

Impact of Extraction Methods on Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Antihypoxic Properties of Allium ampeloprasum in Mice

Razieh Shahnazi¹,
Fariborz Mehrdadfar¹,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh²

¹Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

²Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 20, 2017 Accepted January 31, 2018)

Abstract

Background and purpose: *Allium* (Liliaceae) genus has about 600 spp. This investigation was designed to study the impact of extraction methods on total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, and antihypoxic properties of *A. ampeloprasum* in mice.

Materials and methods: The aerial parts were extracted by three different methods, i.e. maceration, ultrasonic assisted (UAE) and Soxhlet assisted extraction (SAE). The total phenolic and flavonoid contents were determined. Antioxidative capacity was assessed utilizing four different methods. Antihypoxic activities of maceration extract against hypoxia-induced lethality in haemic, asphytic and circulatory hypoxia models.

Results: Soxhlet assisted extract showed the highest amount of total phenolic contents (89.1±3.3 GAE) and Ultrasonic assisted extract showed the highest amount of total flavonoid contents (36.9±1.7 QE). In DPPH radical scavenging activity, maceration extract had higher activity which was significantly different from that of other extracts (IC₅₀ 622.6±12.7). Extraction method did not show any effect on reducing power. All extracts showed the same activity (P>0.05). Extracts did not show any good nitric oxide radical scavenging and iron chelating activities. In haemic and asphytic models, the extract at 250 mg/kg showed statistically significant activities compared with that in the controls. In circulatory model the extract at 500 mg/kg, significantly prolonged the latency for death compared with that in control groups (P<0.05).

Conclusion: According to current study, extraction methods significantly affected antioxidant capacities and total phenolic and flavonoid contents. For *A. ampeloprasum*, maceration extraction was found to be more efficient. It showed high antihypoxic properties.

Keywords: maceration, Soxhlet, antioxidant, total phenolics, total flavonoids, anti-hypoxia

بررسی تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی هیپوکسی گیاه تره *Allium ampeloprasum*

رضیه شهنازی^۱فریبرز مهردادفر^۱محمد علی ابراهیم زاده^۲

چکیده

سابقه و هدف: جنس گیاه *Allium* (Liliaceae) دارای بیش از ۶۰۰ گونه است. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی، فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی هیپوکسی *A. ampeloprasum* طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اندام هوایی با سه روش خیساندن، سوکسله و التراسونیک عصاره گیری شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی نیز اندازه گیری گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی با چهار روش مختلف ارزیابی شد و سپس فعالیت آنتی هیپوکسی موثرترین عصاره در سه مدل هیپوکسی خونی، جریان خونی و خفگی در موش سوری بررسی گردید.

یافته‌ها: عصاره التراسونیک بالاترین مقدار پلی فنولی 3.3 ± 0.89 GAE و عصاره سوکسله بالاترین مقدار فلاونوئید 1.7 ± 0.36 QE را دارا بودند. در به دام اندازی رادیکال DPPH، بهترین اثر مربوط به خیساندن بوده است (با IC_{50} برابر 12.7 ± 0.622). نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی نشان داد که اختلاف بین عصاره ها از نظر آماری معنی دار نبود ($p < 0.05$). عصاره ها فعالیت خوبی در تست به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید و شلاته کنندگی آهن از خود نشان ندادند. در هیپوکسی خونی و خفگی عصاره با دوز 250 mg/kg نسبت به گروه کنترل فعالیت قابل توجهی از خود نشان داده است و زمان مرگ را به تاخیر انداخت. در هیپوکسی وابسته به جریان خون زمان زنده ماندن بین گروه های دریافت کننده 500 mg/kg و گروه کنترل، اختلاف معنی دار بوده است ($p > 0.05$).

استنتاج: مطابق با نتایج این مطالعه استفاده از روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. در مورد این گیاه، روش خیساندن بهتر از بقیه موارد تعیین شد. این گیاه اثرات خوب آنتی اکسیدانی و آنتی هیپوکسی از خود نشان داد.

واژه های کلیدی: خیساندن، سوکسله، آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید، آنتی هیپوکسی

مقدمه

را دارا می باشند. این اثر مضر می تواند توسط مواد آنتی اکسیدان متوقف گردد. آنتی اکسیدانها موجب به دام اندازی رادیکال های آزاد شده و بدین ترتیب موجب سمیت زدایی می شوند. غذاهای غنی از

نقش ذرات آزاد اکسیژن و نیتروژن در ایجاد بسیاری از بیماری ها به اثبات رسیده است (۱). واکنش های بیوشیمیایی متعددی در بدن این ذرات آزاد را تولید نموده که توانایی تخریب مولکول های بزرگ

Email: zadeh20@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۹/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱

استرازی گزارش شده است (۱۷، ۱۴). اثر گل سیر بر کیست هیداتید نیز اخیرا گزارش شده است (۱۸). اثر آنتی اکسیدانی، محافظت کبدی و آنتی همولیز از *A. paradoxum* گزارش شده است (۲۱-۱۹). فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی همولیز از *A. scabriscapum* و *A. rotundum* نیز گزارش شده است (۲۳، ۲۲).

تره *A. ampeloprasum* L. یک فرم وحشی از *Leek* بوده که بر اساس نامگذاری گیاه شناسان آن را زیر گونه *persicum* نامیده اند (۲۴). این گیاه که به طور گسترده کشت می شود بومی خاور میانه بوده و از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد (۲۴). در ایران *Tarreh* نامیده می شود و به طور گسترده در باغات بزرگ از قرن دهم در تمامی کشور کاشته می شود. این گیاه به طور روزانه و خام یا به صورت جزئی برای تهیه سوپ یا خورشتهای استفاده می شود (۲۵). این گیاه در ایران در طب سنتی، در درمان یبوست، آسم، نفرس، چاقی، هموروئید، سردرد به عنوان دیورتیک و حتی افزایش دهنده میل جنسی استفاده می شود (۲۶). تا کنون چند ترکیب از این گیاه جداسازی و گزارش شده اند که می توان از مشتقات سیتینامیک اسید مانند *N-feruloyltyramine* و چند *N-caffeoyltyramine* و همچنین کامفرول گلیکوزید در تره نام برد (۲۹، ۲۷). تره هم چنین حاوی سطوح بالایی از لوتئین، بتاکاروتن، ویتامین ث و ویتامین ای می باشد (۳۰). در مطالعه ای که در بلژیک انجام گرفت، عصاره های ساقه سفید و برگ های سبز تره کشت شده برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، فنل تام و میزان ویتامین ث مورد سنجش قرار گرفت. روش های به کار رفته شامل، DPPH و تست FRAP بوده است و نتایج حاکی از آن بود که عموما فعالیت آنتی اکسیدانی برگ های سبز بیشتر از ساقه های سفید می باشد. بررسی آماری نشان داد که در تره، فنل و ویتامین ث موجود در گیاه عمدتا مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه هستند (۲۹).

آنتی اکسیدانها نقش مهمی را در پیشگیری از بیماری های قلبی - عروقی، سرطان، بیماری های دژنراتیو (پارکینسون و الزایمر) بازی می کنند نظر به این که گیاهان منبع آنتی اکسیدانهای طبیعی می باشند تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان هستند می توانند سلولها را از استرس های اکسیداتیو محافظت کنند (۲۱، ۴). امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره های گیاهی انجام می شود تا به موادی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا دست یابند. از آنجا که روش های مختلفی برای تهیه عصاره های گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با سایر روشها از محدودیتها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می باشند، در چند سال اخیر توجه زیادی به عرضه روش های نوین استخراج شده است. روش مطلوب روشی است که بیشترین اجزای اصلی گیاه را در کوتاه ترین زمان ممکن با کمترین قیمت به دست آورد (۵).

جنس گیاه *Allium* از خانواده *Liliaceae* دارای بیش از ۶۰۰ گونه است. مهم ترین آنها که خوراکی نیز بوده، سیر (*A. sativum* L) و پیاز (*A. cepa* L) می باشند (۶). تحقیقات فراوانی در مورد گونه های مختلف از جنس آلیوم مانند سیر خوراکی و پیاز انجام شده است (۱۰، ۷). سیر دارای عوامل موثر بر کاهش گلوکز، از جمله دی الیل دی سولفید، دی الیل تری سولفید، دی الیل سولفید، S- الیل سیستئین سولفو کسید و الیل پروپیل دی سولفید می باشد که در سایر گونه های جنس آلیوم نیز یافت می شوند (۱۲، ۱۱). در سال ۱۹۹۵ گزارش شد که تجویز آمینو اسیدهای سولفو کسید موجود در سیر و پیاز باعث بهبود شرایط دیابت اعم از تحمل گلوکز، کاهش وزن و تخلیه گلیکوزن کبدی می شود (۱۳). عصاره خوراکی سیر موجب کاهش سطح گلوکز و افزایش سطح انسولین سرم در حیوانات یا انسان شده است (۷). از *A. rotundum* فلاونوئید، کومارین استروئیدال گلیکوزید و همچنین اثر ضد میکروبی و کولین

دستگاه قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به مدت ۸ ساعت ادامه پیدا کرد سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید (۵).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

تعیین محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد (۳۲). غلظت ۱ میلی گرم / میلی لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه گردید. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان گردید. میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید، قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار گردید.

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد (۳۲). غلظت ۱ میلی گرم / میلی لیتر از هر عصاره تهیه گردید. ۰/۵ میلی لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل شد. ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی - ماوراء بنفش اندازه گیری شد. کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرتستین در گرم عصاره گزارش گردید.

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر روش استخراج بر قدرت آنتی اکسیدانی اندام هوایی *A. ampeloprasum* انجام شده است و فعالیت آنتی هیپوکسی قوی ترین عصاره، در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، محتوای تام فنل و فلاونوئید تمامی عصاره‌ها نیز تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، نمونه‌ی گیاهی از شهرستان آمل توسط آقای دکتر بهمن اسلامی (دکترای سیستماتیک گیاهی) جمع‌آوری و تأیید شد. نمونه هرباریومی گیاه به هرباریوم دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر با شماره هرباریومی ۷۶۹ نگهداری می‌شود. اندام‌های هوایی در سایه در مجاورت هوا خشک شد و سپس پودر گردید (به قطر حدود ۲ تا ۳ میلی متر). در نهایت عصاره‌گیری با روش‌های خیساندن، سوکسله و اولتراسونیک با استفاده از متانول خالص انجام شد.

در تهیه عصاره به روش خیساندن، ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با حدود ۵۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید و فاز آلی جدا و مجدداً متانول جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز سوم، مجموعه حلال‌ها توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید.

در تهیه عصاره به روش اولتراسونیک، از امواج غیر مستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۶۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم برگ ریز شده گیاه به همراه حلال متانول در بشر قرار داده شد. مجموعه به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول به دست آمده توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید (۳۱).

در تهیه عصاره به روش سوکسله، ۵ گرم برگ ریز شده گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در

آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش گردید.

ارزیابی میزان توانایی به دام‌اندازی رادیکال

DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی لیتر از عصاره ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه گردید و بعد تکان دادن مخلوط حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. ویتامین ث و BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC50 به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاکسازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین گردید. در نهایت درصد به دام‌اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول شماره ۱ محاسبه شد.

$$\text{فرمول شماره ۱} \quad \left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

در فرمول شماره ۱، AB جذب بلانک، AS جذب

نمونه یا استاندارد می‌باشد (۳۲، ۳۳).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق متدین و چن ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف از هر عصاره تهیه گردید و با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶/۵ = ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید [K3Fe(CN6)] مخلوط، و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی لیتر از

قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید (FeCl3) به آن اضافه شد و جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار گردید (۳۲، ۳۳).

ارزیابی میزان به دام‌اندازی نیتریک اکساید

در این روش سدیم نیترو پروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید می‌کند که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتريت تولید می‌نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنش گر گریس مورد سنجش قرار می‌گیرد. به دام‌اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتريت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. همان مخلوط واکنش بدون عصاره مورد (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک به کار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر واکنش گر گریس (سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلرید ۰/۱ درصد در اسید فسفریک ۲ درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید. کوئرتستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام‌اندازی هم طبق فرمول شماره ۲ محاسبه، و بر اساس آن IC50 برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100 \quad \text{فرمول شماره ۲}$$

در فرمول شماره ۲، AB جذب بلانک، AS جذب نمونه یا استاندارد می‌باشد (۳۲، ۳۳).

ارزیابی میزان شلات کنندگی آهن

اندازه گیری قدرت شلاته کنندگی آهن با روش دینز انجام شد. به ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف هر عصاره ۰/۰۵ میلی لیتر محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن II اضافه شد و پس از ۵ دقیقه ۰/۱ میلی لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه گردید و با آب، به حجم ۳ میلی لیتر رسانده شد. پس از ۱۰ دقیقه آنکوبه شدن در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین، با کمک فرمول شماره ۳ محاسبه شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100 \quad \text{فرمول شماره ۳}$$

در فرمول شماره ۳، AB جذب بلانک و AS جذب نمونه یا استاندارد EDTA به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. فعالیت شلاته کنندگی آهن به صورت IC50 بیان شد. در این آزمایش نیز محلول بلانک شامل تمامی اجزای شرکت کننده در واکنش به جز عصاره بوده است (۳۲، ۳۳).

روش تست‌های حیوانی

آماده سازی نمونه‌ها

از پودر خشک عصاره‌ی خیساندن به عنوان موثر ترین عصاره، محلول‌هایی با غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در نرمال سالین تهیه شد.

حیوان مورد مطالعه

موش‌های سوری نر با سن ۱۰-۸ هفته‌ای که از موسسه تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهیه گردید. در این مطالعه از ۱۰ گروه و در هر گروه از ۷ سر موش سوری با وزن ۲۰-۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی دوره ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی (نگهداری شد. پودر غذا و آب جهت تغذیه در دسترس آن‌ها قرار گرفت.

هیپوکسی خفگی

دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تهیه شد. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از هر عصاره، حیوان در یک محفظه شیشه‌ای در بسته و مهر و موم شده توسط پارافیلیم، به حجم ۳۰۰ میلی لیتر قرار گرفت. از مقداری آهک در پارچه توری به عنوان جاذب CO₂ استفاده شد. موش‌ها بر اثر کمبود اکسیژن محیط (هیپوکسی) تشنج گرفته و مردند. اثر ضد هیپوکسی عصاره به صورت زمان زنده بودن موش (به دقیقه) بیان گردید. از نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و از فنی توئین (i.p. 50 mg/kg) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۳۴، ۳۵). در این تست در هر گروه از ۷ موش استفاده گردید.

هیپوکسی خونی

در این روش از نیتريت سدیم به عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی خونی استفاده شد. دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره تهیه شد. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از عصاره به موش، ۳۶۰ mg/kg NaNO₂ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. اثر ضد هیپوکسی به صورت زمان زنده

ماندن در مقایسه با گروه کنترل نرمال سالین بیان گردید (۳۴، ۳۵).

هیپوکسی وابسته به گردش خون

در این روش از سدیم فلورید به عنوان عامل ایجاد کننده هیپوکسی وابسته به گردش خون، استفاده شد، و دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره متانولی تهیه گردید. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی دوزهای مورد نظر از عصاره به هر موش NaF با دوز ۱۵۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق گردیده و درصد فعالیت در مقابل کنترل به صورت زمان زنده ماندن در مقایسه با نرمال سالین سنجیده شد. (۳۴، ۳۵).

تمامی اندازه گیری ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت Mean \pm SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن برای مقایسه میانگین ها به کار رفت. نتایج با احتمال $p > 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت های مربوطه به دست آمد. برای ترسیم منحنی ها از برنامه گراف پند پریم ۵ استفاده شد.

یافته ها

نتایج راندمان استخراج، محتوای تام فنولی و

فلاونوئیدی

پس از انجام فرآیند عصاره گیری وزن عصاره ها محاسبه شد. بازده هر یک از آنها در جدول شماره ۱ آمده است. عصاره حاصل از روش سوکسله با ۴۳ درصد راندمان، بالاترین مقدار را نشان داد. این روش به طور معنی داری راندمان بالاتری نسبت به سایر روش ها از خود نشان داد ($p > 0.001$). محتوای تام فنلی عصاره ها به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره و محتوای تام فلاونوئیدی به

صورت میلی گرم معادل کوئرستین QE در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین نیز در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: راندمان استخراج، محتوای تام فنولی و

فلاونوئیدی عصاره های متانولی اندام هوایی گیاه تره

عصاره حاصل از روش های مختلف استخراج	راندمان (%)	میلی گرم معادل گالیک اسید	میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره
سوکسله	۴۳/۰	۶۷/۰ \pm ۱/۵	۳۶/۹ \pm ۱/۷***
اولتراسونیک	۲۵/۱	۸۹/۱ \pm ۳/۳***	۲۶/۴ \pm ۰/۹
ماسراسیون	۳۶/۷	۷۵/۸ \pm ۲/۱**	۲۷/۵ \pm ۰/۸ ^{ns}

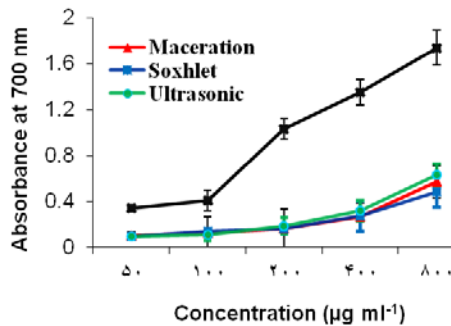
هر یک از مقادیر جدول، میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می باشد.

0.05 < P < 0.01 **، p < 0.001 *** نسبت به گروه کنترل.

عصاره حاصل از روش التراسونیک $89/1 \pm 3/3$ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بوده است ($p < 0.001$). عصاره حاصل از روش سوکسله با $36/9 \pm 1/7$ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بالاترین مقدار فلاونوئید تام را از خود نشان داد ($p < 0.001$).

نتایج بخش آنتی آکسیدانی

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر قدرت به دام اندازی رادیکال DPPH عصاره ها ناشی از خیساندن بالاترین اثر را از خود نشان داد. مقدار IC_{50} $12/7 \pm$ ۶۲۲/۶ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. این اثر به طور معنی داری بالاتر از اثر عصاره حاصل از روش التراسونیک بوده است ($p > 0.001$). نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. عصاره ها فعالیت خوبی در این تست نشان ندادند. عصاره حاصل از خیساندن با IC_{50} $13/5 \pm$ ۸۵۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، قوی تر از بقیه بوده است. این اثر نیز به طور قابل ملاحظه ای بالاتر از اثر عصاره حاصل از روش التراسونیک بود ($p > 0.001$).



نمودار شماره ۱: تأثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی عصاره‌های تیره، ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت به کار رفت.

بین عصاره‌ها اختلاف معنی داری وجود نداشته است ($p < 0.05$). اما اختلاف معنی داری بین ویتامین ث و عصاره‌ها وجود داشت ($p > 0.001$).

نتایج تست هیپوکسی

بررسی اثرات آنتی هیپوکسی خونی

نتایج حاصل از تزریق نیتريت سدیم NaNO_2 به میزان 360 mg/kg در جدول شماره ۳ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه می‌باشد و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۳: فعالیت آنتی هیپوکسی عصاره‌ی متانولی با

روش خیساندن در هایپوکسی خونی در موش های سوری نر	۵۰۰	۲۵۰	نرمال سالین
	$17.93 \pm 1.98^{***}$	$15.47 \pm 1.33^*$	12.93 ± 1.73
			انحراف معیار \pm میانگین

در مقایسه با گروه کنترل $p < 0.05$ ، $*** p < 0.001$

عصاره با دوز 500 mg/kg در هیپوکسی خونی نسبت به گروه کنترل فعالیت قابل توجه‌ای از خود نشان داد ($p > 0.001$) و به صورت بارزی زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت. در دوز 250 mg/kg نیز اختلاف معنی داری با گروه کنترل مشاهده شد ($p > 0.05$). موش‌ها در گروه کنترل در مدت زمان 12.93 ± 1.73 دقیقه مردند. نمودار شماره ۲

نتایج حاصل از تأثیر روش استخراج بر میزان قدرت شلاته کنندگی آهن نیز خوب نبوده است و عصاره‌ها فعالیت خوبی در این تست نشان ندادند. به همین دلیل توانایی عصاره‌ها در شلاته کردن آهن، تست صرفاً در یک غلظت بالا (1600 میکرو گرم در میلی‌لیتر) گزارش گردید. عصاره‌ی حاصل از روش سوکسله و خیساندن قوی‌تر از عصاره‌ی التراسونیک بوده است ($p > 0.001$). عصاره در این غلظت بیش از 49 درصد مهار از خود نشان داد و EDTA به عنوان استاندارد به کار رفت. این ترکیب فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داده است و میزان IC_{50} این ترکیب $18/1 \pm 1/0$ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول شماره ۲: تأثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی

اکسیدانی عصاره‌های متانولی اندام هوایی گیاه تیره

عصاره حاصل از روش های مختلف استخراج	به دام اندازی رادیکال NO	به دام اندازی رادیکال DPPH	شلاته کنندگی آهن
	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g ml}^{-1})^b$	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g ml}^{-1})^a$	(درصد) در غلظت $1/6 \text{ mg ml}^{-1} c$
روش سوکسله	$914/6 \pm 7/9^{***}$	$658/9 \pm 11/3^{***}$	$49/9 \pm 1/2^{***}$
روش اولتراسونیک	$154/4 \pm 14/7$	$764/8 \pm 10/9$	$25/7 \pm 0/5$
روش ماسیراسیون	$851/5 \pm 13/5^{***}$	$622/6 \pm 12/7^{***}$	$49/4 \pm 0/8^{***}$

هریک از مقادیر جدول، میانگین به دست آمده از سه

آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می‌باشد.

IC_{50} a IC_{50} ترکیب BHA $52/82 \pm 3/2$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

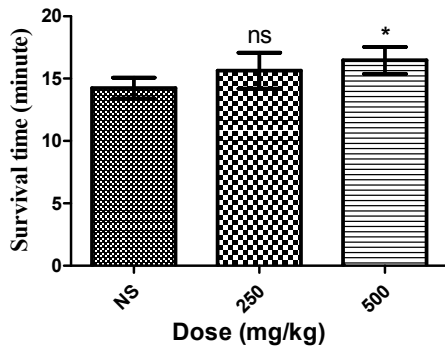
IC_{50} b ترکیب کورتستین $195/0 \pm 6/4$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

IC_{50} c ترکیب EDTA $18/1 \pm 1/0$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

نتایج حاصل از تست احیا کنندگی در نمودار شماره

۱ آمده است. در تست احیا کنندگی، عصاره‌ها اثر ضعیفی از خود نشان دادند. اختلاف معنی داری بین عصاره‌ها وجود نداشته است ($p < 0.05$). ویتامین ث که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، اثر احیا کنندگی بالایی از خود نشان داد که به مراتب بالاتر از عصاره‌ها بوده است ($p > 0.001$).

مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌هایپوکسی عصاره‌ی متانولی تره در هایپوکسی خونی در موش‌ها را نشان داده است.



نمودار شماره ۳: مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌هایپوکسی عصاره‌ی متانولی گیاه تره در هایپوکسی گردش خون
 $p > 0.05$ ns و $p < 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

بررسی اثرات آنتی‌هایپوکسی خفگی

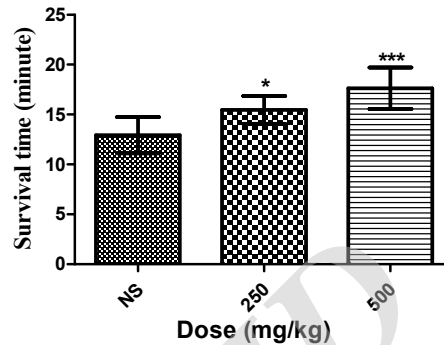
نتایج حاصل از شرایط کمبود اکسیژن برای تست خفگی در جدول شماره ۵ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از قرارگیری در محفظه بسته دچار تشنج و مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۵: بررسی اثرات آنتی‌هایپوکسی خفگی در موش‌های سوری نر

فنی توئین	۵۰۰	۲۵۰	نرمال سالین	انحراف معیار ± میانگین
	± ۱/۹۲ ***	± ۲/۶۳ ***	± ۱/۷۸ ***	۱۵/۸۱ ± ۱/۷۵
	۳۹/۸۰	۲۸/۵۸	۲۰/۶۷	

*** $p > 0.001$ نسبت به گروه کنترل

دوز ۵۰۰ mg/kg به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل زمان مرگ را به تعویق انداخت ($p > 0.001$) (حدود ۲۸ دقیقه در مقایسه با گروه کنترل). در دوز ۲۵۰ mg/kg نیز زمان مرگ موش‌ها به تعویق افتاد. این اثر نیز قابل ملاحظه بود ($p > 0.001$) (حدود ۵ دقیقه تعویق در زمان مرگ). زنده ماندن در گروه‌های دریافت‌کننده فنی توئین $1/92 \pm 39/80$ دقیقه بود که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($p > 0.001$). هم‌چنین زنده ماندن در گروه‌های دریافت‌کننده فنی توئین به طور معنی‌داری از گروه دریافت‌کننده



نمودار شماره ۴: مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌هایپوکسی عصاره‌ی متانولی تره در هایپوکسی خونی در موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ ***

بررسی اثرات آنتی‌هایپوکسی وابسته به گردش خون

نتایج حاصل از تزریق سدیم فلوراید به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جدول شماره ۴ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بیان شده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را نمایش می‌دهد.

جدول شماره ۴: بررسی اثرات آنتی‌هایپوکسی وابسته به

گردش خون در موش‌های سوری نر

۵۰۰	۲۵۰	نرمال سالین	انحراف معیار ± میانگین
۱۶/۴۷ ± ۱/۱۶ *	۱۵/۶۴ ± ۱/۸۷ ^{ns}	۱۴/۲۳ ± ۰/۸۰	

ns $p > 0.05$ و $p > 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

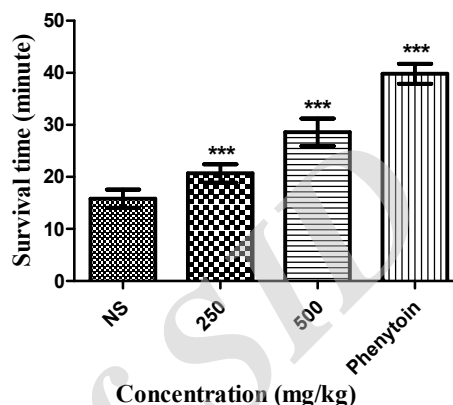
عصاره با دوز ۲۵۰ mg/kg در هایپوکسی گردش خون زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت اما این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p < 0.05$). اما عصاره با دوز ۵۰۰ mg/kg فعالیت قابل توجه‌ای از خود نشان داد ($p > 0.05$) و به طور معنی‌داری زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت. موش‌ها در گروه کنترل در مدت زمان $0/80 \pm 14/23$ دقیقه مردند (نمودار شماره ۳).

نشان داد (۳۷). نتایج مطالعه‌ی مطلبی و همکاران نشان داد که عصاره زولنگ دارای محتوی تام فنولی ۵۸/۸، ۶۰/۱ و ۱۰۵/۵ معادل میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی التراسونیک، خیساندن و سوکسله بوده است. نتایج حاکی از وجود مواد فنولی بیشتر در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بود (۳۸). در این مطالعه، عصاره حاصل از روش التراسونیک بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بوده است ($p < 0.001$). در مطالعات قبلی میزان ترکیبات پلی فنلی در سایر گونه‌های سیر *A. paradoxum*، *A. scabriscapum*، *A. rotundum* به ترتیب $4/49 \pm 1/66$ ، $0/71 \pm 24/40$ و $3/50 \pm 62/70$ GAE به دست آمده است (۲۱، ۲۳).

فلاونوئیدها به طور گسترده در گیاهان توزیع داشته و تقریباً نیمی از حدود ۸۰۰۰ فنول‌های شناسایی شده را تشکیل می‌دهند (۳۶). فلاونوئیدها مسئول ایجاد رنگ گل‌ها و میوه‌ها هستند. این ترکیبات به علت فعالیت آنتی اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند. مکانسیم عمل فلاونوئیدها به دام اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون‌ها می‌باشد (۳۶). شواهد نشان می‌دهد که بین مصرف فلاونوئیدها و ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی ارتباط معکوس وجود دارد (۳۹). در مطالعه‌ی حاضر، عصاره حاصل از روش سوکسله بالاترین مقدار فلاونوئید تام را از خود نشان داد ($p < 0.001$). بر اساس مطالعات قبلی میزان فلاونوئیدها در سایر گونه‌های سیر *A. rotundum*، *A. scabriscapum* و *A. paradoxum* به ترتیب $0/37 \pm 10/81$ ، $0/35 \pm 13/04$ و $47/90 \pm 2/60$ QE به دست آمده است (۲۱، ۲۳).

عرضه روش‌های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، به خصوص در صنایع دارویی افزایش یافته است بر این اساس، نیاز به روش ایده آل استخراج بوده که بتواند بیشترین مقدار ترکیبات فعال بیولوژیک را در کوتاه‌ترین زمان ممکن با پایین‌ترین

بالاترین دوز مؤثر تر بوده است ($p > 0.001$). در نمودار شماره ۴ مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌هایپوکسی عصاره‌ی متانولی گیاه تره در هیپوکسی خفگی نشان داده شده است.



نمودار شماره ۴: نمودار مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌هایپوکسی عصاره‌ی متانولی گیاه تره در هیپوکسی خفگی در موش‌های $p < 0.001$ سوری نر، ***

بحث

روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می‌توان به طور عمده به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد (۳۶). در مطالعه‌ای به منظور عصاره‌گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد عوامل مختلف در روش اولتراسونیک بر روی کیفیت عصاره‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نوع حلال نسبت به زمان عصاره‌گیری تأثیر بیش‌تری بر محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی دارد. عصاره متانولی حاوی مقدار بیش‌تری ترکیبات پلی فنولی نسبت به عصاره اتانولی بوده است و با افزایش زمان عصاره‌گیری، میزان ترکیبات پلی فنولی در عصاره بیش‌تر گردید. با این حال، عصاره اتانولی فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی

فلاونوئید را دارا بود، در تست DPPH و به دام اندازی H_2O_2 هم قوی ترین عصاره بود. عصاره تهیه شده به روش خیساندن در تست قدرت احیا کنندگی قوی ترین عصاره بود. فراکسیون پلی فنولی توانایی بسیار خوبی در شلات کردن آهن از خود نشان داده است (۴۴). مطلبی و همکاران گل آذین گیاه زولنگ *Eryngium caucasicum* را با سه روش عصاره نمودند و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل را با چهار روش با یکدیگر مقایسه کردند. در عمده تست ها عصاره حاصل از روش سوکسله، قوی ترین فعالیت را از خود نشان داد. اگر چه اختلاف زیادی بین این عصاره و عصاره حاصل از روش التراسونیک وجود نداشت. این مطالعه هم چنین نشان داد که روش های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئید در این گیاه موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می کنند. بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می باشد (۳۸).

قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می رود (۴۵). روش استخراج تأثیر زیادی بر فعالیت احیا کنندگی عصاره‌های حاصل داشته است. عصاره حاصل از خیساندن بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. بین عصاره‌های حاصل از زولنگ، بین سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند با اسید آسکوربیک که به عنوان استاندارد به کار رفت، اختلاف زیادی وجود داشت. آسکوربیک اسید فعالیت بالاتری نسبت به تمامی عصاره‌ها داشت ($p < 0.001$). هر سه عصاره در غلظت ۲۵ تا ۸۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر قدرت احیا کنندگی ضعیفی از خود نشان دادند (۳۸). در این مطالعه، در تست احیا کنندگی، عصاره‌ها اثر ضعیفی از خود نشان دادند. اختلاف معنی داری بین عصاره‌ها وجود نداشته است. ویتامین ث که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، اثر احیا کنندگی بالایی از خود نشان داد که به مراتب بالاتر از عصاره‌ها بود. در هیچ یک از مطالعات

قیمت به دست آورد (۴۰). گزارشات متعددی از به کارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون ها از ریشه *Radix puerariae*، هسپریدین از پوست *Citrus reticulata*، پلی ساکاریدها از پوست میوه *longan* و ترکیبات فنولی از غلات در دست است (۴۰). در این گزارشات نشان داده شده است که روش التراسونیک به طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش زمان و کاهش حجم حلال مصرفی می شود. در یک مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Agrimonia pilosa* با کمک روش استخراج التراسونیک و روش سوکسله با یکدیگر مقایسه شده است. در این مقاله نشان شد که هر دو روش در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه مؤثر و کارآمد بوده و به خوبی قابل استفاده در صنایع غذایی هستند (۴۱). در مطالعه‌ای دیگر دو روش عصاره گیری قدیمی شامل دم کردن و خیساندن برای ارزیابی آنتی اکسیدان‌های عصاره‌های گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفت، نشان داد که این دو روش دم کردن شامل جوشاندن گیاهان در آب و روش ماسیراسیون شامل خیساندن گیاه در الکل برای استخراج آنتی اکسیدان‌های گیاهان دارویی مناسب هستند (۴۲). در مطالعه‌ای دیگر جهت عصاره گیری از گیاه *Cucumis melo* از روش های سوکسله، اولتراسونیک و ماسیراسیون استفاده شد. عصاره سوکسله برگ‌های گیاه، ترکیبات فنولی بیش تری نسبت به عصاره‌های دیگر داشته است. در برگ گیاه محتوای تام فنولی به صورت سوکسله > اولتراسونیک > ماسیراسیون گزارش شده است (۴۳). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تأثیر روش های مختلف استخراج در فعالیت آنتی اکسیدانی، بر روی اندام های هوایی گیاه *Crocus caspius* انجام شد. روش های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی فنولی بود. عصاره اندام هوایی که به روش اولتراسونیک تهیه شده بود و بیش ترین میزان فنول و

کاهش ورود یون‌های سدیم از غشاهای سلولی در قشر حرکتی مغز طی تولید تکانه‌های عصبی محدود می‌کند. فنی توئین با طبیعی کردن ورود سدیم به رشته‌های پورکنز در بیماران دچار آریتمی‌های ناشی از دیژیتال، اثر ضد آریتمی خود را اعمال می‌کند. این دارو برای کنترل حملات تشنجی تونیک-کلونیک و پارشیال به کار می‌رود (۴۶). در مطالعه‌ی حاضر، عصاره گیاه تره حاصل از روش خیساندن در دوز ۵۰۰ mg/kg به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل زمان مرگ را به تعویق انداخت ($p < 0/001$). حدود ۲۸ دقیقه در مقایسه با گروه کنترل). در دوز ۲۵۰ mg/kg نیز زمان مرگ موش‌ها به تعویق افتاد. این اثر نیز قابل ملاحظه بوده است ($p < 0/001$). حدود ۵ دقیقه تعویق در زمان مرگ رخ داد. زنده ماندن در گروه‌های دریافت کننده فنی توئین ۱/۹۲ ± ۳۹/۸۰ دقیقه بود که تفاوت معنی داری با گروه کنترل داشت ($p < 0/001$). همچنین زنده ماندن در گروه‌های دریافت کننده فنی توئین به طور معنی داری از گروه دریافت کننده بالاترین دوز مؤثر تر بود ($p < 0/001$). در بررسی مسمومیت‌های شیمیایی دو سری مواد وجود دارند، موادی که مسمومیت خونی ایجاد می‌کنند و موادی که مسمومیت گردش خونی ایجاد می‌کنند. در دستکاری‌هایی که در متابولیسم مغزی با مواد مختلف توسط گیسون و همکاران انجام گرفت، در کار بر روی سمیت سدیم نیتريت مشخص گردید که ارتباط نزدیکی بین واکنش اکسیداسیون و فعالیت سیستم کولینرژیک مغزی وجود دارد (۴۷). در این مطالعه، با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از هیپوکسی نیتريت سدیم، اثرات عصاره سوکسله گیاه تره در زمان زنده ماندن موش‌ها در این مدل از هیپوکسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره سوکسله ی گیاه تره با دوز ۵۰۰ mg/kg در هیپوکسی خونی نسبت به گروه کنترل فعالیت قابل توجه ای از خود نشان داد ($p < 0/001$) و

قبلی نیز در گونه‌های *A. rotundom*، *A. scabriscapum* و *A. paradoxum* فعالیت احیا کنندگی قابل ملاحظه نسبت به ویتامین ث گزارش نشده است (۲۱، ۲۳). در مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ها ناشی از خیساندن بالاترین فعالیت را در قدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH از خود نشان داد. مقدار IC_{50} ۱۲/۷ ± ۶۲۲/۶ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. در مطالعات قبلی میزان IC_{50} در سایر گونه‌های سیر *A. rotundom*، *A. scabriscapum* و *A. paradoxum* به ترتیب ۱۱/۶۴ ± ۲۸۴/۱۵، ۶۱۱/۱۰ ± ۶۱۱/۱۰ و ۳/۲۰ ± ۸۹۰/۹۳ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است (۲۱، ۲۳). نتایج حاصل از تأثیر روش استخراج بر میزان به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتريك اکساید نیز در جدول شماره ۲ آمده است. هیچ یک از سه عصاره فعالیت خوبی در این تست نشان ندادند. عصاره‌ی حاصل از خیساندن با IC_{50} ۱۳/۵ ± ۸۵۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، قوی‌تر از بقیه بود. در مطالعات قبلی میزان IC_{50} در سایر گونه‌های سیر *A. rotundom* و *A. scabriscapum* به ترتیب ۱۹/۶۸ ± ۴۶۴/۱۵ و ۲۳/۳۱ ± ۶۶۶/۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است. در گونه *A. paradoxum* تنها ۳۳/۳ درصد مهار در ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمده است (۲۱، ۲۳).

هیپوکسی خفگی یکی از مدل‌های رایج مورد استفاده می‌باشد که شرایط کمبود اکسیژن را در سلول تقلید می‌کند. همان‌طور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شد، در این مطالعه بعد از تزریق عصاره، افزایش در زمان زنده ماندن حیوان در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. در مطالعه‌ی مشابه، فنی توئین نیز به عنوان عامل خواب آور و پایین آورنده خلق و به عنوان کنترل مثبت استفاده گردیده است که میزان فعالیت سلولی و اکسیژن و ATP مصرفی را کمتر و مقاومت در برابر هیپوکسی را بیش تر می‌کند (۳۴). فنی توئین مانند سایر مشتقات هیدانتوئین غشاهای سلول‌های عصبی را تثبیت کرده و فعالیت تشنجی را با افزایش خروج یا

موش‌ها در گروه کنترل در مدت زمان $0/80 \pm$ ۱۴/۲۳ دقیقه مردند.

بیش‌ترین عامل موثر در افزایش زمان زنده ماندن موش‌ها وجود فلاونوئید، ترکیبات آنتی‌اکسیدان دیگر در گیاه و وجود ترکیباتی است که خون‌رسانی به اندام‌های حیاتی را افزایش می‌دهند. در بررسی اثر ضد هیپوکسی گزنه که توسط بورکوا صورت گرفت علت اثر بخشی را افزایش میزان لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها و هموگلوبولین ذکر گردید. اثرات آنتی‌هیپوکسی گزنه را به خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌پراکساید و مهار کردن زنجیره پراکسیداسیون چربی نیز ربط می‌دهند که از تخریب و مرگ سلول‌ها در برابر هیپوکسی جلوگیری می‌کنند. مکانیسم افزایش خون‌رسانی نیز در تحریک تولید هموگلوبین می‌باشد (۴۹). در مطالعه‌ای ضمن اثبات اثر محافظتی گیاه جینکو بیلوبا در برابر آسیب‌های مغزی ناشی از هیپوکسی، مشخص شد که برگ این گیاه متابولیسم تجزیه انرژی مغز در موش دچار هیپوکسی با تهویه مصنوعی را به تأخیر می‌اندازد. در این مطالعه نتیجه گرفتند که بخش غیر فلاون برگ گیاه دارای فعالیت آنتی‌هیپوکسی است. اثرات روی متابولیسم مغز برای ایجاد این فعالیت پیشنهاد شده است (۵۰).

فعالیت آنتی‌هیپوکسیک خوبی نیز در دو مدل هیپوکسی خونی و *circulatory* از *elbursense* Delphinium توسط نبوی و همکاران گزارش شده است، اثرات قوی و وابسته به دوز بوده است و عصاره این گیاه در مقادیر ۳۱/۲۵ تا ۱۲۵ mg/kg زمان مرگ را در مدل هیپوکسی خونی از ۱۱ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۹ دقیقه و در مدل *circulatory* از ۹ دقیقه برای گروه کنترل به ۱۷ دقیقه افزایش داد ($p < 0/01$) (۵۱). ابراهیم زاده و همکاران فعالیت آنتی‌هیپوکسیک دانه گیاه *Hibiscus esculentus* را در دو مدل هیپوکسی خونی و هیپوکسی وابسته به گردش خون از دانه گیاه *Hibiscus esculentus* گزارش دادند (۳۴). هم‌چنین نبوی و همکاران با بررسی اثرات آنتی‌هیپوکسیک

به صورت بارزی زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت. در دوز ۲۵۰ mg/kg نیز اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/05$). موش‌ها در گروه کنترل در مدت زمان $1/73 \pm 12/93$ دقیقه مردند. مسمومیت شیمیایی دیگری که به بررسی آن پرداخته شده است، مسمومیت گردش خون بود. در این مسمومیت مواد شیمیایی سبب لیز شدن هموگلوبین شده، در نتیجه ظرفیت حمل اکسیژن کاهش می‌یابد و سلول با وجود سالم بودن سیستم‌های آنزیمی و عملکردی دچار هیپوکسی و مرگ می‌گردد. در ایجاد این مسمومیت در این مطالعه از سدیم فلوراید به این منظور استفاده گردید. فلوراید اثرات خود را با توجه به غلظت تزریق شده به صورت حاد و مزمن نشان می‌دهد. در غلظت‌های بالا که سبب مسمومیت حاد می‌گردد، این ماده سبب لیز هموگلوبین شده که در نتیجه سبب وارد شدن ترکیبات موجود در ساختار آن به داخل خون می‌شود. از جمله این ترکیبات هیستامین موجود در این زنجیره می‌باشد که در اکثر مقالات به افزایش این ماده در این مسمومیت و شاخص این مسمومیت از آن یاد گردیده است. در مسمومیت مزمن این ماده سبب تضعیف مغز استخوان می‌گردد که در نتیجه تولید لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها در بدن را فلج کرده، و سبب مرگ سلول در اثر نرسیدن اکسیژن به سلول‌ها می‌گردد که به دنبال آن زنجیره تنفسی سلول قطع می‌شود و سلول می‌میرد (۴۸). در تست هیپوکسی گردش خونی که توسط سدیم فلوراید القا شد استفاده از عصاره‌ی سوکسله تره در نتایجی که به دست آمد نشان داد عصاره با دوز ۲۵۰ mg/kg در هیپوکسی گردش خون، زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت اما این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). اما عصاره با دوز ۵۰۰ mg/kg فعالیت قابل توجه‌ای از خود نشان داد و به طور معنی‌داری زمان مرگ را نسبت به گروه کنترل به تأخیر انداخت ($p < 0/05$).

عصاره خیساندن، منجر شده تا این عصاره برای فعالیت آنتی هیپوکسی انتخاب شود. این عصاره با انجام تست‌های مربوط به خفگی در هر سه مدل هایپوکسی خونی، وابسته به گردش و خفگی توانست اثرات محافظتی خوبی در افزایش زمان زنده ماندن موش‌ها در شرایط هایپوکسی از خود نشان دهد.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه دوره دکترای حرفه‌ای آقای فریبرز مهرداد فر در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد.

References

- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J Med Plants Res.* 2011; (7): 1128-1133.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002; 113(Suppl 98): 71S-88S.
- Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effect 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.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of the bulb and aerial parts of *Ornithogalum sintenisii* L (Liliaceae) at flowering stage. *Trop J Pharm Res.* 2010; 9(2): 141-148.
- 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. *Int Food Res J.* 2014; 21(2):783-788.
- Sharma VD, Sethi MS, Kumar A, Rarotra JR. Antibacterial property of *Allium sativum* in vivo and in vitro studies. *Indian J Exp Biol.* 1980; 15(6): 466 - 469.
- Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and Streptozotocin -induced diabetic rats. *Juglans regia* در دو مدل هایپوکسی خونی و هایپوکسی وابسته به گردش خون، نشان دادند که این گیاه قادر است مرگ ناشی از هایپوکسی را به تعویق بیاورد (۵۲).

یکی از اهداف این مطالعه تعیین تأثیر متد استخراج بر محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی گیاه تره بوده است. نتایج نشان داد که عصاره حاصل از استخراج به کمک روش سوکسله در مقایسه با روش‌های ماسراسیون و التراسونیک دارای بالاترین راندمان استخراج و هم‌چنین بیش‌ترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی بود. بیش‌ترین راندمان ترکیبات فنولی در عصاره‌گیری به روش التراسونیک بوده است. با این حال نتایج نشان داد که عصاره حاصل از روش خیساندن بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشد. این فعالیت خوب

- Phytomedicine. 2006; 13(9-10): 624 - 629.
8. Augusti KT. Therapeutic values of onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*). *Indian J Exp Biol*. 1996; 34(7): 634-640.
 9. Elkayam A, Mirelman D, Peleg E, Wilchek M, Miron T, Rabinkov A. The effects of allicin on weight in fructose-induced hyperinsulinemic, hyperlipidemic, hypertensive rats. *Am J Hypertension*. 2003; 16(12): 1053-1056.
 10. Mathew PT, Augusti KT. Studies on the effect of allicin (diallyl disulphide-oxide) on alloxan diabetes: part I hypoglycaemic action and enhancement of serum insulin effect and glycogen synthesis. *Indian J Biochem Biophys*. 1973; 10(3): 209 - 212.
 11. Sheela CG, Augusti KT. Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn. *Indian J Exp Biol*. 2012; 30(6): 523-526.
 12. Liu C, Hse H, Lii C, Chan P, Sheen L. Effect of garlic oil & diallyl trisulfid on glycemic control in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2005; 516(2): 165-173.
 13. Sheela CG, Kumud K, Augusti KT. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Med*. 1995; 61(4): 356-357.
 14. Maisashvili MR, Gvazava LN, Kuchukhidze JK. Flavonoids and coumarins from *Allium rotundum*. *Chem Nat Compd*. 2009; 45(1): 87-88.
 15. Maisashvili MR, Kuchukhidze DK, Gvazava LN, Eristavi LI. Steroidal Glycosides from *Allium rotundum*. *Chem Nat Compd*. 2008; 44 (4): 545-547.
 16. Tosun A, Bahadır Ö, Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in turkey. *Turk J Pharm Sci*. 2006; 2(3): 167-176.
 17. Hadačová V, Vacková K, Klozová E, Kutáček M, Pitterová K. Cholinesterase activity in some species of the *Allium* genus. *Biologia Plantarum*. 1983; 25(3): 209-215.
 18. Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh MA, Fathi H, Rezaei Anzahaie F. Scolicidal effect of *Allium sativum* flowers on hydatid cyst protoscolices. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(1): 129-132.
 19. Nabavi SM, Hajizadeh Moghaddam A, Fazli M, Bigdellou R, Mohammadzadeh S, Nabavi SF, et al. Hepatoprotective activity of *Allium paradoxum*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 16(Suppl 3): 43-46.
 20. Khodadadi S, Nejadstari T, Naqinezhad A, Ebrahimzadeh MA. Diversity in antioxidant properties and mineral contents of *Allium paradoxum* in the Hyrcanian forests, Northern Iran. *Biodiversitas*. 2015; 16(2): 281-287.
 21. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Central European Journal of Biology*. 2010; 5(3): 338-345.
 22. Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Eslami B, Jafari N. In vitro antioxidant and antihemolytic activities of hydroalcoholic extracts of *Allium scabriscapum* Boiss. & Ky. aerial parts

- and bulbs. *Int J Food Prop.* 2013; 16(4): 713-722.
23. Assadpour S, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA. In vitro antioxidant and antihemolytic effects of the essential oil and methanolic extract of *Allium rotundum* L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(24): 5210-5215.
 24. Mousavi A, Kashi A. Characterization of an *Allium* cultivated in Iran: the Persian leek. *Belgian Journal of Botany.* 2006; 139(1):115-123.
 25. Rojhan MS. *Food and Cure.* Tehran: Khayyam Pub, 1981. pp.77.
 26. Avicenna AA. *Canon of Medicine. V II*, Translated By: Jamia Hamdard, New Delhi University, India, 1998, pp.382.
 27. Fattorusso E, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O. Antifungal N-feruloyl Amides from roots of *Alliums* species. *Plant Biosyst.* 1999; 133(2): 199-203.
 28. Silva TMS, Nascimento RJB, Camara CA, Castro RN, Braz-Filho R, Agra MF, et al. Distribution of flavonoids and N-trans-caffeoyltyramine in *Solanum* subg. *Leptostemonum*. *Biochem Syst Ecol.* 2004; 32(5): 513-516.
 29. Fattorusso E, Lanzotti V, Tagliatalata-Scafati O, Cicala C. The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistry.* 2001; 57(4): 565-569.
 30. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad Res.* 2002; 36(2): 217-233.
 31. 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 Pro Res.* 2012; 26(24): 2353-2357.
 32. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15(6): 658-664.
 33. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. *Pharmacologyonline.* 2009; 2: 644-650.
 34. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihypoxic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* seeds. *Grasas Y Aceites.* 2010; 61(1): 30-36.
 35. Khalili M, Ebrahimzadeh MA, Omrani F, Karami M. Antihypoxic activities of the Golden Chanterelle Mushroom, *Cantharellus cibarius* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms.* 2014; 16(4): 339-344.
 36. Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem.* 1996; 7: 66-76.
 37. Falleh H, Ksouri R, Lucchessi ME, Abdelly C, Magné C. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L

- Aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2012; 11(2): 243-249.
38. Motallebi Riekandeh S, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Antioxidant activities of *Eryngium caucasicum* Inflorescence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(5): 946-949.
 39. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk: ten year follow-up of the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1997; 349(9053): 699.
 40. Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Xu G, Liu D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason Sonochem*. 2008; 15(3): 227-232.
 41. Li HB, Jiang Y, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 388(2): 483-488.
 42. He C, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res*. 2010; 9(5): 448-461.
 43. Ebrahimzadeh M A, Askari M, Forouzani M. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *Cucumis melo* L. fruit and leaves. *Int J Forest Soil Erosion*. 2013; 3(3): 95-99.
 44. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods. *Pak J Pharm Sci*. 2016; 29(3): 773-777.
 45. Ebrahimzadeh MA, Nabavi S, FNabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculenus* leaves. *Pharmacologyonline*. 2009; 2: 1097-1105.
 46. Imaizumi S, Suzuki J, Kinouchi H, Yoshimoto T. Superior protective effects of phenytoin against hypoxia in a pharmacological screening test. *Neurol Res*. 1988; 10(1): 18-24.
 47. Gibson GE, Shumada M, Blass JP. Alterations in acetylcholine synthesis and cyclic nucleotides in mild cerebral hypoxia. *J Neurochem*. 1978; 31(4): 757-760.
 48. Khalili M, Dehdar T, Hamed F, Ebrahimzadeh MA, Karami M. Antihypoxic activities of *Eryngium caucasicum* and *Urtica dioica*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(17): 3282-3285.
 49. Burkova VN, Boev SG, Vengerovskii AI, Yudina NV, Arbuzov AG. Antihypoxic and hemostimulating actions of a nettle extract prepared by a nanotechnological approach. *Pharm Chem J*. 2010; 44(3): 141-143.
 50. Oberpichler H, Beck T, Abdel-Rahman MM, Bielenberg GW, Krieglstein J. Effects of *Ginkgo biloba* constituents related to protection against brain damage caused by hypoxia. *Pharmacol Res Commun*. 1988; 20(5): 349-368.
 51. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Mahmoudi M, Eslami B and Dehpour AA. Biological and pharmacological effects of *Delphinium*

- elbursense. Afr J Biotechnol. 2010; 9(34): 5548-5555.
52. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Keyvani Rad Sh. Biological activities of Juglans regia flowers. Rev Brasil Farmacog. 2011; 21(3): 465-470.

Archive of SID