Archive of SID

بررسی فعالیتهای ضداکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی مرزنجوش، کلپوره و آویشن دنائی

دکتر علی میرزایی [۱] هاجر جابری هفشجانی [۲] دکتر عبدالحسین مدنی [۳]

[۱] استادیار گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، [۲] کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج [۳] استادیار گروه اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

مجله پزشکی هرمزگان سال پانزدهم شماره چهارم زمستان ۹۰ صفحات ۲۹۴-۲۸۵

چکیده

مقدمه: *گیاهان یکی از منابع مهم ضد اکسیدانها می‌باشند. ضد اکسیدانهای طبیعی باعث افزایش قدرت ضد اکسیدانهای پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماریها مانند سرطان، بیماریهای قلبی و سکته مغزی می‌شوند. با توجه به سمی بودن و اثرات سوءتغذیه‌ای ضد اکسیدانهای ساختگی موجود در مواد غذایی، نیاز به ضد اکسیدانهای طبیعی از گیاهان با سمیت کمتر و اثربخشی بیشتر یک ضرورت جدی است.*

روش کار: *در این مطالعه تجربی، پس از خشک کردن ساقه و گلهای گیاهان کلپوره، مرزنجوش و آویشن، عصاره‌گیری بوسیله اتانول ۷۰ درصد در مدت ٤٨ ساعت به روش ماسرسیون انجام شد. عصاره‌ها تحت شرایط خلاء خشک شدند و سپس فعالیت ضداکسیدان آنها بوسیله پنج روش مختلف شامل: دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فعالیت آنتی اکسیدانی معادل ترولکس، فعالیت آنتی اکسیدانی آهن احیاء شده، آزمون فسفومولیبدنیم و قدرت احیاءکنندگی ارزیابی گردید. به علاوه، برای تعیین ترکیبات ضد اکسیدانی، میزان فنل و فلاونوئید تام آنها اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس استفاده شد.*

نتایج: محتوای فنلی نمونه‌ها در محدوده ۱٤۰/۳-۹۷/۷ میلی‌گرم اسید گالیک بود. مقدار فلاونوئید تام نمونه ها بین ٦٨-٣٤/٦ میلی گرم روتین در گرم عصاره بود. مرزنجوش دارای بیشترین مقدار فنل تام و فلاونوئید بود که اختلاف معنی‌داری بین فنل تام مرزنجوش و آویشن دیده شد ($P<۰/۰۵$). مرزنجوش دارای بیشترین میزان فعالیت ضد رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (۱۹۰٦/۵) و فعالیت ضد اکسیدانی معادل ترولکس (۷٤۷) میلی مول ترولکس بود. تفاوت زیادی بین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزنجوش و سایر عصاره‌ها در هر دو آزمون دیده شد ($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: *در این مطالعه، عصاره‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی متفاوتی بودند که عصاره مرزنجوش دارای بیشترین فعالیت ضداکسیدانی بود.*

کلیدواژه‌ها: *آنتی‌اکسیدانها – فلاونوئیدها – فنل*

نویسنده مسئول:
دکتر علی میرزایی
مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
یاسوج – ایران
تلفن: ٤٢٣٦ ١٤٣ ٩١٧ ٩٨+
پست الکترونیکی:
mrzaee3a2003@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۹/۷/۱۰ اصلاح نهایی: ۸۹/۱۱/۱۹ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۱۸

مقدمه:

به هر اتم یا مولکولی که در اربیتال اتمی یا مولکولی خود یک یا چند الکترون غیرپیوندی داشته باشد، رادیکال آزاد می‌گویند. این ترکیبات معمولاً ناپایدار، کاملاً واکنش‌پذیر و با انرژی بالا می‌باشند که به علت ایجاد آسیب اکسیداتیو در لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک منجر به بیماریهای التهابی، دیابت ملیتوس، آترواسکلروز، سکته قلبی و مغزی، سرطان، نقص ایمنی، پیری و چندین بیماری فرساینده دیگر در انسان می‌شوند. (۳-۱).

www.SID.ir

Archive of SID

بدن انسان دارای چندین مکانیسم دفاعی، بویژه سیستم ضداکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای حفاظت مولکولهای سلولی بر علیه رادیکالهای آزاد مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد (٤،٥). با توجه به اینکه ممکن است سیستم دفاعی بدن برای استرس اکسیداتیو مداوم یا شدید کافی نباشد، مقادیر معینی ضداکسیدانهای خارجی به طور ثابت به منظور حفظ تعادل بین سطح ضداکسیدانها و اکسیدانها در بدن انسان مورد نیاز است.

امروزه در صنایع غذایی، تعداد زیادی از ضد اکسیدانهای ساختگی یا سنتزی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)، پروپیل گالات (PG) و ترت بوتیل هیدروکینون (TBHQ) برای پردازش صنعتی مواد غذایی و جلوگیری از اکسیداسیون چربیها به کار برده می‌شود. مطالعات نشان داد که این ترکیبات ضد اکسیدانی در حیوانات آزمایشگاهی خطر آسیب کبدی و ابتلا به سرطان را نشان می‌دهد (۹-٦).

در بسیاری از مطالعات اخیر، توجه محققان به یافتن ضداکسیدانهایی طبیعی با منشأ گیاهی معطوف شده است. با توجه به اینکه گیاهان یکی از منابع طبیعی مهم ضداکسیدانها محسوب می‌شوند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می‌باشد. اثرات ضد اکسیدانی مواد گیاهی تا حدودی به حضور ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها نسبت داده می‌شود که در تمام قسمتهای مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند (۱۰).

اگرچه تاکنون مطالعاتی در مورد خواص ضد اکسیدان بسیاری از گیاهان از جمله کلپوره، آویشن دنایی و مرزنجوش از خانواده نعنائیان انجام شده است (۱۱،۱۲). اما عوامل بسیار زیادی از جمله آب، هوا، خاک، ارتفاع، اختلاف در گونه‌های مختلف، روشهای استخراج و روش اندازه‌گیریهای ضد اکسیدانها در میزان متابولیتهای ثانویه گیاهی از جمله فنل و فلاونوئید تام و خواص ضد اکسیدان دخالت دارند (۱۳). علاوه بر این، استان کهگیلویه و بویراحمد گیاهان دارویی بسیار زیادی دارد که تاکنون مطالعات ضد اکسیدان تقریباً بر روی هیچکدام از گیاهان دارویی نامبرده صورت نگرفته است. در این تحقیق برای نخستین بار میزان ترکیبات ضد اکسیدان و خواص ضد اکسیدان سه گیاه کلپوره، آویشن و مرزنجوش بررسی شد. تنوع و ماهیت شیمیایی ضد اکسیدانها باعث می‌شود که جداسازی و اندازه‌گیری آنها در نمونه‌های مختلف گیاهی با یک نوع آزمایش امکان‌پذیر نباشد، بنابراین طراحی مجموعه‌ای از آزمایشات که بتوانند فعالیت ضد اکسیدان را اندازه‌گیری نماید، ضروری است. بنابراین در این مطالعه برای ارزیابی خواص ضد اکسیدانی از پنج آزمایش پاکسازی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، فعالیت ضداکسیدان معادل ترولکس (TEAC) توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)، فسفومولیبدینوم (PM) و قدرت احیاکنندگی (RP) استفاده شد. بعلاوه، برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات ضداکسیدان از آزمایش فنل و فلاونوئید تام استفاده شد.

روش کار:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در شهر یاسوج در دانشکده پزشکی یاسوج در بخش بیوشیمی و مرکز تحقیقات گیاهان داروئی صورت گرفت.

تهیه عصاره هیدروالکلی:

تمام گیاهان در منطقه یاسوج در اطراف شهر سی سخت در خرداد سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری و توسط متخصص گیاه‌شناس دکتر محمدحسین حکیمی شناسائی و تحت هر باریوم شماره HMRC 03-01 در آزمایشگاه مرکز تحقیقات گیاهان داروئی نگهداری شدند. نمونه‌ها در هوای آزمایشگاه در سایه خشک گردید و تا زمان استفاده در ظرف‌های در بسته دور از نور نگهداری شدند. عصاره‌های هیدروالکلی (اتانول ۷۰٪) به روش خیساندن به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق در دو نوبت تهیه شد و سپس با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان هیدلف آلمان مدل ٤۰۰۰ در دمای پایین پودر عصاره ایجاد شد.

۱- اندازه گیری فنل تام:

مقادیر فنل تام در نمونه‌های عصاره گیاهی با اندکی تغییر توسط روش فولین سیکالتو اندازه‌گیری گردد (۱۵). بر طبق این روش، در لوله آزمایش به ۰/۱میلی لیتر عصاره اتانولی (با غلظت ۱میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول اتانولی استاندارد اسید گالیک (غلظت ۲۵- ۳۰۰ میکروگرم) ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین –

www.SID.ir

Archive of SID

سیوکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ۰/٤ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه و مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (فارماسیا مدل ال کا بی نووآ اسپکت II ساخت انگلستان) در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنل تام در نمونه های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان گردید.

۲- اندازه گیری فلاونوئید تام:

مقدار فلاونوئیدها در نمونه عصاره‌های گیاهی با اندکی تغییر توسط روش زیشن و همکاران اندازه‌گیری شد (۱٦). بر طبق این روش، فلاونوئیدها با اتصال به آلومینیوم تشکیل کمپلکس زرد رنگی می‌دهند. به ۱ میلی لیتر نمونه عصاره (غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول استاندارد روتین (۵۰-۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر نیتریت سدیم ۵ درصد اضافه شد و پس از مخلوط نمودن به مدت ٦ دقیقه در دمای آزمایشگاه ۰/۲ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه یک میلی‌لیتر هیدراکسید سدیم یک مولار افزوده و بلافاصله جذب نوری در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. مقادیر فلاونوئید تام در نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم روتین به ازاء گرم عصاره (میلی گرم در گرم) محاسبه شد.

۳- ارزیابی فعالیت ضد اکسیدان بوسیله رادیکال آزینو بیس اتیل تیازولین سولفونیک ($ABTS^{\cdot+}$) یا پتانسیل آنتی اکسیدانی معادل ترولکس:

فعالیت ضد اکسیدان عصاره گیاهی توسط روش ری و همکارانش ارزیابی شد (۱۷). به منظور تولید $ABTS^{\cdot+}$، ۷ میلی‌مول ABTS و ۲/٤۵ میلی‌مول پرسولفات پتاسیم در آب مقطر حل و به مدت ۱٦-۱۲ ساعت در دمای محیط و در تاریکی نگه داشته شد. محلول $ABTS^{\cdot+}$ با اتانول خالص تا حدی رقیق شد که جذب آن در طول موج ۷۳٤ نانومتر، ۰/۷±۰/۰۲ شد. به ۰/۰۲ میلی لیتر عصاره اتانولی (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر) یا محلول اتانولی استاندارد ترولکس، ۲ میلی‌لیتر محلول اتانولی $ABTS^{\cdot+}$ اضافه و مخلوط شد. همچنین محلول $ABTS^{\cdot+}$ به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. بعد از ٦ دقیقه قرار دادن نمونه‌ها در دمای محیط، ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ال کا بی نووآ اسپکت II ساخت انگلستان در طول موج ۷۳٤ نانومتر توسط اتانول خالص صفر گردید و سپس جذب نمونه ها قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول ترولکس با غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومول استفاده شد. درصد فعالیت خنثی‌سازی رادیکالی عصاره (RSA Radical Scavinging Activity) بر اساس فرمول زیر بدست آمد.

$A_{Control}$ = میزان جذب کنترل در زمان صفر(t=0).

A_{sample}= میزان جذب نمونه در زمان ٦ دقیقه (t=6min)

$$\%RSA = \frac{\left(A_{Control} - A_{Sample}\right)}{A_{Control}} \times 100$$

فعالیت ضد اکسیدان نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره ($\mu mol/g$) بیان گردید.

٤- ارزیابی فعالیت ضد اکسیدان بوسیله رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل ($DPPH^{\cdot}$):

فعالیت ضد اکسیدان تام نمونه‌های عصاره توسط روش ون گادو و همکارانش ارزیابی شد (۱۸). بر طبق این روش، ۲/٤ میلی‌گرم پودر DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول خالص حل شد. در لوله آزمایش به ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر نمونه یا محلول استاندارد ترولکس، ۱ میلی‌لیتر محلول الکلی DPPH اضافه و مخلوط شد. همچنین از محلول $DPPH^{\cdot}$ به عنوان کنترل استفاده گردید. بعد از ۱۰ دقیقه قرار دادن در تاریکی و دمای محیط، جذب نوری نمونه‌ها قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول ترولکس با غلظت ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرومول استفاده شد. بر اساس فرمولی که در بالا ذکر شده است، درصد فعالیت خنثی‌سازی رادیکالی عصاره (RSA) برای هر نمونه بدست آمد و سپس فعالیت ضداکسیدان نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم عصاره محاسبه شد.

۵- اندازه‌گیری خواص آنتی اکسیدانی از طریق آزمون توان آنتی اکسیدانی احیاء یون فریک (FRAP):

برای اندازه‌گیری توانایی احیاءکنندگی نمونه‌های عصاره به طریق FRAP از روش بنزی و استرین با اندکی تغییر استفاده شد (۱۹). محلول کار FRAP بوسیله مخلوط کردن ۱۰ میلی لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

بافراستات ۳۰۰ میلی مول (PH=۳/٦)، ۱ میلی‌لیتر ۲و٤و٦ تری-۲- پیریدیل- S- تریازین (TPTZ) ۱۰ میلی مول (حل شده در اسید کلریدریک ٤۰ میلی مول) و ۱ میلی‌لیتر کلرید آهن ۲۰ میلی‌مول روزانه تهیه شد. در لوله آزمایش به ۰/۰۲ میلی‌لیتر عصاره (با غلظت ۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد آبی سولفات آهن (غلظت ۰/۳۷-۰/۱۸۵ میکرومول)، ۱ میلی‌لیتر از محلول کاری FRAP اضافه و مخلوط گردید. مخلوط فوق ٥ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها قرائت شد. فعالیت احیاءکنندگی نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره محاسبه شد.

٦- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسیدان به طریق فسفومولیبدنم (PMB):

برای اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسیدان عصاره‌ها به طریق کمپلکس فسفومولیبدنم از روش پریتو،پنیدا و اگولار استفاده شد (۲۰). به ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های عصاره مورد مطالعه (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد ترولکس (غلظت ۰/٤-۱/٦ میکرومول)، ۱ میلی‌لیتر از محلول معرف (اسید سولفوریک ۰/٦ مول، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مول و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی مول) اضافه و مخلوط شد. نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹٥ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ٦۹٥ نانومتر در مقابل محلول شاهد قرائت شد. فعالیت ضداکسیدان نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره محاسبه شد.

۷- اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسیدان به روش توان احیاءکنندگی (RP):

پتانسیل احیاءکنندگی نمونه‌ها و استاندارد بر طبق روش سینگ و راجینی اندازه‌گیری شد (۲۱). به ۰/۱میلی لیتر عصاره (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا محلول استاندارد بوتیل هیدرواکسی آنیزول، یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با PH=٦/٦ و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۰/۱٪ اضافه و مخلوط نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٥۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول بالائی حاصل از (سانتریفوژ یخچال‌دار یونیورسال هیتاچی کا دو اس دی ۷۲۰۰ آلمان) را با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ کلروفریک و یک میلی‌لیترآب مقطر مخلوط کرده و جذب نوری آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

برای بررسی نتایج آزمونها و مقایسه میانگین عصاره های مختلف از تجزیه و تحلیل واریانس استفاده شد. $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

تمامی اندازه‌گیریها برای هر نمونه گیاهی سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت میانگین ±انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج:

در این تحقیق از سه عصاره گیاهی شامل: کلپوره، آویشن و مرزنجوش با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد.

پس از وارد کردن داده‌ها در نرم‌افزار اکسل معادله خطی رگرسیون و ضریب همبستگی با استفاده از غلظت‌های مختلف و مشخص بطور اختصاصی برای هر آزمون رسم شد و نتایج هر آزمایش محاسبه شد.

بر طبق نتایج جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱، محتوای فنلی نمونه‌ها در محدوده ۱٤۰/۳-۹۷/۷ میلی‌گرم اسید گالیک بود. بود که مرزنجوش دارای بیشترین مقدار و آویشن کمترین مقدار فنل تام را داشت.

جدول شماره ۱- برخی ویژگی‌های گیاهان کلپوره، آویشن و مرزنجوش (۱۴)

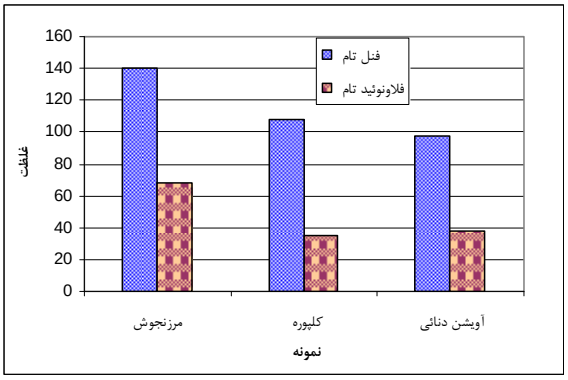
نام گیاه	نام علمی گیاه	خانواده	نمونه گیاهی	نام عمومی	مصرف
کلپوره	Teucrium Polium	Lamiaceae	اندام هوایی	Germarder	مقوی، ضد تشنج، رفع بیماریهای دستگاههای تناسلی - ادراری
آویشن	Thymus Daensis	Lamiaceae	اندام هوایی	Thyme	ضد نفخ، هضم‌کننده غذا، ضد اسپاسم، ضد سرفه و خلط آور
مرزنجوش	Origanurm Vulgare	Lamiaceae	اندام هوایی	Oregano	مقوی، مدر، آرام‌بخش، ضد عفونی‌کننده، التیام دهنده زخم‌ها

www.SID.ir

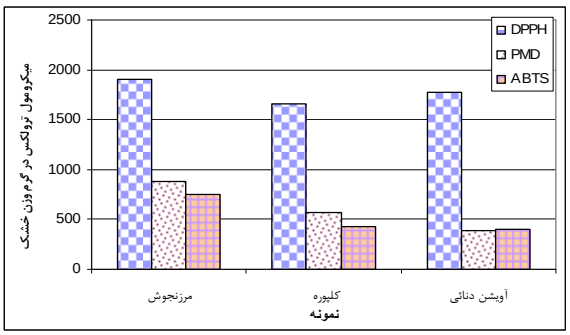
Archive of SID

اختلاف معنی‌داری بین میزان فنل تام آویشن دنائی و مرزنجوش ($P<0/05$) دیده شد. تغییر معنی‌داری بین میزان فنل تام کلپوره و مرزنجوش و فنل تام کلپوره و آویشن دنائی دیده نشد.

در نمودار ۱ و جدول ۲ مقدار فلاونوئید تام نمونه‌ها بین ۶۸-۳۴/۶ میلی‌گرم روتین در گرم عصاره بود. مرزنجوش دارای بیشترین مقدار (۴/۳± ۶۸ میلی‌گرم روتین) و کلپوره کمترین میزان فلاونوئید تام را داشت (۳/۳±۳۴/۶ میلی‌گرم روتین). اختلاف معنی‌داری بین فلاونوئید تام کلپوره و مرزنجوش و آویشن دنائی و مرزنجوش دیده شد ($P<0/001$).



نمودار شماره ۱- مقایسه میزان فنل و فلاونوئید تام در عصاره هیدروالکلی مرزنجوش، کلپوره و آویشن دنایی در گرم عصاره



نمودار شماره ۲- مقایسه عصاره هیدروالکلی سه آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل تروکس و فسفومولیدینم بر حسب میکرومول تروکس در هر گرم عصاره در نمونه‌های مرزنجوش، کلپوره و آویشن دنایی

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار فعالیت ضداکسیدان و میزان فنل و فلاونوئید تام در عصاره هیدروالکلی کلپوره، آویشن دنایی و مرزنجوش

آزمایشات	کلپوره	آویشن دنایی	مرزنجوش
* فنل تام	۱۰۷/۶±۹/۲	۹۷/۷±۱۱/۶	۱۴۰/۳±۱۸
** فلاونوئید تام	۳۴/۶±۳/۳	۳۷/۵±۲/۸	۶۸±۴/۳
*** دی فنیل پیکریل هیدرازیل	۱۶۵۴±۶/۵	۱۷۷۶/۶±۳/۱	۱۹۰۶±۶۶/۵
♦ توان آنتی‌اکسیدانی معادل تروکس	۴۲۷/۴±۳/۲	۴۰۳±۳	۷۴۷±۵/۱
♦♦ توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن	۸۴۵/۳±۵/۶	۹۶۲±۳/۵	۱۰۷۴/۶±۵
♦♦♦ فسفومولیبدات	۵۷۳/۳±۳۶	۳۹۰±۳۶	۸۸۰±۷۰
توان احیاءکنندگی	۱/۰۸±۰/۱	۰/۹±۰/۱۴	۱/۲۴۳±۰/۰۷

* (میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره)
** (میلی‌گرم روتین به ازاء گرم عصاره
*** (میکرومول تروکس در گرم عصاره
♦ (میکرومول تروکس در گرم عصاره)
♦♦ (میکرومول آهن در گرم عصاره)
♦♦♦ (میکرومول تروکس در گرم عصاره)

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد عصاره‌های مختلف بر اساس روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل در عصاره مرزنجوش دارای بیشترین مقدار (۱۹۰۶/۵±۶۶/۵ میکرومول تروکس) و کلپوره دارای کمترین مقدار (۱۶۵۴/۳±۶/۵) بود. اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت ضد رادیکالی دی فنیل پیکریل هیدرازیل در تمام عصاره‌های مورد مطالعه وجود دارد ($P<0/001$) (جدول و نمودار شماره ۲).

نتایج جدول شماره ۲، نشان می‌دهد که فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌ها بر اساس آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل تروکس در عصاره مرزنجوش دارای بیشترین (۷۴۷±۵/۱ میکرومول تروکس) و آویشن (۴۰۳±۳ میکرومول تروکس) دارای کمترین مقدار بود. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل تروکس کلپوره و آویشن دنائی و مرزنجوش دیده شد ($P<0/001$).

محدوده مقدار فعالیت ضداکسیدانی به روش آزمون توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن از ۸۴۵/۳ تا ۱۰۷۴/۶ میکرومول آهن در گرم عصاره بود. فعالیت ضداکسیدان مرزنجوش دارای بیشترین مقدار (۵ ±۱۰۷۴/۶) و کلپوره دارای کمترین مقدار (۸۴۵/۳±۵/۶) میکرومول آهن در گرم عصاره بود. تفاوت معنی‌داری بین کلپوره و آویشن دنائی و مرزنجوش دیده شد ($P<0/001$) (جدول و نمودار شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

محدوده فعالیت ضداکسیدان نمونه‌ها در روش فسفومولیبدینم ۸۸۰–۳۹۰ میکرومول ترولکس در گرم عصاره بود. فعالیت ضد اکسیدان مرزنجوش بیشترین مقدار (۷۰±۸۸۰) و آویشن دنائی کمترین مقدار بود (۳۶±۳۹۰). اختلاف معنی‌داری در روش فسفومولیبدنم بین تمام نمونه‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$).

در آزمایش توان احیاءکنندگی، جذب نوری نمونه‌ها بطور مستقیم توسط (دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ال کا بی نووآ اسپکت II ساخت انگلستان) قرائت شد. در این آزمایش جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با خاصیت احیاءکننده نمونه‌ها دارد. به عبارت دیگر جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاءکنندگی بیشتر می‌باشد. بیشترین و کمترین جذب نوری به ترتیب مربوط به مرزنجوش (۰/۰۰۷±۱/۲۴۳) و آویشن دنائی (۰/۱۴±۰/۹) بود که اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۵$). اختلاف معنی‌داری بین سایر عصاره‌ها مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری:

این اولین مطالعه برون‌تنی انجام شده در خصوص اندازه‌گیری فعالیتهای ضداکسیدان گیاهان داروئی در شهر یاسوج می‌باشد که از سه نوع گیاه دارویی استفاده شد.

گیاه مرزنجوش دارای بیشترین مقدار فنل تام و فعالیتهای ضد اکسیدان می‌باشد و می‌توان نتیجه گرفت که خاصیت قوی ضد اکسیدان این گیاه مربوط به ترکیبات فنلی موجود در آن می‌باشد. ترکیبات فنلی موجود در مرزنجوش عبارت از: اسید پروتوکاتچینیک و گلیکوزید مربوطه، اسید کافئیک و اسید روزمارینیک است (۲۲). گزارش بعضی از محققان بیانگر این است که ارتباط بسیار بالائی بین آزمایش فنل تام به روش معرف فولین – سیوکالتو با آزمایشات فعالیت ضد اکسیدان دی فنیل پیکریل هیدرازیل، فعالیت آنتی اکسیدانی معادل ترولکس و پتانسیل آنتی اکسیدانی احیاء آهن وجود دارد (۲۵–۲۳). در این مطالعه ارتباط مستقیمی بین فنل تام و فعالیت ضد اکسیدان مرزنجوش مشاهده گردید.

اختلاف معنی‌داری بین فنل تام نمونه آویشن دنائی و مرزنجوش بخاطر ترکیبات مختلف در این دو نوع گیاه مشاهده شد.

خاصیت قوی آنتی اکسیدانی مرزنجوش ناشی از میزان فنل تام و فلاونوئید می‌باشد که با تحقیق حاضر همخوانی داشت (۲۶).

یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنل تام، فلاونوئیدها می‌باشد که خاصیت ضد اکسیدان آنها به اثبات رسیده است. میزان فلاونوئید مرزنجوش دارای بالاترین و کلپوره دارای کمترین مقدار بود. علیرغم اینکه میزان فنل تام آویشن کمتر از کلپوره است ولی میزان فلاونوئید آن بیشتر است. فلاونوئیدها دارای ۹ نوع می‌باشند که میزان آنها بسته به نوع گیاهان فرق می‌کند.

فلاونوئیدها دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد تب، ضد آلرژی و خواص ضد اکسیدان می‌باشند. مصرف فلاونوئیدها باعث کاهش ابتلا به بیماری قلبی و عروقی می‌شوند. بنابراین استفاده از گیاهان مرزنجوش و کلپوره و آویشن دنائی در طب سنتی قابل توجیه است که می‌تواند بیشتر بخاطر ترکیبات فلاونوئیدی نسبتاً بالای آنها باشد (۲۸–۲۷).

کلپوره در درمان فشارخون بالا، دیابت و به عنوان ضد باکتری، ضد التهاب، ضد درد، ضد تب و ضد اسپاسم بکار می‌رود. فیتوکمیکالهای استخراج شده از عصاره آبی این گیاه بیشتر فنل و فلاونوئید تام بود که بیشترین خواص درمانی این گیاه را به خاطر وجود این دو ترکیب می‌دانند (۲۹).

در این پژوهش آویشن دنائی دارای خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی بود که با مطالعه‌ای که در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده بود، همخوانی داشت (۳۰).

آویشن دنائی در طب سنتی در درمان زکام، برونشیت، آسم و ناراحتی‌های معده بکار می‌رود. خواص درمانی آویشن می‌تواند به علت وجود ترکیبات موجود در گیاه آویشن بخصوص فلاونوئیدها و فنل تام باشد (۳۰).

بیشترین قدرت مهار رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل مربوط به مرزنجوش بود. با توجه به بالا بودن میزان فنل تام مرزنجوش انتظار می‌رود که بیشترین خاصیت مهار رادیکالی را داشته باشد. اعتقاد بر این است که ارتباط مستقیمی بین مقدار فنل تام و خاصیت ضد رادیکالی دی فنیل پیکریل هیدرازیل وجود دارد که در این تحقیق این ارتباط وجود دارد (۳۱).

رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل یک رادیکال آزاد، الی نیتروژن‌دار و پایدار به رنگ بنفش می‌باشد که روش حساس

www.SID.ir

Archive of SID

،ساده و سریع برای اندازه‌گیری فعالیت ضـد اکـسیدان ترکیبـات خالص و یا عصاره گیاهی می‌باشد (۳۲).

رنگ اولیه آن پس از احیاء تبدیل به رنگ زرد می‌شود. خاصیت احیاءکنندگی نمونه‌ها را می‌توان از طریق کاهش در جذب نوری آن اندازه‌گیری کرد. می‌توان گفت که خاصیت احیاءکنندگی نمونه مرزنجوش تفاوت معنی‌داری با کلپوره دارد.

الگوی فعالیت ضدرادیکالی یا آنتی اکسیدانی گیاهان بر اساس آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس شبیه به آزمونهای فسفومولیبدات و توان احیاءکنندگی بود. بدین صورت که بیشترین فعالیت مربوط به مرزنجوش و کمترین فعالیت مربوط به آویشن دنائی بود. معمولاً هرچقدر ترکیبات فنل تام بیشتر باشد، خاصیت آنتی اکسیدانی در آزمونهای فوق بیشتر می‌شود که در این تحقیق این ارتباط مشاهده شد (نمودار شماره ۲).

ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد (تانین‌ها)، توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد با فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروههای جا به جا شونده هیدروکسیل دارد (۲۲). با توجه به نتایج این تحقیق احتمالاً مرزنجوش دارای ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد می‌باشد که در تمام روشهای مورد آزمایش دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی است.

گیاهانی که دارای توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن بالائی هستند پتانسیل خنثی کردن رادیکالهای آزاد موجود در بدن را دارند که در این تحقیق بیشترین خاصیت ضد رادیکالی بترتیب ناشی از عصاره مرزنجوش، آویشن و کلپوره بود.

تمام ضد اکسیدانها قادر به احیاء آهن در مدت زمان کوتاهی نیستند، مثلاً پلی فنل‌های غذایی در محیط آب حتی بعد از چندین ساعت بطور آهسته باعث احیاء آهن می‌شوند، در حالیکه در این تحقیق مدت زمان انجام واکنش پنج دقیقه می‌باشد که زمان بسیار کوتاهی برای انجام واکنش برای بعضی ترکیبات می‌باشد. در این تحقیق علیرغم اینکه کلپوره دومین گیاه از نظر مقدار فنل تام بود، ولی از نظر میزان آزمون پتانسیل آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن در موقعیت سوم قرار گرفت. این اختلاف می‌تواند به علت فنل‌هایی باشد که واکنش کندی با آزمون پتانسیل آنتی اکسیدانی احیاء آهن داشتند (۳۳).

در روش فسفومولیبدینم الگوی فعالیت آنتی اکسیدانی شبیه به آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس بود. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت احیاءکنندگی مرزنجوش و آویشن دنائی دیده شد که می‌تواند به علت ترکیبات فیتوکمیکال دو گیاه می‌باشد (جدول و نمودار شماره ۲).

در روش احیاءکنندگی افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش بیانگر قدرت احیاءکنندگی نمونه می‌باشد (۳٤). نتایج این آزمایش با بقیه آزمونهای دیگر تفاوت داشت، زیرا در این روش مستقیماً جذب نوری حاصل از واکنش اندازه‌گیری و به عنوان جواب آزمایش گزارش شد و از استاندار بوتیل هیدراکسی آنیزول برای مقایسه استفاده شد. میزان جذب نوری استاندارد در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر برابر با مرزنجوش بود. می‌توان گفت که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزنجوش برابر با بوتیل هیدراکسی آنیزول می‌باشد.

در این تحقیق بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای فنل تام، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس، فسفومولیبدینم و توان احیاءکنندگی الگوی ضد اکسیدانی عبارتند از: مرزنجوش> مریم نخودی> آویشن بود.

الگوی ضد اکسیدانی بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای فلاونوئید تام، دی فنیل پیکریل هیدرازیل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن مرزنجوش> آویشن > کلپوره بود.

گیاهان داروئی مورد استفاده در منطقه مورد مطالعه می‌توانند بعنوان منابع امید بخش جهت تأمین منابع طبیعی ضداکسیدان باشند. بهترین فعالیت ضداکسیدان مربوط به مرزنجوش بود.

عدم مقایسه لازم بین آزمایشات انجام شده یکی از محدودیتهای مهم در این پژوهش است. زیرا در انجام این گونه آزمایشات برای بیان مقادیر ضد اکسیدانها نیاز به استاندارد می‌باشد. فراوان بودن ترکیبات فیتوکمیکال در گیاهان از یک طرف، کمیاب بودن ترکیبات سنتزی آنتی اکسیدانها در بازار کار از طرف دیگر باعث می‌شود که یک استاندارد واحد برای اندازه‌گیری به راحتی در دسترس وجود نداشته باشد.

علاوه بر این، عصاره‌گیری به روشهای مختلف و بکار بردن مقادیر متفاوت نمونه در اندازه‌گیریها توسط محققین باعث ایجاد اشکال در مقایسه تحقیق‌های انجام شده می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری:

بدینوسیله از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی یاسوج که امکان اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References منابع

1. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive Oxygen, Species, Aging, and Antioxidative, Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004;3:21-33.
2. Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovasular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:47-54.
3. Bourgeois CF. Antioxidant vitamins and health: cardiovascular disease, cancer, cataracts, and aging. New York: HNB Press; 2003.
4. Aviram M, Kaplan M, Roserhold M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxinases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;170:263-300.
5. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001;54:176-186.
6. Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70:343-347.
7. Gao JJ, Igalashi K, Nukina M. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in Caryopteris incana. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63:983-988.
8. Osawa T, Namiki M. Natural antioxidant isolated from Eucalyptus leaf waxes. *J Agric Biol Chem*. 1985;33:777-780.
9. Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:1027-1038.
10. Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:198-206.
11. Steinar D, Senoo H, Wake K, Kari H, Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr*. 2003;133:1286-1290.
12. Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Dehghan G, Abdollahi M. In vivo antioxidant potential of Teucrium polium as compared to alpha a-tocopherol. *Acta Pharm*. 2007;57:123–129.
13. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 1998;44:1309–1315.
14. Zargari A. Medicinal Plants.5th ed. Tehran: Tehran University Press; 1990:28-132.
15. McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*. 2001;73:73-84.
16. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999;64:555–559.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology*. 1999;26:1231–1237.
18. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibosed tea (Aspalathon linearis), a-tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45:632–638.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: The FRAP Assay. *Anal Bioch*. 1996;239:70–76.

20. Prieto P, Pineda M, Aguilar MM. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269:337–341.

21. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr*. 1986;44:307-315.

22. Lagouri V, Boskou D. Nutrient antioxidants in oregano. *Int J Food Sci Nutr*. 1996;47:493-497.

23. De Beer D, Joubert E, Gelderblom WC, Manley M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J Agric Food Chem*. 2003;51:902-909.

24. Madhujith T, Izydorczyk M, Shahidi F. Antioxidant properties of pearled barley fractions. *J Agric Food Chem*. 2006;3:3283-3289.

25. Stratil P, Klejdus B, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem*. 2006;54:607-616.

26. Faleiro L, Miguel G, Gomes S, Costa L, Veranico F, Teixeira A. et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from Thymbra capitata L. (Cav.) and Origanum vulgare L. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8162–8168.

27. Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochrome P450. *Chemico-Biological Int*. 2002;139:1–21.

28. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*. 1996;24:790–795.

29. Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, Mohammadira A, Dehghan GH, Abdollahi M. In vivo antioxidant potential of Teucrium polium as compared to a-tocopherol. *Acta Pharm*. 2007;57:123–129.

30. Alavi L, Barzegar M, Jabbari A, Naghdi Badi H. Effect of Heat Treatment on Chemical Composition and Antioxidant Property of Thymus daenensis Essential Oil. *Journal of Medicinal Plants*. 2010;9:129-138.

31. Siatka T, Kasparová M. Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH 31 Scavenging Activity of Bellis perennis L. *Molecules*. 2010;15:9450-9461.

32. Gil MI, Tomás-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 2000;48:4581-4589.

33. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal Methods*. 2009;2:41–60.

34. Jayaprakash GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (vitis vinifera) extracts on peroxidation models in-vitro. *Food Chemistry*. 2001;55:1018-1022.

www.SID.ir

Archive of SID

Antioxidant activities, total phenols and total Flavonoids assay of Origanurm vulgare, Teucrium polium and Thymus daensis

A. Mirzaee, PhD [1] H. Jaberi Hafashani, MSc [2] A. Madani, PhD [3]

Assistant Professor Department of Biochemistry , Center of Medicine Plant [1] , Master of Biochemistry [2] , Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj, Iran. Assistant Professor Department of Epidemiology [3] , Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

(Received 2 Oct, 2010 Accepted 9 Mar, 2011)

ABSTRACT

Introduction: Medicinal plants are important sources of antioxidants. Natural antioxidants increase the antioxidant capacity of the plasma and reduce the risk of certain diseases such as cancer, heart diseases and stroke. Synthetic antioxidants commonly used in processed foods have side effects and are toxic. Therefore, there is a need for more effective, less toxic and cost effective antioxidants derived from medicinal plants.

Methods: The Stems and flower sample of plants were air-dried, finely ground and extracted by 70% ethanol for 48 hours. The antioxidant activity of three ethanolic extract of medicinal plants (Origanurm vulgare, Teucrium polium and Thymus daensis), were analyzed by five different methods including (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazy l (DPPH) radical ,2,2-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline -6-sulphonic acid (ABTS) radical cation, Ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP) , phosphomolybdenum (PMB) and reducing power (RP). For determination of antioxidant components total phenolic content was analyzed.

Results: The total phenolic content and flavonoid of medicinal plant extracts ranged from 97.7-140 mgE/g and 34.6-68 mg. Origanurm vulgare had the highest value of total phenol and flavonoid content. There was significant variation in total phenol value of Origanurm vulgare and Thymus daensis ($P<0.05$). Origanurm vulgare showed highest activities in ABTS and DPPH assays 747 ± 5.2 and 1906.5 ± 66.5 respectively. Significant difference activities was found in all extracts in FRAP and PMB assays ($P<0.0001$).

Conclusion: The extracts showed various antioxidant activities in all antioxidant assay systems. Origanurm vulgare extract could be an important dietary source of phenolic compounds with high antioxidant capacity.

Correspondence:
A. Mirzaee, PhD.
Center of Medicine Plant, Medical School. Yasouj University of Medical Sciences.
Yasouj, Iran
Tel:+98 917 143 4236
Email: mirzaee3a2003@yahoo.com

Key words: Antioxidants - Flavonoids - Phenol

www.SID.ir