Archive of SID

بررسی اثر آنتی اکسیدانی، ضد رادیکالی و قدرت احیاء کنندگی عصاره‌های مختلف گیاه داروئی مورد *Artemisia annua* L.

*مریم قادری قهفرخی، سمانه ممشلو، علیرضا صادقی ماهونک، مهران اعلمی
گروه علوم و صنایع غذائی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۳

چکیده

گیاه مورد یا گندجارو با نام علمی *Artemisia annua* L. یکی از گونه‌های مهم جنس *Artemisia* می‌باشد که توزیع گسترده‌ای در مناطق مختلف ایران دارد. در این بررسی میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های مختلف آبی، متانولی و اتانولی تعیین و فعالیت آنتی اکسیدانی آنها با استفاده از روش‌های قدرت احیاء کنندگی، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و توانائی مهار رادیکال‌های آزاد ارزیابی شد. نتایج نشان داد عصاره اتانولی گیاه از بیشترین بازدهی (٤٦/٨١درصد) و بالاترین میزان توتال فنول ($mgGAEg^{-1}$) ۲۰۸/۲۱ و توتال فلاونوئید ($mgQUEg^{-1}$) ٦٤/٣٢ برخوردار بود. در تمامی آزمون‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش یافت. همچنین در آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، کمترین میزان غلظت موثره متعلق به عصاره اتانولی بود و پس از آن عصاره‌های متانولی و آبی قرار گرفتند. اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) بین مقدار غلظت موثره عصاره‌های متانولی و آبی در تمامی آزمون‌ها مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: مورد (*Artemisia annua* L.)، فنول، فلاونوئید، فعالیت آنتی اکسیدانی، قدرت احیاء کنندگی.

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیکی حاکی از آن است که ترکیبات طبیعی و آنتی اکسیدان در میوه‌ها و سبزیجات در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها موثر است. بنابراین روند رو به رشد اهمیت آنتی اکسیدان‌های طبیعی گیاهان داروئی در جلوگیری یا کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از عملکرد رادیکال‌های آزاد و عوارض جانبی داروهای شیمیایی در بدن موثر است. استرس‌های اکسیداتیو با بروز بسیاری از بیماری‌های مزمن نظیر سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، ایدز، آرتریت، سندروم داون و ناهماهنگی‌های حرکتی مرتبط می‌باشند (Hamad et al., 2010). از مهمترین منابع آنتی اکسیدانی موجود در رژیم غذائی طبیعی، می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوتاتیون‌ها، اسید آسکوربیک، نمک‌های آسکوربات، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی اشاره کرد.

از بین ترکیبات آنتی اکسیدان گیاهی، ترکیبات فنلی توزیع گسترده‌ای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی‌های آنتی

* Email:mghaderi_gh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیائی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (Pokorny, 2007).

Artimisia یکی از بزرگ‌ترین و گسترده‌ترین جنس‌های گیاهی است که از ٦٠ زیر گونه مختلف تشکیل شده است. این جنس دارای بیش از ٤٠٠ گونه مختلف است و رویشگاه اصلی آن قاره آسیا معرفی شده است (ربیعی و همکاران، ١٣٨٥). نام درمنه و افسنطین در زبان فارسی، اغلب به گیاهان متعلق به جنس *Artemisia* گفته می‌شود که اغلب آنها دارای برگ‌های تلخ، معطر و خواص داروئی کم و بیش مشابه هم می‌باشند. این جنس دارای ٣٤ گونه گیاهی علفی یکساله و چند ساله است که در سراسر ایران پراکنده‌اند و پس از آن گون‌ها (*Astragalus*) فراوان‌ترین جنس این تیره به شمار می‌آیند. برخی از این گونه‌ها بومی ایران می‌باشند (Kazemi et al., 2009). گیاهان این جنس به صورت بوته‌ای و سبز متمایل به خاکستری، پرشاخه، انبوه، توده‌ای، دارای ریشهٔ عمودی، چوبی شده ضخیم، در انتها منشعب بوده و ارتفاع آنها به ٣٠ تا ٤٠ سانتی‌متر می‌رسد و فصل جمع‌آوری آنها اواخر خرداد است. از مهمترین ترکیبات ثانوی موجود در این جنس می‌توان به کومارین، فلاون و ترپن‌ها اشاره کرد. گونه موره (*A.annua*) بومی آسیا بوده و در بسیاری از کشورها از آن در درمان تب، مالاریا و سر درد استفاده می‌شود. از مهمترین متابولیت‌های ثانویه در این گونه‌ها می‌توان به کتون‌ها، الکل‌ها، آرتانیون، میرسن و هیدروپراکسیدها اشاره کرد. برخی از این ترکیبات در اسانس و عصاره گیاه یافت می‌شوند (Verdian-rizi et al., 2008). اسانس بدست آمده از گیاه در تهیه فرآورده‌های داروئی کاربرد فراوان دارد و به طور موضعی به عنوان بی‌حس کننده، ضدعفونی کننده و ضدالتهاب که در درمان آماس‌ها به کار می‌رود. سینئول موجود در اسانس دارای اثر ضدپاتوژنیک، ضدنفخ و ضدعفونی کننده در رفع سرفه، سردرد و دفع حشرات کاربرد فراوان دارد (زرگری، ١٣٦٨). عصاره‌های مختلف گونه *A. annua* فعالیت ضدباکتریائی قابل توجهی در برابر رنج وسیعی از ارگانیسم‌های بیماری‌زا از خود نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به سویه‌های باکتری‌های باسیلوس، میکروکوکوس لوتئوس، اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، سودوموناس ائروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس اشاره کرد (Gupta et al., 2009). با توجه به اینکه تاکنون هیچ گونه پژوهشی در زمینه استخراج ترکیبات فنولی و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آنها از گونه *A. annua* در منطقه انجام نشده است، هدف از بررسی فوق ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه گندجارو جمع‌آوری شده از منطقه گنبد کاووس با چند روش مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و تهیه عصاره

نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این بررسی در خرداد ١٣٨٩ از شهرستان گنبد کاووس استان گلستان جمع‌آوری گردید. پس از خشک شدن در دمای ٤٠°C، توسط آسیاب برقی به تبدیل شدند. عصاره با سه حلال آب، متانول ٨٠ در صد و اتانول ٧٠ در صد و با روش استخراج مجدد، استخراج گردید. عصاره‌های اتانولی و متانولی توسط تبخیر کننده چرخان (Heidolph LABOROTA 4000) تا حدودی تغلیظ گردیدند و در نهایت تمامی عصاره‌ها با خشک کن انجمادی (Operun- FDB5503) به پودر خشک تبدیل شدند (Liu & Yao, 2007).

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنل و فلاونوئید توتال

www.SID.ir

Archive of SID

جهت تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی از روش فولین سیکالتو استفاده شد (Slinkard & Singelton, 1977) و منحنی استاندارد نیز با غلظت‌های مختلف گالیک اسید رسم گردید. به منظور اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فلاونوئیدی نیز از روش اسپکتروفتومتری (Chang et al., 2002) استفاده و مقدار این ترکیبات بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در گرم عصاره پودر شده بیان شد.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH[1]

میزان مهار رادیکال‌های دی.پی.پی.اچ (DPPH) با روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور محلول‌هائی با غلظت‌های ۵۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تمامی عصاره‌ها در حلال متانول آماده شدند. روش آزمایش به این صورت بود که یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصل به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (٪)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_C} \times 100$$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند (Shimada et al., 1992).

قدرت احیاکنندگی

توانائی عصاره‌ها برای احیاء یون‌های آهن سه ظرفیتی با این آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت (Yildirim et al., 2001). برای این منظور محلول‌هائی با غلظت ۵۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های پودر شده در حلال‌های مربوطه تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH ٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰°C قرار گرفت. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ (وزنی: حجمی) نمونه‌ها ۱۰ دقیقه با دور ۱٦۵۰g سانتریفوژ شدند. از محلول بالائی پس از سانتریفوژ ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید.

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌ها (با غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) از روش Prito و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با غلظت‌های مختلف (۱۰۰۰- ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۰°C قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ٦۹۵ نانومتر قرائت گردید. در نمونه بلانک به جای عصاره از ۰/۱ میلی لیتر متانول استفاده شد. نحوه آماده‌سازی معرف به این صورت بود که پس از آماده‌سازی محلول اسید سولفوریک ۰/٦ مولار، مقادیر محاسبه شده از فسفات سدیم و آمونیوم مولیبدات برای رسیدن به غلظت موردنظر در یک لیتر معرف، به صورت جداگانه در اسید سولفوریک حل شدند. سپس این دو محلول با هم ادغام و مخلوط حاصله با باقی مانده اسید سولفوریک به حجم یک لیتر رسانده شد (Prito et al., 1999).

[1]. 2, 2`- diphenyl 1-2- picryl hydrazyl

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز آماری

در روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنول توتال، میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، مقایسه میانگین‌های به دست آمده از سه تکرار با آزمون دانکن ($P<0/05$) بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت. رسم گراف‌ها نیز با نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

مقدار ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج

مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ها و بازده استخراج عصاره‌ها نیز در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بازدهی استخراج به ترتیب برای عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی بیشتر بود. هر چند که از این نظر اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) بین عصاره‌های اتانولی و متانولی مشاهده نشد. عصاره اتانولی همچنین دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل و نیز ترکیبات فلاونوئیدی بود. مقدار ترکیبات فنلی کل و نیز میزان ترکیبات فلاونوئیدی در عصاره آبی به ترتیب ۱٦٤/٤ میلی‌گرم معادل گالیک اسید و ۲۷/۷۹ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در گرم عصاره پودر شده بود در حالی که این میزان برای عصاره متانولی به ترتیب ۱۷۲/۰۲ میلی‌گرم معادل گالیک اسید و ٤۹/۵۱ میلی‌گرم معادل کوئرسیتین در گرم عصاره پودر شده به دست آمد.

جدول ۱: مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و بازدهی استخراج عصاره‌های مختلف

عصاره	ترکیبات فنولی کل (میلی گرم معادل اسید گالیک/گرم عصاره)	فلاونوئید (میلی گرم معادل کوئرسیتین/گرم عصاره)	بازدهی استخراج (٪)
اتانول (۷۰٪)	۲۰۸/۲۱^{a} ± ۳/۱۲	٦٤/۳۲^{a} ± ۰/٥٤	٤۹/۱۳^{a}
متانول (۸۰٪)	۱۷۲/۰۲^{b} ± ۰/۸۹	٤۹/٥۱^{b} ± ۰/۸۹	٤٦/۸۱^{a}
آب	۱٦٤/٤^{b} ± ۱/۱	۲۷/۷۹^{c} ± ۰/٥	۲٦/٦۷^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌ها در سطح احتمال ۵٪ است.

جدول ۲: مقایسه میانگین مقادیر EC_{50} عصاره‌ها (میکروگرم در میلی لیتر) در آزمون‌های مختلف

عصاره	نوع آزمون		
	مهار رادیکال‌های آزاد	قدرت احیاء کنندگی	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
اتانولی	۱۳۹/۲۲^{b}	٤٥۳/٤٤^{c}	٥۰٤^{c}
متانولی	۱٤۷/۲۱^{b}	۷۰٦/٦٦^{b}	٥۸٦/۷٥^{b}
آب	۳۸۷/٤۲^{a}	۷۸۲/٥^{a}	۸٥۰^{a}

حروف غیر مشابه در هر آزمون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌ها در سطح احتمال ۵٪ است

میزان مهار رادیکال‌های آزاد

مهار رادیکال‌های آزاد یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌هائی است که به واسطه آن ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند اکسیداسیون چربی‌ها را مهار نمایند. در این روش نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می‌گردد (Ferreres et al., 2007). نتایج آنالیز واریانس در این تحقیق نشان داد که نوع و غلظت عصاره

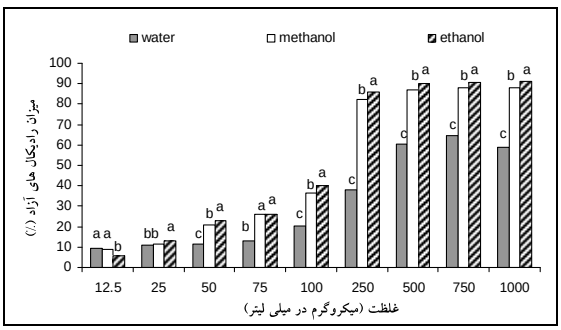
www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد دارد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در هر سه عصاره با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافته است. به استثنای غلظت‌های پائین (زیر ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر)، در سایر غلظت‌ها عصاره اتانولی فعالیت ضد رادیکالی بیشتری از خود نشان داد و بعد از آن عصاره‌های متانولی و آبی قرار گرفتند.

قدرت احیاء کنندگی

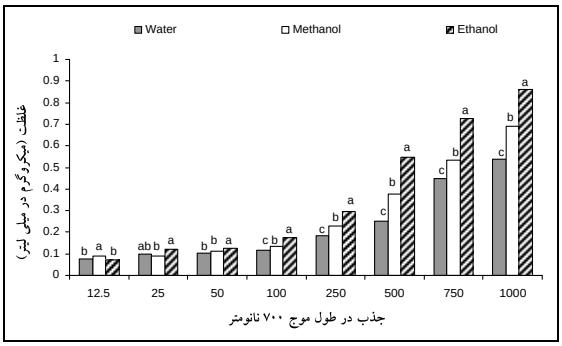
در این روش توانائی عصاره‌ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاء کننده (آنتی اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آنها به فرم فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاءکنندگی عصاره‌های مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است (Soares et al., 2009). نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌های مختلف از نظر قدرت احیاء کنندگی اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با یکدیگر دارند. همچنین با افزایش غلظت میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت.



شکل ۱: مقایسه میانگین میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ است.)

شکل ۲، مقایسه میانگین میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانولی بیشترین میزان قدرت احیا کنندگی را نشان داد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاءکنندگی عصاره آبی و متانولی در غلظت‌های ۵۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دیده نشد، اما در غلظت‌های بالاتر میزان جذب عصاره متانولی به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره آبی بود.



شکل ۲: مقایسه میانگین قدرت احیاء کنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ است.)

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ٦۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند (Prieto et al., 1999). نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵)

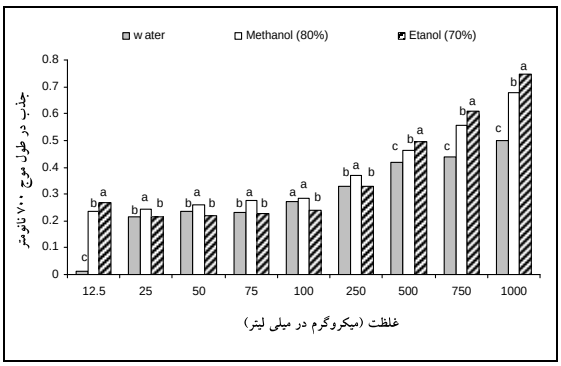
www.SID.ir

Archive of SID

افزایش یافت. عصاره‌های اتانولی و متانولی در غلظت‌های پائین ظرفیت آنتی اکسیدانی مشابهی داشتند و میزان جذب عصاره اتانولی در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از عصاره متانولی بود. عصاره آبی در اکثر غلظت‌ها ظرفیت آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به دو عصاره دیگر داشت.

مقایسه مقادیر EC_{50} عصاره‌ها در آزمون‌های مختلف

معمولاً برای مقایسه بهتر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} استفاده می‌شود. طبق تعریف EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضدرادیکالی بیشتری دارد. در این بررسی نیز مقادیر EC_{50} برای تمامی عصاره‌های تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید (جدول ۲).



شکل ۳: مقایسه میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌ها

(حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ است.)

همانطور که در جدول دیده می‌شود، کمترین میزان EC_{50} متعلق به عصاره متانولی بود که از این نظر اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) با عصاره اتانولی نداشت و هر دو عصاره نسبت به عصاره آبی قوی‌تر بودند. در آزمون قدرت احیاء کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نیز، غلظتی از عصاره که به ترتیب در طول موج ۷۰۰ و ٦٩٥ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ دارد، تحت عنوان EC_{50} نامیده می‌شود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین مقادیر EC_{50} عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۲). با توجه به جدول، بیشترین میزان EC_{50} در آزمون قدرت احیاءکنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل متعلق به عصاره آبی می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاءکنندگی عصاره آبی و متانولی مشاهده شد و EC_{50} عصاره متانولی در آزمون ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به طور معنی‌داری ($P<0/05$) کمتر از عصاره آبی بود.

بحث

عوامل متعددی مقدار ترکیبات فنولی موجود در بافت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای ژنتیکی، میزان تابش نور خورشید، شرایط خاک، درجه رسیدگی در زمان برداشت، شرایط محیطی، آب و هوا، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری اشاره کرد (Faller & Fialho, 2009). برای استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از بافت‌های گیاهی می‌توان از حلال‌های مختلف و روش‌های متعدد عصاره‌گیری استفاده کرد. درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات پلی فنلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون و برهمکنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. تحقیقات نشان داده است که حلال‌های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (٤٠ تا ٨٠درصد) توانائی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki et al., 2002). استفاده از حلال آب در عصاره‌گیری، با ایجاد یک محیط کاملاً قطبی سبب می‌شود فقط مقدار کمی از ترکیبات فنلی با درجه

www.SID.ir

Archive of SID

قطبیت پائین استخراج گردند، بنابراین با افزودن آب به حلال‌های آلی و با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی استخراج می‌شوند. علاوه بر این عصاره آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌هائی نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند (Chirinos et al., 2007). هیچ گزارشی در ارتباط با مقایسه میزان استخراج ترکیبات فنولی از عصاره‌های مختلف گیاه مورد بررسی در منطقه گنبد به دست نیامده است، اما تحقیقات زیادی در زمینه استخراج این ترکیبات با سامانه‌های مختلف حلال از منابع گیاهی دیگر انجام شده است. هم چنان که Turkmen و همکاران، به منظور استخراج ترکیبات فنلی از دو گونه چای *Camellia sinensis* و *Ilex Paraguariensis*، از حلال‌های استون، اتانول و متانول به صورت خالص و مخلوط با آب استفاده و نشان دادند که مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها در حالت خالص کمتر از آب بود، به گونه‌ای که حلال‌های استونی، متانولی و اتانولی به ترتیب حاوی کمترین میزان این ترکیبات بودند، ولی با افزودن ۵۰ درصد آب به حلال‌های نامبرده کارائی حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنلی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت، به طوری که به ترتیب فنل توتال در عصاره‌های هیدروالکلی (۵۰ در صد) استونی و اتانولی بیشترین و در عصاره آبی کمترین میزان گزارش گردید (Turkmen et al., 2006). قادری (۱۳۸۸) جهت استخراج ترکیبات فنلی موجود در میوه دو واریته از بلوط ایرانی به ترتیب از حلال‌های آب، متانول (۸۰ درصد) و اتانول (۷۰ درصد) استفاده کردند و نتایج حاکی از آن بود که برای واریته کاستانیفولیا بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی به ترتیب با حلال‌های اتانول، متانول و آب حاصل شد، در حالی که برای واریته برانتی عصاره متانولی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل را دارا بود و پس از آن حلال‌های اتانول و آب قرار گرفتند. ابوطالبیان (۱۳۸۵) برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از گیاهان نعنا، پونه و ریحان از حلال‌های آب، متانول ۸۰٪ و اتانول ۸۰٪ استفاده کرد و از متانول به عنوان بهترین حلال در استخراج فنل و فلاونوئید نام برد. میزان فلاونوئید عصاره‌های متانولی گیاهان نعنا، پونه و ریحان به ترتیب ۵۲/۸، ۵۱/۱۷ و ٤٥/١٩ میلی‌گرم معادل اپی کاتچین در هر گرم وزن خشک گیاه گزارش گردید. میزان فلاونوئید توتال در گیاه کرفس کوهی ۰/۵۹۵ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک و نسبت فلاونوئید توتال به فنل توتال، ۵۸ درصد گزارش شد (Ahmadi et al., 2007). معرف فولین سیکالتو به صورت غیراختصاصی با ترکیبات فنلی واکنش می‌دهد. علاوه بر این به جز ترکیبات فنلی، سایر ترکیبات موجود در عصاره نظیر قندها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی، آمین‌های آروماتیک و ویتامین‌ها نیز قادر به احیاء این معرف می‌باشند.

در کل افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانائی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno et al., 1999). قدرت مهار کنندگی عصاره‌های مختلف به میزان زیادی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل و وزن مولکولی ترکیبات فنلی بستگی دارد. در ترکیبات فنلی با وزن مولکولی پائین‌تر گروه‌های هیدروکسیل راحت‌تر در دسترس قرار می‌گیرند. علاوه بر این ترکیبات فنلی پس از اهداء هیدروژن خود به رادیکال‌های آزاد فنوکسیل تبدیل می‌شوند. میزان ثبات این رادیکال‌ها می‌تواند ظرفیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی را

www.SID.ir

Archive of SID

تحت تاثیر قرار دهد، چرا که رادیکال‌های فنوکسیل با ثبات کمتر با رادیکال‌های DPPH در جذب اتم‌های هیدروژن وارد رقابت می‌شوند و بنابراین درصد به دام اندازی رادیکال‌های DPPH کاهش می‌یابد (Jung et al., 2006). محققین دیگری نیز توانائی عصاره‌های گیاهی مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار داده‌اند. در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف جلبک دریائی دوتی مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب ۳/۰۳ و ٤/٧٦ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد که از مقادیر به دست آمده برای آنتی اکسیدان سنتزی BHT (۲/۸۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیشتر بود. از آن جا که میزان ترکیبات فنولی نیز در عصاره اتانولی بیشتر از متانولی بود. ارتباط مثبتی بین میزان مهار رادیکال‌های آزاد با مقدار ترکیبات فنولی کل وجود دارد (Suresh-Kumar et al., 2008).

در تحقیق دیگر، فعالیت آنتی اکسیدانی دو نوع قارچ وحشی (Ld) *Lactarius deliciosus* و (Tp) *Tricholoma portentusum* را مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر EC_{50} برای قارچ‌های Ld و Tp به ترتیب ۸/۵۲ و ۲۲/۹ میلی‌گرم در میلی لیتر بود. آنها تفاوت‌های مشاهده شده بین مقادیر EC_{50} عصاره متانولی دو نوع قارچ را به تفاوت در مقدار ترکیبات فنولی آنها نسبت دادند. مقدار ترکیبات فنولی در عصاره Ld و Tp به ترتیب ۱۷/۲۵ و ۱۰/۸۰ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بود (Ferraria et al., 2007). همان طور که مشاهده شد، یافته‌های به دست آمده توسط سایر محققین نیز حاکی از آن است که بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاهی با فعالیت ضد رادیکالی آنها ارتباط وجود دارد. این یافته‌ها نتایج تحقیق حاضر را تائید می‌نماید.

اختلاف مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف از نظر قدرت احیاءکنندگی را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنلی استخراج شده توسط حلال‌های مختلف نسبت داد. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی مختلف با توجه به ساختار شیمیائی آنها متفاوت است. علاوه بر این طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری که حلالیت بالائی در آب و محلول‌های الکلی دارند، همراه با ترکیبات فنولی وارد عصاره می‌شوند. از آنجائی که برخی از این ترکیبات نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها خود اهداء کننده الکترون می‌باشند بنابراین درصد بیشتری از یون‌های آهن سه ظرفیتی با جذب الکترون احیا شده و بنابراین شدت جذب محلول افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده توسط سایر محققین وجود ارتباط بین میزان ترکیبات فنلی عصاره و قدرت احیاءکنندگی آن را تائید می‌نماید. محققین دیگری مقدار ترکیبات فنلی و قدرت کاهندگی عصاره آبی پوسته سبز ۵ رقم مختلف گردو مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد رقم‌های فرانکوت، ماربوت، مایته، پارزین و ملانایز به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی بود و مقادیر EC_{50} این رقم‌ها در این عصاره‌ها به ترتیب ۰/۵، ۰/۵۱، ۰/٦٧، ۰/٦٢ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در کل عصاره‌های حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنلی EC_{50} کمتری داشتند که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت دارد (Oliveira et al., 2008).

قدرت کاهندگی بخش‌های مختلفی از گیاه *Cassia fistula* مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره حاصل از پوست ساقه، برگ، گل و گوشت میوه به ترتیب بیشترین قدرت احیاءکنندگی را داشتند. آنها قدرت احیاءکنندگی پائین پالپ میوه را به حضور مقادیر زیادی از ترکیبات پرواکسیدان نسبت دادند (Siddhuraju et al., 2002).

عصاره‌های استخراج شده با متانول، اتانول (۸۰٪)، هگزان، اتیل استات و استون دو نوع از مرکبات از نظر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داد که در گریپ فروت عصاره‌های اتیل استات، استون، هگزان، متانول (۸۰ درصد) و متانول و در پرتقال ترش عصاره‌های متانول، استون، اتیل استات و هگزان به ترتیب بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی را دارا بودند. تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را به اختلاف در میزان ترکیبات شیمیائی آنها نظیر اسید آسکوربیک، کاروتنوئید و فلاونوئیدها نسبت داده شد (Jayaprakasha et al., 2008). مقدار ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ شاه توت نیز مورد بررسی قرار گرفت. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی، آبی و BHT به ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸٦، ۰/٦٦ و ۳/۹۲۱ معادل میکرومول آلفا توکوفرول در گرم عصاره بود. همچنین مقدار ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره‌ی متانولی> استونی> آبی بود (Arabshahi & Urooj, 2006). نتایج به دست آمده در این تحقیق از نظر وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌ها با ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها با نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر مطابقت داشت.

نتیجه گیری نهائی

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد، گیاه *Artemesia annua* L. به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بالائی است. بنابراین با توجه به غنی بودن پوشش گیاهی شمال کشور از این گیاه و با در نظر گرفتن اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، می‌توان زمینه استفاده از آن را به عنوان یک منبع آنتی اکسیدانی جدید در صنایع غذایی و داروئی فراهم نمود.

منابع

ابوطالبیان، م. (۱۳۸۵). استخراج ترکیبات فنولیک موجود در برگی‌های گیاهان نعناع، پونه و ریحان و مقایسه اثر آنتی اکسیدانی آنها در روغن آفتابگردان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۲۰ ص.

ربیعی، م.، جلیلی، ع.، زرین‌کمر، ف. (۱۳۸۵). خصوصیات آناتومیکی ۵ گونه درمنه (*Artemisia*) در شمال ایران. پژوهش و سازندگی، شماره ۷۰، ۸۷-۷۹.

زرگری. ع. (۱۳٦۸). گیاهان داروئی. موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. ۹۲٦ ص.

قادری، م. (۱۳۸۸). بررسی ویژگی‌های شیمیائی، آنتی اکسیدانی و تاثیر فرآیندهای مختلف بر میزان ترکیبات فنولی دو گونه بلوط ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم و صنایع غذائی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۱٦۰ ص.

Ahmadi, F., Kadivar, M., Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. Food Chemistry 105, 57-64.

Arabshahi, D.S., Urooj, A. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry 102, 1233-1240.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers. Separation & Purification Technology 55, 217-225.

Faller, A.L.K., Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic coking. Food Research International 42, 210-215.

www.SID.ir

Archive of SID

and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Asteraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). Arabian Journal of Chemistry 3, 79–84.

Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food & Chemical Toxicology 46, 2326–2331.

Pokorny, J. (2007). Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components. European Journal of Lipid Science and Technology 109, 629-642.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantization of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269, 337–341.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International 32, 407–412.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural & Food Chemistry 40, 945-948.

Siddhuraju, P., Mohan, P.S., Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. Food Chemistry 79, 61-67.

Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology & Viticulture 28, 49-55.

Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry 100, 1511-1516.

Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2007). Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. Food Chemistry 101, 549-558.

Gupta, P.C., Dutta, B., Pant, D., Joshi, P., Lohar, D.R. (2009). *In vitro* antibacterial activity of *Artemisia annua* Linn. growing in India. International Journal of Green Pharmacy 3, 255-258.

Hamad, I., Erol-Dayi, O., Pekmez, M., Onay-Ucar, E., Arda, N. (2010). Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Aphanes arvensis* Extracts. Plant Food for Human Nutrition 65, 44-49.

Jayaprakasha, G.K., Girennavar, B. & Patil, B.S. (2008). Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. Bioresource Technology 99, 4484-4494.

Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Park, M.W., Cho, H.Y. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT 39, 266-274.

Kazemi, M., Dakhili, M., Rustaiyan, A., Larijani, K., Ahmadi, M.A., Mozaffarian, V. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia tschernieviana* Besser from Iran Pharmacognosy Research 1, 120-124.

Liu, Q., Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry 102, 732-737.

Naili, M.B., Alghazeer, R.O, Saleh, N.A., Al-Najjar, A.Y. (2010). Evaluation of antibacterial

www.SID.ir

Archive of SID

tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry 99, 835-841.

Verdian-rizi M.R., Sadat-Ebrahimi, E., Hadjiakhoondi, A., Fazeli, M.R., Pirali Hamedani M. (2008). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia annua* L. Essential Oil from Iran. Journal of Medicinal Plants 7, 58-62.

Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4083-4089.

Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S.M.G., Peralta, R.M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murr.il) in two stages of maturity. Food Chemistry 112, 775-781.

Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., Tsuji, K. (2002). An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi 49, 507-511

Turkmen, N., Sari, F. & Sedat-Velioglu, Y. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of antioxidant activity, reducing power and free radical scavenging of different extract of *Artemisia annua* L.

***Ghaderi Ghahfarokhi, M., Mamashloo, S., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M.**
Dep. Science and Food product, Gorgan Agricultural Science and Naural resource, Gorgan, Iran

Abstract

Artemisia annua L. is the one of important species of *Artemisia* genus and commonly found in the North East of Iran. In this study, phenolic and flavonoid compounds were extracted with water, ethanol and methanol. Total phenolic and flavonoid content were determined and antioxidant activity was evaluated using three different methods: including scavenging effect on DPPH radicals, reducing power and total antioxidant capacity. Result showed that ethanol extract had highest yield extraction (46.81%), total phenolic content was (208.21 mg GAE g^{-1}) and(64.32 mg QE g^{-1}) flavonoid. For all tested methods, antioxidant activity of extracts was increased with increasing concentration. Also, ethanol extract had lowest effective concentration (EC_{50}) in scavenging effect on DPPH radicals, reducing power and total antioxidant capacity methods, followed by methanol and water extract. In all methods, there were significant differences ($P<0.05$) between EC_{50} of methanol and water extract.

Key words: Antioxidant activity, *Artemisia annua* L., Flavonoid, Phenolic extract, Reducing power.

* *Email:mghaderi_gh@yahoo.com*

www.SID.ir