بررسی میزان فنل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی صمغ گیاه *Pistacia atlantica* از منطقه سراوان (استان سیستان و بلوچستان)

زهرا صادقی[۱]، جعفر ولی‌زاده[۲]، امید عزیزیان شرمه[۳]*

[۱]مربی، دانشکده کشاورزی و منابع‌طبیعی مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران
[۲]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
[۳]کارشناس‌ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۱/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۲

چکیده

صمغ درخت بنه *Pistacia atlantica* در طب سنتی بلوچستان به‌صورت خوراکی و موضعی در درمان بیماری‌های عفونی به کار می‌رود. در این پژوهش مقدار فنل، فلاونوئید کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آلی و آبی صمغ و دود حاصل از سوزاندن صمغ بنه بررسی شد. برای سنجش میزان فنل و فلاونوئید به‌ترتیب از معرف‌های فولین سیوکالتیو و $AlCl_3$ و برای اندازه‌گیری پتانسیل آنتی‌اکسیدانی از دو روش DPPH و FRAP استفاده شد. نتایج نشان داد محتوای فنلی و فلاونوئیدی برای نمونه‌ها به‌ترتیب در محدوده ۷/۰٤– ٤/۰۷ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک و ۱/۳٤–۰/٦٥ میلی‌گرم کوئرسیتی در هر گرم وزن خشک می‌باشد که عصاره متانولی صمغ با ۰/۱۵±۷/۰٤ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک بیشترین مقدار فنول و با ۰/۱۳±۱/۳٤ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک بیشترین مقدار فلاونوئید نسبت به سایر عصاره‌ها برخوردار بود .در ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH محدوده غلظت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد توسط عصاره‌ها µg/ml ۳٤۰/۰۸–۱۲۲/۰٤۳ می‌باشد که عصاره متانولی صمغ با مقدار ۱۲۲/۰٤۳±۲/۳µg/ml دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی است. توان آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP در محدوده (mM Fe^{2+}/ mg sample) ۳۳/٤٤–۱٦/۰۳ می‌باشد که عصاره متانولی با مقدار mM Fe^{2+}/mg sample ۳۳/٤٤±۱/۷ از توان بالاتری برای احیای آهن برخوردار است و اینکه عصاره‌های کلروفرمی از مقادیر کم فنل، فلاونوئید و حداقل فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخوردار است. میزان همبستگی داده‌ها با نرم‌افزار SPSS بررسی گردید. صمغ گیاه بنه به دلیل تولید ترکیبات فنلی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی نیز برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، بنه، ترکیبات فنلی، فلاونوئید، سیستان و بلوچستان

*نویسنده مسئول: omid_aziziyan@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو در سلول‌ها را کاهش داده و قادر به مهار رادیکال‌های آزاد، جلوگیری از اکسیداسیون، تقویت دستگاه ایمنی و دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدسرطانی و کاهش علایم آسیب‌های مغزی، کاتاراکت، رتینوپاتی و دیابت هستند (Ebrahimzadeh 2008; Mohajerani 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها به دو صورت طبیعی و سنتزی وجود دارند. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر TBHQ، BHT، BHA همانند سایر افزودنی‌های شیمیایی به‌دلیل سمیت احتمالی و سرطان‌زایی آنها، محدود شده است. امروزه بیشتر تحقیقات صورت گرفته بر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های جدید و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی تمرکز یافته است (Mohammadi *et al.,* 2014; Pourreza, 2013. ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاهان از آنتی اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند که توان آنتی اکسیدانی مشابهی با آنتی اکسیدان‌های سنتزی، بدون اثرات جانبی دارند (Shashi *et al.,* 2014; Salmanian *et al.,* 2013).

از این رو تجویز آن‌ها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مفید و مؤثر است. ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها دسته‌ای از ترکیبات فیتوشیمیایی هستند که انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت بیولوژیکی متنوع این ترکیبات از جمله فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدالتهاب و گشاد کنندگی عروق آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshidi *et al.,* 2010). این دسته از ترکیبات با داشتن خواص بیولوژیکی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند (Shariatifar *et al.,* 2012).

پسته با نام علمی *Pistacia* (تیره *Anacardiaceae*) شامل ۱۵ گونه است که سه گونه آن شامل پسته خندان[1]، بنه[2] و خنجوک[3] در ایران وجود دارد (Taran *et al.,* 2010). بنه به‌صورت درختان کوتاه و یا درختچه‌ای یکی از مهمترین گونه‌های وحشی پسته است که دارای ۳ زیرگونه کابولیکا[4]، کردیکا[5] و موتیکا[6] می‌باشد. این گیاه از جزایر قناری و کشورهای ساحل دریای مدیترانه تا آسیای صغیر، سوریه، قفقاز، ایران، افغانستان و پاکستان انتشار می‌یابد. بنه در ایران در حد فاصل استان‌های فارس و کردستان به‌صورت انبوه و در بقیه نقاط کشور به‌صورت پراکنده دیده می‌شود (Saffarzadeh et al., 1999; Daryaei *et al.,* 2012; Salimi *et al.,* 2011).

مناطق انتشار بنه در منطقه بلوچستان ارتفاعات تفتان، ارتفاعات ناهوک سراوان و بیرک مهرستان و ارتفاعات سرباز و لاشار است (Ghanavati *et al.,* 2003). میوه بنه در حالت تازه کمی گرم و خشک بوده و مدر و قاعده آور است. میوه خشک آن بدلیل چربی بالای آن مصرف خوراکی دارد و از آن برای تهیه غذا استفاده می‌کنند. روغن مغز میوه بنه گرم و خشک و برای تقویت اعصاب، قوای جنسی، معده و کلیه بسیار مفید است. صمغ حاصل از تنه درخت بنه دارای خاصیت ضدعفونی کننده می‌باشد. برای تسکین زخم معده و ناراحتی‌های گوارش به کار می‌رود و برای خوشبو کردن دهان به عنوان آدامس باعث استحکام بافت لثه می‌شود. همچنین ملین، مدر تسکین دهنده و ضد نفخ می‌باشد. در زبان بلوچی به بنه، گون یا ون گویند و سقز بدست آمده از بنه گُونجک نامیده می‌شود. در میان مردم بلوچ صمغ این گیاه برای التیام زخم و بیماری‌های حرکتی مورد استفاده است. علاوه

1. *Pistacia vera*
2. *Pistacia atlantica*
3. *Pistacia khinjuk*
4. Cabulica
5. Kurdica
6. Mutica

www.SID.ir

بر این، صمغ این گیاه به صورت خوراکی (جوشانده) و موضعی (دود و شستشو) برای درمان بیماری‌های عفونی واژینال توسط زنان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bozorgi *et al.*, 2013; Mosaddegh *et al.,* 2012; Sadeghi *et al.,* 2014). در عصاره مجاری رزینی بنه، هم صمغ و هم رزین وجود دارد که برای سهولت، فقط از اصطلاح صمغ در متن استفاده شده است. تاکنون مطالعات فارماکولوژیکی مختلفی نظیر خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بر روی میوه و برگ گیاه بنه انجام شده است. بهره بر و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی میوه بنه را به صورت برون تنی و درون تنی در موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد عصاره متانولی بنه دارای بیشترین مقدار متابولیت‌های شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود (Bahrebar *et al.,* 2012). پکسل[1] و همکاران اثرات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی استیل کولین استرازی عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی برگ گیاه بنه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد هردو عصاره اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی را در مقایسه با نمونه‌های سنتزی نظیر BHT و BHA و ά توکوفرول نشان دادند. فعالیت بازدارندگی آنزیم استیل کولین استراز عصاره اتیل استات بیش از اثرات بازدارندگی عصاره متانولی می‌باشد (Peksel *et al.,* 2010). در تحقیق دیگری که توسط بنهامو و همکاران فعالیت آنتی‌میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های برگ بنه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج یک اثر ضد قارچ قوی و ضد باکتری ضعیف و همچنین قدرت کاهندگی قوی را با معرف‌های EEPL وEEPA در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد اما توان روبندگی آنیون سوپر اکساید عصاره‌ها پایین بود (Benhammou *et al.,* 2008). توحیدی و همکاران نیز اثرات انتی باکتریال گونه خنجوک و بنه را مطالعه کردند که گونه بنه از اثرات ضدباکتری کمتری نسبت به گونه خنجوک برخوردار بود (Tohidi *et al.,* 2011). حاتم نیا و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار فنل کل قسمت‌های مختلف میوه ۵ ژنوتیپ بنه را مورد مطالعه قرار دادند (Hatamnia *et al.,* 2014). تحقیقات زیادی بر روی صمغ گیاه بنه انجام نگرفته است. حسینی و همکاران فعالیت ضد باکتریایی اسانس صمغ بنه منطقه بوکان (غرب ایران) را مورد مطالعه قرار دادند (Hosseini *et al.,* 2013). سلیمی و همکاران اسانس صمغ بنه منطقه بانه استان کردستان را آنالیز کرده و ترکیبات اصلی اسانس را مشخص کردند (Salimi *et al.,* 2011). با توجه به این که عوامل بسیار زیادی از جمله اقلیم، خاک و ارتفاع، اختلاف در گونه‌های گیاهی، روش‌ها و حلال‌های استخراج و روش‌های مختلف اندازه گیری در میزان متابولیت‌های ثانویه از جمله فنل تام و خواص آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند (Mirzaei *et al*., 2011)، ضرورت انجام تحقیق بروی میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بنه در منطقه سراوان قابل توجیه است. این مطالعه، میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در عصاره‌های آبی و آلی صمغ و برای اولین بار در دود طبی حاصل از سوختن صمغ که بیشتر برای درمان بیماری‌های عفونی به کار می‌روند مورد بررسی قرار می‌دهد.

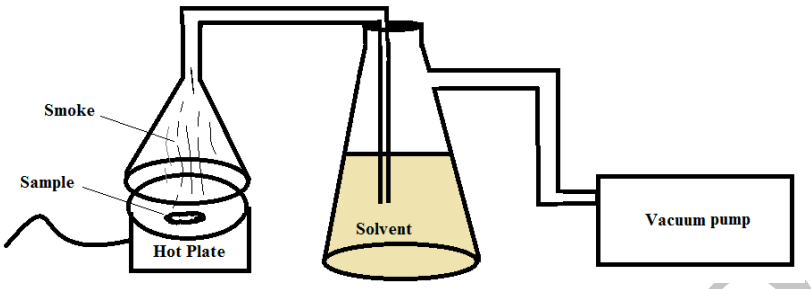
مواد و روش‌ها

در این تحقیق آزمایشگاهی صمغ تازه درخت بنه در خردادماه ۱۳۹۳ از عطاری شهرستان سراوان خریداری شد. برای تهیه هریک از عصاره‌های آبی و آلی مقدار ۵ گرم از نمونه به دقت توزین و به کار رفت. عمل عصاره‌گیری از صمغ بنه توسط حلال‌های متانول، آب و کلروفرم به روش خیساندن به مدت ۴۸ ساعت انجام شد (Zohouri *et al.,* 2014). عمل استحصال دود توسط دستگاه طراحی شده به این

1. Peksel

www.SID.ir

منظور (شکل ۱)، در ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول انجام شد. به منظور جلوگیری از تخریب شدید ترکیبات موثره موجود در صمغ و ایجاد ترکیبات سمی و رادیکال از حرارت ملایم برای ایجاد دود استفاده شد. پس از عصاره‌گیری، حلال نمونه تبخیر و عصاره‌های تغلیظ شده برای انجام تست‌های مورد نظر در یخچال نگهداری شد.



شکل ۱- دستگاه طراحی شده به منظور استحصال عصاره متانولی دود حاصل از سوختن صمغ بنه

اندازه‌گیری مقدار فنول کل: محتوی فنول کل با استفاده از معرف فولین - سیوکالتیو توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل (UNICO UV 2100) اندازه‌گیری شد. به نیم میلی‌لیتر از عصاره‌ها (مقدار ۰/۰۰۵ گرم پودر نمونه در ۱ میلی‌لیتر متانول)، ۲ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در طول موج ۷٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد (Wojdylo *et al.*, 2007). گالیک اسید به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت و میزان فنول کل بر اساس میزان معادل "میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره" گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد.

تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل: از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئید کل استفاده شد (Chang *et al.*, 2002). هر کدام از عصاره‌های گیاهی (۰/۵ ml از ۱:۱۰ g. ml^{-1}) به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰ درصد متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب محلول‌ها در ٤۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتراندازه گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) در حلال متانول در غلظت‌های ۲۵۰-۱۰۰۰ µg. ml^{-1} تهیه شد و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط y=ax+b بدست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x یا همان غلظت (واحد) بدست آمد. آزمایشات ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی[1] به کمک ۲-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH (سیگما -آلدریچ) ترکیبی است بنفش رنگ که به‌دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن به راحتی به‌صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال

1. Radical Scavenging Capacity
2. Ferric ion reducing antioxidant power
3. Benzie
4. Strain

Archive of SID
www.SID.ir

آزاد می‌باشد. توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این تست با میزان بی رنگ کردن یا کاهش میزان جذب نوری محلول بنفش DPPH در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد (Thaipong *et al.*, 2006; Kamkar *et al.*, 2009). غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها به همرا ۱ میلی‌لیتر از DPPH۰/۱ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر متانول تهیه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPHدر مقابل بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید: $\%IP = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$

%IP: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد)

A_{blank} : جذب شاهد (که حاوی ۱ میلی‌لیتر از متانول در ۱ میلی لیتر از محلول DPPH می‌باشد)

A_{Sample}: جذب نمونه (که حاوی حجم‌های مختلفی از عصاره گیاهی (آنتی‌اکسیدان)، متانول و محلول DPPH می‌باشد)

در این تست از بوتیلات هیدروکسی تولوئن، BHT، (یک آنتی‌اکسیدان سنتزی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و کلیه آزمایشات سه بارتکرار شدند و میانگین آنها گزارش شد.

اندازه‌گیری توان آنتی اکسیدانی به روش احیاء یون آهن (III)، FRAP[۲]: برای اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن روش بنزی[۳] و استرین[۴] با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت. اصل این روش مبتنی بر کاهش کمپلکس فریک تری پیریدیل تری آزین، به فرم فروس در حضور آنتی اکسیدان‌ها است (Shahwar *et al.*, 2012; Chaouche *et al.*, 2013). در لوله آزمایش به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر حلال آب) مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از محلول تازه فرپ افزوده شد (محلول فرپ با افزودن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3.6H_2O$ قبل از انجام آزمایش تهیه شد). مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت احیاکنندگی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی مول یون آهن (II) بر میلی‌گرم وزن خشک نمونه محاسبه شد. در این آزمایش از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و پس از سه بار تکرار آزمایش، میانگین آنها گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به‌دست آمده به صورت انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) برای سه بار تکرار محاسبه و از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای بررسی رابطه بین آزمایشات آنتی اکسیدانی و فنل و فلاونوئید کل از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل و فلاونوئید کل ٤ عصاره مختلف صمغ بنه مورد سنجش قرار گرفت. غلظت تمام عصاره‌ها برای کلیه آزمایشات mg/ml ۱ به کار رفت. قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط آزمایش DPPH مورد بررسی قرار گرفت علاوه بر این روش قدرت احیاءکنندگی آهن، FRAP برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی صمغ استفاده شد. در روش DPPH با افزایش غلظت عصاره‌ها، مهار رادیکال‌ها با قدرت بیشتری صورت گرفت. برای محاسبه مقدارIC_{50} ابتدا منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری (%IP) بر حسب غلظت (µg/ml) رسم شد (شکل ۲) و معادله خط نمودار بدست آمده و با جایگزین کردن عدد ۵۰ در محور y مقدار IC_{50} از محور x محاسبه شد. غلظتی از عصاره‌ها که ۵۰ درصد مهار رادیکالی را منجر شد در جدول ۱ و در مقایسه با بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT) آورده شده است. محدوده پتانسیل آنتی اکسیدانی به روش DPPH نشان داد که عصاره متانولی

Archive of SID

www.SID.ir

صمغ با مقدار µg/ml ۲/۳ ± ۱۲۲/۰٤۳ دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی است. شکل ۳ نمودار درصد بازداری غلظت‌های مختلف عصاره صمغ بنه را در مقابل BHT، در روش DPPH نشان می‌دهد. در روش FRAP فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس توانایی احیاء یون فریک (III) به یون فروس (II) سنجیده می شود که نتایج بر حسب میلی مول یون فروس بر هر میلی گرم نمونه گزارش شد. عصاره متانولی با مقدار ۱/۷±۳۳/٤٤ از توان بالاتری برای احیای آهن برخوردار بود (جدول ۱ و شکل ۳). حداقل فعالیت آنتی اکسیدانی در هر دو روش مربوط به عصاره‌های کلروفرمی می‌باشد. به منظور ارزیابی مقدار متابولیت‌های ثانویه که مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، محتوای فنلی و فلاونوئیدی صمغ با دستگاه اسپکتروفتومتر UV- Vis مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده در جدول ۲ گزارش شده است. یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره متانولی صمغ با مقدار ۷/۰٤ ±۰/۱۵ میلی گرم گالیک اسید بر گرم نمونه، بیشترین مقدار فنول و با مقدار۰/۱۵ ± ۱/۳٤ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم خشک نمونه بیشترین مقدار فلاونوئید را به خود اختصاص داده است. نتایج ثابت کرد عصاره‌های کلروفرمی از مقادیر پایین فنل و فلاونوئید برخوردارند. در تمام تست‌های انجام شده عصاره متانولی دود در جایگاه سوم از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار کل فنل و فلاونوئید قرار گرفت. برای بررسی رابطه بین آزمایشات آنتی‌اکسیدانی، فنول و فلاونوئید کل، از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. جدول ۳ ضرایب همبستگی و سطح معنی‌داری را برای تست‌های آنتی اکسیدانی، مقدار فنول و فلاونوئید کل نشان می‌دهد.

جدول ۱-مقایسه نتایج حاصل از فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با دو روش DPPH و FRAP در مقابل BHT و آسکوربیک اسید

Sample	DPPH assay IC_{50} (µg/ml)	FRAP assay mM Fe^{2+}/ mg sample
smoke	۲۹٤/۹۸ ±٦/٥	۲۱/۸۸±۲/۲
methanol extract	۱۲۲/۰٤±۲/۳	۳۳/٤٤±۱/۷
aqueous extract	۱۸۹/٤۸±٤/۹	۲٦/٤۱± ۲/۷
chloroform extract	۳٤۰/۰٦± ۷/٦	۱٦/۰۳۱± ۱/۳
BHT	٤/۸±۰/۳۲	----
Ascorbic acid	----	٦۰/۷٥±۲/۳

جدول ۲- مقایسه مقادیرفنل و فلاونوئید کل صمغ بنه با حلال‌های مختلف

Sample	Total Flavonoids (mg Quercetin/g DW)	Phenol content (mg Galic acid/g DW)
smoke	۰/۹٦± ۰/۱۰	٥/۱۲٤ ±۰/۳٦
methanol extract	۱/۳٤±۰/۱۳	۷/۰٤±۰/۱٥
aqueous extract	۱/۲۲± ۰/۱۸	٦/۱٤±۰/۱۹
chloroform extract	۰/٦٥± ۰/۱٤	٤/۰۷± ۰/۱۲

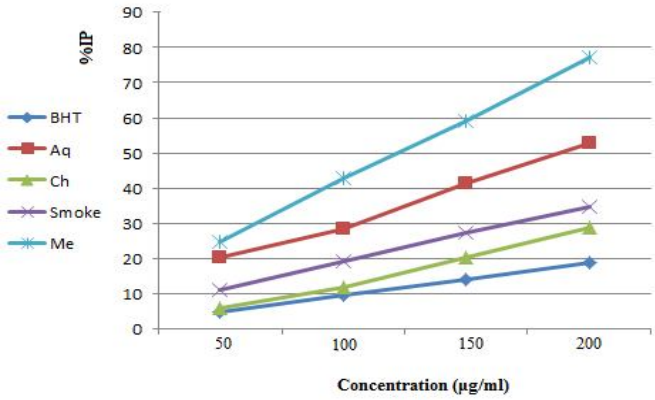
جدول ۳- میزان همبستگی میان فنول و فلاونوئید کل و مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی

سنجش آنتی اکسیدان	DPPH		FRAP	
	مقدارSig (P)	R	مقدارSig (P)	R
مقدار فنول کل	۰/۰۱۳**	-۰/۹۸۷	۰/۰۰٦	۰/۹۹٤**
مقدار فلاونوئید کل	۰/۰۳٤*	-۰/۹٦٦	۰/۰۳۱	۰/۹٦۹*

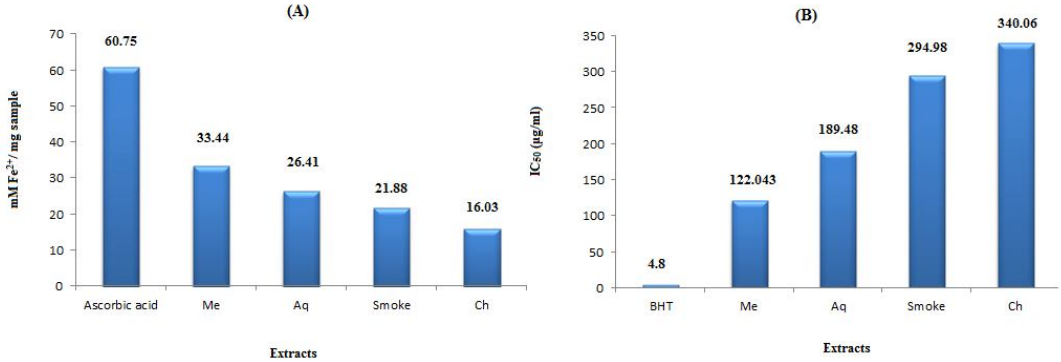
** همبستگی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است؛ * همبستگی در سطح ۰/۰٥ معنی‌دار است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- منحنی کالیبراسیونی قدرت بازداری عصاره‌های مختلف در مقابل BHT در روش DPPH



شکل ۳- پتانسیل آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره صمغ بنه، A: روش FRAP در مقایسه با آسکوربیک اسید B: روش DPPH در مقایسه با BHT

بحث

چندین روش برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی وجود دارد. بکارگیری حداقل ۲ روش برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی صحت نتایج را تایید می‌کند. در تحقیق حاضر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)، مورد سنجش قرار گرفت. از آنجا که متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنل و فلاونوئید دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند، مقدار فنول و فلاونوئید کل صمغ گیاه بنه نیز به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. در این تحقیق الگوی فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان فنل و فلاونوئید کل از بیشترین به کمترین عبارتند از:

عصاره متانولی صمغ > عصاره آبی صمغ > عصاره متانولی دود صمغ > عصاره کلروفرمی صمغ

روش فولین - سیوکالتو از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی است. اساس کار در این روش، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهد. مخلوط متانول-آب و یا متانول به تنهایی برای استخراج ترکیبات فنلی به ویژه فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی از بافت گیاهی به کار می‌رود (Mirzaei *et al.*, 2011). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد عصاره متانولی صمغ بنه منطقه سراوان دارای ۷/۰۴ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم نمونه صمغ می‌باشد. افزایش غلظت ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک ترکیبات فنلی در محیط واکنش، احتمال

Archive
www.SID.ir

دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. توانایی و قدرت مهارکنندگی فنل‌ها به‌دلیل گروه‌های هیدروکسیل در ملکول‌های آنهاست. در بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها ترکیبات آنتی اکسیدانی قویتری محسوب می‌شوند. فلاونوئیدها بازدارنده‌های قوی رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هستند. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در روش DPPH بستگی به غلظت عصاره‌های گیاهی دارد. با افزایش غلظت، توانایی دادن الکترون‌ها به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه قدرت مهارکنندگی شدت می‌یابد و واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد متوقف می‌شود (Peksel *et al.*, 2010). همچنین ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌توانند باعث افزایش احیاء آهن شوند (Pourreza *et al.*, 2013; Mirzaei *et al.*, 2011). اختلاف معنی‌دار (منفی) بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تمام نمونه‌ها به روش DPPH و مقدار فنول ($P<۰/۰۱$) و فلاونوئید کل ($P<۰/۰۵$) مشاهده گردید. همچنین در مطالعه حاضر رابطه معنی دار (مثبت) میان مقدار فنول ($P<۰/۰۱$) و فلاونوئید ($P<۰/۰۵$) و روش ارزیابی آنتی اکسیدانی FRAP مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق بهره بر همسو می‌باشد. بهره بر و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی میوه بنه به صورت برون تنی و درون تنی در موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد عصاره متانولی بنه دارای بیشترین مقدار ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی بود (Bahrebar *et al.*, 2012). یوسفی و همکاران مقدار فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدان کل قسمت‌های مختلف درخت بنه را مطالعه کردند. نتایج نشان داد عصاره‌های فنلی خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار بالایی دارند. همچنین آنها با روش‌های مختلف کروماتوگرافی قادر به جداسازی و شناسایی ترکیب آنتی اکسیدانی طبیعی از هیسپولون موجود در بنه شدند (Yousefi *et al.*, 2009). کاواشتی[1] و همکاران فلاونوئید کوئرستین ۳-گلوکوزید و همچنین آدامز[2] و همکاران ترکیب فنلی متوکسی کارپاکرومن[3] را در اندام هوایی بنه گزارش کرده‌اند (Kawashty *et al.*, 2000, Adams *et al.*, 2009). بعضی از تری ترپنوئیدهای موجود در اندام هوایی بنه توسط شریفی و همکاران شناسایی شد که شامل ماستیکادی انونیک اسید[4] و ماستیکادی انوئیک اسید[5] و مورولیک اسید[6] و اولئانویک اسید[7] و یورسونیک اسید[8] و ۳- او- استیل-۳- اپیزوماتیکادیئنولیک اسید[9] می‌باشند (Sharifi *et al.*, 2012). تاکنون مطالعات فارماکولوژی متعددی در مورد میوه و برگ بنه گزارش شده است، اما علی رغم اهمیت زیاد صمغ بنه در صنایع غذا و دارو مطالعات زیادی بر روی صمغ، انجام نشده است. حسینی و همکاران فعالیت ضدباکتریایی اسانس صمغ بنه را بر روی استرپتوکوکوس موتانز بررسی کردند نتایج فعالیت ضد باکتریایی مناسبی را برای اسانس صمغ نشان داد (Hosseini *et al.*, 2013). مهمترین مواد تشکیل دهنده صمغ شامل روغن تربانتین و کلوفان می‌باشد (Daryaei *et al.*, 2012). سلیمی و همکاران اسانس صمغ بنه را با GC-MS آنالیز کرده و ترکیبات اصلی اسانس را مشخص کردند که آلفا- پینن ۸۱/۹ درصد و مقدار بتا -پینن ۷/٤ درصد گزارش کردند(Salimi *et al.*, 2011).

در این تحقیق خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار فنول و فلاونوئید کل دود حاصل از سوختن بنه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در طب سنتی مردم بلوچ دود دادن موضع عفونت به خصوص در بیماری‌های عفونی ادراری و واژینال در زنان، توسط درمانگران محلی بسیار توصیه می‌شود. مطالعات زیادی بر روی

1. Kawashty
2. Adams
3. Methoxycarpachromene
4. Masticadienonic acid
5. Masticadienolic acid
6. Morolic acid
7. Oleanolic acid
8. Ursonic acid
9. 3-O-acetyl-3- epiisomasticadienolic acid

Archive of SID

www.SID.ir

خاصیت آنتی اکسیدانی و مقدار فنول کل دودهای طبی به خصوص دود صمغ بنه انجام نگرفته است. پروین و همکاران خواص ضد میکروبی دود حاصل از دانه‌های اسپند و سرگین را بر روی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوک اورئوس بررسی کردند که دود حاصل از سرگین اثر قابل توجهی بر میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه داشت. بسیاری از ترکیبات دود مانند فرمالدئید، استالید، متانول و بعضی از ترکیبات آروماتیک مانند فنل‌ها، گایاکل، کروزول دارای خاصیت باکتریسیدال و یا باکتریواستاتیک می‌باشند (Parvin *et al.,* 2010).

محقق زاده و همکاران نیز در مقاله خود درباره دودهای با مصارف طبی به این نکته اشاره دارد که اطلاعات اندکی در خصوص ترکیب این دودهای طبی وجود دارد. حرارت دهی موجب تبدیل مواد موجود در یک گیاه و یا فرآورده به اجزاء ریز و میکروسکوپی شده و امکان جذب بیشتر این مواد را فراهم می کند این مورد به مکانیسم نفوذ دود در سلول‌ها به نوعی اشاره دارد (Mohagheghzadeh *et al.,* 2006).

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق نشان داده شد که عصاره متانولی صمغ بنه اثرات آنتی‌اکسیدانی قویتر و میزان فنل و فلاونوئید بیشتری تسبت به دود و عصاره‌های آبی و کلروفرمی دارد. همچنین در غلظت میانگین، نتایج همبستگی معنا داری میان میزان ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی در این تحقیق را نشان داد. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت موثری به‌عنوان‌دهنده هیدروژن عمل نموده لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر عمل می‌کنند. برای استفاده عملی از خواص آنتی اکسیدانی این گیاهان در زمینه‌های مختلف، باید تحقیقات بیشتری در زمینه بنه از جمله کار آزمایشگاهی روی عصاره‌های مختلف تهیه شده از قسمت‌های مختلف این گیاه، همچنین ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره در مدل‌های غذایی انجام شود.

سپاسگزاری

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند که مراتب سپاس خود را از همکاران محترم آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، مجتمع آموزش عالی سراوان اعلام نمایند.

منابع

1. Adams, M., Plitzko, I., Kaiser, M., Brun, R., and Hamburger, M. 2009. HPLC-profiling for antiplasmodial compounds-3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*, Phytochem. Lett, 2(4):159–162.
2. Bahrebar, M., Mirzaei, A., Mantegheyan, E., and Bahrebar, A. 2012. In vivo and in Vitro Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extract of *Pistacia atlantica*, Armaghane-danesh, 17(6): 540-551
3. Benhammou, N., Bekkara, FA., and Panovska, TK. 2008, Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. Afr. J. Pharm. Pharacol., 2(2): 22-28.
4. Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, MH., Shams-Ardekani, MR., and Rahimi, R., 2013. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. The Scientific World Journal. 1-33.
5. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, J. Food Drug. Analaysis, 10: 178-182.
6. Chaouche, TM., Haddouchi, F., and Ksouri, R. 2013. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasiummajus* L. free radical Antioxidant, 3: 43-46.
7. Daryaei, MG., Hoseiny, .SK, Taheri, K., Mirzaei, J., and Mzbani, A. 2012. Effect of morphological variables of *Pistacia atlantica* on gum and seed production. Iranian journal of biology, 25(2): 303-314.
8. Ebrahimzadeh, MA., Pourmorad, F., and Hafezi, S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turk J Biol, 32: 43-49.
9. Jamshidi, M., Ahmadi, HR., Rezazadeh, S., Fathi, F., and Mazanderani, M. 2010. Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Medic Plan; 9(34):177-183.
10. Hatamnia, AA., Abbaspour, N., and Darvishzadeh, R. 2014, Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits, 15(145): 306-311.
11. Hosseini, F., Adlgostar, A., and Sharifnia, F. 2013, Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm, Int. Res. J. Biological Sci. 2(2): 1-7.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Ghanavati, F., and Moradi, F. 2003. Plants of Sistan and Baluchestan province. First edition. Publishing Sistan and Baluchistan Agricultural Jihad Organization. Zahedan. Pp 180.
13. Kawashty, SA., Mosharrafa, SAM., El-Gibali, M., and Saleh, NAM. 2000. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. Biochem. Syst. Ecol. 28(9): 915–917.
14. Kamkar, A., Asadi, F., Jebelli Javan, A., and Jamshidi, R. 2009. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian Mentha spicat, Journal of Veterinary Medicine & Laboratory, 1(1): 69-77.
15. Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N., and Mirzaei, M. 2011. The antioxidant Capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. Journal of Fasa University of medicinal sciences, 1(3): 160-166.
16. Mohajerani, M. 2012. Antioxidant activity and total phenolic content of *Nerium oleander* L. grown in north of Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(4):1121-1126.
17. Mohagheghzadeh, A., Faridi, P., Shams-Ardakani, M., and Ghasemi, Y. 2006. Medicinal smokes. J Ethnopharmacol, 108(2):161-184.
18. Mohammadi, M., Kazemi tabar, K., Asili, J., and Kamali, H. 2014. Study of the antioxidant and antibacterial activity in methanolic, dichloromethan and hexane extracts of aerial parts of *Cyperus longos*, Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 6(1):168.
19. Mosaddegh, M., Naghibi, F., Moazzeni, H., Pirani, A., and Esmaeili, S. 2012. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran, J. Ethnopharmacol, 141(1):80–95.
20. Parvin, N., Validi, M., and Banitalebi M. 2010. Effect of medicinal smokes on some nosocomial infection factors. 2010, 12(2):76-83.
21. Peksel, A., Arisan-Atac, I., Yanardag, R. 2010. Evaluation of Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of the Extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. Journal of Food Biochemistry, 34(3):451–476.
22. Pourreza, N. 2013. Phenolic Compounds as Potential Antioxidant. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 8(4): 149-50.
23. Sadeghi, Z., Kuhestani, K., Abdollahi, V., and Mahmood, A. 2014. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants of Saravan region, Baluchistan, Iran. J. Ethnopharmacol; 153: 111–118.
24. Saffarzade, A., Vincze, L., Csapo, J,. 1999, Determination of the chemical composition of Ocurn (*Quercus branti*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as non-conventional feedstuffs. Acta Agraria Kaposvariensis, 3(3): 59-69.
25. Salimi, F., Shafaghat, A., Sahebalzamani, H., and Alizadeh, MM. 2011, α-Pinene from *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *Kurdica* (Zohary) Rech. F. Der Chemica Sinica, 2(3):1-3.
26. Salmanian, Sh., Sadeghi, MAR., Alami, M., and Ghorbani, M. 2013. Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit *(Crataegus elbursensis*). Iran J. Nutr. Food Sci. Food Technol. 8(1): 177- 185.
27. Shashi, A., Sanjay, KJ., Amita, V., Mayank, K., Alok, M. and Monika, S. 2014. Herbal antioxidant in clinical practice: A review. Asian Pac J Trop Biomed, 4(1):78-84.
28. Shariatifar, N., Kamkar, A., Shams Ardakani, MR., Misaghi, A., Jamshidi, AH. and Jaed Khaniki, GR. 2012. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant *Pulicaria gnaphalodes*. Ofogh-e- Danesh J., 18(1): 35-41.
29. Sharifi, MS. and Hazell, SL. 2012. Isolation, analysis and antimicrobial activity of the acidic fractions of mastic, Kurdica, *Mutica and Cabolica* gums from Genus *Pistacia*, Global Journal of Health Science, 4(1): 217–228.
30. Shahwar, D., Asam Raza, M., Bukhari, S. and Bukhari, G. 2012. Ferric reducing antioxidant power of essential oils extracted from *Eucalyptus* and *Curcuma* species. Asian Pac J Trop Biomed, 2(3):1633-1636.
31. Taran, M., Sharifi, M., Azizi, E. and Khanahmadi, M. 2010. Antimicrobial Activity of the Leaves of *Pistacia khinjuk*, J. Med. Plants, 9(6): 81-85.
32. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., and Byrne, DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, J. Food Composit Anal., 19: 669–675.
33. Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V., and Meftahizade, H. 2011. Evaluation of antibacterial activity and wound healing of *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk*. J. Med. Plants Res., 5(17): 4310-4314.
34. Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., 2007, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, Food Chem., 105: 940–949.
35. Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Chahrazed-Hamia, A., Duhem, B., Gaydou, EM. 2009. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. Phytother. Res. 23(9):1237–1242.
36. Zohouri, A. Tabatabaee Yazdi, F. Mortazavi, S.A. and Shahidi, F. 2014, Comparision ps efficiency and extraction of color and natural compounds from red beet by maceration and ultrasonic extraction methods. JFST, 52(13): 50-56.

Archive of SID

www.SID.ir