

## بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنلی و بیوستنز نانو ذرات نقره و طلا از عصاره‌های مختلف اندام‌های گیاه *Conocarpus erectus* L.

فاطمه گرجیان<sup>۱</sup>، رویا میرزاجانی<sup>۱</sup>، مریم کلاهی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۲۳

### چکیده

آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی ترکیباتی هستند که محافظت بدن را در مقابل تخریب ناشی از استرس‌های اکسیداتیو به عهده‌دارند. هدف مطالعه حاضر، بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات موجود در برگ و گل گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus* L.) و تعیین و مقایسه محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف آن می‌باشد. به این منظور در بهار ۱۳۹۴، نمونه‌های برگ و گل این گیاه از فضای سبز دانشگاه شهید چمران اهواز جمع‌آوری شده و پس از خشک‌کردن، به دو روش سوکسله و خیساندن، عصاره‌گیری شدند. به منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی، از آزمون‌های فیتوشیمیایی و دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی استفاده شد. در این بررسی، نوزده ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی در عصاره متانولی برگ با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی شناسایی شد که در میان اجزای شناسایی شده، برخی ترکیبات از جمله استروئیدها در هردو عصاره استخراج شده به روش سوکسله و خیساندن یافت شد. در این مطالعه محتوای فنلی با استفاده از روش فولین-سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت عصاره گل استخراج شده به روش سوکسله بالاترین میزان ترکیبات فنلی را به خود اختصاص داد. به منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره برگ و گل نیز از روش DPPH استفاده شد. در میان عصاره‌های استخراج شده از گیاه کنوکارپوس، عصاره گل به دست آمده به روش سوکسله، دارای کمترین  $IC_{50}$  و در نتیجه بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی بود. در ادامه با استفاده از این عصاره‌ها نانوذرات طلا و نقره سنتز شد و برای تعیین اندازه تقریبی آن‌ها از آنالیز اندازه ذره<sup>۴</sup> استفاده گردید. این عصاره‌ها توانستند نانوذرات طلا با قطری در حدود ۷۰ نانومتر تولید کنند. در سنتز نانوذرات نقره، عصاره گل کنوکارپوس با سنتز ذراتی با قطر تقریبی ۷/۸ نانومتر موفق‌تر عمل کرد. وجود ترکیبات شیمیایی مختلف، محتوای فنلی بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب در عصاره کنوکارپوس بیانگر پتانسیل عصاره این گیاه برای استفاده به‌عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی، در جهت ساخت نانوذرات و داروها می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، بیوستنز نانو ذرات نقره، کنوکارپوس، محتوای فنلی.

\* نویسنده مسئول: m.kolahi@scu.ac.ir

## مقدمه

نتایج حاصل از مطالعات مختلف بیانگر نقش مؤثر رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیش از صد نوع بیماری بوده که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به انواع سرطان‌ها، آرتریت روماتوئید، التهاب، آلزایمر و همچنین فرایندهای پیری اشاره نمود (Brewer, 2011). گیاهان از گذشته‌های دور منبعی برای یافتن دارو و درمان بیماری‌ها بوده‌اند که با تولید داروهای صنعتی برای مدت‌ها به ورطه فراموشی سپرده شدند ولی امروزه به دلیل عوارض جانبی و هزینه‌ی بالا داروهای صنعتی، مجدداً نظر جستجوگران پژوهشگران متوجه این منبع سرشار و باارزش شده است (Bibak et al., 2012). آن‌ها با دارا بودن بسیاری ترکیبات از جمله ترکیبات فنلی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هستند. اطلاعات دقیق علمی و شناخت ترکیب‌های شیمیایی یا در واقع متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Petrovska, 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که باعث مهار یا به تأخیر اندازی آسیب به یک مولکول هدف می‌گردند. این ترکیبات به دودسته‌ی عمده سنتزی و طبیعی تقسیم می‌شوند. امروزه در صنعت از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها استفاده می‌شود، اما به دلیل اثرات بد تغذیه‌ای و سرطان‌زا بودن این ترکیبات و نیز تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از ترکیبات طبیعی، کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه محققین قرار گرفته است. در همین زمینه تلاش‌های زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است (Brewer, 2011). از سوی دیگر در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی به‌ویژه نانوذرات طلا و نقره به‌عنوان عامل دارویی برای کاربردهای درمانی به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. امروزه از این نانوذرات در درمان بیماری‌های مختلف از جمله

سرطان، دیابت، پارکینسون، آلزایمر، ایدز، هپاتیت، بیماری‌های قلبی و عروقی، سل و ... استفاده می‌گردد. از این رو سنتز نانو ذرات طلا و نقره به‌عنوان یک روش کارآمد، باصرفه و دوستدار محیط‌زیست بسیار، مورد توجه محققان حوزه نانوپزشکی قرار گرفته است (Kuppusamy et al., 2016). در میان روش‌های موجود برای سنتز نانوذرات، روش‌های سبز دارای مزایای متعددی نسبت به روش‌های مرسوم هستند که از این بین می‌توان به سنتز آسان، تمیز و کارآمد، سازگاری با محیط‌زیست، صرفه‌جویی اقتصادی، سنتز در دما و فشار محیط بدون نیاز به لیگاند خارجی و یا واکنش‌گر پوشاننده و یا پایدارکننده (Capping or Stabilizing agent) اشاره کرد (Ahmed et al., 2016).

به همین دلیل در این روش سنتزی می‌توان از منابع زیستی مانند گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عامل کاهنده، پوشاننده و پایدارکننده استفاده نمود (Nadaf et al., 2016).

آلودگی هوا یک مشکل جدی در نواحی مسکونی و صنعتی در دنیا است. شهر اهواز به‌عنوان مرکز استان خوزستان و دومین شهر بزرگ ایران از لحاظ وسعت پس از تهران و پنجمین شهر پرجمعیت ایران می‌باشد. این شهر به دلیل منابع غنی نفت و گاز، صنایع پتروشیمی، صنایع بزرگ فلزی و غیرفلزی، برق و شرایط آب‌وهوای گرم و مرطوب و همچنین بروز پدیده‌ی گرد و غبار در اکثر روزهای سال دارای آلودگی هوا می‌باشد (Rafiei et al., 2009). در سال‌های اخیر به‌منظور کنترل این آلودگی‌ها و همچنین زیباسازی فضای شهری، اقدام به کاشت گسترده‌ی گیاه کنوکارپوس در تمامی مناطق اهواز و سایر نقاط استان خوزستان شده است.

*Conocarpus erectus* L. از خانواده‌ی Combretaceae، یک درختچه زیتنی رایج در مناطق

شناسایی آن‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) و همچنین تعیین محتوای فنلی این گیاه بود. در ادامه نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از برگ و گل گیاه با استفاده از روش DPPH سنجیده شد و در پایان تأثیر این عصاره‌ها در سنتز نانوذرات طلا و نقره آزموده شد.

**روش کار:** نمونه‌های برگ و گل مورد مطالعه از گیاه *Conocarpus erectus* L. در بهار ۱۳۹۴، از فضای سبز دانشگاه شهید چمران اهواز در چند نوبت جمع‌آوری و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌های سالم جداسازی شده و دو بار به‌وسیله‌ی آب مقطر شستشو داده شد. برگ‌های این گیاه به‌دور از تابش مستقیم خورشید و در سایه خشک گردید و توسط دستگاه آسیاب خانگی برقی به پودر تبدیل شد. **آزمون‌های فیتوشیمیایی:** به‌منظور شناسایی کیفی متابولیت‌های ثانویه موجود در برگ و گل گیاه *Conocarpus erectus* L. آزمون‌های مختلفی بر مبنای روش‌های استاندارد، بر روی نمونه‌های پودر شده صورت گرفت. در این آزمون‌ها حضور پنج دسته مهم از متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و استروئیدها مورد بررسی قرار گرفت.

از جمله آزمایش‌های صورت گرفته می‌توان به آزمون پیو (Yusuf et al., 2014) و سدیم هیدروکسید (Zohra et al., 2012) برای فلاونوئیدها، استفاده از معرف مایر و واگنر (Khan et al., 2011; Zohra et al., 2012) Ugochukwu et al., 2013) برای آلکالوئیدها، واکنش محلول استات سرب (Zohra et al., 2012) و محلول آهن (III) کلرید (Yusuf et al., 2014) برای تانن‌ها، آزمون سولفوریک اسید (Yusuf et al., 2014) برای استروئیدها و آزمون تشکیل کف (Khan et al.,

نیمه گرمسیری و گرمسیری بارنگ پوسته معمولاً قهوه‌ای تیره و ترک بردارنده و کم انشعاب با ۴-۱/۵ متر ارتفاع و یا یک درخت همیشه سبز با ارتفاع بین ۲۰-۱۲ متر و گاهی حتی بیشتر می‌باشد (Bandeira, 2003). این گیاه بومی سواحل مرکزی و جنوبی فلوریدا، باهاما، بخش وسیعی از نواحی غربی هندوستان، مکزیک، اکوادور، جزایر گالاپاگوس، برزیل و مناطق گرمسیری غرب آفریقا می‌باشد (Bashir et al, 2015). معدود پژوهش‌های انجام شده بر روی این گیاه، به‌ویژه در کشورهای حوزه خلیج فارس بیانگر ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اثرات حفاظتی و قابض بود (Abdel-Hameed et al., Bashir et al., 2015; Abdel-Hameed et al., 2013; Bandeira, 2003). همچنین در پژوهشی دیگر این گیاه به‌عنوان یکی از گونه‌های پوشش‌های حرا و رایج در طب عامیانه، در درمان کم‌خونی، زکام، ورم ملتحمه، دیابت، اسهال، تب، سوزاک، سردرد، خونریزی، ورم بیضه، بشورات جلدی شناخته‌شده است (Nascimento et al., 2016). در تحقیق دیگری نیز، ویژگی‌های دارویی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و اثرات حفاظتی برای گیاه گزارش گردید (Lopez et al., 2000).

از جمله دلایل کاشت گسترده این گیاه می‌توان به همیشه سبز بودن آن و نیاز اندک به رسیدگی اشاره کرد. از آنجاکه این گیاه بومی ایران نبوده و تنها در مناطق جنوبی کشور و به‌عنوان یک گیاه زینتی مورد استفاده قرار گرفته است، تاکنون مطالعات اندکی بر روی آن انجام شده است. با توجه به اینکه گستردگی کاشت این گیاه، بدون مطالعات جدی علمی، امری غیر کارشناسی تلقی می‌گردد، محققان بومی در سال‌های اخیر اقدام به مطالعه و پژوهش پیرامون این گیاه غیربومی نموده‌اند. هدف از انجام این مطالعه نیز بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات موجود در این گیاه و

شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده: شناسایی طیف‌ها با استفاده از کتابخانه‌های مربوط به اطلاعات جرمی و پیشنهادها کتابخانه‌ی رایانه‌ی خود دستگاه صورت پذیرفت. بدین ترتیب که ترکیبات با بالاترین درصد فراوانی و احتمال به‌عنوان اجزای موجود در عصاره گزارش گردید.

**اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی:** به‌منظور تعیین محتوای فنلی عصاره‌های مختلف کنوکارپوس از روش استاندارد فولین-سیوکالتو استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید<sup>۳</sup> استفاده شد. به این منظور میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره برحسب معادل گالیک‌اسید و با استفاده از معادله به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Marinova et al., 2005). برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید استفاده شد. به این منظور ابتدا به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف آن مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر محلول رقیق‌شده‌ی فولین-سیوکالتو اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ درصد وزنی - حجمی سدیم کربنات به آن افزوده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت ملایم هم زده شد. پس از آن جذب محلول مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (فرابنفش-مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آلمان) در طول موج ۷۶۵ نانومتر و در سه تکرار خوانده شد.

**اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی:** به‌منظور اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره از روش DPPH استفاده شد (Sharma et al., 2009). معمولاً جهت مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ها از فاکتور IC50 استفاده می‌شود (غلظتی از عصاره که در

برای تأیید حضور ساپونین‌ها اشاره کرد.

**عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس:** به‌منظور عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس از دو روش سوکسله و خیساندن استفاده گردید. در هر دو روش پس از پایان عصاره‌گیری، حلال تحت خلأ و توسط دستگاه روتاری تبخیر گردید. عصاره‌های حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. بازده عصاره‌گیری برای برگ و گل کنوکارپوس با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه گردید.

$$\text{وزن خشک عصاره} \times 100 = \frac{\text{وزن خشک گیاه}}{\text{وزن خشک عصاره}} \times 100$$

رابطه ۱: محاسبه درصد بازده عصاره‌گیری

**شناسایی ترکیبات استخراج شده در برگ گیاه کنوکارپوس**

**مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی:** برای شناسایی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) متصل به دکتکتور طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent A7890 و دکتکتور جرمی نوع Agilent-۵۹۷۵ بودند. ستون استفاده‌شده از نوع HP-MS5 و دارای ۳۰ متر طول و ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی بود. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل به‌کاربرده شد. یک میکرولیتر از عصاره‌ی متانولی برگ گیاه کنوکارپوس به همراه یک میلی‌لیتر متانول به دستگاه تزریق شده و برنامه‌ی دمایی به این‌گونه تنظیم شد. برای مدت ۱۰ دقیقه دمای آون در ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شده و پس از آن با سرعت ۵ درجه بر دقیقه بر آن افزوده شد تا به دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

#### 1. Gallic acid

دیگر به منظور سنتز نانو ذرات نقره روش گجر و همکارانش (Gajjar et al., 2009) استفاده شد. در این روش مقادیر مورد نظر از عصاره‌های مختلف کنوکارپوس، به محلول نمک نقره افزوده شد و هم زدن محلول به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. تغییر رنگ محلول به زرد یا قرمز آجری می‌تواند بیانگر سنتز نانو ذرات نقره باشد. سپس جذب محلول حاصل در طول موج ۴۲۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر (فرابنفش - مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آمریکا) قرائت شد. در نهایت برای تعیین اندازه‌ی تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول‌های تهیه‌شده به وسیله Nano Particle Size Analyser مورد سنجش قرار گرفت.

### نتایج

نتایج سنجش‌های فیتوشیمیایی: عصاره‌ی متانولی برگ و گل گیاه کنوکارپوس با انجام آزمون‌های فیتوشیمیایی مختلف مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی حضور متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، استروئیدها، ساپونین‌ها و تانن‌ها را در برگ و گل گیاه کنوکارپوس به اثبات رساندند (جدول ۱).

آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار می‌شوند و هرچه این مقدار کمتر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد. برای محاسبه این پارامتر از رابطه ۲ استفاده می‌شود:

$$\text{رابطه ۲: محاسبه میزان باقیمانده از رادیکال آزاد DPPH} \\ \text{activity\%} = \left(1 - \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

سنتز نانو ذرات طلا و نقره با استفاده از عصاره متانولی برگ و گل کنوکارپوس: به منظور سنتز نانوذرات طلا از روش اسمیت و همکارانش استفاده شد (Mojab et al., 2003). در این روش حجم مشخصی از عصاره‌های مختلف برگ و گل کنوکارپوس به محلول به جوش آمده‌ی طلا افزوده شد و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه بدون حرارت هم زده شد. تغییر رنگ محلول به بنفش نشان‌دهنده‌ی صحت سنتز نانو ذرات طلا می‌باشد. پس از آن جذب محلول در طول موج ۵۲۵ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر (فرابنفش - مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آمریکا) خوانده شد (Smith et al., 2013). از سوی

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمون‌های فیتوشیمیایی انجام شده بر روی برگ و گل گیاه *Conocarpus erectus* L.

نتیجه		آزمون فیتوشیمیایی	متابولیت ثانویه
گل	برگ		
+	+	آزمون Pew	فلاونوئید
+	+	آزمون سدیم هیدروکسید	
+	+	معرف مایر	آلکالوئید
+	+	معرف واگنر	
+	+	محلول استات سرب	تانن
+	+	محلول آهن (III) کلرید	
+	+	استفاده از سولفوریک اسید	استروئید
+	+	آزمون کف کنندگی	ساپونین

بازده عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس: به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه‌ی موجود در برگ و گل کنوکارپوس از دو روش استخراج سوکسله و خیساندن استفاده شد و در پایان بازده هر روش محاسبه گردید (جدول ۲).

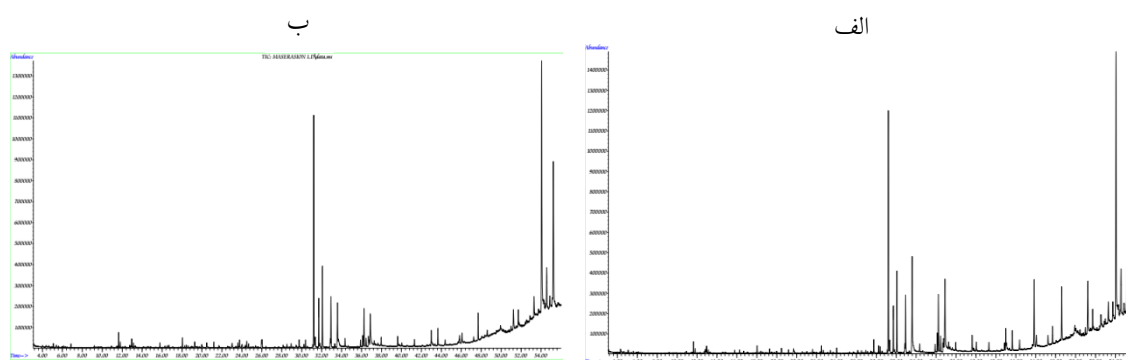
جدول ۲: بازده وزنی- وزنی عصاره‌گیری از برگ و گل *Conocarpus erectus* L. به دو روش سوکسله و خیساندن

انواع عصاره متانولی کنوکارپوس	وزن خشک عصاره (گرم)	بازده %
برگ - سوکسله	۲/۲۶۰	۱۸/۸۳۲
برگ - خیساندن	۱/۸۷۷	۱۸/۷۷۰
گل - سوکسله	۱/۲۴۲	۱۰/۳۵۰
گل - خیساندن	۱/۰۸۶	۱۰/۸۶۷

کتابخانه‌ی موجود در دستگاه، پیشنهادهایی برای ترکیبات موجود ارائه شد و ترکیبات با بالاترین درصد احتمال به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در این عصاره‌ها پیشنهاد گردید. جدول ۳ و ۴ به‌ترتیب دربردارنده‌ی ترکیبات احتمالی موجود در عصاره‌ی برگ کنوکارپوس استخراج شده به دو روش سوکسله و خیساندن می‌باشد. شکل ۱ نیز در بخش الف و ب به ترتیب کروماتوگرام GC/MS عصاره استخراج شده به روش سوکسله و خیساندن می‌باشد.

بررسی نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که روش‌های استخراجی سوکسله و خیساندن برای هر دو قسمت برگ و گل کنوکارپوس تقریباً مشابه عمل کرده و درصد بازده نزدیکی را نشان داده‌اند.

نتایج شناسایی ترکیبات استخراج شده از برگ کنوکارپوس به روش GC/MS: به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در برگ گیاه کنوکارپوس، عصاره‌ی استخراج شده با دو روش سوکسله و خیساندن به دستگاه GC/MS تزریق گردید. با استفاده از



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از عصاره‌ی متانولی برگ کنوکارپوس استخراج شده: الف- به روش سوکسله، ب- به روش خیساندن

جدول ۳: ترکیبات موجود در عصاره متانولی برگ گیاه *Conocarpus erectus* L. با بالاترین درصد احتمال حضور، استخراج شده به روش سوکسله.

ردیف	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی g.mole <sup>-1</sup>	زمان بازداری min	درصد احتمال حضور در عصاره
۱	trans-phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	۲۹۶/۵۴	۳۱/۲۰۹	۹۳
۲	Neophytadiene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	۲۷۸/۵۲۴	۳۱/۷۱۲	۹۳
۳	Methyl hexadecanoate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	۲۷۰/۴۵۰	۳۲/۹۳۷	۹۹
۴	n-Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲۵۶/۴۳	۳۳/۵۹۳	۹۸
۵	Methyl Linolenate	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲۹۲/۴۵۶	۳۶/۲۳۹	۹۶
۶	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	۲۶۴/۴۴۶	۳۶/۸۸۷	۹۴
۷	2-Palmitoylglycerol	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	۳۳۰/۵۰۲	۴۲/۹۹۲	۸۱
۸	Heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	۳۸۰/۷۴۵	۴۵/۸۳۷	۹۸
۹	Nonacosane	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	۴۰۸/۸۰	۴۸/۶۰۲	۹۵
۱۰	Cyclooctacosane	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	۳۹۲/۷۴۴	۵۱/۲۳۶	۹۹
۱۱	Vitamin E	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>32</sub>	۹۱۰	۵۱/۷۱۸	۹۶
۱۲	HexadecamethylOctasiloxane	C <sub>16</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub> Si <sub>8</sub>	۵۷۷/۲۳۳	۵۳/۲۹۶	۷۲
۱۳	gamma.-Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	۴۱۴/۷۰۶	۵۴/۰۶	۹۹
۱۴	alpha.-Amyrin	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	۴۲۶/۷۳	۵۵/۲۲۸	۹۵

فول، استروئید و ترین از مهم ترین ترکیباتی هستند که در عصاره استخراج شده به روش خیساندن حضور دارند.

بسیاری از ترکیبات دو عصاره‌ی سوکسله و خیساندن مشابه یکدیگر هستند. در میان اجزا شناسایی شده عصاره استخراج شده به روش خیساندن، ترکیب استروئیدی 5-Ethylcholest-(23S)-en-3-β-ol و همچنین آلفا-آمیرین با ۱۸/۶۸۹ و ۱۲/۰۲ درصد بیشترین مقدار از کل ترکیبات عصاره را به خود اختصاص داده‌اند. این ترکیبات به ترتیب دارای ۹۹ و ۹۳ درصد احتمال حضور می‌باشند.

با توجه به ساختارهای شیمیایی مشاهده شده به نظر می‌رسد بخش عمده‌ای از ترکیبات برگ کنوکارپوس از خانواده ترکیبات فنلی، استروئیدها و ترین‌ها باشند. از جمله مهم ترین ترکیبات مشاهده شده در ساختار برگ کنوکارپوس می‌توان به ویتامین E و اسکوالن اشاره نمود. در بین اجزای شناسایی شده در عصاره سوکسله ترکیب گاما-سیتوسترول و آلفا-آمیرین به ترتیب با ۱۵/۳۸۳ و ۱۰/۹۵۱ درصد به ترتیب بیشترین مقدار از کل ترکیبات عصاره را به خود اختصاص داده‌اند. این ترکیبات به ترتیب دارای ۹۹ و ۹۵ درصد احتمال حضور می‌باشند. همانند عصاره استخراج شده به روش سوکسله، ترکیبات خانواده

جدول ۴: ترکیبات موجود در عصاره متانولی برگ گیاه *Conocarpus erectus* L. با بالاترین درصد احتمال حضور، استخراج شده به روش خیساندن.

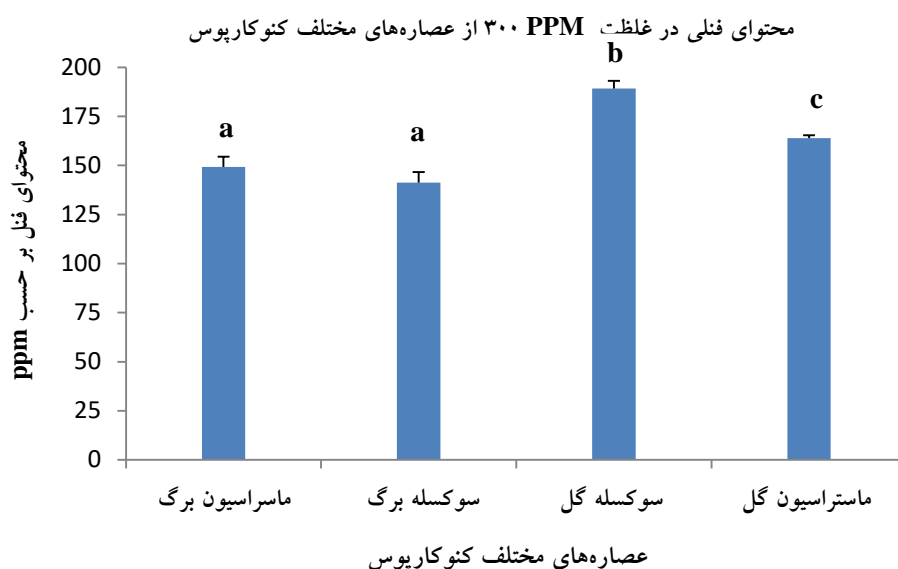
ردیف	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی (g.mole <sup>-1</sup> )	زمان بازداری	درصد احتمال حضور در عصاره
۱	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	۲۸۰/۵۳۱	۳۱/۲۱۱	۹۳
۲	Neophytadiene	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	۲۷۸/۵۲۴	۳۱/۷۱۴	۹۳
۳	trans-phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	۲۹۶/۵۳۹	۳۲/۰۷۲	۷۲
۴	Methyl hexadecanoate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	۲۷۰/۴۵۰	۳۲/۹۳۸	۹۹
۵	n-Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲۵۶/۴۳	۳۳/۵۸۵	۹۹
۶	Methyl Linolenate	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	۲۹۲/۴۵۶	۳۶/۲۴۱	۹۸
۷	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	۲۶۴/۴۴۶	۳۶/۸۸۷	۹۹
۸	Squalene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	۴۱۰/۷۳	۴۷/۶۹۳	۹۵
۹	n-Tetracosanol-1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	۳۵۴/۶۵	۵۱/۲۳۷	۹۱
۱۰	(23S)-Ethylcholest-5-en-3-β-ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	۳۸۶/۶۶۴	۵۴/۰۶۲	۹۹
۱۱	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl eptasiloxane,	C <sub>14</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub> Si <sub>7</sub>	۵۰۵/۰۹۴	۵۴/۸۷۹	۶۲
۱۲	alpha-Amyrin	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	۴۲۶/۷۳	۵۵/۲۲۷	۹۲

خیساندن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p < 0/05$ ) (شکل ۲).

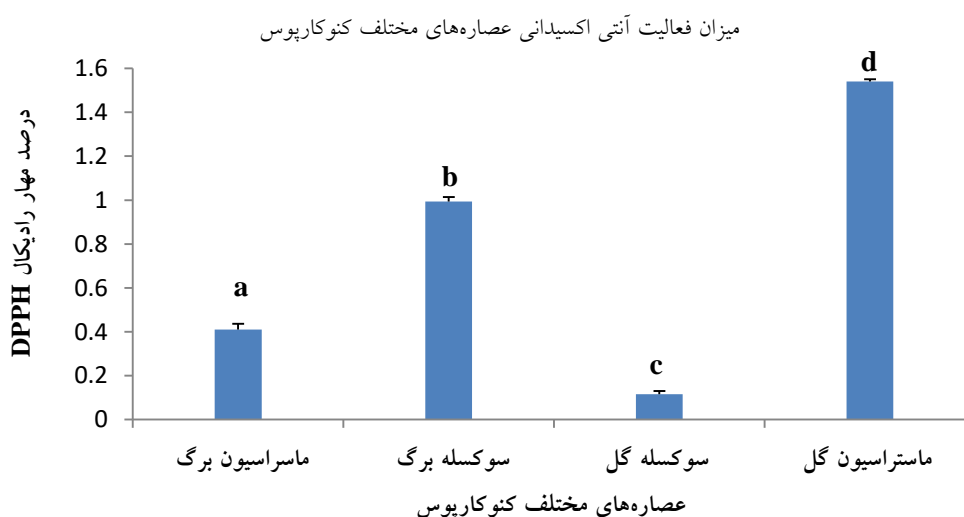
نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس به روش DPPH: بررسی IC<sub>50</sub> به‌دست‌آمده از عصاره‌ها نشان داد که عصاره استخراج شده از گل کنوکارپوس به روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌های دیگر دارای کمترین IC<sub>50</sub> می‌باشد. همچنین عصاره گل به‌دست‌آمده به روش خیساندن با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌های دیگر بیشترین IC<sub>50</sub> را دارا بود ( $p < 0/05$ ) (شکل ۳).

نتایج اندازه‌گیری محتوای کل فنلی عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس: یافته‌های حاصل از بررسی محتوای کل فنلی با استفاده از روش استاندارد گالیک‌اسید نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به‌دست‌آمده مربوط به عصاره گل گیاه کنوکارپوس بود. در بررسی محتوای فنلی عصاره به‌دست‌آمده از گل این گیاه مشخص شد که عصاره حاصل از روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش خیساندن دارای محتوای فنلی بیشتری بود. این در حالی است که محتوای فنلی به‌دست‌آمده از عصاره برگ گیاه کنوکارپوس با استفاده از دو روش سوکسله و





شکل ۲: محتوای کل فنلی در عصاره متانولی برگ و گل کنوکارپوس

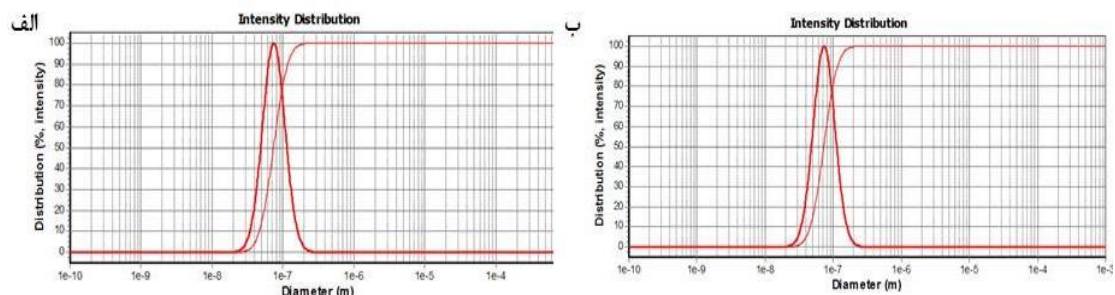


شکل ۳: مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌های متانولی برگ و گل کنوکارپوس

اندازه‌ی تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول‌های تهیه شده به وسیله Nano Particle Size Analyzer مورد سنجش قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد که نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از عصاره برگ و گل کنوکارپوس با احتمال ۵۰٪ به ترتیب دارای قطری معادل ۷۴/۴ و ۷۲/۹ نانومتر بودند (شکل ۴).

مقایسه مقدار  $IC_{50}$  به دست آمده نشان می‌دهد که گیاه کنوکارپوس دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد و قادر است در غلظت‌های بسیار پایین رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند.

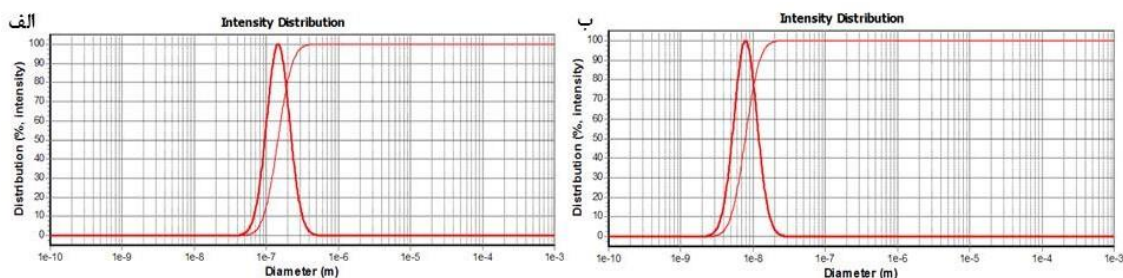
نتایج بررسی سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس: پس از تأیید سنتز نانوذرات طلا و خواندن مقادیر جذب، به منظور تعیین



شکل ۴: آنالیز سایز ذره نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از عصاره متانولی: الف- برگ، ب- گل کنوکارپوس.

نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره ی برگ و گل کنوکارپوس با احتمال ۵۰ درصد به ترتیب دارای قطری معادل ۱۴۶ و ۷/۸ نانومتر بودند. شکل ۶ نتایج به دست آمده از این بررسی را نشان می دهد.

نتایج حاصل از بررسی سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره برگ و گل کنوکارپوس: به منظور تعیین اندازه تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول های تهیه شده به وسیله ی Nano Particle Size Analyzer مورد سنجش قرار گرفت. این بررسی ها نشان داد



شکل ۵: آنالیز سایز ذره نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره متانولی: الف- برگ، ب- گل کنوکارپوس.

بیانگر آن است که عصاره ی هیدروالکلی گیاه کنوکارپوس حاوی ترکیباتی از خانواده فلاونوئید، تانن، آلکالوئید، استروئید و ساپونین می باشد. محتوای فنلی اندازه گیری شده برای برگ و گل کنوکارپوس در سطح متوسط و نسبتاً خوبی قرار داشت. در این بین مشخص شد که عصاره گل حاصل از روش سوکسله با اختلاف معنی داری نسبت به روش خیساندن دارای محتوای فنلی بیشتری است. با توجه به محتوای مناسب فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی برای عصاره ها قابل پیش بینی بود. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره های حاصل از برگ و گل کنوکارپوس دارای  $IC_{50}$  بسیار پایین و در نتیجه فعالیت

#### بحث

با توجه به مشکلات زیست محیطی جدی در استان های جنوبی از جمله استان خوزستان و اهمیت وجود پوشش های گیاهی سازگار با محیط زیست منطقه، در سال های اخیر اقدام به کاشت گسترده گیاه کنوکارپوس شد که متأسفانه این کار بدون بررسی های دقیق علمی صورت گرفت. بمنظور شناخت بیشتر ترکیبات کنوکارپوس، این پژوهش باهدف بررسی فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی برگ و گل گیاه کنوکارپوس انجام شد و در ادامه نیز توان عصاره گیاه در سنتز نانوذرات طلا و نقره آزموده شد. یافته های این مطالعه

هر دو عصاره‌ی استخراج شده با روش‌های سوکسله و خیساندن حضور داشتند. از سوی دیگر بررسی‌های کمی و کیفی وجود مقادیر بالای از ترکیبات فنلی را تأیید کرد. در مطالعه ایوب و همکاران (Ayoub et al., 2010)، گلیکوزید جدید تری متوکسی الاژیک و دوازده ترکیب فنلی شناخته شده از برگ کنوکارپوس جدا شدند. ترکیب جدید، همراه با چهار ترکیب شناخته شده‌ی جدا شده از گیاه، خود اثر مهاری قوی در برابر حمله گونه‌های اکسیژن فعال اسید سالیسیلیک به صورت وابسته به دوز با استفاده از روش سنجش گزانتین/هیپوگزانتین اکسیداز نشان دادند (Ayoub et al., 2010).

در مطالعه‌ای دیگر سیزده ترکیب فنلی تأیید شده توسط روش‌های FTESI-MS و NMR از عصاره آبی الکل برگ این گیاه جداسازی شدند. بر اساس اصول سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی، عصاره برگ گیاه کنوکارپوس حاوی ترکیبات جدید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی همراه با گلوکورونید، کوئرستین، میرستین، دی‌متوکسی میرستین، گلوکوپیرانوئید و گالیک اسید می‌باشد (Adonizio et al, 2008; Abdel-Hameed et al., 2014) آنالیز HPLC عصاره برگ، ساقه، گل و میوه کنوکارپوس بیانگر حضور گالیک اسید، اتیل استات، n-بوتانول، کاتکین، آپیزنین، روئتین و کوئرستین بود (Abdel-Hameed et al., 2013). این نتایج با داده‌های سنجش کمی میزان فنل و تشخیص انواع ترکیبات فنلی در نتایج GC-mass همخوانی دارد.

کار تحقیقاتی قبلی نشان داده که عصاره متانول میوه کنوکارپوس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری و ضد سرطان است. در مطالعات بیشتر از این گیاه عصاره متانولی میوه با استفاده از کروماتوگرافی در ستون ژل سیلیس و سپس به کارگیری تکنیک‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا - ماوراء بنفش و

آنتی‌اکسیدانی بسیاری بالایی می‌باشند (شکل ۳). امکان سنتز نانوذرات طلا و نقره با استفاده از این عصاره‌ها می‌تواند در مباحث شیمی سبز مورد توجه قرار گیرد. این عصاره‌ها با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب خود توانستند نانوذرات طلا و نقره سنتز کنند. بهینه‌سازی شرایط سنتز از جمله زمان، دما و حجم عصاره‌ی مورداستفاده می‌تواند به تولید نانوذرات بهتر و با اندازه‌ی کوچک‌تر منجر شود (Mojab et al., 2003). همان‌طور که نتایج این پژوهش در تعیین محتوای فنلی و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد، در مقایسه‌ی بین عصاره‌های برگ و گل کنوکارپوس که به دو روش سوکسله و خیساندن استخراج شده بودند، روش سوکسله دارای بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی بود. روش سوکسله علاوه بر ساده و آسان بودن عصاره‌گیری، به دلیل تماس مداوم حلال تازه با پودر گیاهی و استفاده از دمای بالا، منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین شده است. در نتیجه میزان ترکیبات فنلی استخراج شده با این روش، بیشتر از روش خیساندن است. اصولاً روش خیساندن بهتر است زمانی به کار گرفته که گیاه مورد عصاره‌گیری دارای ترکیبات قابل استخراج کمتری باشد (Azwanida et al., 2015). محتوای فنلی عصاره‌ی برگ گیاه کنوکارپوس در دو روش سوکسله و خیساندن اختلاف معنی‌داری نداشت. با توجه به میزان کمتر ترکیبات فنلی موجود در برگ گیاه کنوکارپوس، روش خیساندن نیز با همان کارایی روش سوکسله عمل می‌کند و همان‌طور که ذکر شد اختلاف معنی‌داری بین میزان محتوای فنلی حاصل از دو روش مشاهده نشد (شکل ۲).

همچنین در بررسی کروماتوگرام‌های عصاره‌ی برگ کنوکارپوس، نوزده ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی شناسایی شد که در میان اجزا شناسایی شده برخی ترکیبات از جمله استروئیدها در

یافته‌های این تحقیق همخوانی دارند. مطالعات دیگر بر عصاره برگ کنوکارپوس بیانگر ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، اثرات حفاظتی و قابض بود ( Abdel-Hameed et al., 2013; Bandeira, 2003).

در سال ۲۰۱۵ بشیر و همکارانش ( Bashir et al., 2015) با استفاده از عصاره‌ی متانولی برگ، گل، ساقه و میوه‌ی کنوکارپوس توانستند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محافظت کبدی و ضد سرطانی بالایی را گزارش کنند. تمامی این خواص به دلیل حضور ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات فنلی در گیاه می‌باشد. وجود ترکیبات تانن نیز منجر به بروز خواص ضد میکروبی خوبی از سوی این گیاه گردید (Gajjar et al., 2009).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که مولکول‌های فعال زیستی این گیاه شامل فلاونوئیدها، تانن و ساپونین می‌باشند. بر اساس LD50 محاسبه شده برای موش‌ها، عصاره آبی در رده ۵ ترکیبات، یعنی کم سمیت حاد طبقه‌بندی شد (Nascimento et al., 2016). مطالعات برگ کنوکارپوس خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اثرات حفاظتی را قابض نشان داد (Bandeira, 2003, 2014, 2013, Abdel Hameed et al., 2013, 2014, 2013). ویژگی‌های دارویی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و اثرات حفاظتی گیاه مربوط به فیتوکمیکال‌ها موجود مانند فلاونوئیدها و ساپونین‌ها می‌باشد ( Lopez et al., 2000).

#### نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از بررسی طیف‌های GC/MS به نظر می‌رسد عملکرد آنتی‌اکسیدانی مناسب عصاره متانولی برگ کنوکارپوس، ناشی از حضور گروه‌های فنلی متعدد و ترکیبات آنتی‌اکسیدان

یونیزاسیون تجزیه و تحلیل شد و ترکیبات الازیک اسید، ایزومر کاستالازین / وسکالازین به‌عنوان اجزاء اصلی با بسیاری از انواع تانن‌های پایدار در آب شناسایی گردیدند. حضور گالیک‌اسید کائومفارول ۳-O-β-d-glucopyranoside و ۳-O-β-d- quercetin glucopyranoside مطابق با زمان ماند (tR) و طیف توده، با توجه به استانداردها مشخص شدند (Abdel-Adonizio et al., 2008; Hameed et al., 2014). مطالعات عصاره متانول و هگزان برگ کنوکارپوس، حضور تری‌ترین‌ها را در عصاره هگزان و عدم وجود ساپونین را در عصاره متانولی نشان داد (Bandeira, 2003).

در مطالعه‌ای که به‌عنوان اولین گزارش فیتوشیمیایی مفصل در شناسایی فیتوشیمی میوه کنوکارپوس در نظر گرفته می‌شود ایزومرهای فلاونوئیدی در عصاره گیاه شناسایی شدند. در این مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها رابطه مستقیمی با مقدار کل ترکیبات فنلی داشت ( Adonizio et al., 2008). این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارند و توان آنتی‌اکسیدانی بالا در این گیاه می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی باشد. اثر حفاظتی عصاره کنوکارپوس بر آسیب مزمن کبدی ناشی از CCl<sub>4</sub> در موش مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که عصاره به طرز معنی‌داری تخریب سلول‌های کبدی آسیب‌دیده را کاهش داد. بررسی عصاره آبی کنوکارپوس حضور فلاونوئیدها، تانن و ساپونین و عدم وجود آلکالوئیدها، کومارین‌ها و تری‌ترین‌ها را نشان داد (Abdel-Hameed et al., 2013).

این نتایج مشابه با آزمون‌های فیتوشیمیایی در این پژوهش می‌باشد. مطالعه دیگری بر روی عصاره متانولی و هگزانی گیاه کنوکارپوس حضور تری‌ترین‌ها را در عصاره هگزان و عدم وجود ساپونین، در عصاره متانولی را نشان داد (Bandeira, 2003) که با

گیاه می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر طبیعی در مطالعات آینده استفاده گردد.

#### تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره ۳۱۴۰۰ و شماره ۳۱۵۸۰) در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

دیگر نظیر ویتامین E و اسکوالن می‌باشد. شناسایی ترکیبات شیمیایی مختلف از جمله استروئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی در گیاه حائز اهمیت است. حدود بیست ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی عصاره متانولی برگ شناسایی شدند. محتوای فنلی بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب در عصاره کنوکارپوس بیانگر پتانسیل عصاره این گیاه به‌ویژه بخش گل برای استفاده به‌عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی در جهت ساخت نانوذرات و داروها می‌باشد. با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره خام متانولی، این

#### References

1. Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A. and Sabra, A.N.A. 2013. Protective Effect of *Conocarpus erectus* extracts on CCl<sub>4</sub>-Induced chronic liver injury in Mice. *Global Journal Pharmacology*, 7(1): 52-60.
2. Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A. and Shohayeb, M.M. 2014. RP-HPLC-UV-ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. *Chemical Papers*, 68(10): 1358-1367.
3. Adonizio, A. Kong, K.F. and Mathee, K. 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(1):198-203.
4. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L. and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of advanced research*, 7(1): 17-28.
5. Ayoub, N.A. 2010. trimethoxyellagic acid glucuronide from *Conocarpus erectus* leaves: isolation, characterization and assay of antioxidant capacity. [Research Support, Non-U S Gov't]. *Pharmaceutical biology*, 48(3): 328-332.
6. Azwanida, N.N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4: 196.
7. Bandeira, A.R.G. 2003. Estudo Fitoquímico e aAtividade. Biológica de *Conocarpus erectus* L. (MangueBotão). Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco, 86 p.
8. Bashir, M., Uzair, M. and Bashir Ahmad, C.H. 2015. A review of phytochemical and biological studies on *Conocarpus erectus* (Combretaceae). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*, 1(1): 1-8.
9. Bibak, B. Khakshor, A. Kamali, H. Ahmadzadeh Ghavidel, R. and Aminimoghadamfaruj, N. 2012. Evaluation of Antibacterial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of leaf and stem barks of *Uvaria grandiflora* Roxb. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*, 4(1):113-118.
10. Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4): 221-247.
11. Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D.W., Huang, W. Johnson, W.P. and Anderson, A.J. 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(9): 1754-1611.
12. Khan, A.M., Qureshi, R.A., Ullah, F., Gilani, S.A., Nosheen, A., Sahreen, S., Laghari, M.K., Laghari, M.Y., Hussain, I. and Murad, W. 2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of

- Margalla Hills and surroundings. Journal of Medicinal Plants Research, 5(25): 6055-6060.
13. Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P. and Govindan, N. 2016. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications An updated report. Saudi Pharmaceutical Journal, 24(4): 473-484.
  14. Lopes, R.M., Oliveira, T.T., Nagem, T.J. and Pinto, A.S. 2000. Flavonóides: farmacologia de flavonoides no control e hiperlipidê micoemanimais experimentais. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 3: 18-22.
  15. Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 403 : 255-260.
  16. Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N. and Vahidipour, H.R. 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 77-82.
  17. Nadaf, N.Y. and Kanase, S.S. 2016. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. Arabian Journal of Chemistry, 4:1-9.
  18. Nascimento, D.K., Souza, I.A., Oliveira, A.M., Barbosa, M.O., Santana, M.A., Pereira, D.F., Lira, E.C. and Vieira, J.R. 2016. Phytochemical screening and acute toxicity of aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus in Swiss Albino Mice. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88 (3): 1431-7.
  19. Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy, 6(11): 1-5.
  20. Rafiei, M., Gadgil, A.S., Ghole, V.S., Gore, S.D., Jaafarzadeh, N., Mirkazemi, R. 2009. Assessment of air pollution and its effects on the health status of the workers in beam rolling mills factory (Iran National Steel Industrial Group) from Ahvaz-Iran. Indian journal of occupational and environmental medicine, 13(1): 20-22.
  21. Sharma, R.K., Chatterji, S., Rai, D. K., Mehta, S., Rai, P.K., Singh, R.K., Watal, G. and Sharma, B. 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some Indian medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research, 3(11) :944-948.
  22. Shohayeb, M.M, Abdel-Hameed, E.S.S. and Bazaid, S.A. 2013. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus erectus* L. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(2): 544-553.
  23. Smith, C.A., Simpson, C.A., Kim, G., Carter, C.J. and Feldheim, D.L. 2013. Gastrointestinal bioavailability of 2.0 nm diameter gold nanoparticles. [Research Support, Non-U S Gov't]. American Chemical Society Nano, 7(5): 3991-3996.
  24. Ugochukwu, S.C., Uche, A. and Ifeanyi, O. 2013. Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of *Dennetia tripetala* G. Baker. Asian Journal of Plant Science and Research, 3(3): 10-13.
  25. Yusuf, A.Z., Zakir, A., Shemau, Z., Abdullahi, M. and Halima, S.A. 2014. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnatalinn*. Journal of pharmacognosy and phytotherapy, 6(2):10-6.
  26. Zohra, S.F., Meriem, B., Samira, S. and Muneer, M.A. 2012. Phytochemical screening and identification of some compounds from Mallow. Journal of Natural Product and Plant Resources, 2 (4):512-516.