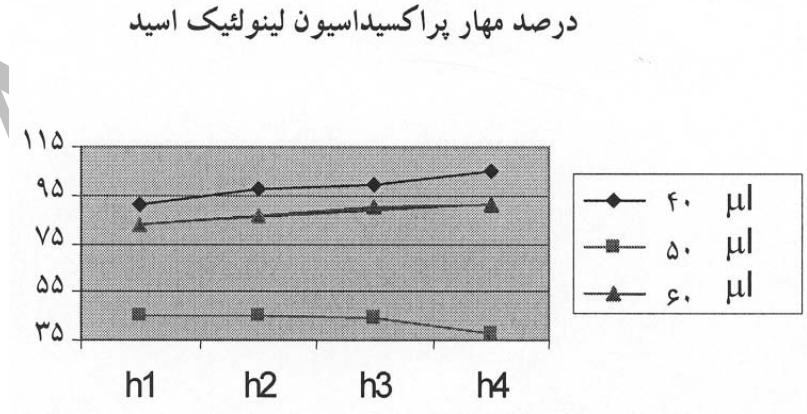
www.SID.ir



شکل ۵- اثر مقادیر مختلف اسانس میوه اردوج در غلظت ppm ۲۰۰۰ و ویتامین C (غلظت نهایی µl۱۰۰) بر اکسیداسیون LDL



شکل ٦- اثر حجمهای مختلف از غلظت ppm ۲۰۰۰ اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعتهای مختلف



شکل ۷- اثر حجمهای مختلف از غلظت ppm ۲۰۰۰ اسانس میوه و سرشاخه اردوج بر میزان پراکسیداسیون لینولئیک اسید در ساعتهای مختلف

www.SID.ir

منابع مورداستفاده

- ثابتی، ح.، ۱۳۵۵. جنگلها، درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات وزارت کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ۸۱۰ صفحه.
- اسدی، م.، ۱۳۷٦. فلورایران، شماره ۲۱، انتشارات مؤسسه جنگلها و مراتع کشور، تهران، ۵۸ صفحه.
- Acuna, U.M., Atha, D.E., Ma, J., Nee, M.H. and Kennellyl, E.J., 2002. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. Phytother Res, 16(1): 63-5.
- Adams, R.P., 1990. The Chemical Composition of Leaf Oils of *Juniperus excelsa* M. Bieb., Journal of Essential Oil Research, 2: 45-48.
- Adams, R.P., 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream, USA, 456.
- Adams, R.P., Zanoni, T.A and Hogge, L., 1984. Oil of *Juniperus flaccida var. flaccida.* Journal of Natural Products, 47: 1064-1065.
- Agric, J. and Bucar, F., 2000. Antioxidant effect of some essential oils. Food Chemistry, 4: 156-161.
- Asgary, S., Naderi, G.A., Sarrafzadegan, N. and Vakili, R., 2002. The inhibitory effects of pure flavonoids on *in vitro* protein glycosylation. Journal of Herbal Pharmacotherapy, 2(2): 47-55.
- Burtis, M., and Bucar, F., 2000 Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil phytotherapy Research, 14: 323-328.
- Burtis, M., Asres, K. and Bucar, F., 2001 The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssininca* and *Juniperus procera*. Phytother Research, 15: 103-108.
- Cross, A.R. and Jones, O.T.G. 1991. Enzymatic mechanism of super oxide production. Biochemical et Biophysica Acta, 1057: 281-298.
- Farag, R.S., Badei, A.Z. Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S., 1989. Antioxidant activity of some essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. Journal of American Oil Chemist Society, 66: 792-99.
- Farjon, A., 1992. The Taxonomy of Multiseed Junipers (*Juniperus* Sect. *Sabina*) in Southwest Asia and East Africa (Taxonomic Notes on Cupressaceae), Edinbourg Botany journal, 49: 251-283.
- Hooper, D. and Field, H., 1937. Useful Plants and Drugs of Iran and Iraq. Field Museum of Natural History Publication Botany Serial, 9(3): 73-241.
- Jochile, W., 1979. Mense-Inducing Drugs: Their role in antique, medival and renaissance gynecology and birth control. Contraception, 10: 425-439.
- Koga, T., Moro, K. and Terao, J., 1998. Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidy lchromanol , against oxidative hemolysis of human erythrocytes. Lipids, 33: 589-95.
- Leuke, D.S. and Rankin, S.M., 1990. The oxidative odification. Biochemistry Journal, 270: 741-748.
- Lim, J.P., Song, Y.C., Kim, J.W., Ku, H., Eun, J.S., Leem, K.H. and Kim, D.K., 2002. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. Archives Pharmacutical Research, 25(4): 44-52.
- Machlin, L.J. and Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protetive role of antioxidant nutrients. FASEB Journal, 1: 441-446.
- Mahfuz, E., Ilhami, G., Sukru, B., Kufrevioglu, I. and Enein, A., 2005. A study on the *in vitro* antioxidant activity of *Juniper (Juniperus Communis L.*) fruit extracts. Analytical letters, 39(1): 47-65.
- Mohr, D., Bowry, V.W. and stocker, R., 1992. Dietary supplementation with COQ10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human LDL. Biochemistry and Biophysics Acta, 1126: 247-254.
- Muhammad, I., Mossa, J.S. and El-Feraly, F.S., 1992. Antibactrial Diterpenes from the Leaves and Seeds of *Juniperus* excelsa. M. Bieb., Phytotherapy Research, 6**:** 261-264.
- Parsa, A., 1949. Flora de l'Iran, Tome 5 Coniferea, Publication du Minstére de l'Education, Museum d'Histoire Naturelle de Téhéran, 1024 p.
- Parthasarathy, S., Santhnam, N. and Ramachandran, S., 1999. Oxidant and antioxidant in athergenisis: An appraisal. Journal of Lipid Research, 40:2143-2157.
- Regnstrom, J., Nilsson, J., Tornvall, P., Landon, C. and Hamsten, A., 1992. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. Lancet, 339: 1183-1186.
- Ruberto, G. and Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69: 167-174.
- Stait, S.E. and Leake, D.S., 1994. Ascorbic acid can either increase or decrease LDL- modification. FEBS Letter, 341: 263-269.
- Topcu, G., Goren, A.C., Bilsel, G., Bilsel, M., Cakmak, O., Schilling, G. and Kingston, G.I., 2005. Cytotoxic activity and essential oil composition of leaves and berrries of *Juniperus excelsa*. Pharmaceutical Biology, 43: 125-128.

Archive of SID

www.SID.ir

- Valenzual, A., Guerra, R. and Videla, L.A., 1986. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxy toloen. Planta Medica, 8: 438-440.
- Vankampen, E.J., Zijlstra, W.G., 1965. Determination of hemoglobin and its derivatives. Advance Clinical Chemistry, 8: 141-187.
- Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. and Takaishi, Y., 1995. Traditional Medicine in Turkey, V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. Journal of Ethnopharmacology, 46: 133-152.

Archive of SID

www.SID.ir

Antioxidant effects of the essential oils from the fruits and twigs of *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* on several oxidative systems

S. Asgary[1], S.A. Emami[2], M.R. Shams Ardekani[3], Gh. Naderi[1], S. Aslani[4], T. Kasher[4] and A. Airin[4]

1- Associate Professor, Isfahan Cardiovascular Research Center, Email:s_asgari@crc.mui.ac.ir
2- Assistant Professor, Mashhad University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy
3- Associate Professor, Tehran University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy
4- Isfahan University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy

Abstract

Free radicals especially reactive oxygen species damage biomolecules such as DNA, proteins, enzymes and membrane lipids. Nowadays, it is believed that antioxidant and oxidant systems play an important role in the pathogenesis of many diseases such as atherosclerosis, cancers, aging, etc. In the present study, antioxidant effects of essential oils from the fruits and twigs of *Juniperus excelsa* subsp. *Excelsa* on several oxidative systems (red blood cells haemolysis , LDL oxidation, insulin and haemoglobin glycosylation and linoleic acid peroxidation) were studied. Plant specimens were identified after collection and essential oils from the fruits and twigs were separately extracted by steam distillation method. Three different concentration of each extracts from the fruits and twigs of plant were used. Experiments were carried out in the presence and in the absence of each concentration by Cu^{2+} and spectroscopic method for LDL oxidation. 2, 2'-Azobis- (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was used to hemolysis of red blood cells and the amount of haemolysis was measured by spectroscopic method in 540 nm. Total conjugated dienes (CDs) formation from linoleic acid was determined at the presence of $FeSO_4$ in 234 nm. The results of this study show that insulin and haemoglobin glycosylation were effectively inhibited by the examined essential oil, also LDL oxidation was inhibited in the presence of different concentration of these oils. Inhibitory effect of twigs on LDL oxidation was greater than vitamin C. No anti-oxidation activity on LDL oxidation was observed when the experiments run with examined-concentrations of fruit. Linoleic acid oxidation in the presence of examined-oils was efficiently inhibited and a direct correlation was observed between the level of inhibition and incubation time. The obtained essential oils inhibited red blood cells haemolysis in low concentration and accelerate red blood cells haemolysis by peroxidant properties in high concentration. These results demonstrate that the essential oils prepared from the fruit and twigs of the *Juniperus excelsa subsp. excelsa* possess antioxidant activity in low concentration in several oxidative systems even them caused red blood cells haemolysis in vitro. Hence, more studies are called to examine the effect of this plant for treatment of some disease including atherosclerosis, diabetes, cancer, etc.

Key words: Antioxidant, *Juniperus*, Red blood cell hemolysis, LDL oxidation, insulin, haemoglobin.

Archive of SID

www.SID.ir