Original Article

Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction

Seyedalipour B[1*], Hasani A[2], Ebrahimzadeh MA[3], Taravati A[1]

1- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I. R. Iran.
2- Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Sanandaj, I. R. Iran.
3- Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I. R. Iran.

Received August 30, 2015; Accepted May 28, 2016

Abstract:

Background: The genus *Ballota* L. (BL) belongs to the Labiateae family spread throughout the world. Plants of this genus possess anti oxidant, anti cancer, anti microbial and anti inflammatory properties. This study aimed to investigate the antioxidant activities of extract taken from aerial parts of *Ballota platyloma* Rech. f. using percolation, ultrasonic and polyphenol fraction methods.

Materials and Methods: In this experimental study, aerial parts of *Ballota platyloma* were collected from Veresk (Mazandaran, Iran). Dried aerial parts of *Ballota platyloma* were extracted by percolation, ultrasonic and polyphenol fraction. The antioxidant activity of extracts was investigated using different methods: 1, 1-diphenyl- 2-picryl hydrazyl (DPPH), iron ion chelating activity and reducing power. Data were analyzed using ANOVA and Duncan test at a significant level of $P<0.05$.

Results: The total phenolic and total flavonoid contents were in order of polyphenol> ultrasonic > percolation, respectively. The IC_{50} for polyphenol, percolation and ultrasonic extracts in DPPH radical-scavenging activity were 7.52±1.07, 6.64±0.87 and 2.58±0.06, respectively. The IC_{50} for iron chelating ability were in order of polyphenol < ultrasonic < percolation. Polyphenol fraction showed better reducing power than the ultrasonic and percolation extracts ($P<0.001$) which was comparable to that of Vitamin C ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that polyphenol fraction was rich in total phenolic and total flavonoid contents. Polyphenol fraction showed the best activity in reducing power but ultrasonic extracts was the most potent one in DPPH radical-scavenging activity. Thus, antioxidant activity may be attributed to the presence of phenols and flavonoids in the extracts.

Keywords: Antioxidant activity, *Ballota platyloma*, Flavoniods, Ultrasonic method, Polyphenol fraction

* **Corresponding Author.**
Email: b.alipour81@gmail.com
Tel: 0098 11 353 02450
Fax: 0098 11 353 02450

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2016; Vol. 20, No 2, Pages 147-156

Please cite this article as: Seyedalipour B, Hasani A, Ebrahimzadeh MA, Taravati A. Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. ***Feyz*** 2016; 20(2): 147-56.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوی فنول و فلاونوئید تام عصاره‌های بخش هوای گیاه فراسیون آسای کجوری (*Ballota platyloma* Rech.f.) با سه روش التراسونیک، پلی-فنولیک و پرکولاسیون

باقر سیدعلی‌پور [1*]، علی حسنی [2]، محمدعلی ابراهیم‌زاده [3]، علی طراوتی [1]

خلاصه:

سابقه و هدف: جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به خانواده نعناعیان (Labiatae) است که در سراسر جهان پراکنده می‌باشد. گیاهان این جنس خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد التهابی از خود نشان می‌دهند. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره قسمت هوایی گیاه *Ballota platyloma* با استفاده از روش‌های التراسونیک، پلی‌فنولیک و پرکولاسیون انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی قسمت‌های هوایی گیاه از منطقه ورسک استان مازندران جمع‌آوری شد. عصاره گیری با روش‌های التراسونیک، پلی‌فنولیک و پرکولاسیون انجام گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل، قدرت احیاکنندگی و میزان شلات‌کنندگی یون آهن مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: محتوی فنول و فلاونوئید تام به‌ترتیب بدین صورت بود: پلی‌فنول > التراسونیک > پرکولاسیون. میزان IC_{50} برای به‌دام اندازی رادیکال DPPH با سه روش پلی‌فنولی، پرکولاسیون و التراسونیک به‌ترتیب ۷/۰۱±۰۷/۵۲، ۸۷/۰±۶۴/۶ و ۰۶/۰±۵۸/۲ به‌دست آمد. میزان IC_{50} برای شلات‌کنندگی یون آهن نیز به‌صورت زیر بود: پلی فنول< التراسونیک< پرکولاسیون. عصاره پلی‌فنولیک قدرت احیاءکنندگی بیشتری نسبت به عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون ($P<0/001$) در مقایسه با ویتامین C نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج فراکشن پلی‌فنولیک بالاترین مقدار پلی‌فنول و فلاونوئید تام را نشان داد. فراکشن پلی‌فنولیک بیشترین قدرت احیاءکنندگی و التراسونیک بیشترین فعالیت به‌دام اندازی رادیکال DPPH را نشان داد. بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به‌حضور فنول‌ها و فلاونوئیدها در عصاره‌ها نسبت داد.

واژگان کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدان، *Ballota platyloma*، محتوی فلاونوئید، عصاره التراسونیک، عصاره پلی‌فنولیک

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۵، صفحات ۱۵۶-۱۴۷

مقدمه

امروزه موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و اثرات آن بر سیستم‌های بیولوژیک یکی از مباحث مهم و مطرح در دانش پزشکی می‌باشد. رادیکال‌های آزاد ترکیبات مضری هستند که موجب تغییر در سلول‌های بدن، آسیب به هسته سلول‌ها و در نهایت مرگ آنها می‌شوند [۱]. این ترکیبات به‌صورت طبیعی در بدن تولید می‌شوند و در اثر مواجهه با سموم محیطی میزان آن‌ها افزایش می‌یابد.

[1] استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

[2] کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، سنندج، ایران

[3] دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

***نشانی نویسنده مسئول:**

دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی

تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰ **دورنویس:** ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۰

پست الکترونیک: b.alipour81@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۳/۸

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و از حملات اکسیداتیو آنها جلوگیری می‌کنند و با غیرفعال کردن آنها سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگه می‌دارند [۲]. مکانیزم اثر این آنتی‌اکسیدان‌ها به‌این‌ترتیب است که با دادن اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند؛ لذا، کارائی و درجه تأثیر یک آنتی‌اکسیدان به سهولت جدا شدن اتم هیدروژن از آن مربوط می‌شود. بدیهی است که رادیکال آزاد به‌جا مانده از آنتی‌اکسیدان پس از دادن هیدروژن باید حتی‌الامکان خود سبب تولید رادیکال اسید چرب و آغاز اکسیداسیون نشود و در ضمن به‌سرعت توسط اکسیژن اکسید نگردد [۳]. در میان آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنولی از همه مؤثرتر می‌باشند؛ این ترکیبات به‌خوبی اتم هیدروژن را اهداء می‌کنند. هم‌چنین، حدواسط رادیکالی آنها به‌واسطه رزونانس پایدار است [۴]. امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار رواج یافته است [۵]. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمیت و اثرات سوء مواد غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را تأ ئید می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

به‌همین دلیل یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از منابع گیاهی و استفاده از آنها در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار مطلوب است [۷،۶]. مطالعات نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های پوست، برگ، ساقه، میوه و ریشه گیاهان به مقدار کل ترکیبات فنولی آنها بستگی دارد. ترکیبات فنولی یک گروه متابولیت‌های ثانویه آروماتیک گیاهی هستند که به‌طور گسترده‌ای در سراسر گیاه پخش شده‌اند و دارای تأثیرات بیو-لوژیکی متعدد هم‌چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی هستند [۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در گیاهان عمدتا به‌دلیل ویژگی‌های اکسایش-کاهش و ساختار شیمیایی آنها است که می‌توانند نقش‌های مهمی را در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، احاطه کردن فلزات واسطه و فرونشاندن مولکول‌های اکسیژن از طریق تغییر مکان یا تجزیه پراکسیدها ایفا کنند. این ویژگی‌ها با تأثیرات مفید آنتی‌اکسیدان‌های فنولی بر روی سلامت در ارتباط است که به‌دلیل تأثیرات بازدارندگی این ترکیبات در مقابل پیشرفت بسیاری از بیماری‌های وابسته به تنش اکسایشی، هم‌چون بیماری قلبی-عروقی، سندروم روده التهابی و بیماری آلزایمر است. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم توازن میان تولید اکسیژن فعال و خنثی شدن آن توسط سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی، عامل ایجاد بسیاری از بیماری‌ها هم‌چون پیری، انواع سرطان و بی‌نظمی‌های نورودژنراتیو هم‌چون آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می‌باشد [۱۱-۹]. طبق بررسی‌های به‌عمل آمده در تیره نعناع ۴۰۰۰ گونه و زیرگونه گیاهی شناخته شده است که دارای پراکندگی جغرافیایی وسیعی هستند؛ به‌طوری‌که در اغلب نواحی یافت می‌شوند، اما بیشترین پراکندگی را در منطقه مدیترانه دارا می‌باشند. گیاهان این تیره عموما علفی، یک‌ساله و یا پایا و دارای ساقه‌های راست یا خزنده هستند [۱۲]. در بین گیاهان این تیره گونه‌های مفید به‌وفور یافت می‌شوند که در داروسازی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی از گونه‌های نعناع جهت تولید اسانس در سراسر دنیا برای مصارف دارویی کشت می‌شود. گیاهان این تیره به‌علت دارا بودن خاصیت ضدالتهابی، ضداسپاسم و محرک بودن در طب سنتی جهت درمان تهوع، برونشیت، بی-اشتهایی و ناراحتی کبدی استفاده می‌گردند [۱۴،۱۳]. جنس فراسیون آسا (*Ballota* L.) متعلق به تیره Lamiaceae می‌باشد. این جنس در ایران سه گونه گیاهی علفی چندساله دارد که شامل *Ballota nigra* L. (فراسیون آسای سیاه) و *Ballota aucheri* Boiss. و یک گونه انحصاری ایران *Ballota platyloma* Rech.f. می‌باشد. گونه مذکور یکی از گونه‌های اندمیک تیره نعناعیان در ایران است که در شمال ایران نظیر دیلمان، خطیرکوه، فیروزکوه و ورسک مازندران انتشار دارد. گیاهی چندساله، بوته‌ای، با ساقه‌هایی افراشته به ارتفاع ۴۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، با برگ‌های قلبی شکل و پوشیده از کرک‌های نمدی بوده و جام گل آن به رنگ صورتی روشن با طول ۱۲ میلی‌متر است [۱۲]. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در جهت بررسی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان مختلف صورت گرفته است. هم‌چنین، فناوری‌های جدید و مختلفی به‌منظور کاهش دادن مدت زمان عصاره گیری، کاهش میزان حلال مصرفی، افزایش بازده استخراج و تقویت کیفیت عصاره حاصله گسترش یافته است. برای به‌دست آوردن بهترین و موثرترین عصاره، توجه به مواردی از جمله خصوصیات ماده گیاهی، انتخاب حلال مناسب و دقت در مراحل عصاره‌گیری ضروری می‌باشد [۱۵]. در روش عصاره‌گیری با استفاده از امواج فراصوت (التراسونیک) نفوذ حلال به بافت گیاهی به‌خوبی صورت می‌گیرد و در مقایسه با سایر روش‌ها این روش ارزان، ساده و موثر بوده و افزایش بازده عصاره‌گیری و افزایش سرعت واکنش از مهم-ترین محاسن آن به‌شمار می‌رود و با هر نوع حلالی نیز قابل انجام می‌باشد، اما فیلتراسیون و جدا کردن عصاره حاصله از ماده گیاهی پس از عصاره گیری از معایب روش فوق است [۱۷،۱۶]. در سال-های اخیر مطالعات وسیعی بر روی گیاهان عالی و اسانس‌ها و عصاره‌های حاصل از آن‌ها برای یافتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان انجام شده است. نقش رادیکال آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به-خوبی به اثبات رسیده است و این اثر زیان بخش رادیکال‌های آزاد می‌تواند توسط مواد آنتی‌اکسیدان بلوکه شده و سمیت زدائی گردد. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند، می‌توانند سلول را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت نمایند. باتوجه به اثرات بسیار مفید گیاهان خانواده Lamiaeae، و عدم ارائه گزارشی مبنی بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی گیاه *Ballota Platyloma* بر آن شدیم تا در رابطه با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این گیاه که اندمیک ایران و منطقه ورسک مازندران می‌باشد تحقیقاتی را انجام دهیم. در این راستا خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست آمده از سه روش پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و عصاره‌گیری با استفاده از امواج فراصوت با اندازه‌گیری قدرت احیاء کنندگی، قدرت شلاته‌کنندگی، قدرت به‌دام اندازی رادیکال آزاد DPPH و نیز محتوای تام فنول و فلاونوئید مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی گیاه *Ballota platyloma* Rech.f. در بهار ۱۳۹۱ از منطقه ورسک استان مازندران با

Archive of SID

www.SID.ir

مختصات جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۵۴ دقیقه عرض شمالی جمع‌آوری و توسط دکتری سیستماتیک گیاهی شناسایی گردید؛ نمونه هرباریومی گیاه مذکور در دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر به شماره ۳۹۳ نگهداری می‌شود. برای عصاره‌گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و التراسونیک استفاده شد. برای تهیه عصاره از روش پرکولاسیون، بخش‌های هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) در سایه و در مجاورت هوا خشک و سپس پودر شدند. پانزده گرم از نمونه پودر شده با متانول۸۰ درصد مخلوط شد. بعد از یک روز ماندگاری، فاز آلی با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جدا گردید و این عمل سه بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره جمع آوری گردید و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد. برای حذف کامل آب و تهیه پودر نیز از فریز درایر استفاده گردید. در روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت از امواج غیرمستقیم التراسونیک با فرکانس ۱۰۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه به‌مدت یک ساعت استفاده شد. برای این منظور ۱۵ گرم از نمونه پودرشده با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به‌مدت یک ساعت در حمام التراسونیک قرار گرفت. هر ۲۰ دقیقه حلال را عوض کرده، این عمل ۳ بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره جمع آوری گردید و از دستگاه تبخیر کننده چرخان برای حلال پراکنی استفاده شد و برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر استفاده شد [۱۸]. در روش استخراج پلی‌فنولیک، ابتدا مقدار ۲۰ گرم از نمونه پودرشده با ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال (متانول، استون و آب) به‌ترتیب با نسبت‌های ۳/۵، ۳/۵ و ۳ که حاوی فرمیک اسید ۱ درصد بود، مخلوط گردید. نمونه به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و سپس صاف شد. با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان و با تنظیم دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه حلال پراکنی انجام شد؛ در این‌صورت با توجه به دمای تنظیم شده استون و متانول حذف می‌شوند. سپس، ماده از دستگاه جدا شده و محتویات آن داخل یک قیف جداکننده ریخته شده و طی دو مرحله و در هر مرحله ۵۰ میلی-لیتر پترولیوم اتر به آن اضافه شد. این عمل جهت جدا کردن پیگمان‌ها استفاده شد. پس از آن فاز اتری رویی جدا شده و به فاز آبی باقیمانده طی ۳ مرحله اتیل استات (۱:۱) اضافه شد و در پایان اتیل استات حلال پراکنی شده و در نهایت فریز و خشک شد [۱۹].

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها

محتوای تام فنولی از طریق روش فولین‌سیوکالتیو انجام شد [۲۰]؛ بدین‌منظور غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره (در متانول) تهیه شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط شد و به‌مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. سپس، محتوای تام فنولی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در هر یک گرم عصاره اندازه‌گیری شد. میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد [۲۱]. غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه (۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار، و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم اضافه شد. جذب مخلوط بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراءبنفش بررسی شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره (ماده خشک) گزارش گردید.

فعالیت به‌دام اندازی رادیکال آزاد

رادیکال پایدار دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به‌دام اندازی رادیکال آزاد به‌کار رفت. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره (۴۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر)، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد؛ مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد [۲۲]. در این روش ویتامین C (آسکوربیک اسید) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایشات سه بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش گردید. میزان IC_{50} به‌معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاک-سازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در این آزمایش غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای همه عصاره‌ها تهیه شد. در نهایت درصد به‌دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_C - A_S}{A_C}\right)\times 100$$

A_C= جذب کنترل؛ و A_S= جذب نمونه یا استاندارد

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی قدرت احیاء کنندگی

قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق روش Yen و Chen ارزیابی شد [۲۳]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۸۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در آب با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید [$K_3Fe(CN_6)$] مخلوط شد. مخلوط مربوطه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد تری‌کلرواستیک اسید به‌عنوان متوقف کننده واکنش، مجموعه به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید ($FeCl_3$) مخلوط شده و بلافاصله جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش گردید. افزایش جذب در مخلوط واکنش به‌مفهوم افزایش قدرت احیاء کنندگی (آنتی‌اکسیدانی) خواهد بود. آسکوربیک اسید به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به‌کار گرفته شد.

ارزیابی میزان شلات کنندگی آهن II

برای اندازه گیری میزان شلاته کنندگی آهن از روش دنیز استفاده شد [۲۴]. به ۵ میلی‌لیتر از هر عصار (۸۰۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و یک میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد. EDTA به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار رفت و فعالیت شلاته کنندگی آهن برحسب اکی‌والان Na_2EDTA در گرم عصاره بیان شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین با کمک فرمول زیر محاسبه شد: [(A0-A_0 AS)/AS]X100 جذب کنترل و A_S جذب عصاره یا استاندارد می‌باشد.

آنالیز آماری

داده‌ها پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای بررسی نتایج و مقایسه میانگین عصاره‌های مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA جهت مقایسه کلی و پس‌آزمون دانکن جهت مقایسه زیر گروه‌ها استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد و مقادیر به‌صورت میانگین-±انحراف معیار گزارش گردید. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به‌دست آمد.

نتایج

در این پژوهش، درصد بازده انواع عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک بخش هوایی گیاه *Ballota Platyloma* متفاوت بود. پس از انجام فرآیند عصاره‌گیری وزن عصاره‌ها محاسبه شد و بازده هریک از آنها گزارش شد.

جدول شماره ۱- بازده استخراج بخش هوایی گیاه *Ballota Platyloma* براساس روش‌های مختلف عصاره‌گیری

عصاره گیاه	وزن خشک گیاه (گرم)	مقدار عصاره به‌دست آمده (گرم)	بازده
پرکولاسیون	۱۵	۱/۷۳	٪۱۱/۵۳
التراسونیک	۱۵	۱/۳۲	٪۸/۸
پلی‌فنولیک	۲۰	۱/۴۱	٪۷/۰۵

ارزیابی محتوای فنول و فلاونوئید تام عصاره‌ها

محتوای تام فنولی با متد فولین سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید به‌صورت زیر محاسبه شد: ($Y=0.0054X+0.0583$, $R^2=0.999$). محتوای تام فنولی برای عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، التراسونیک و پرکولاسیون به‌ترتیب ۹۸/۱۲±۵۰/۲۰۶، ۴۳/۷±۷۶/۱۷۷ و ۳۳/۱±۷۲/۱۵۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره به‌دست آمد. محتوای تام فنولی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P=۰/۰۰۱). با انجام آنالیز تعقیبی دانکن مشخص شد که محتوای تام فنولی حاصل از هر سه روش استخراج تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ باهم دارند؛ به‌نحوی‌که بیشترین محتوای فنولی تام برای روش پلی‌فنولیک مشاهده شد و بعد از آن به‌ترتیب برای روش‌های التراسونیک و پرکولاسیون. هم‌چنین، محتوای فلاونوئید تام نمونه‌ها با معادله خط استاندارد کوئرستین به‌صورت ($Y=0.0064X-0.010$, $R^2=0.999$) محاسبه شد. محتوای تام فلاونوئید موجود در عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، التراسونیک و پرکولاسیون به‌ترتیب ۰۱/۱±۱۴/۴۰، ۶۲/۰±۸۷/۳۱ و ۵۶/۰ ±۸۴/۲۹ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره به‌دست آمد. محتوای تام فلاونوئید اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۰۱). با انجام آنالیز تعقیبی دانکن مشخص شد که محتوای تام فلاونوئید حاصل از هر سه روش استخراج تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ باهم دارند؛ به‌نحوی‌که بیشترین محتوای فلاونوئید تام برای روش پلی‌فنولیک مشاهده شد و بعد از آن به‌ترتیب برای روش‌های التراسونیک و پرکولاسیون (جدول شماره ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۲- مقایسه محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *Ballota platyloma*

	روش عصاره‌گیری			
	پلی‌فنولیک	التراسونیک	پرکولاسیون	*P*
فنول تام[1]	۵۰/۲۰۶ ± ۹۸/۱۲c	۷۶/۱۷۷ ± ۴۳/۷b	۷۲/۱۵۷ ± ۳۳/۱a	۰/۰۰۱
فلاونوئید تام[2]	۱۴/۴۰ ± ۰۱/۱c	۸۷/۳۱ ± ۶۲/۰b	۸۴/۲۹ ± ۵۶/۰a	<۰/۰۰۱

[1]میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره؛ [2]میلی‌گرم کوئرستین اسید در گرم عصاره

فعالیت به‌دام اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* حاصل از روش‌های پلی-فنولیک، التراسونیک و پرکولاسیون توانایی خوبی در به‌دام اندازی و مهار رادیکال DPPH دارند. میانگین و انحراف معیار مقادیر IC_{50} برای عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک به-ترتیب برابر ۶//۶۴±۰/۸۷، ۲/۵۸±۰/۰۶، ۷/۵۲±۰۷/۱ و برای استاندارد ویتامین C ۳/۶۱±۰/۰۳ برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. فعالیت به‌دام اندازی رادیکال DPPH اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P=۰/۰۰۵). بنابراین، با تجزیه و تحلیل داده‌ها نتیجه می‌گیریم که همه عصاره‌های حاصل از این گیاه در غلظت مهار ۵۰ درصد توانایی خوبی در مهار رادیکال DPPH دارند. به‌دلیل اینکه تفاوت معنی‌داری بین عصاره حاصل از استخراج به‌روش التراسونیک و ویتامین C در مهار رادیکال DPPH وجود ندارد می‌توان نتیجه گرفت که عصاره حاصل از این روش توانایی خوبی در حد ویتامین C در مهار رادیکال DPPH از خود نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌های حاصل از استخراج با روش‌های پرکولاسیون و پلی‌فنولیک مشاهده نشد، اما با روش التراسونیک تفاوت معنی‌داری داشتند.

سنجش میزان شلاته کنندگی آهن II

نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* قابلیت اتصال به آهن را دارا می‌باشد. عصاره روش پرکولاسیون نسبت به عصاره‌های التراسونیک و پلی‌فنولیک دارای قدرت شلاته کنندگی بیشتری بود؛ به-طوری‌که در غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درصد شلاته کنندگی عصاره‌های بخش‌های هوایی گیاه به‌ترتیب ۹۰/۰۸±۱/۱۰، ۸۱/۹۹±۰/۵۹ و ۶۴/۷۱±۲/۹۹ به‌دست آمد. IC_{50} برای شلاته کنندگی عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک به-ترتیب ۸۳/۱۹±۲/۷۱، ۱۵۱/۳۵±۰/۰۰ و ۲۳۷/۲۷±۵۹/۱۱ برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. این درحالی است که میزان شلاته کنندگی برای استاندارد EDTA مقدار ۱۴/۶۹±۳۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. آنالیز آماری نشان داد که برای میزان شلاته کنندگی بین تمامی روش‌ها و هم‌چنین استاندارد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). همان‌طورکه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، عصاره به‌دست آمده از روش پرکولاسیون بهترین فعالیت شلاته کنندگی را از خود نشان داده است و بعد از آن بهترین فعالیت شلاته کنندگی به‌ترتیب برای روش‌های التراسونیک و پلی‌فنولیک مشاهده شد.

جدول شماره ۳- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *Ballota platyloma*

	روش عصاره‌گیری				
	پلی‌فنولیک	التراسونیک	پرکولاسیون	استاندارد	*P*
فعالیت به‌دام اندازی DPPH IC_{50} (µg/ml)	۵۲/۷±۰۷/۱[b]	۵۸/۲±۰۶/۰[a]	۶۴/۶±۸۷/۰[b]	۶۱/۳±۰۳/۰[a]	۰۰۵/۰
میزان شلاته کنندگی آهن IC_{50} (µg/ml)	۲۷/۲۳۷±۵۹/۱۱[d]	۳۵/۱۵۱±۰۰/۰[c]	۱۹/۸۳±۷۱/۲[b]	۶۹/۱۴±۳۰/۲[a]	<۰۰۱/۰

*حروف متفاوت در هرردیف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است؛ *مقادیر IC_{50} تست DPPH برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ویتامین C برابر ۶۱/۳±۰۳/۰؛ *مقادیر IC_{50} تست شلاته کنندگی برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر برای EDTA برابر ۶۹/۱۴±۳۰/۲

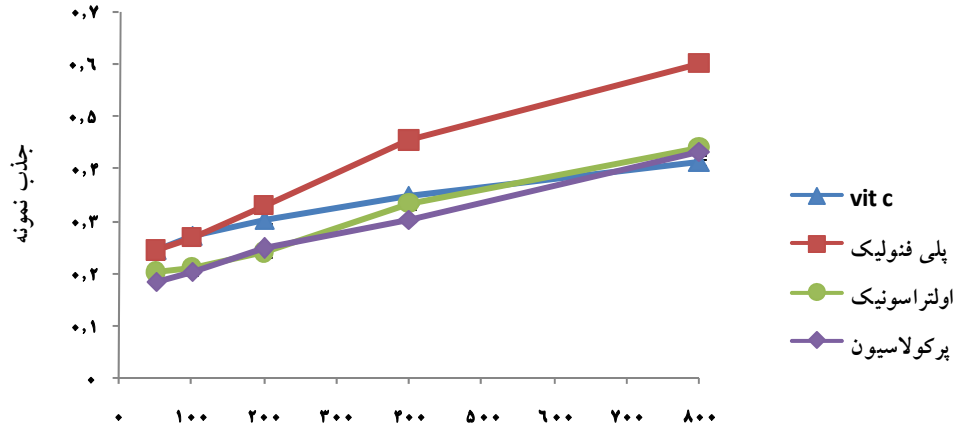
قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها

در بررسی قدرت احیاء کنندگی جذب نور با قدرت احیاء کنندگی رابطه مستقیم دارد. نمودار شماره ۱ منحنی غلظت-جذب را در عصاره‌های به‌دست آمده از روش‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود دارد (P<۰/۰۰۱). همان‌طورکه در نمودار مشخص است قدرت احیاء کنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد می‌شود؛ به‌طوری‌که عصاره پلی‌فنولیک نسبت به سایر عصاره‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

جذب بیشتری داشته است؛ یعنی با افزایش غلظت قدرت احیاء کنندگی بیشتری را نشان داد. فعالیت عصاره پلی‌فنولیک حتی از استاندارد ویتامین C هم بالاتر بود.



شکل شماره ۱- مقایسه قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* با استاندارد ویتامین C

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گیاه *Ballota platyloma* مانند بسیاری از گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که با روش‌های مختلف عصاره گیری استخراج می‌شوند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها نوع حلال و روش استخراج می‌باشند [۲۵]. هر روش، راندمان استخراج متفاوتی دارد. بنابراین انتخاب روش مناسب استخراج می‌تواند غلظت آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره مربوط به گیاه را افزایش دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیشترین بازده استخراج مربوط به روش پرکولاسیون و کمترین آن مربوط به‌روش پلی‌فنولیک بود. فنول‌ها و ترکیبات پلی‌فنولی، مانند فلاونوئیدها به‌طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با منشأ گیاهی یافت می‌شوند و می‌توانند اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته باشند [۲۶]. پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که در بسیاری از ترکیبات طبیعی وجود دارند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مواد به گروه‌های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان موجود در ساختارشان نسبت داده می‌شود؛ یکی از مکانیسم‌های محتمل برای این مواد، به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد از طریق الکترون‌های جفت شده موجود در اطراف حلقه آروماتیک آن‌ها است که این توانایی ناشی از وجود پیوندهای هیدروژنی حلقه آروماتیک است [۲۷]. فلاونوئیدها نیز بزرگ‌ترین دسته پلی‌فنول‌ها هستند که به‌طور گسترده در رژیم غذایی انسان وجود دارند و دارای ساختمان بنزوپیرن می‌باشد. مطالعات نشان داد که افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، می‌تواند منجر به کاهش برخی بیماری‌ها در انسان شود [۲۸]. مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی‌اکسیدانی به‌صورت جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید، آنیون‌ها، رادیکال‌های پراکسید چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. علاوه بر این، توانایی به‌دام اندازی اکسیژن منفرد و شلات کردن فلزات را نیز دارند. جهت ارزیابی محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های متانولی گیاه *Ballota platyloma*، از روش فولین‌سیوکالتو و روش رنگ سنجی استفاده شد. باتوجه به نتایج به‌دست آمده این تحقیق، عصاره به‌دست آمده از روش پلی‌فنولیک محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی بیشتری نسبت به عصاره‌های حاصل از روش‌های التراسونیک و پرکولاسیون نشان داد؛ به‌طوری‌که محتوی فنول و فلاونوئید تام برای عصاره‌ها به‌صورت زیر می‌باشد: پلی‌فنولیک > التراسونیک > پرکولاسیون. مطالعه Kalia و همکارانش بر روی قسمت هوایی گیاه *Potentilla atrosanguinea* نشان داد بیشترین میزان تام فنولی و فلاونوئیدی به‌ترتیب برای روش سوکسیله، روش عصاره‌گیری با مایکروویو، روش عصاره گیری با امواج فراصوت و ماسراسیون به‌دست آمد [۲۹]. مطالعه عصاره برگ و گل گیاه *Lythrum salicaria* نشان داد محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره پلی‌فنولیک بیشتر از عصاره التراسونیک و پرکولاسیون می‌باشد که با مطالعه ما هم‌خوانی داشت [۳۰]. بنابراین شاید بتوان گفت که

Archive of SID

www.SID.ir

خاصیت آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های هوایی این گیاه بیشتر مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آنها می‌باشد و میزان فنول تام و فلاونوئید در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها سه روش به‌دام اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، قدرت احیاء کنندگی و میزان شلات کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرآیندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می‌شود. ترکیب‌هایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند [۳۱]. فعالیت به‌دام اندازی رادیکال DPPH اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. درصد مهار کلیه عصاره‌ها در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برای عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک برابر با ۱/۱۸±۹۳/۷۱، ۰/۶۵±۹۵/۲۶ و ۰/۷۰±۷۸/۲۵ به‌دست آمده است که این درصدها در مقایسه با استاندارد ویتامین C با درصد مهار ۰/۵۶±۹۵/۸۴ بسیار قابل توجه بود. باتوجه به درصد مهار به‌دست آمده مشخص شد که عصاره‌های حاصل از روش التراسونیک و پرکولاسیون نسبت به عصاره پلی‌فنولیک فعالیت و توانایی بیشتری در به‌دام اندازی رادیکال DPPH از خود نشان دادند. در مقایسه بین عصاره‌ها، عصاره التراسونیک کمترین IC_{50} و در نتیجه بیشترین توانایی در به‌دام اندازی رادیکال DPPH نسبت به عصاره‌های پرکولاسیون و پلی‌فنولیک داشت. Cai و همکارانش در سال ۲۰۰۴ ارتباط خطی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش کردند، درحالی‌که این ارتباط خطی در مطالعه ما و بعضی از مطالعات دیگر مشاهده نشد [۳۲]. مطالعات He و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد که روش استخراج التراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاه‌تر در مقایسه با روش سنتی می‌شود [۳۳]. مطالعه انجام شده روی گیاه *Hyoscyamus squarrosus* نشان داد عصاره التراسونیک در به‌دام اندازی رادیکال DPPH و به‌دام اندازی نیتریک اکساید بهتر از ماسراسیون عمل می‌کند [۳۴]. مطالعه انجام شده روی برگ و قسمت‌های هوایی گیاه *Lythrum salicaria* با سه روش مختلف نیز نشان داد به‌دام اندازی رادیکال DPPH و نیتریک اکساید عصاره پلی‌فنولیک بیشتر از عصاره التراسونیک و پرکولاسیون بوده که با نتایج ما هم‌خوانی نداشت. به‌علاوه، قدرت احیاء کنندگی پلی‌فنولیک بیشتر از آسکوربیک اسید گزارش شده که موافق با نتایج ما بود [۳۰]. بنابراین با استفاده از داده‌های حاصل می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که این گیاه از لحاظ مهار رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار توانمند بوده و قدرت‌آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در مقایسه با آسکوربیک اسید کاملا قابل ملاحظه است. نتایج آزمون DPPH نشان داد توانایی عصاره‌های پرکولاسیون، التراسونیک و پلی‌فنولیک در مهار رادیکال آزاد وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت فعالیت به‌دام اندازی رادیکال افزایش می‌یابد؛ به‌عبارت دیگر در غلظت‌های بالاتر ترکیبات موجود در عصاره‌ها به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به‌دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. عناصر واسطه دوظرفیتی که معمول‌ترین آنها آهن است، توانایی انتقال الکترون را دارند و از طریق واکنش فنتون، باعث تولید مقدار زیادی رادیکال هیدروکسیل می‌شوند؛ به‌این‌ترتیب اثرات تخریبی هیدروپراکساید افزایش می‌یابد. رادیکال هیدروکسیل مهم‌ترین رادیکال آزاد در بافت‌های بیولوژیک است و به‌راحتی با اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و DNA واکنش داده و باعث تخریب سلول می‌شود [۳۵]. باتوجه به تمایل بالای رادیکال هیدروکسیل به مولکول‌های زیستی بدن و اثرات مخرب آن، پیشگیری از چنین واکنش‌های آسیب رسانی در سلامتی انسان اهمیت دارد. اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث احیاء رادیکال‌های هیدروکسیل و هیدروکسیلاسیون شود. EDTA، آسکوربیک اسید، ترکیبات فنولی و اسید سیتریک با شلات کردن فلزاتی مثل آهن از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری می‌کنند. عوامل شلات کننده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه هستند، زیرا آنها پتانسیل احیاء را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسید شده یون فلزی می‌شوند. شلاتورهای آهن با اتصال به آهن ترکیبات پایداری ایجاد می‌کنند که از طریق مدفوع یا ادرار دفع می‌شوند. درمان با شلاتورها، مشکلات مربوط به سمیت آهن را در انسان کاهش داده و کیفیت زندگی و بقا در بیماری‌هایی مثل تالاسمی بهبود می‌یابد [۳۶]. عناصر واسطه مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکال‌های آزاد از پراکسیدها را براساس واکنش‌های فنتون دارا بوده و می‌توانند موجب بیماری‌های قلبی عروقی در انسان شوند [۳۷]. یکی از درمان‌های اصلی بیماری آلزایمر که ناشی از عدم تنظیم جریان آهن در مغز و تشکیل پلاک‌های پروتئینی از پیش‌سازهای آمیلوئیدی است، استفاده از شلاتورهای آهن می‌باشد [۳۸]. امروزه داروهای زیادی به‌عنوان شلاته کننده آهن مانند دفروکسامین‌سیلات و دفراسیروکس برای درمان سمیت مزمن آهن ناشی از تزریق آهن در آنمی‌ها مانند تالاسمی و هم‌چنین در سمیت حاد آهن استفاده می‌شود. در این تحقیق هم EDTA و هم عصاره‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

دارای اثر شلاته کنندگی بوده و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته نمودند. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و کنترل مثبت EDTA به‌صورت زیر بود: EDTA > پرکولاسیون > التراسونیک > پلی‌فنول. برپایه این نتایج، تمامی عصاره‌ها توانایی شلات دهندگی از خود نشان دادند؛ عصاره حاصل از پرکولاسیون فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از سونیکیت و پلی‌فنول از خود نشان داد، ولی با استاندارد مورد نظر فاصله داشت. سنجش قدرت احیاء کنندگی در نمونه‌ها، ناشی احیا آهن III (فریک) به آهن II (فروس) با اهدا الکترون می‌باشد. میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب نوری در این طول موج نشان دهنده افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش قابلیت احیاء کنندگی می‌باشد [۳۹]. همان‌طورکه در بخش نتایج آورده شده است، قدرت احیاء کنندگی تمامی عصاره-ها تفاوت معنی‌داری در مقایسه با استاندارد نشان دادند ($P<$۰/۰۰۱). عصاره‌ها در غلظت ۸۰۰–۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قدرت احیاء کنندگی نسبتا خوبی را نشان دادند؛ به‌طوری‌که میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر و در بالاترین غلظت یعنی ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برای عصاره‌های پرکولاسیون، التزا-سونیک و پلی‌فنولیک ۰/۴۳۱±۰/۰۰۶، ۰/۴۳۸±۰/۰۰۷ و ۰/۰۰۳-±۰/۵۹۹ به‌دست آمد. از آنجا که قابلیت احیاء کنندگی عصاره پلی‌فنولیک نسبت به سایر عصاره‌ها قوی‌تر بوده و حتی در مقایسه با آسکوربیک اسید میزان احیاء کنندگی بیشتری را نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره پلی‌فنولیک با کمک اهداء الکترون موجب ختم واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد بخش‌های هوایی گیاه *Ballota platyloma* دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید می‌باشد. عصاره‌های مختلف بخش هوایی این گیاه در تمامی مدل‌های مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. عصاره‌های التراسونیک، پلی‌فنول و پرکولاسیون بیشترین فعالیت در به‌دام اندازی رادیکال DPPH، قدرت احیایی و توانایی شلات کنندگی آهن را به‌ترتیب نشان دادند. بنابراین، مطالعات تکمیلی در مورد جداسازی ترکیبات موثره این گیاه، و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات جدا شده به شکل مجزا می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد فعالیت‌های دارویی برای درمان بیماری‌ها فراهم کند.

تشکر و قدرانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر بهمن اسلامی برای کمک در جمع‌آوری و شناسایی نمونه و هم‌چنین از کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم عظیمی برای کمک در کارهای آزمایشگاهی نهایت تشکر به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Babitha N, Swamya DN, Chakrapania S. Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease. ***J Orofac Sci*** 2009; 1(2): 39-42.
[2] Lamina S, Ezema CI, Theresa AI, Anthonia EU. Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. ***Oxid Antioxid Med Sci*** 2013; 2: 83-91.
[3] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activities of methanol extract of sambucus ebulus L. Flower. ***Pak J Biol Sci*** 2009; 12(5): 447-50.
[4] Ebrahimzadeh MA, Ehsonifar S, Eslami B. Sambucus ebulus elburensis Fruits: A good for antioxidants. ***Pharmacogn Mag*** 2009; 4(19): 213-18.
[5] Aruoma OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. ***J Am Oil Chem Soc*** 1996; 73: 1617-25.
[6] Gao JJ, Igalashi K, Nukina M. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in Caryopteris incana. ***Biosci Biotechnol Biochem*** 1999; 63(6): 983-8.
[7] Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxyltoluene as antioxidant food additives. ***Food Chem Toxicol*** 1999; 37(9-10): 1027-38.
[8] Stoilova A, Krastano A, Dtoyanova P, Senev P, Farfova S. Antioxidant activity of ginger extract (Zingiber Officinale). ***Food Chem*** 2007; 102(3): 764-70.
[9] Wardle EN. Cellular oxidative process in realation to renal disease. ***Am J Nephrol*** 2005; 25(1): 13-22.
[10] Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2 2 diphenyl- 1- picrylhydrazyl radical. ***J Agric Food Chem*** 2000; 48(3): 648-56.
[11] Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. ***Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*** 2003; 2(2): 95-107.

Archive of SID

www.SID.ir

[12] Jamzad Z. Flora of Iran: Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands. 1st ed. Tehran; 2012. 76: 407-15, 1066.
[13] Iscan G, Kirimer N, Kurkcuoglu M, Baser KHC, Demirci F. Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. ***J Agric Food Chem*** 2002; 50(14): 3943-46.
[14] Moreno L, Bello R, Primo-Yufera E, Esplugues J. Pharmacological properties of the methanol extract from Mentha suaveolens Ehrh. ***Phytother Res*** 2002; 16 Suppl 1: S10-3.
[15] Zolfaghari B, Yegdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. ***Ournal Herbal Drugs*** 2010; 1(1): 51-5.
[16] Wang J, Sun BG, Cao YP, Tian Y. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. ***Food Chem*** 2008; 106(2): 804-10.
[17] Yang B, Zhao MM, Shi J, Yang N, Jiang YM. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. ***Food Chem*** 2008; 106(2); 685-90.
[18] Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis.* ***Nat Prod Res*** 2012; 26(24): 2353-7.
[19] Sun J, Yao J, Huang S, Long X, Wang J, Garcia-Garcia E. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of Kadsura coccinea (Lem.) A.C. Smith. ***Food Chem*** 2009; 117: 276-81.
[20] Ordone AAL, Gomez JD, Vattuone MA. Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) swartz extracts. ***Food Chem*** 2006; 97(3): 452-58.
[21] Chang YL, Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. ***J Agric Food Chem*** 2002; 50(13): 3713-17.
[22] Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. ***Turk J Biol*** 2008; 32: 43-9.
[23] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. ***J Agric Food Chem*** 1995; 43(1): 27-32.
[24] Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. ***Arch Biochem Biophys*** 1994; 315: 161-9.
[25] Samsam shariat SH. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods. Esfahan: Mani Press; 1992. p. 12-3. [in Persian]
[26] van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. ***Free Radic Biol Med*** 1996; 20(3): 331-42.
[27] Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. ***J Agric Food Chem*** 2000; 48(8): 3597-604.
[28] Hertog MG, Feskens EM, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease: the zutphen elderly study. ***Lancet*** 1993; 342(8878): 1007-11.
[29] Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. ***J Agric Food Chem*** 2008; 56(21): 10129-34.
[30] Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). ***Int Food Res*** 2014; 21(2): 783-8.
[31] Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. ***Lebensm Wissen Technol*** 1995; 28: 25-30.
[32] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. ***Life Sci*** 2004; 74: 2157-84.
[33] He Ch, Ji X, Pan YM, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. ***Med Chem Res*** 2009; 19(5): 448-61.
[34] Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. ***Pharmacologyonline*** 2009; 2: 796- 802.
[35] Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. ***Crit Rev Food Sci Nutr*** 2008; 48(5): 430–41.
[36] Hebbel RP, Leung A, Mohandas N. Oxidation-induced changes in microheological properties of the red cell membrane. ***Blood*** 1990; 76(5): 1015-22.
[37] Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? ***J Lab Clin Med*** 1992; 119(6): 598–620.
[38] Reznichenko L, Amit T, Zheng H, Weinreb O, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MB, et al. Reduction of the iron-regulated beta-amyloid precursor protein and toxic beta-amyloid peptides expression by green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate:implication of iron chelation in Alzheimer's disease. ***J Neurochem*** 2006; 97(2): 527–36.
[39] Jayaprakash GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed extracts on per oxidation models invitro. ***Food Chem*** 2001; 55: 1018-22.

Archive of SID

www.SID.ir