Archive of SID

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea* L. (مرکبان) از ایران

نفیسه الماسی[۱]، رویا کرمیان[۱*] و فرح کریمی[۲]

[۱] همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۴

چکیده

جنس *Centaurea* L. با حدود ۷۰۰ گونه در دنیا و ۷۰ گونه در ایران، بزرگ‌ترین جنس از تیره کاسنی (Asteraceae) است. گیاهان این جنس بدلیل خواص دارویی خود، در طب سنتی برخی کشورها کاربرد دارند. در این مطالعه سنجش محتوای فنلی، فلاونوئیدی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدباکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea* شامل *C. imperialis*، *C. iransharii* و *C. glastifolia* به تفکیک در دو بخش کاپیتول و اندام هوایی (برگ و ساقه) انجام شد. سنجش محتوای فنل کل به روش فولین- سیوکالتیو و سنجش محتوای فلاونوئید کل به روش کلریدآلومینیوم و ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH انجام شد. همچنین خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. محتوای فنلی عصاره‌ها قابل توجه و بین ۳۵/۹۲ تا ۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ها بین ۴/۴۵ تا ۵/۳۱ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره بود. تمام عصاره‌ها خاصیت مهارکنندگی بالای رادیکال آزاد نشان دادند و در بین آن‌ها، اندام‌های هوایی *C. iransharii* بیشترین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را داشت (IC_{50}=۰/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر). همچنین عصاره‌ها خاصیت ضدمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus megaterium* و *Bacillus thuringiensis* نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، فنل ، فلاونوئید، خاصیت ضد میکروبی، *Centaurea*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۱۳۴۱۶۱، پست الکترونیکی:R_karamian@basu.ac.ir

مقدمه

Centaurea L. یکی از جنس‌های مهم تیره Asteraceae است. گیاهان این جنس علفی یک‌ساله، دوساله یا چندساله، دارای ساقه منشعب یا ساده به ارتفاع ۲۵ تا ۸۰ سانتی‌متر هستند. آن‌ها برگ‌هایی سبز مایل به سفید و پوشیده از تارهای نسبتاً پنبه‌ای یا به ندرت بی‌کرک دارند و چون در مزارع گندم و غلات یافت می‌شوند، به گل گندم معروفند (۹). این گیاهان در منابع فارسی با عنوان قنطوریون، عنبر، ترنشاه و گل ذرت نامیده می‌شوند (۱). دستگاه زایشی در این گیاهان وضعیت خاصی دارد که در گیاهان دولپه دیگر دیده نمی‌شود. گل‌آذین به صورت کپه‌ای است که در آن محور یا دمگل در انتها به صورت نهنجی مشترک توسعه می‌یابد و در گریبانی از برگک‌ها محصور می‌شود. گل‌ها معمولا در کنار برگک‌های مادر که آنها را پولک (پرزهای روی نهنج) می‌نامند، قرار دارند. این جنس با حدود ۷۰۰ گونه پراکنش وسیعی در نیمکره شمالی دارد. مراکز اصلی تنوع این جنس اروپا، منطقه مدیترانه و جنوب غربی آسیاست (۳۴). این جنس در ایران حدود ۷۰ گونه دارد که در سرتاسر کشور پراکنده‌اند که حدود ۳۲ گونه آن

www.SID.ir

Archive of SID

انحصاری هستند (۲۲ و ۲۳). گیاهان این جنس خواص دارویی متنوعی دارند و در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارند (۱۳، ۱۵ و ۳۲). به طور مثال در ترکیه از گونه*Centurea cyanus* جهت درمان اسهال، افزایش نیروی بدن، افزایش اشتها و درمان تنگی نفس استفاده می‌شود. همچنین از گونه *Centurea behen* جهت رفع مشکلات معده، از گونه *Centurea calcitrapa* برای درمان تب و از گونه *Centurea jacea* به عنوان تب‌بر، ملین، اشتها آور و قاعده‌آور استفاده می‌شود (۷). از گونه *Centurea iberica* جهت تسکین دردهای شکمی و همچنین برای کاهش سوزش حاصل از نیش حشرات، نیش مار و تسکین درد زخم استفاده می‌شود (۳۳). در منابع طب سنتی ایران خواص مختلفی برای گل‌گندم (*Centurea cyanus*) ذکر شده‌است که از جمله می‌توان به تقویت دستگاه گوارش، درمان سوء هاضمه، یبوست، سرفه، سینه درد، سرما خوردگی، زکام و گریپ اشاره نمود. همچنین از این گونه برای درمان ورم کلیه، مثانه و مجاری ادراری، دفع آب و سموم بدن، تقویت قوه بینایی و درمان تراخم و نیز به عنوان محلول دهان شویه جهت رفع عفونت‌های دهان استفاده می‌شود. از کاپیتول گونه *cyanus* .*C*برای التیام التهاب پوست و چشم (۸; ۲۰) و از ساقه‌ها و برگ‌های آن برای درمان آبسه استفاده می‌شود (۲۶). به طور کلی شواهد علمی زیادی مبنی بر خواص دارویی جنس گل‌گندم همچون ضد دیابت، ضد شوره، ضد فشار خون، ضد رماتسیم، ضد التهاب، ضد درد، ضد تب، قابض، مدر، ضد باکتری وهمچنین خاصیت سمیت سلولی وجود دارد (۱۰ و ۱۲). گیاهان در طبیعت مانند کارخانه‌های تولید مواد طبیعی عمل می کنند.این مواد شامل متابولیت‌های اولیه و ثانوی می‌شود. مواد اولیه موادی هستند که توسط همه گیاهان تولید می‌شود و در تمامی آن‌ها یکسان هستند. اما متابولیت‌های ثانوی موجود در هر گیاه متفاوت از گیاهان دیگر است.اهمیت متابولیت‌های ثانوی از این جهتاست که اغلب متابولیتهای ثانوی خواص درمانی دارند. گل‌گندم نیز واجد متابولیت‌های ثانوی مختلف به‌ویژه ترکیبات فلاونوئیدی و ترپن‌ها است که مسئول خواص دارویی این جنس می‌باشند (۱۴، ۲۹ و ۳۵). به طور مثال در اسانس آن ، ترکیبات ترپنوئیدی گزارش شده‌است (۱۱). در پژوهش Akkol و همکاران (۲۰۰۹)، دو سزکوئی‌ترپن استخراج شده از ریشه و بخش هوایی دو گونه *Centaurea* عوامل ضد درد و ضد تب معرفی شده‌اند (۲) و در پژوهش‌های Skaltsa (۲۰۰۰) سزکوئی‌ترپن‌های استخراج شده، خاصیت ضد قارچی قابل توجهی نشان داده‌اند (۲۹).

رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن مخرب مولکول‌های زیستی چون لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها هستند و بدن توسط آنتی‌اکسیدان‌هایی چون برخی آنزیم‌ها، گلوتاتیون، فریتین و ... از خود در برابر این مواد مخرب دفاع می‌کند (۲۱). وجود این ترکیبات آنتی‌اکسیدان برای سلامت بدن و جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان، اختلال سیستم عصبی، پیری و دیابت لازم است (۱۶، ۱۸ و ۲۱). بررسی‌های انجام شده در راستای سلامت جوامع، ارتباط میان رژیم غذایی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و کاهش بروز برخی از بیماری‌ها را نشان داده است (۶). تاکنون روی متابولیت‌های ثانوی و اثرات بالینی بسیاری از گونه‌ها و جمعیت‌های این جنس مطالعاتی صورت گرفته است (۳، ۴ و ۵)، لیکن هنوز گزارشی از گونه‌های بومی ایران ارائه نشده‌است. در تحقیق حاضر سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل و نیز خاصیت آنتی-اکسیدانی و ضدباکتریایی سه گونه بومی از جنس *Centaurea* برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: سه گونه *C. imperialis* ، *C. iransharii* و *C. glastifolia* از بخش *Cynaroides* از نقاط مختلف ایران جمع آوری شدند و پس از شناسایی، یک نمونه از هر گونه در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا

www.SID.ir

Archive of SID

(BASU) نگهداری شد. گیاهان جمع آوری شده در محیط تاریک و دور از رطوبت در دمای اتاق خشک شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های گونه‌های *Centaurea* مورد مطالعه.

شماره هرباریومی	ارتفاع (متر)	محل جمع‌آوری	گونه
BASU28880	۱۵۰۰	کردستان: ۵ کیلومتری بانه به سردشت	*C. imperialis*
BASU33041	۱۴۶۰	ایلام: ۵ کیلومتری آبدانان به دینار کوه	*C. iransharii*
BASU33001	۱۱۷۰	آذربایجان غربی: ۱۴ کیلومتری خوی به سلماس	*C. glastifolia*

تهیه عصاره: جهت تهیه عصاره متانولی بخش هوایی(ساقه و برگ) و کاپیتول به صورت جدا گانه آسیاب شده و سپس ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص (مرک) به روش سوکسله به مدت ۸-۶ ساعت عصاره-گیری شد. عصاره‌ها به کمک دستگاه روتاری اواپوریتور در دمای ۵۰°C تغلیظ شده و سپس خشک شد. عصاره‌های خشک شده در فریزر در محیط تاریک تا زمان مصرف نگهداری شدند.

تعیین محتوای فنل کل: سنجش محتوای فنل کل عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین- سیوکالتیو انجام شد (۳۰). در این سنجش ۰/۲ میکرولیتر از عصاره متانولی (با غلظت ۴/۱۰۰۰ گرم بر میلی‌لیتر) یا گالیک اسید با ۱ میلی لیتر محلول فولین- سیوکالتیو و ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ مخلوط و حجم نهایی محلول واکنش با افزودن آب مقطر به ۷ میلی‌لیتر رسید. پس از گذشت زمان ۲ ساعت در دمای اتاق، میزان جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول واکنش به همراه ۰/۲ میکرولیتر متانول (به‌جای عصاره) به عنوان بلانک استفاده شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد. در نهایت محتوای فنل کل عصاره‌ها بر اساس میلی-گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره ارائه گردید.

تعیین محتوای فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس روش Mc Donald و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد (۱۶). بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره (در غلظت ۱/۱۰گرم در لیتر) با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول خالص، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ ، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس محلول واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 صورت گرفت. از محلول واکنش به همراه ۰/۵ میلی-لیتر متانول به جای عصاره، به عنوان بلانک استفاده شد و هر آزمایش در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد DPPH: DPPH (۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) از رادیکال‌های آزاد پایدار است (۲۸). در این روش توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره-های موجود، از روی میزان تغییر رنگ محلول ارغوانی DPPH به محلول زرد رنگ سنجیده می‌شود. بدین منظور ۲/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم عصاره در هر میلی‌لیتر متانول) با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۳ میلی‌مول بر ۱ میلی‌لیتر) مخلوط شد. پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه در محیط تاریک و در دمای اتاق میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 اندازه‌گیری شد. از اسید آسکوربیک اسید به عنوان شاهد استفاده شد و هر

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه در سه تکرار ارزیابی گردید. خاصیت مهارکنندگی به روش زیر محاسبه شد (۳۱).

$$DPPH\% = 1-((As-Ab)/Ac)100$$

As = جذب محلول واکنش شامل عصاره (۲/۵ میلی‌لیتر) و محلول DPPH (۱ میلی‌لیتر)

Ab = جذب محلول حاوی عصاره (۲/۵ میلی‌لیتر) و متانول (۱ میلی‌لیتر)

Ac = جذب محلول حاوی متانول (۲/۵ میلی‌لیتر) و محلول DPPH (۱ میلی‌لیتر)

باکتری‌های مورد مطالعه: باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده شامل *Bacillus cereus* PTCC 1247، Wild *Staphylococcus aureus* PTCC 1017، *Bacillus megaterium* PTCC 1491 و *Bacillus thuringiensis* و باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده شامل *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221، *Serratia marcesens* PTCC 1111 و *Escherichia coli* PTCC Wild از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: تست حساسیت میکروبی عصاره با استفاده از روش انتشار دیسک مطابق دستور العمل CLSI انجام شد. برای کشت باکتری از محیط کشت جامد مولرهینتون استفاده شد. پس از آماده سازی محیط کشت و استریل کردن آن و قبل از سرد شدن کامل، حدود ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت‌های استریل با قطر ۱۰۰ میلی‌متر ریخته شد. مقدار µg ۳۰ عصاره حل شده در حلال DMSO بر روی دیسک‌های بلانک استریل (شرکت پادتن طب ایران) ریخته شد. سوسپانسیون میکروبی از تک‌کلونی باکتری‌های مورد مطالعه، در محلول نرمال سالین با کدورت معادل نیم مک‌فارلند (۱/۵×۱۰^{۸} cfu/ml) تهیه شد. باکتری‌ها به صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون، کشت داده شد. در عرض مدت ۵ دقیقه دیسک‌گذاری انجام شد. پلیت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در مقابل نور با کمک کولیس اندازه‌گیری شد. کشت باکتری و دیسک‌گذاری در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی محتوای فنل و فلاونوئید کل: در جدول ۲ میزان فنل کل در سه گونه *Centaurea* در دو بخش اندام هوایی و کاپیتول ارائه شده است. بر این اساس کاپیتول *C. iransharii* دارای بیشترین محتوای فنلی به میزان ۷۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بوده و کاپیتول *C. imperialis* کمترین مقدار معادل ۳۵/۹۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره را داشت.

جدول۲- محتوای فنل و فلاونوئید کل در سه گونه *Centaurea* به تفکیک اندام هوایی و کاپیتول.

گونه	بخش مورد مطالعه	محتوای فنل کل(mg GAE/g)	محتوای فلاونوئید کل(mg QE/g)
C. imperialis	برگ و ساقه	۴۸/۵۷±۱/۶^{b}	۵/۱۶±۰/۰۹^{b}
	کاپیتول	۳۵/۹۲±۱/۳^{a}	۴/۴۴±۰/۰۶^{a}
C. iransharii	برگ و ساقه	۵۶/۲۹±۱/۳^{c}	۵/۳۰±۰/۰۸^{b}
	کاپیتول	۷۳/۰۰±۳/۷^{e}	۵/۲۶±۰/۲۲^{b}
C. glastifolia	برگ و ساقه	۶۸/۱۱±۳/۴^{d}	۵/۳۱±۰/۰۷^{b}
	کاپیتول	۶۵/۲۱±۰/۷^{d}	۵/۱۴±۰/۰۷^{b}

حروف یکسان بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است. مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش‌های محدودی در مورد محتوای فنل کل از جنس *Centaurea* وجود دارد. میزان فنل کل در گونه *C. ammocyanus* ۱۰/۹ میلی‌گرم گالیک اسید برگرم عصاره (۳) ، در گونه *C. patula* ۲۵/۶۱، در گونه *C. pulchella* ۵۵ و در گونه *C. tchihatcheffi* ۲۲/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شد (۳۵). در مطالعات Aktumsek و همکاران (۲۰۱۱) میزان فنل در گونه *C. kurdica* ۱۳۵/۷۰، در گونه *C. rigida* ۱۱۳/۵۸، در گونه *C. amanicola* ۱۰۴/۵۹، در گونه *C. cheirolopha* ۱۷۵/۴۰ و در گونه *C. ptosimopappoides* ۸۲/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم بود (۳). در گونه‌های مورد مطالعه توسط Aktumsek (۲۰۱۳) میزان فنل در گونه *C. pseudoscabiosa* ۱۴۶، در گونه *C. pulcherrima* ۳۴۸/۵۶، در گونه *C. salicifolia* ۳۰۹/۳۹ و در گونه *C. babylonica* ۲۷۴/۹۴ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره برآورد شد (۳).

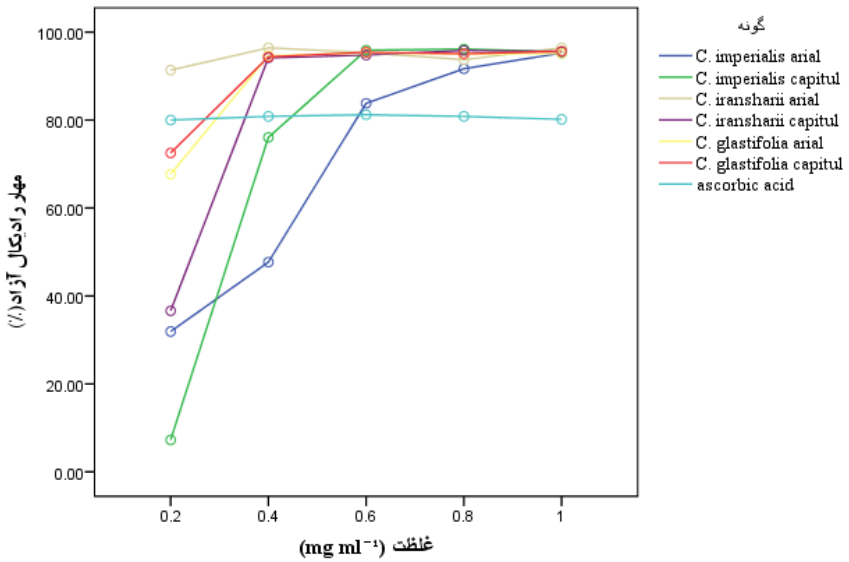
فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی را شامل می شوند که سهم بزرگی از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاهان را به خود اختصاص می‌دهند. در پژوهش حاضر میزان فلاونوئید کل در سه گونه مورد مطالعه بین ۴/۴۴ تا ۵/۳۱ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره مشاهده شد. با توجه به جدول ۴ و صرف نظر از تفکیک به بخش هوایی و کاپیتول، گونه‌های *C. iransharii* و *C. glastifolia* دارای محتوای فنلی و فلاونوئیدی بالایی هستند و تفاوت معنی-داری بین این دو گونه وجود نداشت، در حالی که *C. imperialis* محتوای کمتری از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را داشت. در یک مطالعه میزان فلاونوئید در گونه *C. kurdica* معادل ۱۶۵/۲، در گونه *C. rigida* معادل ۷۶/۲، در گونه *C. amanicola* ۱۳۴/۲، در گونه *C. cheirolopha* ۲۴۵ و در گونه *C. ptosimopappoides* ۸۲/۲ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره گزارش شد (۳). در پژوهشی دیگر میزان فلاونوئید گزارش شده در گونه *C. pseudoscabiosa* ۵۴/۳، در گونه *C. pulcherrima* ۱۸۲/۵، در گونه *C. salicifolia* ۱۴۹/۱ و در گونه *C. babylonica* ۱۳/۱ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره بود (۵). میزان فلاونوئید ارائه شده در گزارش Aktumsek و همکاران (۲۰۱۳) برای *C. polypodiifolia* ۴۵/۹، در *C. pyrrhoblephara* ۵۵/۷ و در *C. antalyense* ۴۶/۷ میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره بود (۴). در مجموع با توجه به گزارش حاضر و سایر مطالعات صورت گرفته می‌توان گفت که جنس گل‌گندم منبع مناسبی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بسیاری است. اهمیت ترکیبات گیاهی در ارتقا سلامت بدن، حفظ و نگهداری از مواد درون سلول‌ها، بافت‌ها و یا کل بدن انسان شناخته شده است. ترکیبات گیاهی که اغلب با سلامت انسان در ارتباط هستند شامل پلی‌فنل‌ها، کاروتنوئیدها و توکوفرول‌ها می‌باشند. پلی فنل-ها گروه بزرگی از متابولیت ثانوی هستند که خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد توسط آن‌ها در بسیاری از گیاهان گزارش شده است(۲۴). مطالعات متعددی در مورد استفاده از پلی-فنل‌های غذایی برای کاهش خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر قلب گزارش شده است. همچنین آن‌ها به عنوان عوامل ضد سرطان و ضد التهاب استفاده می‌شوند (۲۴).

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی : DPPH به عنوان یک معرف برای بررسی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره بکار می رود (۱۹). DPPH (۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل) که یک رادیکال آزاد ارغوانی رنگ است، در تماس با ترکیب آنتی‌اکسیدان (عصاره) به ترکیب پایدار زرد رنگی تبدیل می‌شود. ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره متانولی گونه‌های مورد مطالعه در غلظت-های مختلف در شکل ۱ ارائه شده‌است.

IC_{50} غلظت موثری از ترکیبِ آنتی‌اکسیدان است که در آن، ۵۰٪ رادیکال‌های آزاد DPPH مهار شده باشند. از این رو مقدار IC_{50} کم، بیانگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاست.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در اندام هوایی و کاپیتول سه گونه *Centaurea* در غلظت‌های مختلف.

در جدول ۳ و شکل ۲ مقادیر IC_{50} نمونه‌های مورد مطالعه ارائه گردید. میزان IC_{50} در اندام هوایی *C. iransharii* دارای کمترین مقدار معادل ۰/۱۱ میلی‌گرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال و گونه *C. imperialis* دارای بیشترین IC_{50} معادل ۰/۳۶ میلی‌گرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال بود. میزان IC_{50} در گونه *C. iransharii* کمتر از اسیدآسکوربیک یا ویتامین C معادل ۰/۱۲۵ میلی‌گرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال بوده و این حالت بیانگر پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی *C. iransharii* می‌باشد. میزان IC_{50} گزارش شده در مطالعات Zengin و همکاران (۲۰۱۰) در گونه *C. patula* به میزان ۴۱/۴۹، در گونه *C. pulchella* ۳۳/۳۶ و در گونه *C. tchihatchfeii* ۵۵/۷۰ میکروگرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال بود (۳۵). Aktumsek وهمکاران (۲۰۱۱) مقدار IC_{50} را به میزان *C. kurdica* ۳۶۷/۷، گونه *C. rigida* ۴۷۵، گونه *C. amanicola* ۵۸۱/۳، گونه *C. cheirolopha* ۲۲۷/۴ و در گونه *C. ptosimopappoides* ۷۴۵/۱ میکروگرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال گزارش کردند (۳).در مطالعه دیگری از Aktumsek و همکاران (۲۰۱۳) میزان IC_{50} گزارش شده در گونه *C. pseudoscabiosa* ۶۷۰/۵، در گونه *C. pulcherrima* ۱۸۷/۴، در گونه *C. salicifolia* ۲۸۴/۴ و در گونه *C. babylonica* ۴۶۴/۲ میکروگرم عصاره بر میلی‌لیتر حلال گزارش شد (۵).

بر اساس شکل ۱ پتانسیل آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره و یا به عبارتی با افزایش ماده موثره موجود در محلول واکنش افزایش پیدا کرده. بر اساس مطالعات آماری انجام شده، اثر غلظت‌های بکار رفته بر راندمان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH معنی‌دار بود.

همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، صرف نظر از تفکیک به بخش هوایی و کاپیتول، گونه *C. glastifolia* بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل و درصد مهارِ رادیکال آزاد DPPH را داشت. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه را می‌توان به محتوای فنلی و فلاونوئیدی بالای آن نسبت داد. مطالعات علمی نیز موید این امر است که ترکیبات فنلی رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کنند و به همین دلیل است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را اغلب با در نظر گرفتن محتوای فنلی آن‌ها می‌سنجند (۲۷).

بر اساس شکل ۲ پتانسیل آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره و یا به عبارتی با افزایش ماده موثره موجود در محلول واکنش افزایش پیدا کرده. بر اساس مطالعات آماری

www.SID.ir

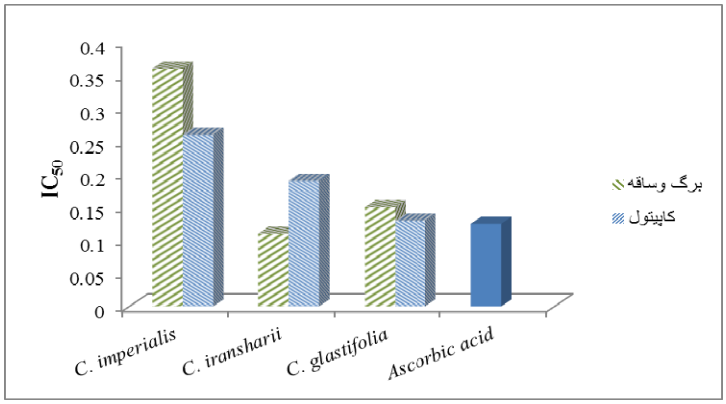
Archive of SID

انجام شده، اثر غلظت‌های بکار رفته بر راندمان مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH معنی‌دار بود.

جدول۳- میانگین درصد مهارِ رادیکال آزاد DPPH و IC_{50} (mg/ml) در اندام هوایی و کاپیتول سه گونه *Centaurea*.

گونه	بخش مورد مطالعه	میانگین درصد مهار	IC_{50} (mg/ml)
C. imperialis	برگ وساقه	۷۰/۰۷±۲۶/۷ a	۰/۳۶
	کاپیتول	۷۴/۱۷±۳۵/۵b	۰/۲۶
C. iransharii	برگ وساقه	۹۴/۶۵±۲/۶ f	۰/۱۱
	کاپیتول	۸۳/۳۸±۲۴/۲d	۰/۱۹
C. glastifolia	برگ وساقه	۸۹/۵۴±۱۱/۳e	۰/۱۵
	کاپیتول	۹۰/۶۰±۹/۴ e	۰/۱۳
Ascorbic acid		۸۰/۶۱±۱/۶c	۰/۱۲۵

مقادیر در سه تکرار ± SE گزارش شده‌اند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف داده‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.



شکل۲- مقایسه مقادیر IC_{50} در کاپیتول و اندام هوایی سه گونه *Centaurea* و اسید آسکوربیک.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: به منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی سه گونه *C. imperialis*، *C. iransharii* و *C glastifolia* چهار گونه باکتری گرم مثبت و سه گونه باکتری گرم منفی انتخاب و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها به روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. هیچ یک از گونه‌ها بر روی سه گونه باکتری گرم منفی *Enterobacter aerogenes* ، *Serratia marcesens* و *Escherichia coli* موثر نبود. تمام عصاره‌ها در برابر باکتری *Staphylococcus aureus*، خاصیت ضدمیکروبی خوبی نشان دادند. پژوهش Şen و همکاران (۲۰۱۳) نیز بیانگر فعالیت ضدمیکروبی بالای نه گونه *Centaurea* از فلور ترکیه در برابر باکتری *Staphylococcus aureus* بود.

جدول۴- مقایسه محتوای فنل و فلاوونوئید کل و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در سه گونه *Centaurea*.

گونه	محتوای فنل کل (mg GAE/g)	محتوای فلاوونوئید کل (mg QE/g)	IC_{50} (mg/ml)
C. imperialis	۴۲/۲۴ a	۴/۸a	۰/۳۱a
C. iransharii	۶۴/۶۴b	۵/۲۸a	۰/۳۰a
C. glastifolia	۶۶/۶۶b	۵,۲۲a	۰/۱۴b

میانگین مقادیر در سه تکرار گزارش شده‌اند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف داده‌ها در سطح $P \leq 0.05$ است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- فعالیت ضد میکروبی عصاره کاپیتول و اندام هوایی سه گونه *Centaurea* در برابر ۴ سویه باکتری گرم مثبت.

		قطر هاله عدم رشد(mm) سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه				
	غلظت(**mg/ml**)	*B. cereus*	*S. aureus*	*B. megaterium*	*B. thuringiensis*
اندام هوایی *C. imperialis*	۲۵	۹/۳۳^{a}	۱۰/۰۰^{a}	۸/۶۶^{a}	۱۲/۰۰^{a}
	۵۰	۱۴/۶۶^{a}	۱۵/۰۰^{b}	۱۲/۰۰^{b}	۱۷/۳۳^{c}
	۱۰۰	۱۸/۳۳^{b}	۱۹/۶۶^{c}	۱۵/۳۳^{c}	۱۵/۰۰^{b}
	۲۰۰	۲۱/۰۰^{b}	۲۱/۳۳^{c}	۱۷/۶۶^{c}	۱۹/۳۳^{c}
کاپیتول *C. imperialis*	۲۵	na	۱۴/۰۰^{a}	۷/۶۶^{a}	na
	۵۰	na	۱۵/۰۰^{a}	۱۳/۰۰^{b}	na
	۱۰۰	۹/۳۳ ^{a}	۱۹/۶۶^{b}	۱۴/۶۶^{b}	na
	۲۰۰	۱۱/۰۰^{b}	۲۱/۳۳^{b}	۱۷/۶۶^{c}	na
اندام هوایی *C. iransharii*	۲۵	۱۶/۶۶^{a}	۱۴/۶۶^{a}	۱۰/۳۳^{a}	۲۰/۰۰^{a}
	۵۰	۲۰/۳۳^{b}	۱۶/۳۳^{cb}	۱۲/۳۳^{b}	۲۲/۰۰^{a}
	۱۰۰	۲۱/۰۰^{cb}	۱۸/۳۳^{bc}	۱۵/۶۶^{c}	۲۱/۶۶^{a}
	۲۰۰	۲۳/۰۰^{d}	۲۰/۳۳^{c}	۱۶/۶۶^{c}	۲۳/۰۰^{a}
C. iransharii کاپیتول	۲۵	۱۳/۰۰^{a}	۱۷/۰۰^{a}	۱۱/۰۰^{a}	۱۲/۳۳^{a}
	۵۰	۱۷/۰۰^{b}	۱۸/۰۰^{a}	۱۰/۳۳^{a}	۱۴/۰۰^{a}
	۱۰۰	۱۸/۰۰^{b}	۱۷/۳۳^{a}	۱۱/۶۶^{a}	۱۲/۶۶^{a}
	۲۰۰	۱۷/۳۳^{b}	۱۹/۶۶^{b}	۱۴/۰۰^{a}	۱۴/۶۶^{a}
اندام هوایی *C. glastifolia*	۲۵	۲۱/۰۰^{a}	۱۷/۰۰^{a}	۱۷/۳۳^{a}	۱۸/۳۳^{a}
	۵۰	۲۴/۰۰^{b}	۱۸/۶۶^{ab}	۱۹/۰۰^{ab}	۲۰/۶۶^{b}
	۱۰۰	۲۵/۰۰^{b}	۲۰/۰۰^{cb}	۲۰/۰۰^{cb}	۲۲/۶۶^{cb}
	۲۰۰	۲۸/۳۳^{c}	۲۱/۶۶^{c}	۲۱/۶۶^{c}	۲۴/۳۳^{c}
C. glastifolia کاپیتول	۲۵	۲۰/۳۳^{a}	۱۵/۳۳^{a}	۱۶/۶۶^{a}	۱۳/۳۳^{a}
	۵۰	۲۳/۶۶^{b}	۱۹/۰۰^{b}	۱۷/۳۳^{ab}	۱۵/۳۳^{a}
	۱۰۰	۲۴/۰۰^{b}	۲۰/۳۳^{cb}	۱۹/۰۰^{cb}	۱۴/۳۳^{a}
	۲۰۰	۲۷/۶^{c}	۲۱/۰۰^{c}	۲۰/۶۶^{c}	۱۶/۳۳^{a}

حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است. na = غیر فعال بودن عصاره در برابر باکتری.

در پژوهش حاضر گونه‌های مورد مطالعه در برابر باکتری-های گرم منفی *Escherichia coli Klebsiella pneumonia*، و *Proteus mirabilis* فعالیت قوی از خود نشان ندادند (۲۵). عصاره‌ها در برابر سه گونه باکتری گرم مثبت دیگر که هر سه باسیل بودند، خاصیت ضدمیکروبی بالایی داشتند. با افزایش غلظت عصاره یا به عبارتی با افزایش ماده موثره موجود بر روی دیسک، قطر هاله عدم رشد در تمام نمونه‌ها افزایش یافت. بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری *B. cereus* در عصاره اندام هوایی و کاپیتول گونه *C. glastifolia* بود. در باکتری *B. megaterium* نیز بیشترین قطر هاله عدم رشد در عصاره بخش‌های مختلف گونه *C. glastifolia* مشاهده شد. در برابر باکتری *B. thuringiensis* بهترین عملکرد از عصاره اندام‌های هوایی گونه‌های *C. iransharii* و *C. glastifolia* مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

سمیت عصاره‌های مورد مطالعه بر روی باکتری *Bacillus cereus*، که به عنوان عامل مسمومیت غذایی شناخته شده است (۱۷)، زیاد بود به نحوی که اثر آن‌ها از آنتی‌بیوتیک Gentamicin قوی‌تر بود (۱۴).

جدول ۶- کنترل مثبت در برابر باکتری‌های مورد مطالعه.

قطر هاله عدم رشد (mm) حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها (کنترل مثبت)

سویه باکتری	Neomycin	Nitrofurantoin	Penicillin	Gentamicin
Bacillus cereus	۲۰	۱۰	na	۲۵
Staphylococcus aureus	۲۵	۳۰	na	۳۵
Bacillus megaterium	۲۰	۲۰	na	۲۵
Bacillus thuringiensis	۱۸	۲۴	na	۱۹
Enterobacter aerogenes	۱۶	۲۱	na	۲۲
Serratia marcesens	۱۹	۲۰	na	۲۲
Escherichia coli	۲۰	۳۰	na	۱۱

na = غیر فعال بودن عصاره در برابر باکتری.

نتیجه نهایی

نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی را برای گونه‌های مورد مطالعه نشان داد. این گونه‌ها حاوی محتوای فنل و فلاونوئید بالایی بودند. محتوای فنلی و فلاونوئیدی در گونه *C. iransharii* بیشترین میزان را به خود اختصاص داد و عصاره اندام هوایی این گونه نیز بیشترین پتانسیل مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را داشت. در مجموع برتری کاپیتول بر اندام هوایی از نظر خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH مشاهده نشد. گونه‌های مورد مطالعه به ویژه گونه *C. glastifolia* خاصیت ضدمیکروبی قابل توجهی داشت. در مجموع تمام عصاره‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه بسیار موثر بودند. در مجموع گونه *C. glastifolia* نسبت به دو گونه دیگر از نظر محتوای فنلی، فلاونوئیدی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برتر بوده و از این‌رو شاید بتوان خاصیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه را به محتوای فنلی و فلاونوئیدی بالای آن نسبت داد.

منابع

۱. پارسا م. ۱۳۸۸. دائرة المعارف پزشک در خانواده. ۱۱۵۰.

2- Akkol EK, Arif R, Ergun F, Yesilada E. 2009. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two Centaurea species. *J Ethnopharmacol* 122:210-5.

3- Aktumsek A, Zengin G, Guler G, Cakmak Y, Duran A. 2011. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five Centaurea L. species from Turkey flora. *Food and Chemical Toxicology* 49:2914-20.

4- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. 2013. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic Centaurea L. species. *Food Chem Toxicol* 55:290-6.

5- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. 2013. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four Centaurea L. taxa from Turkey. *Food Chemistry* 141:91-7.

www.SID.ir

Archive of SID

6- Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75:199-212.

7- Baytop T, 1999., 2nd, ed. I, Turkey, 316. 1999. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. pp 316. Nobel Tıp Kitabevleri.

8- Bruneton J. 1995. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. *Tec-Doc Lavoisier*:310–1.

9- Davis PH. 1988. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Edinburgh University Press.

10- Farrag NM, Abd El Aziz EM, El-Domiaty MM, El Shafea AM. 1993. Phytochemical investigation of Centaurea araneosa growing in Egypt. *Zagreb Journal of Pharmaceutical Sciences* 2:29–45.

11- Jovanovic SG, Skaltsa HD, Marin P, Sokovic M. 2004. Composition and antibacterial activity of the essential oil of six Stachys species from Serbia. *Flav. Frag. J.* 19:139-44.

12- Kaij-A-Kamb M, Amoros M, Girre L. 1992. Chemical and biological activity of the genus Centaurea. *Pharmacetica Acta Helvetica* 67:178–88.

13- Karamenders C, Khan S, Tekwani BL, Jacop MR, Khan IA. 2006. Antiprotozoal and antimicrobial activity of Centaurea species growing in Turkey. *Pharmaceutical Biology* 44:534-9.

14- Koca U, Suntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. 2009. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of Centaurea iberica Trev. ex Spreng. *J Ethnopharmacol* 126:551-6.

15- Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspers M, Nahar L, Sarker SD. 2007. Screening seed of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotrapy Research* 21:615-21.

16- McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73:73-84.

17- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA, Mosby. SL. 2002. *Medical Microbiology*. St. Louis: Mosby.

18- Nakiboglu M, Urek OR, Kayalı AH, Tarhan L. 2007. Antioxidant capacities of endemic Sideritis sipylea and Origanum sipyleum from Turkey. *Food Chemistry* 104:630-5.

19- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. . *Japanese Journal of Nutrition* 44:307–15.

20- Pieroni A, Quave CL, Villanelli ML, Mangino P, Sabbatini G, et al. 2004. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 91:331–44.

21- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63:1035-42.

22- Ranjbar M, Negaresh K, Karamian R. 2012. Centaurea regia subsp. javanroudense, a new subspecies of Centaurea sect. Cynaroides (Asteraceae), from flora of Iran. *Biological Diversity and Conservation* 5/1:5-10.

23- Ranjbar M, Negaresh K, Karamian R, Joharchi MR. 2012. Klasea nana (Asteraceae), a new species from NE Iran. *Anales Botanicci Fennici* 49:402-6.

24- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidants properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152–9.

25- Şen A, Bitiş L, Birteksöz-Tan S, Bulut G. 2013. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of some CentaureaL. species. *Marmara Pharmaceutical* 17:42-5.

26- Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 95–115.

27- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32.

28- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113:1202-5.

29- Skaltsa H, Lazari D, Panagouleas C, Georgiadou E, Garcia B, Sokovic M. 2000. Sesquiterpene lactones from Centaurea thessala and Centaurea attica. Antifungal activity. *Phytochemistry* 55:903-8.

30- Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28:49–55.

31- Stojicevic S, Stanisavljevic I, Velickovic D, Veljkovic V, Lazic MC. 2008. omparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of Sempervivum marmoreum L. extracts obtained by various extraction techniques. *Journal of the Serbian Chemical Society* 73:597-607.

www.SID.ir

Archive of SID

32- Ugur A, Duru ME, Ceylan O, Sarac N, Varol O, Kiveak I. 2009. Chemicmor al composition, antimicrobial and antioxidant activities of Centaurea ensiformis Hub.- (Asteraceae), a species endemic to Mulga (Turkey). *Natural Product Research* 23:149-67.

33- Ugurlu E, Secmen O. 2008. Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia* 79:126–31.

34- Wagentitz G, Hellwig FH. 1996. *Evaluation of characters and phylogeny of Centaurea. In: Hinf, D. J. N. and Beentje, H. J. (eds.), Compositae: Systematics.* pp 491-510. Royal botanic Gardens, Kew, UK.

35- Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. 2010. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three Centaurea species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem Toxicol* 48:2638-41.

Antioxidant and antibacterial activity of the methanolic *Centaurea* L. species (Astraceae) from Iran extracts of three

Almasi N.[1], Karamian R.[1] and Karimi F.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Centaurea L. with about 700 species in the world and 70 species in Iran is the largest genus in the family Asteraceae. *Centaurea* species are used for the treatment of various ailments in the popular medicine in some countries. The aim of the present study was to investigate total phenol and flavonoid contents, antioxidant potency and antibacterial activities of the methanolic extracts from capitulum and aerial parts of three *Centaurea* species, namely *C. imperialis, C. iransharii* and *C. glastifolia*. Total phenolic and flavonoid contents were evaluated by Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. Antioxidant activity was evaluated by DPPH radical scavenging assay. In addition, antibacterial activity of the extracts was studied by disc diffusion method. Results from the study showed that total phenol content in the extracts were found to a range between 32.92 and 73 mg gallic acid/g extract and total flavonoid content varied from 4.45 to 5.30 mg quercetin /g extract. A significant antioxidant capacity was found in all studied extracts and aerial part extract of *C. iransharii* showed the highest antioxidant activity (IC_{50} = 0.11 mg/ ml). In addition, the studied species represented strong antimicrobial activity against Gram positive bacteria.

Key words: antimicrobial activity, antioxidant potency, *Centaurea*, flavonoid, phenol**.**

www.SID.ir