فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۹۵-۲۸۱ (۱۳۹۲)

سنجش محتوای فنل و فلاونوئید تام و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ساقه و برگ ٦ گونه میخک وحشی (*Dianthus* L.) ایران

عذرا صبورا[1*]، خدیجه دادمهر[2] و مسعود رنجبر[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
پست الکترونیک: azrasaboora1034@gmail.com
۲- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۰

چکیده

در این مطالعه، عصاره متانولی ۸۰٪ پودر خشک شده برگ و ساقه ٦ گونه میخک (*Dianthus* L.) از ۹ جمعیت مختلف ایران تهیه شد. سپس محتوای فنل و فلاونوئیدی آنها به‌ترتیب با استفاده از روشهای فولین- سیوکالتیو و کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با استفاده از دو روش تکمیلی در شرایط *in vitro* (آزمون ۲،۲- دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل و آزمون مهار بی‌رنگ شدن β- کاروتن) اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل با خاصیت آنتی‌اکسیدان استاندارد BHT مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های محتوای فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف با هر دو روش وجود دارد ($p < 0.01$). همچنین مشخص شد که تفاوت شرایط منطقه مانند تغییرات اقلیمی، ارتفاع و تغییر خزانه ژنتیکی در سطح سرده، تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها داشت، اما محتوای فلاونوئیدها در سطح درون گونه‌ای تغییر شاخصی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میخک، محتوای فنل و فلاونوئید، *Dianthus* L.

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که به‌طور مؤثر می‌توانند از اکسایش ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک جلوگیری نمایند. عمل فوق از طریق مهار مرحله شروع یا مرحله گسترش واکنش های زنجیره‌ای اکسایش یا تولید رادیکال های آزاد صورت می‌گیرد. تولید اشکال فعال اکسیژن و مشتقات اکسیدهای نیتروژن یکی از علل ایجاد آسیب و مرگ برنامه‌ریزی شده، ایجاد بیماریهای قلبی- عروقی و سرطان‌ها می‌باشد (Zheng & Wang, 2001). آنتی اکسیدان ها به دو دسته شیمیایی و طبیعی تقسیم می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنایع غذایی دارند شامل BHA یا هیدروکسی‌انیزول بوتیلیتد و BHT یا هیدروکسی تولوئن بوتیلیتد، TBHQ یا

Archive of SID

www.SID.ir

tert- بوتیل‌هیدروکوئینون و PG یا پروپیل‌گالات هستند که به علت سرطان‌زایی و اثر منفی این ترکیب ها بر سلامت انسان کاربرد آنها محدود شده‌است (عیوقی و همکاران، ۱۳۸۸). بنابراین از دهه ۱۹۸۰ آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین انواع سنتزی شده‌اند (تجلی و همکاران، ۱۳۸۸).

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که عمدتاً در میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند در میان مصرف‌کنندگان طرفداران زیادی دارند و به نظر می‌رسد که در پیشگیری از بیماریها حائز اهمیت می‌باشند. از طرف دیگر تعدادی از این ترکیب‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان متابولیت‌های ثانوی توسط گیاهان وحشی ساخته می‌شوند که از آن جمله می‌توان به ترکیب‌هایی نظیر فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها اشاره نمود. بخشی از این مواد در مواجهه گیاهان با گونه‌های فعال اکسیژن و تماس با عوامل بیماری‌زا تولید می‌شوند و بخشی دیگر به‌طور طبیعی طی دوره تکمیل مراحل رشد و نمو گیاهان تولید می‌گردند و به راحتی توسط آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی حذف می‌شوند (کامکار، ۱۳۸۸). روشهای مختلفی برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد، ازجمله آنها می‌توان به روش جاروب کردن رادیکال آزاد ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و ۲،′۲-آزینو-بیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-٦-سولفونیک‌اسید) (ABTS) (Thaipong *et al*., 2006) و روش تعیین درصد بی‌رنگ شدن β-کاروتن-لینولئیک اسید اشاره کرد (Zhang *et al*., 2006).

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی یا متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع پزشکی، دارویی و صنایع غذایی کاربرد وسیعی پیدا نموده‌است. علاوه بر منابع سنتی و معمول، گیاهانی که خواص آنها کمتر شناخته شده نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. همان‌طور که می‌دانیم ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان بومی و وحشی روییده در یک منطقه طبیعی به علت تماس آنها با عوامل تنش‌زای متعدد نظیر قارچ‌ها، انواع میکروارگانیسم‌ها و حمله علف‌خواران و تنش‌های محیطی شامل خشکی، شوری، وجود فلزات سنگین و آلاینده‌ها بیشتر از گیاهانی است که در شرایط کنترل شده می‌رویند (Joo *et al*., 2010؛ Pieroni *et al*., 2002). ازاین‌رو تولید ترکیب‌های دفاعی همانند آنتی‌اکسیدان‌ها در این گیاهان بیشتر از گیاهان زراعی است.

در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی چند جمعیت میخک مورد بررسی قرار گرفته‌است. جنس *Dianthus* L. با نام فارسی میخک از خانواده Caryophyllaceae با حدود ۳۰۰ گونه در مناطق مدیترانه و خاورمیانه گسترش یافته‌است (Durucasu *et al*., 2009). در ایران نیز از این جنس ٤۳ گونه شناسایی شده‌است که در آذربایجان‌شرقی و غربی، شمال، در ارتفاعات البرز، کلال بختیاری، الوند، نواحی جنوبی و شرق ایران رویش دارند (قهرمان، ۱۳۸۳؛ مظفریان، ۱۳۷۵). بعضی از گونه‌های میخک در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بر طبق پژوهش‌های انجام شده این گیاه دارای اثر ضدمیکروبی، ضددرد، ضدالتهاب، مدر و برطرف‌کننده سموم کبدی می‌باشد. همچنین در معالجه بیماریهای پوستی و دستگاه ادراری و سرطان مری نقش دارد (Durucasu *et al*., 2009). از ترکیب‌های شیمیایی شاخص جنس *Dianthus* L. می‌توان به ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی، هیدروپیران‌ها و پپتیدهای حلقوی اشاره کرد (Durucasu *et al*., 2009). براساس بررسی‌های انجام شده روی فراکشن‌های زیست فعال گونه‌های وحشی میخک اطلاعات بسیار کمی در دسترس است. تهیه و بررسی عصاره‌های اتانولی، اتیل‌استاتی،

Archive of SID

www.SID.ir

n-بوتانولی، از اندام هوایی *Dianthus superbus* L. در چین نشان داد که عصاره‌های اتانولی این گیاه از قدرت خوبی برای جاروب کردن رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل، که به‌طور طبیعی در بدن تشکیل می‌شوند، برخوردار هستند (Yu *et al.*, 2007). Durucasu و همکاران (۲۰۰۹) برای اولین بار با تهیه عصاره *n*-هگزانی که ۹۸-۹۵٪ ترکیب‌های موجود در آن را اسیدهای چرب تشکیل می‌داد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی ٤ گونه میخک را اثبات نمودند. اما تا به حال بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی میخک‌های ایران هیچ مطالعه‌ای انجام نشده‌است. بنابراین در پژوهش حاضر عصاره متانولی ٦ گونه میخک وحشی تهیه و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها با استفاده از دو روش متداول (DPPH و مهار بی‌رنگ شدن بتاکاروتن) مورد مقایسه قرار گرفته‌است. همچنین برای شناسایی نوع ترکیب‌های احتمالی که در خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مؤثرند غلظت فنل و فلاونوئید تام نیز اندازه‌گیری شد.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی

جمعیت‌های میخک از استان‌های گیلان، فارس و تهران جمع‌آوری گردید. پس از شناسایی جمعیت‌ها، یک نمونه هرباریومی در دانشگاه بوعلی‌سینا همدان (HBASU) نگهداری شد. مشخصات این جمعیت‌ها و محل پراکنش آنها در جدول ۱ نشان داده شده‌است. گیاهان جمع‌آوری شده پس از جدا کردن بخش هوایی از اندام‌های زیرزمینی در شرایط دور از نور و رطوبت (در دمای اتاق) تا رسیدن به یک وزن ثابت، خشک و تا زمان استفاده در تاریکی نگهداری شدند.

به‌منظور عصاره‌گیری از روش تغییر یافته Chen و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌گرم پودر اندام هوایی هر یک از نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ با استفاده از امواج فراصوت تولید شده توسط دستگاه Ultrasonic (مدل WUC-D10H ساخت کره) با قدرت ٤٠ kHz به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤٠°C عصاره‌گیری شد. سپس مخلوط فوق با سرعت ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ و روشناور برای سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی جدا گردید.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری به روش DPPH

در این روش از DPPH، ترکیب رادیکالی پایدار چربی‌دوست با جذب بیشینه ۵۱۷ نانومتر استفاده شد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیب‌های شیمیایی و عصاره‌های مختلف از روی میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش DPPH در متانول سنجیده می‌شود. برای سنجش میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های میخک مقدار ۳۵۰-۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها به ۳ میلی‌لیتر متانول مطلق اضافه گردید. سپس در شرایط تاریکی ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰٤ درصدی DPPH در متانول به آن اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه جذب آنها با استفاده از اسپکتروفتومتر CECILL 9900 (ساخت انگلستان) خوانده شد و در نهایت با استفاده از فرمول زیر میزان به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری شد (Akowuah *et al.*, 2005):

$$I\%=[(A_{blank}-A_{sample})/A_{blank}]\times 100$$

در این فرمول A_{blank} و A_{sample} به‌ترتیب میزان جذب نوری کنترل منفی (فاقد عصاره) و عصاره را بیان می‌کند و I% درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار IC_{50} با استفاده از نمودار خطی رسم شده، درصد بازدارندگی بر حسب mg پودر خشک گیاه در میلی‌لیتر عصاره تعیین گردید.

اندازه‌گیری به روش سیستم β-کاروتن- لینولئیک اسید

آزمون بی‌رنگ شدن β-کاروتن روش دیگری است که با استفاده از آن می‌توان به فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها پی برد. به این صورت که مواد ناشی از اکسایش لینولئیک اسید با β-کاروتن برهم‌کنش نموده و سبب کاهش رنگ مخلوط واکنش می‌شوند، در نتیجه میزان جذب در طول موج ٤۹۰ نانومتر کاهش می‌یابد. حضور ترکیب‌هایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ها باعث جلوگیری از این کاهش جذب نسبت به شاهد می‌گردد. در این روش ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۱۲۵ گرم β-کاروتن در ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم به فلاسک ته‌گردی که حاوی ۲۵ میکرولیتر لینولئیک‌اسید و ٤۰۰ میلی‌گرم توئین-٤۰ بود افزوده شد. پس از تبخیر کلروفرم توسط دستگاه تبخیر در خلأ در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع از اکسیژن برای تشکیل امولسیون به فلاسک افزوده و به شدت هم‌زده شد. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده به لوله‌های آزمایش که حاوی ۳۵۰ میکرولیتر عصاره از نمونه های مختلف و استاندارد BHT بودند اضافه و جذب آنها در زمان صفر و پس از ٤۸ ساعت نگهداری (در دمای اتاق بر روی شیکر) در طول موج ٤۹۰ نانومتر تعیین گردید. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Kartal *et al*., 2007):

$$I\% = [(A_{sample(0)}-A_{sample})/(A_{control(0)}-A_{control})] \times 100$$

I% = درصد بازدارندگی از بی رنگ شدن β-کاروتن

$A_{sample(0)}$، A_{sample} = به‌ترتیب جذب نمونه در زمان صفر و بعد از ٤۸ ساعت

$A_{control(0)}$، $A_{control}$ = به‌ترتیب جذب کنترل در زمان صفر و بعد از ٤۸ ساعت

تعیین میزان فنل تام

میزان فنل تام براساس روش رنگ‌سنجی Folin-ciocaltue با استفاده از گالیک‌اسید به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Marrinova *et al*., 2005). سپس به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاهی یا محلول‌های استاندارد (غلظت‌های $mg\ ml^{-1}$ ۰-۱۰۰ گالیک‌اسید (GAE) در آب مقطر) حدود ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو رقیق (v/v ۱:۱۵) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه، با افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول ۷٪ سدیم‌کربنات حجم مخلوط واکنش با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده و بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر تعیین و مقدار فنل تام از روی منحنی استاندارد بر حسب $mg\ GAE\ g^{-1}\ DW$ محاسبه شد.

تعیین میزان فلاونوئید تام

میزان فلاونوئید تام به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید با استفاده از کوئرستین به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Beketov *et al*., 2005). ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های mgl^{-1} ۰-۱۰۰ از کوئرستین در متانول مطلق تهیه گردید، سپس به ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره گیاهی یا محلول استاندارد ۰/۲ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید و

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید ۳۳٪ آبی افزوده و به خوبی همزده شد. در نهایت مخلوط واکنش را با اتانول ۹۰٪ به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده و لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. میزان جذب نوری آنها در طول موج ٤١٤ نانومتر خوانده و فلاونوئید تام با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب $mg\ g^{-1}\ DW$ بدست آمد.

آنالیزهای آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از سنجش‌های انجام شده در ۹ جمعیت (٦ گونه) مورد بررسی براساس روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از مشخص شدن وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p < ۰/۰۵$ گروه‌بندی و مقایسه شدند.

نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۹ جمعیت مختلف از گیاه میخک به روش DPPH در مقایسه با BHT به‌عنوان کنترل مثبت در شکل ۱ نشان داده شده‌است. در این آزمون، محلول متانولی DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها یا سایر رادیکال‌های دهنده پروتون مانند ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی واکنش داده و به شکل غیررادیکالی خود تبدیل می‌شود و در نهایت مقدار آن کاهش یافته و رنگ آن از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌شود. در نتیجه میزان جذب در طول موج ٥١٧-٥١٠ نانومتر کاهش می‌یابد. بنابراین هر چه مقدار جذب DPPH باقیمانده در نمونه‌های شکل ۱ بیشتر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در حذف رادیکال‌های آزاد کمتر می‌باشد.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جمعیت‌های مورد بررسی میخک بین ۰/۱ ± ۱۰/٤ تا ۰/۰۲ ± ۳/٦ میلی‌گرم پودر خشک در هر میلی‌لیتر عصاره ($mg\ DW\ ml^{-1}$) تغییر کرد. نتایج نشان داد که بیشترین اثرهای آنتی‌اکسیدانی مربوط به جمعیت *D. orientalis* در جیرنده بعد از زمان گلدهی با کمترین مقدار IC_{50} برابر $۳/٦۲mg\ DW\ ml^{-1}$ بود که حدود ٦ برابر فعالیت BHT به‌عنوان کنترل مثبت برآورد شد ($۰/٦٦ \pm ۰/۰۱mg\ DW\ ml^{-1}$). سپس جمعیت *D. hafezi* (از سپیدان) و *D. crinitus* (از کارزین) به‌ترتیب با مقادیر IC_{50} برابر ٤/١٦ و ٤/٣٢ میلی‌گرم پودر خشک در هر میلی‌لیتر مؤثرترین نمونه‌ها بودند (شکل ۱).

کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مورد بررسی مربوط به جمعیت فیروزآباد *D. subaphyllus* با مقدار $۱۰/۳٦mg\ DW\ ml^{-1}$ بود که نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی این جمعیت حدود ۱/۳ فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت جیرنده در زمان بعد از گلدهی است. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود مقدار IC_{50} عصاره‌های گونه *D. Crinitus* از دو محل مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان داد؛ به‌طوری‌که میزان IC_{50} جمعیت کارزین تقریباً نصف IC_{50} جمعیت فیروزآباد بود (به‌ترتیب با ۹/۵۲ و ٤/٣٢ $mg\ DW\ ml^{-1}$) و میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی دو جمعیت *D. subaphyllus* نیز تفاوت معنی‌داری داشتند؛ IC_{50} جمعیت فیروزآباد حدود ۳/۵ میلی‌گرم بیشتر از IC_{50} جمعیت استهبان بود، درنتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری را نشان داد.

در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون مهار بی‌رنگ شدن β-کاروتن، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Archive of SID

www.SID.ir

۹ جمعیت میخک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی BHT به‌عنوان کنترل مثبت مقایسه شدند که در شکل ۱ نشان داده شده‌است. نتایج بدست‌آمده مشخص کرد که بیشترین درصد سفیدشدگی β- کاروتن مربوط به جمعیت‌های کارزین و فیروزآباد *D. crinitus* با قدرت روبش‌گری حدود ٤٥٪ و جمعیت فیروزآباد *D. subaphyllus* نزدیک ٤٣٪ بود. جمعیت‌های استهبان *D. subaphyllus* و سپیدان *D. hafezi* به‌ترتیب با مقادیر ۳۳/۰٦٪ و ۳۱/۵۷٪ درصد بعد از جمعیت‌های ذکر شده دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش سنجش فوق بودند. همچنین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده در جمعیت جیرنده *D. orientalis* در دو زمان متفاوت یعنی قبل و بعد از گلدهی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به‌طوری که کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش فوق در *D. orientalis* جمعیت‌های جیرنده بعد از گلدهی (۱۸٪) و لواسان بزرگ (۱۵/۳۷٪) مشاهده گردید (شکل ۱).

مقایسه محتوای فنل تام در جمعیت‌های مطالعه شده در شکل ۲ آورده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین محتوای فنل تام متعلق به نمونه‌های *D. subaphillus* جمع‌آوری شده از استهبان با مقدار $DW\ mg\ g^{-1}$ ۰/۰٦ ± ۱۰/۰۲ بود. بعد از آن جمعیت *D. orientalis* لواسان بزرگ و *D. austrairanicus* استهبان دارای بیشترین مقدار فنل تام بودند (به‌ترتیب با محتوای فنل ۰/۲٤ ± ۸/٤ و ۰/۱۸ ± ۸/۳ $DW\ mg\ g^{-1}$). محتوای فنل تام جمعیت *D. orientalis* جیرنده در شرایط بعد از گلدهی و جمعیت *D. crinitus* فیروزآباد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به‌نحوی که کمترین محتوای فنل تام مربوط به جمعیت جیرنده در شرایط قبل از گلدهی بود.

بنابراین بررسی محتوای فلاونوئید تام جمعیت‌های مورد بررسی میخک با مقدار فنل تام آنها همخوانی نداشت (شکل ۲). به‌طوری که بیشترین محتوای فلاونوئید تام در اندام هوایی جمعیت‌های *D. orientalis* لواسان و جیرنده (قبل و بعد از گلدهی) به میزان بیش از $DW\ mg\ g^{-1}$ ۲ مشاهده شد. در حالی‌که کمترین محتوای فلاونوئید تام در دو جمعیت *D. hafezi* و *D. austrairanicus* دیده شد که تفاوت معنی‌داری را با بقیه جمعیت‌های دیگر نشان دادند.

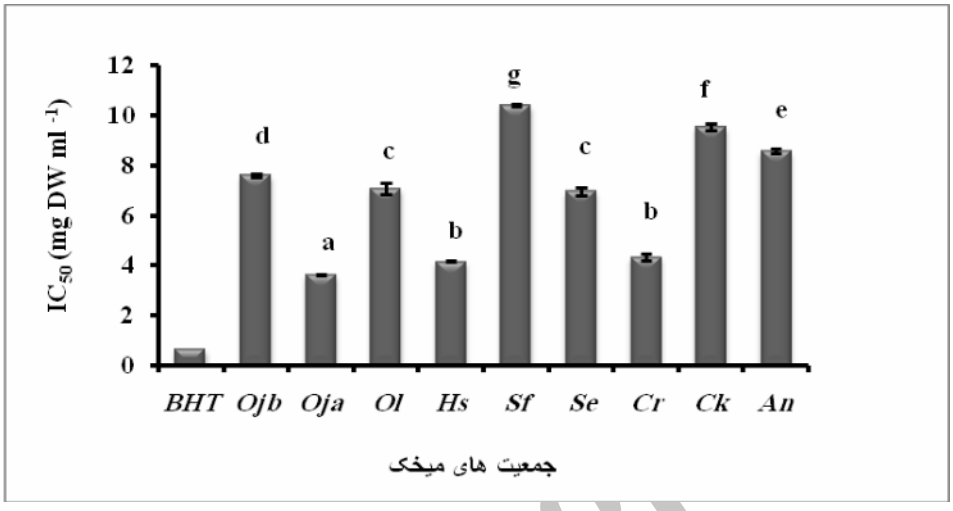
در شکل ۳ رابطه همبستگی بین محتوای فنل و فلاونوئید تام گونه‌های مختلف میخک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی سنجیده شده طبق روش مهار رادیکال‌های DPPH و روش بازدارندگی بی‌رنگ شدن β-کاروتن نشان داده شده‌است. گروه‌بندی جمعیت‌ها براساس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه سطح کم، متوسط و زیاد با توجه به محتوای فنل و فلاونوئید تام آنها انجام شده‌است. همان‌طور که در شکل ۳A و ۳B مشاهده می‌شود جمعیت‌های *D. orientalis* جیرنده بعد از گلدهی و *D. crinitus* ریکان و *D. hafezi* استهبان دارای محتوای فنل و فلاونوئید تام بالایی هستند و احتمالاً خاصیت آنتی‌اکسیدانی زیاد آنها به علت وجود ترکیب‌های فوق می‌باشد. اما با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی پایین جمعیت *D. orientalis* در لواسان و با وجود داشتن محتوای فنل تام بالا، به نظر می‌رسد رابطه‌ای بین این دو عامل وجود نداشته باشد.

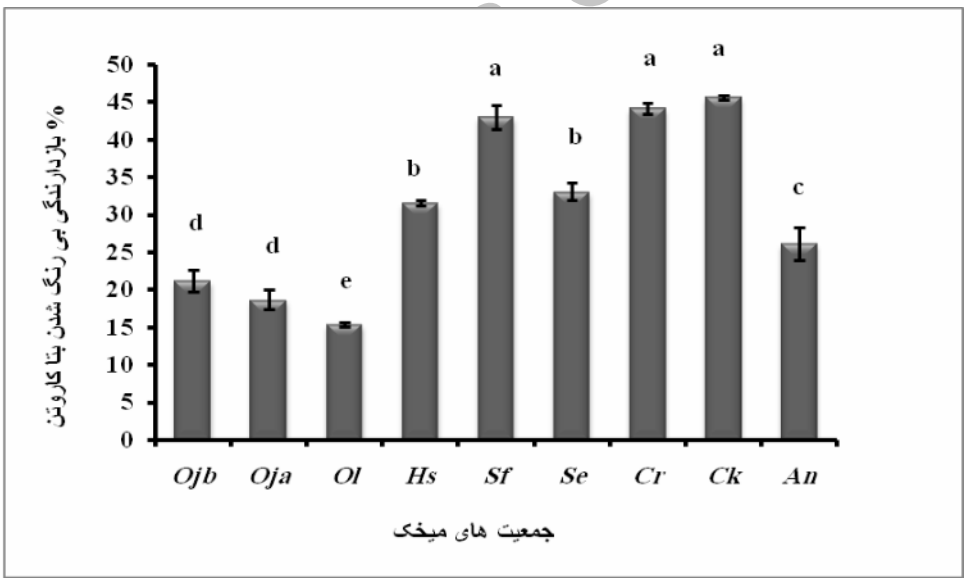
شکل‌های ۳C و ۳D نشان می‌دهند که جمعیت‌های *D. crinitus* ریکان و کارزین و همچنین *D. subaphyllus* فیروزآباد با داشتن محتوای فنل و فلاونوئید تام متوسط نسبت به سایر جمعیت‌ها با روش β-کاروتن فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی را نشان دادند که معرف تأثیر کمتر این

Archive of SID

www.SID.ir

مواد در رابطه با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد می‌باشد. احتمالاً ترکیب های غیرقطبی دیگری نظیر ترپنوئیدها در بی‌رنگ شدن بتاکاروتن دخالت دارند. البته جمعیت های *D. subaphyllus* استهبان و *D. austrairanicus* با وجود فنل تام بالا و جمعیت‌های *D. orientalis* با داشتن محتوای فلاونوئید تام بالا همبستگی منفی را با روش β-کاروتن آشکار ساختند.

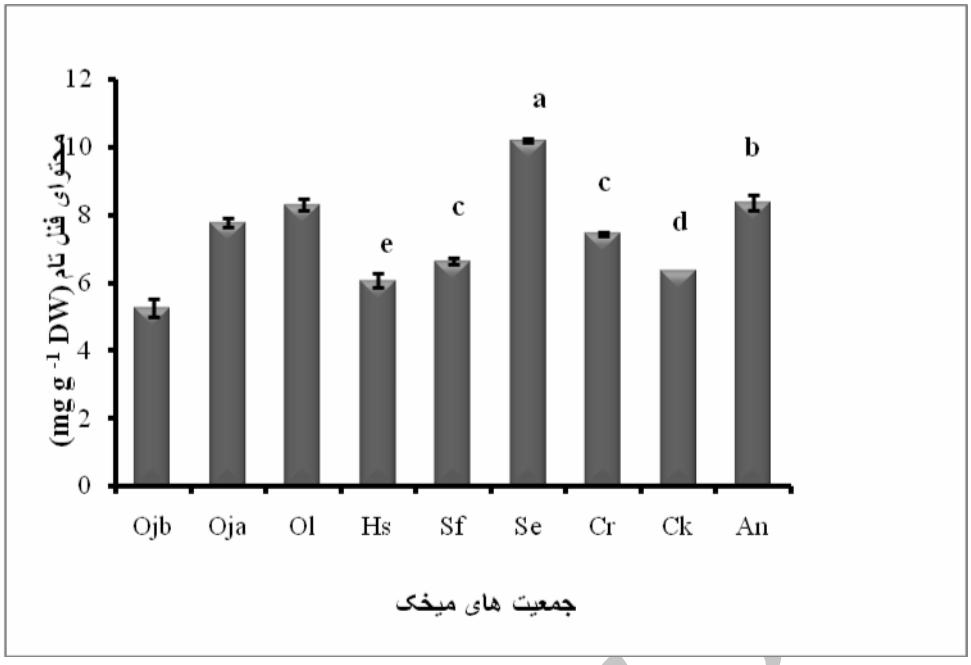


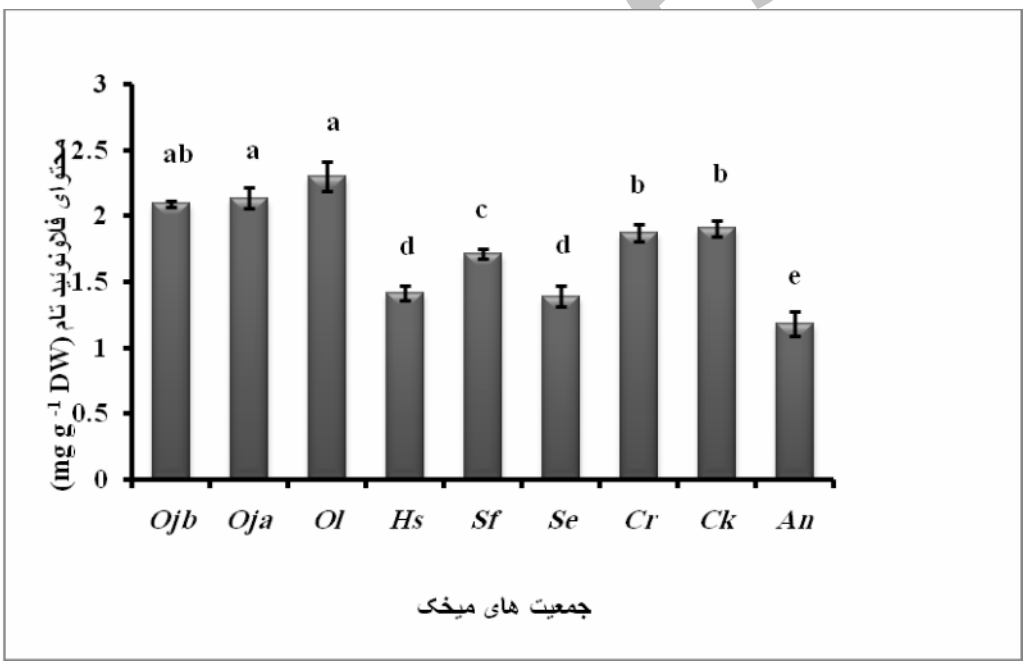


شکل ۱- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف میخک به روش به دام‌اندازی رادیکال‌های DPPH (بالا) و مهار بی‌رنگ‌شدگی در سیستم β-کاروتن- لینولئیک اسید (پایین)

علائم اختصاری در جدول ۱ توضیح داده شده‌است. میانگین‌ها حاصل سه تکرار در هر یک از نمونه‌های آزمایش شده می‌باشد. حروف مشابه عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها را با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $p < 0.05$ نشان می‌دهد.

www.SID.ir

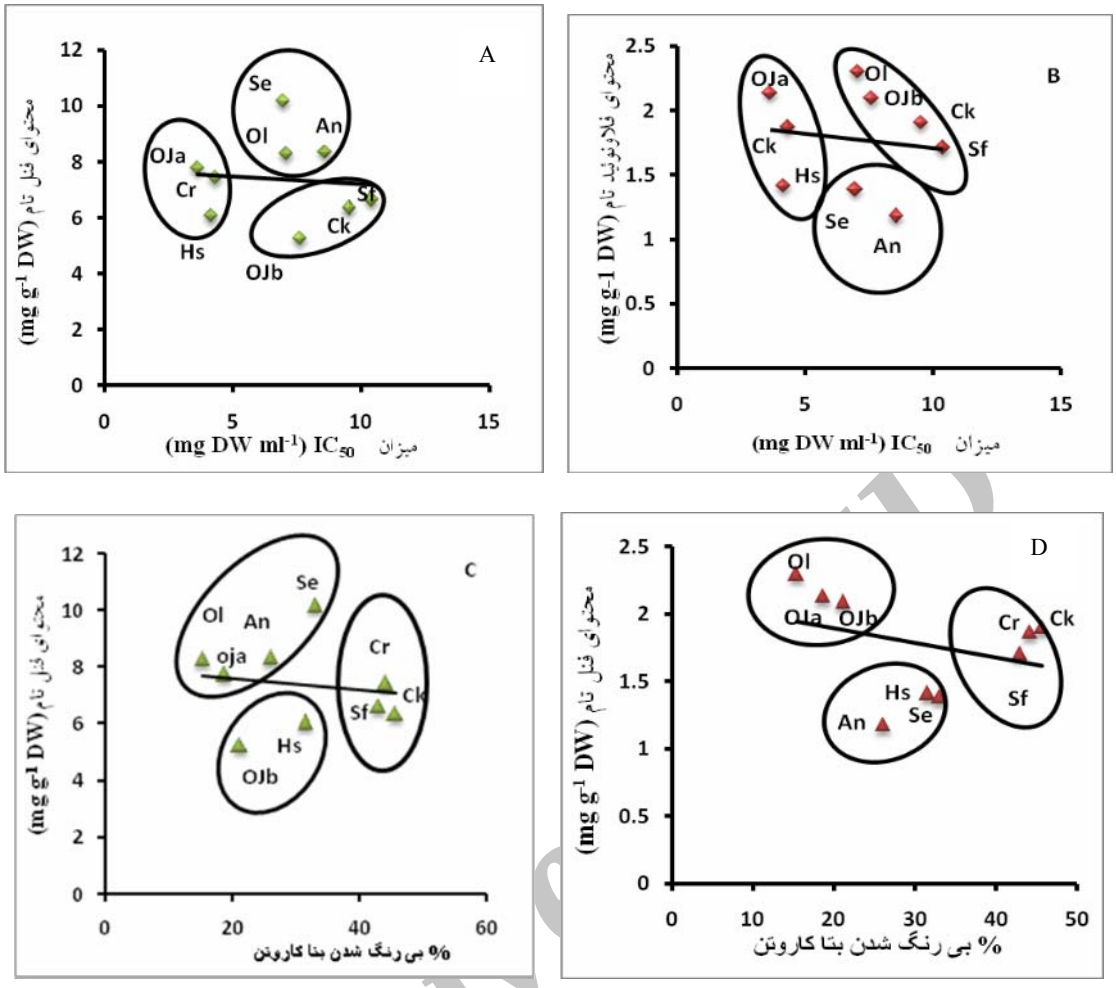




شکل ۲- مقایسه محتوای فنل و فلاونوئید تام در اندام هوایی جمعیت‌های بررسی شده میخک

(علائم اختصاری در جدول ۱ توضیح داده شده‌است).

www.SID.ir



شکل ۳- همبستگی بین ظرفیت جاروب کردن رادیکال‌های DPPH (IC_{50} value) و مهار بی‌رنگ شدن β-کاروتن با محتوای فنل و فلاونوئید تام گونه‌های مورد بررسی میخک

مقدار IC_{50} value بر حسب mg DW ml^{-1} محاسبه شده‌است.

بحث

هر گیاه دارای ترکیب‌های شیمیایی گوناگونی است که مقایسه آنها را از نظر بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پیچیده می‌سازد. به همین علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی ۹ جمعیت میخک با ۲ آزمون مورد بررسی قرار گرفت. سنجش با DPPH می‌تواند خاصیت آب‌دوستی یا آب‌گریزی مواد آنتی‌اکسیدانی را پیش‌بینی کند، در حالی‌که درصد سفیدکنندگی β-کاروتن به قطبیت مواد موجود در عصاره‌ها بستگی دارد (Bouhdid *et al.*, 2008). نتایج بین دو روش آزمون سنجش آنتی‌اکسیدان‌ها تفاوت‌های معنی‌داری را نشان داد که حکایت از تفاوت ترکیب شیمیایی عصاره حاصل از اندام‌های هوایی این جمعیت‌های میخک داشت.

Archive

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات هرباریومی نمونه‌های جمع‌آوری شده تعدادی از جمعیت‌های میخک‌های وحشی در ایران

گونه	علامت اختصاری	محل جمع‌آوری	جمع‌آوری‌کننده	ارتفاع (متر)	تاریخ جمع‌آوری	شماره هرباریومی
D. orientalis subsp. *gilanicus* Rech.f	Ojb	گیلان، رودبار، جیرنده	شهریار دادمهر	۱۸۰۰	۱۳۸۹/٤/٤	BASU ۲۳۷۱۰
D. orientalis subsp. *gilanicus* Rech.f.	Oja	گیلان، رودبار، جیرنده	شهریار دادمهر	۱۸۰۰	۱۳۸۹/٤/۲۷	BASU ۲۳۷۱۰
D. orientalis subsp.*stenaalyx* Rech.f.	Ol	تهران، لواسان بزرگ	خدیجه دادمهر	۲۱۸٦	۱۳۸۹/٤/۱۹	BASU ۲۳۷۰۹
D. hafezi	Hs	فارس، سپیدان به نورآباد	مسعود رنجبر	۱۸۸۲	۱۳۸۹/۱/۱۸	BASU ۲۲٦۹٦
D. subaphyllus Rech.f.	Sf	فارس، ۲۰ کیلومتری بعد از فیروزآباد	مسعود رنجبر	-	-	-
D. subaphyllus Rech.f.	Se	فارس، استهبان به کرمان ۱۵ کیلومتر به نیریز	مسعود رنجبر	۱٦۳۰	۱۳۸۹/۱/۲۰	BASU ۲۲۷۱۸
D. crinitus subsp. *Kermanensis* Rech.f.	Cr	فارس، فیروزآباد بعد از روستای ریکان	مسعود رنجبر	۱۱٤٥	۱۳۸۹/۱/۱۹	BASU ۲۲۲٥۰
D. crinitus subsp. *kermanensis* Rech.f.	Ck	فارس، ۱۵ کیلومتری قیر و کارزین (مسیر فیروزآباد)	مسعود رنجبر	۱۰٤۰	۱۳۸۹/۱/۱۹	BASU ۲۲۲٥۸
D. austrairanicus	An	فارس، استهبان به کرمان ۲۰ کیلومتر به نیریز	مسعود رنجبر	۱۸٤۰	۱۳۸۹/۱/۲۰	BASU ۲۲۲٦۲

به‌عنوان مثال هر دو جمعیت *D. crinitus* و جمعیت *D. subaphillus* فیروزآباد با آزمون β-کاروتن بالاترین درصد مهارکنندگی را نشان دادند، اما در روش DPPH فقط جمعیت *D. crinitus* روستای ریکان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشت و دو جمعیت دیگر بعکس روش قبلی حداقل فعالیت را در بین میخک‌های وحشی آشکار ساختند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره جمعیت *D. crinitus* روستای ریکان حاوی هر دو گروه ترکیب‌های آب‌دوست و ترکیب‌های غیرقطبی آنتی‌اکسیدانی است، در حالی‌که به نظر می‌رسد آنتی‌اکسیدان‌های دو جمعیت اخیر از مواد شیمیایی آب‌گریز تشکیل شده باشد. مشابه همین وضعیت در عصاره *D. subaphillus* استهبان هم دیده شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای *Thymus daenensis* به علت وجود ترکیب‌های ترپنوئیدی و پلی‌فنلی آن است (Alavi *et al.*, 2010). در گونه‌های میخک نیز حضور مواد آب‌گریزی مانند تری‌ترپنوئیدها، هیدروپیران‌ها و پپتیدهای حلقوی اثبات شده‌است (Durucasu *et al.*, 2009). وجود هیدروژن در گروه‌های بنزوئیلی و/یا آلیلی در ترپنوئیدها و استروئیدها باعث فعالیت بهتر این ترکیب‌ها در آزمون β-کاروتن می‌شود. زیرا آنها به راحتی اتم هیدروژن را از این گروه‌ها جدا کرده و به رادیکال‌های پراکسی تشکیل شده در آزمون β-کاروتن می‌دهند (Larson, 1997).

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین در هر یک از آزمون‌های مورد بررسی وجود تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای از نظر محتوای مواد آنتی‌اکسیدانی مشخص بود که تأثیر محل رویش را در گونه‌های میخک *subaphillus*، *orientalis* و *crinitus* و زمان جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی را در گونه *D. orientalis* در جیرنده یادآوری می‌نماید. بنابراین به نظر می‌رسد با تغییر زمان نمونه‌برداری از جمعیت *D. orientalis*، نوع آنتی‌اکسیدان‌های آب‌دوست اندام هوایی آن در مرحله بعد از گلدهی به‌طور شاخص افزایش می‌یابد اما تغییر محسوسی در میزان آنتی‌اکسیدان‌های آب‌گریز آن مشاهده نشد. افزایش معنی‌دار مقدار فنل تام سنجیده شده در نمونه‌های فوق این مسئله را تأیید می‌نماید.

البته وجود تفاوت‌های بین گونه‌ای مشاهده شده در نتایج ما با تحقیقات Durucasu و همکاران (۲۰۰۹) همخوانی داشت. آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هگزانی ٤ گونه میخک به نام‌های *eleganc*، *erinaceu*، *lydus* و *zonathus* را که از کشور ترکیه جمع‌آوری شده بودند به روش DPPH بررسی کردند. مقادیر IC_{50} عصاره‌های مورد مطالعه به‌ترتیب در این گونه‌ها برابر با ۱/۹۳، ۱۷/۱٤، ۳/۲۹ و ۱۲ میلی‌گرم ماده خشک بر میلی‌لیتر عصاره بود. در مقایسه با نمونه‌های بررسی شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد سطح خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه *D. lydus* مشابه *D. orientalis* جمع‌آوری شده از جیرنده بعد از گلدهی و جمعیت سپیدان *D. hafezi* است و سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی *D. zonathus* بیشتر شبیه جمعیت فیروزآباد گونه *subaphillus* و جمعیت کارزین *crinitus* بود. تحقیقات بیشتر می‌تواند روشن نماید که این تشابه مربوط به وجود ترکیب‌های شیمیایی مشابه است یا مواد دیگری مؤثر هستند. متانول ۸۰٪ به‌عنوان یک حلال عمومی با قدرت جداسازی مناسب برای تعداد زیادی از ترکیب‌های شیمیایی شناخته شده‌است، بنابراین احتمال دارد که عصاره‌های متانولی تهیه شده از اندام‌های هوایی میخک در این پژوهش حاوی اسیدهای چربی باشد که در عصاره n-هگزانی آماده شده توسط گروه Durucasu و همکاران (۲۰۰۹) نیز موجود بوده‌است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی یکی دیگر از اعضای خانواده Caryophyllaceae به نام *Saponaria officinalis* به روش β-کاروتن حدود ۷۰٪ گزارش شده‌است (Sengul *et al.*, 2011) که فعالیت آن نسبت به جمعیت‌های *D. crinitus* حدود ۱/۵ برابر بیشتر بود (جمعیت اخیر دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بین نمونه‌های مورد بررسی بود). گیاه *S. officinalis* از نمونه‌های شاخص با محتوای ساپونین بالا در تیره میخک می‌باشد که ساپونین‌های آن از گروه تری‌ترپنوئیدها و دارای ماهیتی غیرقطبی است، به همین علت با روش β-کاروتن فعالیت زیادی نشان می‌دهد (Sengul *et al.*, 2011). در مورد محتوای ساپونین سایر جنس‌ها و گونه‌های دیگر این تیره اطلاعات کمی در دسترس است.

در برخی گیاهان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است به علت وجود ترکیب‌های ناشناخته یا برهم‌کنش‌های سینرژیک (همیاری) بین مواد مختلف باشد. علاوه بر ساپونین‌ها، فنل‌ها و فلاونوئیدها نیز از آنتی‌اکسیدان‌های مشهور گیاهی هستند. هر گیاه دارای طیف وسیعی از ترکیب‌های فنلی متفاوت است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر کدام از این مواد وابسته به ساختار شیمیایی آنها می‌باشد. به‌عنوان‌مثال فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل استخلاف شده روی

Archive of SID

www.SID.ir

حلقه B، به‌ویژه روی کربن موقعیت ′۳ یا یک استخلاف هیدروکسی منفرد افزایش می‌یابد (Rajalakshmi & Narasimhan, 1996). در پژوهش حاضر عصاره‌گیری مواد گیاهی با متانول صورت گرفت، زیرا استفاده از حلال‌هایی نظیر اتانول و متانول برای عصاره‌گیری *Dianthus superbus* نسبت به کاربرد اتیل‌استات و *n*–بوتانل قدرت بیشتری برای استخراج ترکیب‌های فنلی نشان داد و عصاره‌های فوق قدرت احیاکنندگی بالاتری داشتند (Yu *et al*., 2007). این پژوهشگران معتقد بودند که فعالیت آنتی‌اکسیداتیو گیاه ممکن است با قدرت احیاکنندگی و محتوای فنلی آن رابطه مستقیم داشته باشد. تحقیقات آنها قدرت سمّیت بیشتر عصاره‌های ذکر شده این گونه میخک را بر روی ۳ نژاد سلول‌های سرطانی و استفاده از آنها را برای درمان برخی بیماریها تأیید نمود.

آنتی‌اکسیدان‌ها براساس عملکردشان به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: آنتی‌اکسیدان‌های اولیه و ثانویه (Madhavi *et al*., 1995). آنتی‌اکسیدان‌های اولیه الکترون یا هیدروژن خود را به رادیکال‌های آزاد می‌دهند در حالی‌که آنتی‌اکسیدان‌های ثانوی به‌عنوان همیار عمل می‌کنند، یعنی از طریق دادن هیدروژن و بازیابی آنتی‌اکسیدان اولیه و یا جاروب‌کننده‌های اکسیژن و عوامل کلاته‌کننده نقش خود را ایفا می‌نمایند (Gordon, 1990). فنل‌ها و فلاونوئیدها معمولاً به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Pietta, 2000؛ Prakash *et al*., 2007). گروه‌های OH فنلی از ارجح‌ترین گروه‌ها برای از دست دادن پروتون از اشکال اکسید شده تک الکترونی هستند. پایداری رادیکال‌های فنوکسیل منتج از آنها باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی بیشتر ترکیب‌های دارای گروه‌های هیدروکسیل متعدد برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسید شده می‌گردد، همچنین از تشکیل رادیکال‌های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری بعمل می‌آورد (Alavi *et al*., 2010).

محتوای فنل و فلاونوئیدی دو جمعیت گونه‌ی *D. crinitus* تفاوت محسوسی را نشان نداد، در حالی‌که تفاوت فعالیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در آنها کاملاً واضح و در سطح $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار بود. این پدیده نشان می‌دهد که وجود ترکیب‌های دیگری غیر از این دو گروه از مواد به‌ویژه فلاونوئیدها در ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های فوق مشارکت دارند. از طرف دیگر تفاوت فعالیت سنجیده شده در این نمونه‌ها به روش β–کاروتن معنی‌دار نبود که اهمیت تغییر مقادیر کمّی ترکیب‌های آب‌دوست را تأیید می‌نماید. همین مسئله در نمونه‌های *D. orientalis* جیرنده هم تکرار شده‌است. مقایسه محتوای ترکیب‌های فنلی این جمعیت در دو زمان مختلف هماهنگ با تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنهاست و همبستگی مثبتی را بین این دو عامل نشان می‌دهد. محتوای فنل تام این جمعیت بعد از گلدهی به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به دوره قبل از گلدهی افزایش یافته بود. این افزایش در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش جاروب DPPH به خوبی منعکس شده بود، به‌نحوی که با افزایش مختصر فنل تام میزان IC_{50} آن به نحو قابل توجهی کاسته شد و به نصف رسید. محتوای فنل و فلاونوئید تام دو جمعیت *D. subaphyllus* نیز تفاوت معنی‌داری را نشان داد و این تفاوت در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو جمعیت با هر دو روش نمایان بود و همبستگی مثبتی بین مقدار فنل تام اندام هوایی این گونه و قدرت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

آزاد DPPH دیده شد. البته احتمال داده می‌شود که فنل‌ها بخشی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی این گونه را تشکیل دهند.

محتوای فنل و فلاونوئید تام بدست‌آمده از عصاره‌های آبی گیاه *D. superbus* در بررسی انجام شده توسط Gou و همکاران (۲۰۱۱) به‌ترتیب ۲٤ mg GAE g^{-1} و ۳ mg RE g^{-1} گزارش شد. در نتایج ما میزان فنل و فلاونوئید تام نصف یا کمتر از میزان گزارش شده در گیاه *D. superbus* بود. تنها در گونه‌ی *D. orientalis* محتوای فلاونوئید تام اندام هوایی بیشتر از ۲ DW mg g^{-1} بدست آمده بود. کاهش محتوای فنل و فلاونوئید مشاهده شده در گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش ممکن است مربوط به تفاوت روش عصاره‌گیری و حلال‌های مورد استفاده در روش Gou و همکاران (۲۰۱۱) باشد که از طریق تأثیر نوع حلال بر روی نوع ترکیب‌های استخراج شده می‌تواند غلظت رادیکال‌های آزاد را در سنجش DPPH تغییر دهد (Litwinienkol & Engold, 2007).

بعکس، همبستگی مثبتی که بین محتوای فنل تام و مقدار IC_{50} برخی جمعیت‌ها مشاهده شده بود، در گونه *D. hafezi* محتوای پایین فنل و فلاونوئید آن باعث کاهش مقدار IC_{50} و افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نشد. بنابراین به علت پیچیدگی ترکیب‌های موجود در گیاهان ایجاد یک رابطه بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های گیاهی خاص دشوار است (Zheng & Wang, 2001). به‌طوری که در گونه اخیر نیز به نظر می‌رسد مجموعه‌ای از مواد قطبی و غیرقطبی در ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند. البته تحقیقات بیشتر که متضمن شناسایی اجزا مواد شیمیایی موجود در عصاره این گیاه است به تشخیص ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی کمک مؤثری خواهد نمود.

منابع مورد استفاده

- تجلی، ف.، همتی کاخکی، ع.، خاتمی‌راد، م. و گازارانی، س.، ۱۳۸۸. تعیین میزان خواص آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران به دو روش DPPH و سیستم مدل اسید لینولئیک. هجدهمین کنگره ملی علوم صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ۲۵-۲٤ مهر: ۵-۱.
- عیوقی، ف.، برزگر بفرویی، م.، سحری، م.ع. و نقدی‌بادی، ح.، ۱۳۸۸. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس شوید (*Anethum graveolens*) در روغن سویا و مقایسه‌ی آن با آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی. گیاهان دارویی، ۹(۳۰): ۸۳-۷۱.
- قهرمان، ا.، ۱۳۸۳. کروموفیتهای ایران (جلد ۱). مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۷۳٦ صفحه.
- کامکار، ا.، ۱۳۸۸. مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شوید ایرانی. افق دانش، ۱۵(۲): ۱۷-۱۱.
- مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۷۵۰ صفحه.
- Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I. and Sadikun, A., 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chemistry, 93(2): 311-317.
- Alavi, L., Barzegar, M., Jabbari, A. and Naghdi Badi, H., 2010. Effect of heat treatment on chemical composition and antioxidant property of *Thymus daenensis* essential oil. Journal of Medicinal Plants, 9(35): 129-138.
- Beketov, E.V., Pakhomov, V.P. and Nesterova, O.V., 2005. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. Pharmaceutical Chemistry Journal, 39(6): 316-318.
- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M. and Abrini, J., 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. African Journal of Biotechnology, 7(10): 1563-1570.
- Chen, Y., Xie, M.Y. and Gong, X.F., 2007. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering, 81: 162-170.

Archive of SID
www.SID.ir

antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. Phytotherapy Research, 16(5): 467-473.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7): 1035-1042.
- Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh, B.N., 2007. Total phenol, antioxidant, and free radical scavenging activities of some medicinal plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 58: 18-28.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S., 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation: 65-83. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K., (Eds.). Food Antioxidants-Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc., New York, 512p.
- Sengul, M., Ercisli, S., Yildiz, H., Gungor, N., Kavaz, A. and Çetin, B., 2011. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10(1): 49-56.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Zevallosc, L. C. and Byrne, D. H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 19(6-7): 669-675.
- Yu, J.O., Liao, Z.X., Lei, J.C. and Hu, X. ., 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of various fractions of ethanol extract of *Dianthus superbus*. Food Chemistry, 104(3): 1215-1219.
- Zheng, W. and Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(11): 5165-5170.
- Zhang, H., Chen, F., Wang, X. and Yao, H.Y., 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. Food Research International, 39(8): 833-839.
- Durucasu, I., Mutlu, K., Sik, L., Yasa, I., Arda, N. and Kirmizigul, S., 2009. Apolar constituents of some biologically active *Dianthus* species from western Anatolia. Chemistry of Natural Compounds, 45(6): 782-785.
- Gordon, M.H., 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro: 1-18. In: Hudson, B.J.F., (Ed.). Food Antioxidant (Elsevier Applied Science). New York, NY, USA, 329p.
- Gou, J., Zou, Y. and Ahn, J., 2011. Enhancement of antioxidant and antimicrobial activities of *Dianthus superbus*, *Polygonum aviculare*, *Sophora flavescens*, and *Lygodium japonicum* by pressure-assisted water extraction. Food Science and Biotechnology, 20(1): 283-287.
- Joo, S.S., Kim, Y.B. and Lee, D.I., 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of secondary metabolites from white rose flower. The Plant Pathology Journal, 26(1): 57-62.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2): 584-589.
- Larson, R.A., 1997. Naturally Occurring Antioxidants. CRC Press, Lewis Publishers, 195p.
- Litwinienko, G. and Ingold, K.U., 2007. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. Accounts of Chemical Research, 40(3): 222-230.
- Madhavi, D. L., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R., 1995. Technological aspects of food antioxidants: 158-266. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K., (Eds.). Food Antioxidants-Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc., New York, 512p.
- Marinova, D., Ribarov, F. and Atanassova, M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bolgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40(3): 255-260.
- Pieroni, A., Janiak, V., Dürr, C.M., Lüdeke, S., Trachsel, E. and Heinrich, M., 2002. In vitro

Archive of SID

www.SID.ir

Total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts in six Iranian species of wild *Dianthus* L.

A. Saboora[1*], Kh. Dadmehr[2] and M. Ranjbar[3]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, University of Alzahra, Tehran, Iran
E-mail: azrasaboora1034@gmail.com
2- Department of Biology, Faculty of Science, University of Alzahra, Tehran, Iran
3- Department of Biology, Faculty of Science, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

Received: July 2011 Revised: November 2011 Accepted: December 2011

Abstract

Methanolic extracts (80%) were prepared from dried powder of leaves and stems of 9 different populations of six *Dianthus* L. species in Iran. Then, phenolic and flavonoid contents were measured by Foline-ciocalteu and Aluminum chloride methods, respectively. Antioxidant activity was investigated using two complimentary *in vitro* assays: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay and β-carotene bleaching assay and then data were compared with BHT as the standard. Results showed that there were significant differences between means of phenol and flavonoid contents and antioxidant activity of the species by the both methods ($p<0.01$). Also, the results revealed that changes in climate, altitude and genetic pools had a significant effect on the phenol and flavonoid contents and antioxidant properties of the extracts at genus level, but the content of the flavonoids was not changed noticeably within species level.

Key words: antioxidant activity, carnation, *Dianthus* L., flavonoid and phenolic content.

Archive of SID

www.SID.ir