فصلنامهٔ علمی – پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۵۳۳-۵۲۲، (۱۳۹۲)

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول و فلاونوئید کل پوست درختان اکالیپتوس کاملدولنسیس و کاج جنگلی

صالحه نظری[۱*]، نورالدین نظرنژاد[۲] و محمدعلی ابراهیم‌زاده[۳]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع خمیر و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پست‌الکترونیک: salehenazari@yahoo.com
۲- استادیار گروه صنایع چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی، ساری
۳- دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، ساری

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۲

چکیده

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنولی هستند که مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بشمار می‌آیند. آنتی‌اکسیدان‌ها از عوامل اصلی خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند، که از شیوع بیماریهای مزمن و تخریب بسیاری از مواد غذایی جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات از پوست درختان اکالیپتوس و کاج نیز قابل‌استخراج هستند. هدف این مطالعه، ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول و فلاونوئید تام پوست درختان اکالیپتوس و کاج است.پس از تهیه پوست درختان مورد مطالعه، عصاره‌های اتانولی به روش سوکسوله استخراج شدند. ابتدا میزان فنول و فلاونوئید تام عصاره‌ها اندازه‌گیری و بعد برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده از چهار روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل، قدرت احیاکنندگی، نیتریک اکساید و میزان کی‌لیت کنندگی آهن استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان فنول و فلاونوئید تام در پوست درخت اکالیپتوس بیشتر از کاج است. نتایج آزمون به دام اندازی رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل نشان داد که غلظت مهار ۵۰٪ در عصاره اتانولی پوست درخت اکالیپتوس و کاج به‌ترتیب دارای مقادیر ۳/۰۲ و ۱۵/۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین، در آزمون قدرت احیاکنندگی، میزان جذب برای عصاره پوست اکالیپتوس بیشتر از کاج بود. در آزمون به دام اندازی نیتریک اکساید، غلظت مهار ۵۰٪ در عصاره اتانولی پوست اکالیپتوس ۲/٤۱ و در عصاره کاج ۲۲/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. همین طور، نتایج آزمون میزان کی-لیت کنندگی آهن عصاره‌های اتانولی پوست اکالیپتوس و کاج در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌ترتیب مهار۳۷ و ۱۸/۹۷ درصد را نشان دادند. عصاره‌های اتانولی پوست اکالیپتوس و کاج در چهار آزمون مورد مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی را نشان دادند، بنابراین می‌توانند به‌عنوان منابع مفیدی برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باشند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، فنول، فلاونوئید، اکالیپتوس، کاج.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

حجم عظیم پسماندهای جامد صنعتی و خطرهایی که این مواد برای محیط‌زیست و حیات جانداران ایجاد می‌کنند موجب شده توجه زیادی برای یافتن روشی مناسب برای دفع و یا استفاده مجدد از این مواد شود. با توجه به قابلیت استفاده از این مواد در صنایع و فرآورده‌های مختلف و ایجاد ارزش افزوده برای آنها، تحقیقات گسترده‌ای در سطح دنیا در زمینه کاربرد پسماندهای جامد صنایع مختلف در حال انجام است. به‌طورکلی حدود ۳۵ درصد از مواد ورودی به کارخانه‌های خمیر و کاغذ به صورت پسماندهای مختلفی مانند ضایعات پوست‌کنی، انواع پسماندهای مختلف حاصل از فرآوری الیاف بازیافتی، لجن و پسماند سیستم تصفیه آب و پساب و پسماندهای ناشی از جوهرزدایی الیاف بازیافتی جداسازی می‌شود(Scott & Smith, 1995). پوست درختان به طور متوسط ۱۰ تا ۱۵ درصد حجم درختان را تشکیل می‌دهند، که هر ساله میلیون‌ها تن از آن به صورت پسماند در کارخانه‌های صنایع چوب و کاغذ بر جا می‌ماند. انباشت حجم زیاد انواع ضایعات مواد چوبی و به‌ویژه پوست در مراحل مختلف فرایند تولید مسئله بسیار مهم و گاهی اوقات پیچیده در صنایع مختلف تبدیل چوب می‌باشد. حجم باقیمانده پوست به قدری زیاد است که بیرون رفتن آن به طور پیوسته از محل کارخانجات لازم و به یک امر اجتناب‌ناپذیری تبدیل شده است (کاظمی نجفی و عظیمی دلارستاقی، ۱۳۹۰). این در حالیست که تمام هزینه‌های قطع، تبدیل و حمل‌ونقل به آن تعلق می‌گیرد. از آنجایی که پسماندهای جامد ایجادشده در صنایع چوب و کاغذ حاوی مواد با ارزشی مانند مواد پلی‌ساکاریدی (عمدتاً سلولز)، ترکیبات فنولی و مواد معدنی قابل بازیافت هستند، می‌توانند بازیافت شده و یا به مواد با ارزش دیگری تبدیل شوند. از طرف دیگر، با تدوین و ابلاغ محدودیت‌های زیست‌محیطی سخت‌گیرانه در زمینه کاهش پسماندهای جامد صنایع خمیر و کاغذ، تلاش‌های متعددی برای کاهش حجم این مواد و استفاده مجدد از آنها انجام شده است (Monte *et al.*, 2009). بنابراین لازمه کاربرد پوست به‌عنوان ماده اولیه نیازمند شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده آن است (Aron, 1975). پوست به‌عنوان یک ماده لیگنوسلولزی تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با چوب از نظر ساختمان، ترکیب شیمیایی و خواص دارد(Tsoumis, 1991). مواد استخراجی اجزای غیر ساختمانی و برون سلولی چوب بشمار می‌آیند. چوب‌درون و پوست دارای مقادیر زیادی از انواع مواد استخراجی آروماتیکی می‌باشد که پوست دارای مقادیر زیادی مواد انحلال‌پذیر، از قبیل ترکیبات فنولی است که به دو دسته چربی‌دوست و آب‌دوست تقسیم می‌شود. جزء آب‌دوست با آب یا حلال‌های آلی قطبی قابل‌استخراج است و دارای مقدار زیادی ترکیبات فنولی است. ترکیبات فنولی شامل لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و تانن‌ها و استیلین‌ها هستند. فلاونوئیدها اسکلت کربنی سه حلقه‌ای دارند و تانن‌های هیدرولیزشدنی بر اثر هیدرولیز به اسیدگالیک و اسید الاژیک تبدیل می‌شوند (Lila, 2004). ترکیبات فنولی دسته‌ای از ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند که اثرات درمانی و حفاظتی بسیاری به آنها نسبت داده شده است، ازجمله اینکه آنتی‌ؤاکسیدان‌های شناخته‌شده می‌باشند (Pyo *et al.*, 2004). امروزه موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و اثرات آن بر سیستم‌های بیولوژیک یکی از مباحث مهم و مطرح دانش پزشکی می‌باشد. آنتی‌اکسیدان، ماده‌ایست که می‌تواند از

Archive of SID

www.SID.ir

آسیب اکسایشی به مولکول هدف جلوگیری کند و یا آن را به تأخیر بیندازد (Gutteridge & Halliwell, 1994) و از عوامل اصلی خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. یعنی مواد فعالی که برای سلامتی انسان مضر هستند. بنابراین تأمین ذخایر آنتی‌اکسیدانی از منابع طبیعی، به‌منظور کاهش آثار آسیب اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود (کامکار و همکاران، ۱۳۸۹). آنتی‌اکسیدان‌ها با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد از یک طرف باعث کاهش خطر ابتلاء به بیماریهای قلبی- عروقی و سکته می‌شوند و از طرف دیگر، از پیشرفت سرطان‌ها جلوگیری می‌کنند، همچنین آنتی‌اکسیدان‌های می‌توانند باعث حفاظت غشاهای سلولی شوند (Lien *et al.*, 2008). اثرات سمی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی از یک طرف و مقبولیت مواد افزودنی طبیعی از جانب دیگر تمایل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را بیشتر نموده است. این آنتی‌اکسیدان‌های ترکیبات پلی فنولی هستند که در تمام گیاهان و تمام قسمت‌های آنها از قبیل پوست، برگ، ساقه، میوه، ریشه، بذر و غیره یافت می‌شوند(Stoilova *et al.*, 2007). ازاین‌رو امروزه بسیاری از متخصصان تغذیه برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن، این مواد را از گیاهان و پوست درختان استخراج می‌کنند که عوارض کمتر و اثربخشی بیشتری دارند(Riceevans, 2004).

اکالیپتوس در داروسازی کاربردهای زیادی دارد. از خواص درمانی این گونه گندزدای عمومی(به‌ویژه در مورد شش‌ها و مجاری ادرار)، ضد التهاب، خلط‌آور، ضد اسپاسم، کاهنده قند خون، تب بر، محرک، التیام‌دهنده زخم‌ها، انگل‌کش، بیماریهای تنفسی (مانند آسم، برونشیت، سل، زکام و سینوزیت)، عفونت‌های مجاری ادرار، دیابت، تب، روماتیسم، انگل‌های روده مانند آسکاریس و کرمک را می‌توان نام برد (Boland, 1979). خواص درمانی گونه کاج عبارتند از: نیرودهنده، تسکین‌دهنده سرفه، مدر و ضد نزله است. از آن برای رفع نزله‌های مزمن مخاط‌های دستگاه تنفسی و مجاری ادرار استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳۷۳).

مونیر و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانول- آب استخراج‌شده از برگ‌ها، میوه و پوست ساقه سنجد تلخ[1] را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره تهیه‌شده از پوست ساقه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد. Maimoona و همکاران (۲۰۱۱) مقادیر فنول و فلاونوئید تام را در بخش‌های مختلف عصاره‌های پوست و سوزن *pinus roxburghii* و *pinus wallichiana* برآورد کردند و به این نتیجه دست یافتند که دو گونه کاج سرشار از فنول و فلاونوئید هستند. عربشاهی و اروج (۲۰۰۷) از سه حلال متانول، آب و استون برای بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی برگ‌های شاه‌توت استفاده کردند که حلال متانول بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۹/۳۲ گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم عصاره خشک) را استخراج کرد. نیشمورا و همکاران (۱۹۸٦) بر روی پوست بلوط (*Q. Stenophylla Makino*) آزمایش انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که پوست بلوط دارای مخلوط پیچیده‌ای از پلی‌فنول‌ها است که شامل تانن‌های هیدرولیز شدنی و متراکم می‌باشند و مهمترین آنها گالوتانن و الاژی تانن است. فضلی و همکاران (۱۳۹۱) درصد کلی مواد استخراجی پوست درختان راش، ممرز، صنوبر و بلوط را با حلال استن به‌ترتیب ۱٦/۵، ۱۷/۲، ۱۵/۹ و ۲۵/۷ درصد برآورد نموده‌اند و نتیجه گرفتند که بیشترین میزان محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی به‌ترتیب

1- Melia azedarach

Archive of SID

www.SID.ir

مربوط به گونه‌های ممرز (۲۲٤/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره) و بلوط (۱۱/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره) بود؛ و بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی را برای گونه صنوبر (۰/٤ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره) بدست آوردند.

با توجه به اینکه ضایعات پوستی درختان اصولا دورریز می‌شوند و یا برای تولید انرژی سوزانده می‌شوند، هدف از این مطالعه استخراج ترکیبات فنولی از ضایعات پوست درختان اکالیپتوس و کاج و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی آنها بوده تا امکان استفاده از پوست این درختان جهت تولید دارو فراهم شود و از طرف دیگر اثرات تخریبی ناشی از این ضایعات را کاهش دهد.

مواد و روشها

نمونه‌های پوست مورد مطالعه از کارخانه‌های صنایع چوب گیلان تهیه شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه در هوای آزاد خشک‌شده و بعد بدون جدا کردن پوست درونی و بیرونی با آسیاب آزمایشگاهی به پودر تبدیل شدند. عصاره‌گیری با استفاده از اتانول و با روش سوکسوله انجام شد. حلال در خلأ تبخیر و با فریزدرایر خشک شد.

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد (Ordone *et al.*, 2008). بدین منظور غلظت ۱۰mg/ml از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در ۷٦۰ نانومتر در مقابل بلانک (متانل) اندازه‌گیری شد. سپس مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میکروگرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری گردید.

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد (Chang *et al.*, 2002). برای این کار، از هر نمونه عصاره با غلظت ۱۰mg/ml تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ٪۱۰ به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و بعد جذب مخلوط حاصل در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر دوگانه مرئی- ماوراءبنفش بررسی شد. سپس میزان فلاونوئید تام با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میکروگرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها چهار روش به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل[1](DPPH)، قدرت احیاءکنندگی، به دام اندازی نیتریک اکساید و ارزیابی میزان شلات‌کنندگی آهن استفاده شد.

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH

1- DPPH(diphenyl-picrylhydrazyl)

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل را به خوبی تکان داده و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. BHA به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

در این آزمایش غلظت‌های مختلف بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر برای عصاره‌های اتانولی تهیه شد. از مقادیر هم حجم حلال (آب یا متانول) به همراه DPPH بلانک تهیه شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

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

A_B= جذب بلانک، A_S= جذب نمونه یا استاندارد

(Shimada *et al.*, 1992)

تعیین قدرت احیاکنندگی

میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها از طریق متد ین و چن ارزیابی شد (Yen & Chen, 1995). غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با PH و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید[$K_3Fe(CN_6)$] مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر 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 قرارداده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید($FeCL_3$) به آن اضافه شد و بلافاصله جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در این آزمایش بلانک شامل همه اجزا (پتاسیم فری سیانید، بافر فسفاته، آب مقطر و تری کلرواستیک اسید) بجز عصاره است و دستگاه با بلانک صفر می‌شود. در این آزمایش آسکوربیک اسید نیز با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید

سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی‌مولار) 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 شد. بعد از اسپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفات آمید ۱٪، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید۰/۱٪ در اسید فسفریک ۲٪) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۸ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) قرائت شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای مقایسه بکار گرفته شد. سپس میانگین درصد به دام اندازی هم طبق فرمول زیر محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

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

A_B= جذب بلانک، A_S = جذب نمونه یا استاندارد

(Ebrahimzadeh, 2009)

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی میزان کی‌لیت کنندگی آهن

اندازه‌گیری قدرت کی‌لیت کنندگی آهن با روش دنیز انجام شد (Dinis *et al.*, 1994). به ۵ میلی‌لیتر از هر عصاره ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی مولار کلریدآهن II و ۱ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن- فروزین، با کمک فرمول زیر محاسبه شد:

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

A_B= جذب بلانک و A_s= جذب نمونه یا استاندارد

EDTA به‌عنوان استاندارد به‌کار گرفته شد. فعالیت کی‌لیت کنندگی آهن بر حسب IC_{50} هر عصاره بیان شد. تمامی عصاره‌ها در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. در این آزمایش نیز محلول بلانک شامل تمامی اجزای شرکت‌کننده در واکنش بجز عصاره است.

تحلیل آماری

پس از واردکردن داده‌ها در نرم‌افزار اکسل معادله خطی رگرسیون با استفاده از غلظت‌های متفاوت به طور اختصاصی رسم شد. اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار شد و میانگین آنها به همراه انحراف معیارشان گزارش شد.

نتایج

محتوای تام فنولی با روش فولین سیو-کالتیو بر اساس معادله خط منحنی استاندارد اسیدگالیک به صورت $Y= 0.485X - 0.558, R^2 = 0.870$ محاسبه گردید. محتوای تام فنولی برای عصاره اتانولی پوست اکالیپتوس و کاج به‌ترتیب ۷/۶۸۵ و ٤/۸۰۹ میکروگرم اسید گالیک در گرم عصاره به‌دست آمد. و همچنین محتوای فلاونوئید تام نمونه‌ها با معادله خط استاندارد کوئرستین بصورت $Y= 0.358X - 0.464, R^2 = 0.868$ برای اکالیپتوس و کاج به‌ترتیب ۱/۹۷۳ و ۱/۷۳۸ میکروگرم کوئرستین در گرم عصاره محاسبه شد. جدول ۱ محتوای تام فنولی براساس میکروگرم اسیدگالیک در گرم عصاره و محتوای تام فلانوئیدی بر اساس میکروگرم کوئرسیتین در گرم عصاره بدست آمده از گونه‌های اکالیپتوس و کاج را نشان می‌دهد.

جدول۱- میزان فنول و فلاونوئید تام در عصاره اتانولی پوست اکالیپتوس و کاج (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

آزمایش‌ها	اکالیپتوس	کاج
فنول تام	۷/٦۸۵ ±۰/۲۲۵	٤/۸۰۹ ±۰/۲۵۱
فلاونوئید تام	۱/۹۷۳ ±۰/۱۱٤	۱/۷۳۸ ±۰/۱۳۷

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل

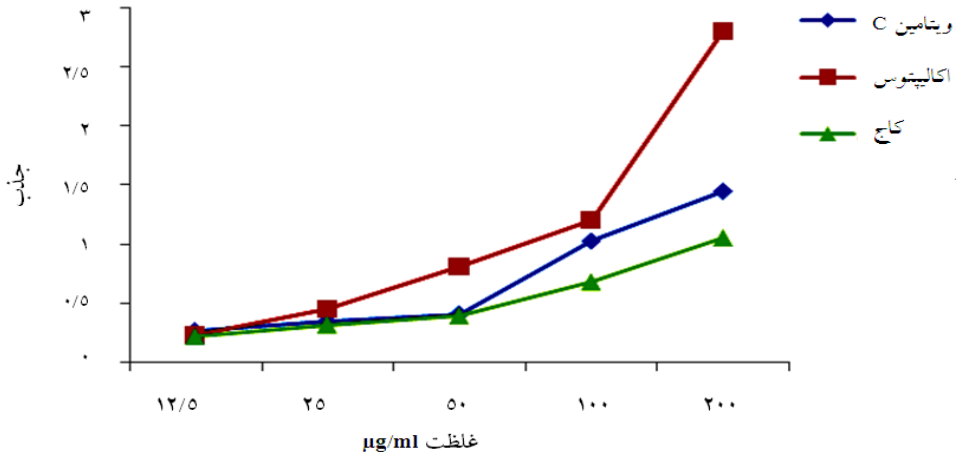
غلظت مهار۵۰٪ در عصاره اتانولی اکالیپتوس و کاج به‌ترتیب ۰/۱۷±۳/۰۲ و ۰/٦۵±۱۵/۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. همانطورکه این نتایج نشان می‌دهد فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH در عصاره اکالیپتوس بیشتر از عصاره کاج است.

Archive of SID

www.SID.ir

قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها

در روش قدرت احیاکنندگی، جذب نور با قدرت احیاکنندگی رابطه مستقیم دارد. شکل شماره ۱ منحنی غلظت جذب را در عصاره اتانولی دو گونه نشان می‌دهد. شکل نشان می‌دهد که قدرت احیاکنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد می‌شود. همچنین در تمام غلظت‌ها قدرت احیاکنندگی اکالیپتوس بیشتر از کاج است. فعالیت عصاره اکالیپتوس حتی از استاندارد (ویتامین ث) هم بالاتر بود ($p < 0.05$).



شکل۱- نمودار مقایسه میزان جذب یا قدرت احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی اکالیپتوس و کاج با استاندارد ویتامین c

ارزیابی به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید

غلظت مهار ۵۰٪ در عصاره اتانولی اکالیپتوس، ۰/۱۵٤±۲/٤۱ و کاج ۱/٦٥۹±۲۲/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. با توجه به نتایج، فعالیت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید در عصاره اکالیپتوس بیشتر از کاج است.

ارزیابی میزان کی‌لیت کنندگی آهن

همانطورکه در جدول ۲ می‌بینیم گونه‌های مورد بررسی فقط در غلظت ۱۰۰ دارای درصد مهار بوده و به عبارت دیگر درصد مهار آنها محدود است.

جدول۲- درصد مهار کی‌لیت کردن آهن توسط عصاره اتانولی اکالیپتوس و کاج در غلظت ۱۰۰ (میکروگرم در میلی‌لیتر)

گونه‌ها	درصد مهار (٪)
اکالیپتوس	۳۷
کاج	۱۸/۹۷

Archive
www.SID.ir

بحث

ترکیبات فنولی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به‌عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند (Fukumoto, 2000). با افزایش ترکیبات فنول تام خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابه‌جا شونده هیدروکسیل دارد (Lagouri, 1996).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، عصاره اتانولی اکالیپتوس دارای مقادیر بیشتری از فنول و فلاونوئید تام می‌باشد و شاید بتوان گفت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی این درختان مربوط به ترکیبات فنولی موجود در آنها می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا می‌باشد که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Singh, 2008). رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیا شدن و تولید مولکول پایدار DPPH-H از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. با توجه به درصد مهار به‌دست آمده مشخص شد که عصاره اتانولی اکالیپتوس فعالیت بیشتری از عصاره پوست کاج از خود نشان می‌دهد. نتایج آزمون DPPH نشان داد که توانایی عصاره‌های گونه‌های اکالیپتوس و کاج در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999). هنگ گائو و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی روی عصاره متانلی پوست درخت سدر دریافتند که در آزمون DPPH، غلظت مهار ۵۰٪ برای درون‌چوب، برون‌چوب، پوست درونی و بیرونی به‌ترتیب برابر ٦٤/٧٧، ۲۹/۰۳، ۱۰/۳۱ و ۱۹/۸۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد و همچنین نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها متناسب با مقدار ترکیبات فنلیک می‌باشد.

در آزمایش قدرت احیاکنندگی، احیاء آهنIII (فریک) به آهنII (فروس) به‌عنوان یک نمایه، برای پتانسیل الکترون‌دهی بکار می‌رود. در این روش سنجش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بر اساس جذب نوری صورت می‌گیرد. افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش بیانگر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و بدون واحد است، زیرا از جذب نوری برای شدت خاصیت احیاکنندگی استفاده می‌شود. در این روش ترکیبات آنتی‌اکسیدان با پتاسیم فری سیانید، تری کلر و استیک اسید و فریک کلراید ترکیب‌شده و کمپلکس آبی رنگی ایجاد می‌نمایند که در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش بیانگر قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها می‌باشد (Jayaprakash *et al.*, 2001). در روش قدرت احیاکنندگی جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با قدرت احیاکنندگی دارند، یعنی جذب

Archive of SID

www.SID.ir

نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر است. همانطورکه در بخش نتایج آورده شده است، میزان جذب نمونه اکالیپتوس در غلظت‌های بالای ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از نمونه استاندارد و گونه کاج بود و دو گونه مورد مطالعه مانند نمونه استاندارد در مقادیر غلظت بالا بیشترین میزان جذب را داشته‌اند. میرزایی و همکاران (۱۳۸۹) برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی بومادران، درمنه و بابونه از روش قدرت احیاکنندگی استفاده کردند. نتایج نشان داد که قدرت احیاکنندگی از بیشترین به کمترین مقدار مربوط به درمنه، بابونه و بومادران بود. محدوده فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها از ۵۰۷ تا ۹۱۵ میکرومول آهن فروس در میلی‌گرم عصاره بود که این فعالیت با افزایش غلظت عصاره رابطه مستقیم داشت.

نیتریک اکساید ($NO^{\bullet}$) رادیکال فعالی است که به دام اندازنده‌های نیتریک اکساید با اکسیژن رقابت کرده و تولید نیتریت را کاهش می‌دهند. به دام اندازی نیتریک اکساید می‌تواند به‌عنوان سازوکاری برای بروز اثرات ضد التهابی یا ضد تشنجی در نظر گرفته شود (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). گیاهانی که توانایی جلوگیری از تشکیل نیتریک اکساید را دارند، به نوبه‌ی خود برای جلوگیری از بیماری‌هایی که در آنها نیتریک اکساید بیش از حالات معمولی تولید می‌شود، مورد توجه واقع شوند. تولید مقادیر بالای نیتریک اکساید به طور موضعی در آسیب بافتی در بیماریهای روماتیک (مفاصل، کلیه، رگ‌های خونی و سیستم اعصاب مرکزی) شرکت می‌کند (Manna *et al.*, 2008). بنابراین گیاه یا گیاهانی که بتوانند با تشکیل نیتریک اکساید مقابله کنند، به‌عنوان یک جایگاه در مهار بیماری‌ها می‌توانند مورد توجه قرار گیرند. بر پایه درصد مهار بدست‌آمده مشخص شد که عصاره اتانولی پوست اکالیپتوس فعالیت بیشتری از عصاره پوست کاج از خود نشان می‌دهد. نتایج آزمون نیتریک اکساید نشان داد که توانایی عصاره‌های گونه‌های اکالیپتوس و کاج در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، فعالیت آنها افزایش می‌یابد. Kiranmai و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به دام اندازی نیتریک اکساید) عصاره اتانولی پوست ریشه درخت افرا نتیجه گرفتند که غلظت مهار ۵۰٪ عصاره ریشه معادل با ۲۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، درحالی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی استاندارد کوئرستین معادل ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

عوامل کی‌لیت کننده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه هستند، زیرا آنها پتانسیل احیا را کاهش داده و باعث پایداری فرم اکسیدشده یون فلزی می‌شوند (Gordon *et al.*, 1990). یون‌های فلزی واسطه دو ظرفیتی یک نقش مهمی را به‌عنوان کاتالیزور فرایندهای اکسیداتیو بازی می‌کنند و همین طور آنها منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و واکنش‌های تجزیه هیدروژن پراکسید از طریق شیمی فنتون می‌شوند (Halliwell, 1997). شناساگر این واکنش فروزین نام دارد که با آهن II موجود در محیط کمپلکس قرمز رنگی به صورت $Fe(Ferrozine)_3^{4-}$ تشکیل می‌دهد. غلظت آهن محیط در حضور عوامل شلات‌دهنده کاهش می‌یابد و رنگ قرمز کمپلکس آهن-فروزین کم می‌شود. مقدار IC_{50} برای EDTA برابر ۱۷/۳۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و عصاره‌های اتانولی اکالیپتوس و کاج در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌ترتیب مهار۳۷ و ۱۸/۹۷ درصد را نشان دادند و گونه‌ها توانایی کی‌لیت کنندگی ضعیفی از خود نشان دادند. اسماعیلی و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مریم گلی دریافتند که غلظت مهار ۵۰٪ عصاره این گیاه ۷۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، یعنی عصاره این گیاه فعالیت مهار فلزی ضعیفی دارد، درحالی‌که استاندارد EDTA با فعالیت مهار ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت مهار خیلی خوبی را نشان داد.

نتیجه‌گیری کلی

عصاره‌های اتانولی اکالیپتوس و کاج دارای ترکیبات فنولی متفاوتی می‌باشند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در چهار آزمون انجام شده اثبات گردید و علاوه بر این با توجه به نتایج این آزمون‌ها مشخص شد که پوست گونه پهن‌برگ اکالیپتوس فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به پوست گونه سوزنی‌برگ کاج دارا می‌باشد. بنابراین استفاده از عصاره پوست درختان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، علاوه بر تهیه آنتی‌اکسیدان طبیعی از منابع تجدیدشونده، باعث ایجاد ارزش افزوده بیشتر و کاهش آلودگی زیست‌محیطی حاصل از پوست درختان تولیدشده در کارخانه‌ها خواهد شد.

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳۷۳. کتاب گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۰۱۰ صفحه.
- فضلی، ر.، نظرنژاد، ن.، ابراهیم‌زاده، م. ع. و ذبیح‌زاده، س. م.، ۱۳۹۱. استخراج و تعیین مقدار فنل و فلاونوئید تام از پوست چهار گونه راش، ممرز، صنوبر و بلوط و تعیین مقدار کمی برخی از ترکیبات فنلی باHPLC، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
- کاظمی نجفی، س.، و عظیمی دلارستاقی، ع.، ۱۳۹۰. بررسی اثر پوست راش بر خواص فیزیکی و مکانیکی مواد مرکب آرد پوست-پلی پروپیلن، فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران، ۲۶(٤): ۸۲۳-۸۱۱.
- کامکار، ا.، شریعتی فر، ن.، جمشیدی، ا.، و محمدیان، م.، ۱۳۸۹. بررسی عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی زیره سبز و بلغست در شرایط آزمایشگاهی، فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گناباد، ۱۶(۲):٤٥-۳۷.

میرزایی، ع.؛ اکبرتبار، م.؛ صادقی، ه. و شریفی، ب.، ۱۳۸۹، ارزیابی میزان فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی بومادران، درمنه و بابونه. مجله ارمغان دانش. ۱۵(۳): ۲۵۲-۲٤۳.

- Arabshahi, D.S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry leaves. Journal Agricultural Food Chemistry. 102:1233-1240.
- Aron, J. R., 1975. Bark: A potentially useful by-product R&D. Paper No.32, Forestry Commission. London.
- Boland, D. L., Brophy, J. J. and House, A. P. N. 1991. Eucalyptus Leaf oils, use, chemistry, distillation and marketing. Inkata Press Melbourne, Sydney, Australia.
- Chang, Y. L., 2002. Vitamin C equivalent anti oxidant capacity(VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal Agricultural Food Chemistry. 50(13): 3713-3717.
- Dinis, T. C. P. Maderia, V. M. and Almeida, L. M., 1994. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salycilate and 5-aminosalycilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, Archives of Biochemistry and Biophysics. 315: 161–169.
- Ebrahimzadeh, M. A. and Bahramian, F., 2009. Antioxidant activity of Crataegus pentagina subsp. elbursis Fruits extracts used in traditional medicine in Iran, Pakistan journal of biological sciences. 12(5): 413-419.
- Esmaeili, A. Tavassoli, A. and Ebrahimzadeh, M. A., 2009. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Activity of Salvia Glutionsa Growing in Iran. Pharmacologyonline 2:109-116.
- Fukumoto, L. R. and Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal Agricultural Food Chemistry. 48(8): 3597-604.
- Gordon, M. H., 1990. The mechanism of anti oxidant action in vitro. Elsevier applied science. 1-18.
- Gutteridge, G. M. C. and Halliwell, B., 1994. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford: Oxford University Press.

Archive of SID

www.SID.ir

Antioxidant Activity of Leaves, Fruit and Stem Bark of Dhraik (Melia azedarach). European Journal of Applied Sciences. 4(2): 47-51.
- Nishmoura, H. Nonaka, G. I. and Nishoka, I., 1986. Scyllo-Quercus gallates and Hexahydroxy diphenoates from Quercus stenophylla. Faculty of pharmaceutical science. Kyusha university Japan.
- Ordone, A. A. L., 2008. Antioxidant activities of sechium edule swartz extracts. Journal Agricultural Food Chemistry. 97: 452-458.
- Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L. and Rosen, R.T., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard(Beta vulgaris subspecies cycla) extracts. Journal Agricultural Food Chemistry. 85:19-26.
- Riceevans, C., 2004. Flavonoida and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. Free Red Biol Med. 36: 827-8.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. and Saura-Calixto, F., 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International. 32:407–412.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of agricultural and food chemistry. 40: 945-948.
- Scott, G. M. and Smith, A., 1995. Sludge characteristics and disposal alternatives for the pulp and paper industry, Proceedings of the 1995 International Environmantal Conference, May 7-10, Tappi Press, Atlanta, GA. 269-279.
- Singh, S. and Singh, R. P., 2008. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. Food Research International. 24: 392-415.
- Stoilova, A., Krastano, A., Dtoyanova, P., Senev, P. and Farfova, S., 2007. Antioxidant activity of ginger extract(Zingiber Officinale). Journal of agricultural and food chemistry. 102(3):764-770.
- Tsoumis, G., 1991. Science and Technology of wood. Structure, Properties, Utilisation. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Yen, G. C. and Chen, H. Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of agricultural and food chemistry. 43(1): 27-32.
- Halliwell, B., 1997. Antioxidants: the basics- what they are and how to evaluate them. Advances in pharmacology. 38: 3-20.
- Heng, Gao., Todd, F., Thomas, L. and Chung, Y., 2007. Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford Cedar. 53: 147-152.
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G. h. and Rakhshanizadeh, M., 2005. Anticonvulsant effect of Hypericum perforatum: role of nitric oxide. Journal Ethnopharmacology. 98: 207–208.
- Jayaprakash, G. K., Singh, R. P. and Sakariah, K. K., 2001. Antioxidant activity of grape seed extracts on per oxidation models invitro. Journal Agricultural Food Chemistry. 55:1018-1022.
- Kiranmai, C., Mahender, K. and Ibrahim, M. D., 2011. Free radical scavenging activity of Neem tree root bark extract. Academic Science. 4(4): 173-180.
- Lagouri, V. and Boskou, D., 1996. Nutrient antioxidants in origano. Intemational Journal Food Science. Nutr. 47:493-497.
- Lien Ai, P. H., Hua, H. and Chuong, P. H., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Intemational Journal biological Science. 4(2):89-96.
- Lila, M. A., 2004. Anthocyanins and human health an in vitro investigative approach. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 5: 306-313.
- Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., Ali, N., Ahmed, G. and Shah, I., 2011. Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of Pinus roxburghii and Pinus wallichiana. Journal of Medicinal Plants Research. 5(21): 5216-5220.
- Manna, I., Liguori, M., Valentino, P., Condino, F., La Russa, A., Clodomiro, A., Nisticò, R., Di Palma, G. and Quattrone, A., 2008. Preliminary evidences of a NOS2A protective effect from relapsing- remitting multiple sclerosis. Journal Neurol Science. 264(1-2): 112-7.
- Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H. and Sharifi, B., 2010. The Antioxidant Activities and Total Phenolic of Artemisia Martima, Achillea Millefolium and Matricaria Recutica. Journal Armaghane-danesh. 15(3): 243-252.
- Monte, M.C. Fuente, E., Blanco, A. and Negro, C., 2009. Waste management from pulp and paper production in the European Union. Waste Management. 29(1): 293-308.
- Munir, A., Sultana, B., Babar, T., Bashir, A., Amjad, M. and ul Hassan, Q., 2012. Investigation on the

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* bark

Nazari, S.[1]*, Nazarnezhad, N.J.[2], Ebrahimzadeh, M.A.[3]

1*- Corresponding Author, M.Sc., Department of Paper Science and Technology, Sari University of Agriculture and Natural Resources Sciences, Sari, Iran, Email: salehenazari@yahoo.com
2- Assistant Professor, Department of Wood and Paper Science, Sari University of Agriculture and Natural Resources Sciences, Sari, Iran
3- Associate Professor, Department of Medicine Chemistry, Mazandran University of medical Sciences, Medical Sciences Research Center, Sari, Iran

Received: May, 2012 Accepted: July, 2013

Abstract

Plants are a rich sources of phenolic compounds as natural antioxidants. Antioxidants are the main factors in neutralizing free radicals and prevent the spread of diseases and destruction of many foods. These compounds are extractable from the bark of *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* trees. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant properties and total phenolic and flavonoids of *Eucalyptus* and pine wood bark. After preparation of the bark, ethanol extracts were extracted using soxhlet extractor. First the amount of total phenol and flavonoids of the extract were measured. Then to evaluate antioxidant properties of the extracts, four methods including Diphenyl Picryl Hydrazyl, reducing power; nitric oxide and metal chelating activity were used. The results showed that total phenol and flavonoid content, in *Eucalyptus* bark was higher than pine. Test results to trap free radicals of diphenyl Pykryl Hydrazyl showed that 50% inhibitory concentration of ethanol extract of the Eucalypt and Pine bark values as 3.02 and 15.77 micrograms per milliliter, respectively. Also, in reducing power test, absorption rate for eucalyptus bark extract was higher than the pine. In nitric oxide trap test, 50% inhibitory concentration in ethanol extract of eucalypt bark was measured as 2.41 and in pine extract was 22.75 micrograms per milliliter. Furthermore, the results of Fe^{2+} chelating ability of ethanol extract of *Eucalyptus* and pine bark at a concentration of 100 micrograms per milliliter inhibited 37 and 97/18 percent respectively. Ethanol extracts of the eucalypt and pine bark in four case study tests, showed an acceptable antioxidant activity. Thus, these compounds can be regarded as good sources ofnatural antioxidants.

Key words: Antioxidant, phenol, flavonoid, *Eucalyptus*, pine.

Archive of SID

www.SID.ir