Modares Journal of Biotechnology
Volume 9, Issue 2, Spring 2018
Pages: 219-226
Type: Original Research

Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging of the Extract Obtained from *Alchemilla persica* by Percolation, Polyphenol Fraction, and Ultrasonic Methods

Seyedalipour B.* ***PhD*****, Dadoei Z.[1]** ***MSc*****, Ebrahimzadeh M.A.[2]** ***PhD***

*Cellular & Molecular Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[1]Biochemistry Department, Biology Faculty, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
[2]"Pharmaceutical Sciences Research Center" and "Medicinal Chemistry Department, Pharmacy Faculty", Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract

Aims: Alchemilla L. genus (Rosaceae) has various biological activities such as anti-inflammatory, anticarcinogenic, antioxidant and antimicrobial. The aim of the present study was to investigate antioxidant activity and free radical scavenging of the extract obtained from *Alchemilla persica* by percolation, polyphenol fraction, and ultrasonic methods.

Materials & Methods: In the present experimental research, *Alchemilla persica* was used and percolation, polyphenol, and ultrasonics methods were used for extraction and the antioxidant activities of the extracts were determined by different tests, including 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitric oxide scavenging activity, Iron chelating activity, and reducing power. Total phenolic and flavonoid content were measured by the Folin Ciocalteu and $AlCl_3$ methods, respectively. The data were analyzed by SPSS 22 software, using one-way ANOVA and tukey test.

Findings: In DPPH radical scavenging activity, the polyphenol extract had a significant different with other extracts ($p=0.001$). Polyphenolic extract showed higher reducing power than other extacts and Vitamin C ($p=0.001$). Percolation extract had higher amounts of total phenolic and flavonoid content than other extracts.

Conclusion: Polyphenolic extracts have the highest DPPH, nitric oxide scavenging activity, Iron chelating activity, and reducing power compared to ultrasonic and percolation methods. Aerial parts of *Alchemilla persica* extracts have high levels of antioxidant activity including phenols and flavonoids.

Keywords
Alchemilla persica [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68031982];
Ultrasonic [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014465];
Antioxidant Activity [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000975];
Flavonoids [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005419]

*Corresponding Author
Tel: +98 (11) 35302405
Fax: +98 (11) 35302450
Post Address: Cellular & Molecular Biology Department, Basic Sciences Faculty, University of Mazandaran Pardis, Babolsar, Iran. Postal code: 4741695447
b.alipour81@gmail.com
Received: September 4, 2016 Accepted: December 6, 2017 ePublished: June 21, 2018

www.SID.ir

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد عصاره *الکمیلا پرسیکا* با روش‌های پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک

باقر سیدعلی‌پور * **PhD**
گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
زهرا دادویی MSc
گروه بیوشیمی، دانشکده زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
محمدعلی ابراهیم‌زاده PhD
"مرکز تحقیقات علوم دارویی" و "گروه شیمی دارویی، دانشکده داروشناسی"، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده
اهداف: جنس الکمیلا از تیره گل سرخ، فعالیت بیولوژیک مختلفی از جمله ضدالتهاب، ضدسرطان، آنتی‌میکروب و آنتی‌اکسیدانی دارد. هدف پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد عصاره *الکمیلا پرسیکا* با روش‌های پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر از گیاه *الکمیلا پرسیکا* و برای عصاره‌گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک، استفاده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌وسیله آزمون‌های به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل، نیتریک‌اکساید، قدرت احیاکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن تعیین شد. محتوی فنولی و فلاونوئیدی تام به‌وسیله روش فولین‌سیو-کالتیو و آلومینیوم‌کلراید سنجیده شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شدند.
یافته‌ها: در روش به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH، عصاره حاصل از روش پلی‌فنولیک اختلاف معنی‌داری با عصاره حاصل از دو روش دیگر داشت (p=۰/۰۰۱). عصاره پلی‌فنولیک فعالیت به‌دام‌اندازی نیتریک‌اکساید و شلاته‌کنندگی یون آهن بیشتری در مقایسه با روش‌های دیگر نشان داد (p<۰/۰۰۱). عصاره پلی‌فنولیک قدرت احیاکنندگی بیشتری در مقایسه با سایر عصاره‌ها و ویتامین C نشان داد (p=۰/۰۰۱). محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره پرکولاسیون بیشتر از بقیه عصاره‌ها بود.
نتیجه‌گیری: عصاره‌های پلی‌فنولیک، بیشترین فعالیت را در به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH، به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید، قدرت احیایی و توانایی شلاته‌کنندگی آهن در مقایسه با روش اولتراسونیک و پرکولاسیون دارند. بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید است.
کلیدواژه‌ها: *الکمیلا پرسیکا*، اولتراسونیک، فعالیت آنتی‌اکسیدان، فلاونوئید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۵
* نویسنده مسئول: b.alipour81@gmail.com

مقدمه
رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی فعال از نظر شیمیایی هستند و تولید این رادیکال‌ها یک فرآیند طبیعی واکنش‌های متابولیزمی بدن است. استرس‌اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن به‌علت تولید کم آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن یا افزایش استفاده از آنها است[1]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شوند، از اکسایش آنها جلوگیری می‌کنند و با غیرفعال‌کردن آنها سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگه می‌دارند[2].
میان آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنولی که به‌طور گسترده در سراسر گیاه پخش شده‌اند از همه موثرتر هستند. ساختار شیمیایی این ترکیبات شامل گروه‌های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان است و از طریق الکترون‌های جفت‌نشده موجود در اطراف حلقه آروماتیک، در به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد نقش دارند[3]. بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در گیاهان عمدتاً به‌دلیل ویژگی‌های اکسایش- کاهش، وجود پیوندهای هیدروژنی در حلقه آروماتیک و ساختار شیمیایی آنها است که می‌توانند نقش‌های مهمی را در خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد بازی کنند[4]. اهمیت رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها کاملاً به اثبات رسیده است[5]. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان[6] و بیماری‌های دژنراتیو (پارکینسون و آلزایمر) بازی می‌کنند[7].
در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری به‌منظور بررسی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان مختلف صورت گرفته است[8]. روش‌های کلاسیک عصاره‌گیری بر پایه قرارگرفتن گیاه در حلال مناسب است. از جمله روش‌های کلاسیک می‌توان سوکسیله، تقطیر، ماسیراسیون و پرکولاسیون را نام برد. اما هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و معایب مخصوص‌به‌خود هستند. از مزایای روش ماسیراسیون این است که بدون به‌کاربردن دستگاه‌ها و ابزارهای پیچیده و عدم استفاده از حرارت می‌توان عصاره‌هایی با میزان مواد موثره یکنواخت به دست آورد. از معایب این روش، زمان طولانی انجام عصاره‌گیری است. کوتاهی مدت کار، صرفه‌جویی در مقدار مایع مصرفی و به‌دست‌آوردن محلول‌های نسبتاً کامل بدون نیاز به حرارت از جمله مزایای روش پرکولاسیون است. استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده و ارزان بوده و جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی استخراج است. افزایش بازده عصاره‌گیری، افزایش سرعت واکنش و استفاده از هر نوع حلال از مهم‌ترین محاسن آن به شمار می‌رود. اما فیلتراسیون و جداکردن عصاره حاصله از ماده گیاهی از معایب این روش هستند[9, 10].
گیاهان جنس آلکمیلا متعلق به خانواده گل سرخ هستند و حدود ۳۰۰ گونه دارند. *الکمیلا پرسیکا* (*Alchemilla persica*)، گیاهی نسبتاً بزرگ به ارتفاع ۲۵ تا۱۰۰سانتی‌متر، برگ‌های قاعده‌ای طوقه‌ای تا حدودی دایره‌ای، پهنک ۵ تا ۱۵سانتی‌متر، لب‌دار، دارای گوشوارک گوشی‌شکل، گل‌آذین خوشه‌ای، دم‌گل طویل، کاسبرگ‌های تخم‌مرغی- مثلثی، دارای رگبرگ‌های برجسته، گلبرگ‌های زرد مایل به سبز یا زرد به طول ۲ تا۳میلی‌متر و قطر ۳ تا ۵میلی‌متر، فصل گل‌دهی اواخر بهار، متعلق به مناطق خزری و ایران- توران است. پراکندگی جغرافیایی *الکمیلا پرسیکا* در قفقاز و عراق، اروپا و بیشتر در مناطق آلپی، خنک و با ارتفاع زیاد بوده و پراکندگی آن در ایران مناطق شمال و شمال غرب، غرب و مرکز است (شکل ۱) [11].

شکل ۱) گیاه *الکمیلا پرسیکا*

Archive of SID
www.SID.ir

براساس مطالعات فیتوشیمیایی تانن، کومارین و ترکیبات فلاونوئیدی شامل اورینتین، کوئرستین، ایزوکوئرستین، روتین و ویتکسین در گونه‌های الکمیلا گزارش شده است[12, 13]. مطالعات انجام‌شده روی گونه‌های مختلف خانواده رزاسه (Rosaceae) از جمله گونه‌های مختلف جنس الکمیلا دلالت بر نقش نزدیک به ۱۰۰ گونه در سراسر جهان در طب سنتی از لحاظ خواص دارویی و درمانی نظیر بهبود دیابت، بهبود زخم، درمان تصلب شرایین، آرام‌بخش، حفظ آب و آماس ناشی از التهاب، اسپاسم عضله، بهبود مشکلات معده‌ای و اسهال خفیف دارد. همچنین فعالیت بیولوژیک مختلفی مانند فعالیت ضدسرطانی، ضدآنفلوآنزا، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی برای گونه‌های مختلف الکمیلا گزارش شده است[14-18]. لذا با توجه به پیشینه مطالعات موجود در این خانواده و نقش تعیین‌کننده دارویی آنها، در این تحقیق تصمیم گرفته شد تا گونه خاصی از این گروه به نام *الکمیلا پرسیکا* که بومی ایران و منطقه گلستانک نور- مازندران است، مورد ارزیابی قرار گیرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد عصاره *الکمیلا پرسیکا* با روش‌های پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، گیاه *الکمیلا پرسیکا* از منطقه حفاظت‌شده گلستانک واقع در شهر بلده نور استان مازندران در ارتفاع ۲۷۰۰متری جمع‌آوری و توسط متخصص گیاه‌شناسی شناسایی شد. برای عصاره‌گیری از سه روش پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک، استفاده و برای تهیه عصاره از روش پرکولاسیون، بخش‌های هوایی گیاه (گل، برگ و ساقه) در سایه و در مجاورت هوا، خشک و سپس پودر شدند. ۴۰گرم از نمونه پودرشده با متانول ۸۰% مخلوط و بعد از یک روز انکوبه‌شدن، فاز آلی با کاغذ صافی واتمن شماره ۱، جدا و این عمل سه‌بار تکرار شد. در نهایت، کل عصاره، جمع‌آوری و از دستگاه تبخیرکننده چرخان برای حلال‌پراکنی استفاده شد. برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر MPS-55 Freeze dryer (Operon co؛ کره جنوبی) استفاده شد[19].

در روش عصاره‌گیری همراه با امواج فراصوت از امواج غیرمستقیم اولتراسونیک با فرکانس ۱۰۰کیلوهرتز در دمای ۲۵°C به‌مدت یک ساعت استفاده شد. برای این منظور ۲۵گرم از نمونه پودرشده با ۲۰۰میلی‌لیتر متانول ۸۰% به‌مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. هر ۲۰دقیقه حلال، عوض و این عمل سه‌بار تکرار شد. در نهایت کل عصاره، جمع‌آوری شده و از دستگاه تبخیرکننده چرخان برای حلال‌پراکنی و برای حذف کامل آب و تهیه پودر از فریز درایر استفاده شد[20].

در روش استخراج پلی‌فنولیک، ابتدا مقدار ۴۰گرم از نمونه پودرشده با ۲۵۰میلی‌لیتر حلال (متانول، استن و آب) به‌ترتیب با نسبت‌های ۳/۵، ۳/۵ و ۳ حاوی فرمیک‌اسید ۱% مخلوط شد. نمونه به‌مدت ۳۰دقیقه روی شیکر قرار گرفت و سپس صاف شد. حلال‌پراکنی با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان و با تنظیم دمای ۳۵ تا ۴۰°C انجام شد. در این صورت با توجه به دمای تنظیم‌شده، استن و متانول حذف می‌شوند. سپس ماده از دستگاه، جدا و محتویات آن داخل یک قیف جداکننده، ریخته و طی دو مرحله و در هر مرحله ۵۰میلی‌لیتر پترولیوم‌اتر اضافه شد. این عمل برای جداکردن پیگمان‌ها، استفاده شد و پس از آن فاز اتری رویی جدا و به فاز آبی باقیمانده طی سه مرحله اتیل‌استات (۱:۱)، اضافه شده و در پایان اتیل‌استات، حلال‌پراکنی و در نهایت فریز و خشک شد[21].

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها: محتوای تام فنولی از طریق روش فولین‌سیو- کالتیو انجام شد[22]. بدین منظور غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره (در متانول) تهیه و ۰/۵میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲نرمال فولین‌سیو-کالتیو، مخلوط و پس از ۵دقیقه، ۲میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم با غلظت ۷۵گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰نانومتر در مقابل بلانک، اندازه‌گیری شده و سپس محتوای تام فنولی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر یک‌گرم عصاره مورد سنجش قرار گرفت. میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد[23]. غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه و به ۰/۵میلی‌لیتر از نمونه (۱۰میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)، ۱/۵میلی‌لیتر متانول، ۰/۱میلی‌لیتر آلومینیوم‌کلراید ۱۰%، ۰/۱میلی‌لیتر از محلول پتاسیم‌استات یک‌مولار و در نهایت ۲/۸میلی‌لیتر آب مقطر هم اضافه شد. جذب مخلوط بعد از ۳۰دقیقه در طول موج ۴۱۵نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون، استفاده و میزان فلاونوئید براساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره (ماده خشک) گزارش شد.

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد: رادیکال پایدار دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) برای تعیین فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد به کار رفت. به یک‌میلی‌لیتر از عصاره (۴۰میلی‌گرم در ۲۵میلی‌لیتر)، یک‌میلی‌لیتر محلول ۰/۱میلی‌مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده و به‌مدت ۱۵دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد[24]. در این روش ویتامین C (آسکوربیک‌اسید) به‌عنوان استاندارد، استفاده و آزمایشات سه‌بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد. میزان IC_{50} به‌معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰% رادیکال‌ها پاکسازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد به‌دام‌اندازی رادیکال } DPPH = [\frac{A_0 - A_S}{A_S}] \times 100$$

A_0: جذب کنترل و A_S: جذب عصاره یا استاندارد است.

بررسی قدرت احیاکنندگی: قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها از طریق روش *ین* و *چن* ارزیابی شد[25]. مقادیر مختلفی از هر عصاره (۸۰۰-۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر) در آب با ۲/۵میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲مولار (pH برابر با ۶/۶) و ۲/۵میلی‌لیتر محلول ۱% پتاسیم‌فری‌سیانید [$K_3Fe(CN_6)$]، مخلوط و در دمای ۵۰°C به‌مدت ۲۰دقیقه انکوبه شد. پس از افزودن ۲/۵میلی‌لیتر از محلول ۱۰% تری‌کلرواستیک‌اسید به‌عنوان متوقف‌کننده واکنش، مجموعه به‌مدت ۱۰دقیقه با ۳۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول ۰/۱% فریک‌کلراید ($FeCl_3$)، مخلوط و بلافاصله جذب محلول در طول موج ۷۰۰نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایش‌ها سه‌بار تکرار و میانگین آنها گزارش شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) بود و آسکوربیک‌اسید به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه استفاده شد.

ارزیابی میزان شلاته‌کنندگی آهن II: برای اندازه‌گیری میزان شلاته‌کنندگی آهن از روش *دنیز* و همکاران استفاده شد[26]. به ۵میلی‌لیتر از هر عصاره (۸۰۰-۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر)،

Archive of SID
www.SID.ir

۰/۱میلی‌لیتر محلول ۲میلی‌مولار کلریدآهن II و یک‌میلی‌لیتر محلول ۵میلی‌مولار فروزین، اضافه و پس از ۱۰دقیقه انکوبه‌شدن در دمای محیط جذب محلول در طول موج ۵۶۲نانومتر قرائت شد. اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA) به‌عنوان کنترل مثبت به کار رفت و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بر حسب اکی‌والان دی‌سدیم‌اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (Na2EDTA) در گرم عصاره، بیان و درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن- فروزین با کمک فرمول ذکرشده در محاسبه فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد تعیین شد.

ارزیابی میزان به‌دام‌اندازی نیتریک‌اکساید: این روش بر این مبنا استوار بوده است که سدیم‌نیتروپروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به‌آهستگی نیتریک‌اکساید تولید می‌کند که با اکسیژن محیط وارد عمل می‌شود و یون نیتریت را تولید می‌نماید. یون نیتریت تولیدشده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می‌گیرد. به‌دام‌اندازی نیتریک‌اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظور سدیم نیتروپروساید (۱۰میلی‌مولار) در بافر فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند، مخلوط شد. مجموعه به‌مدت ۱۵۰دقیقه در دمای اتاق، انکوبه و همان مخلوط واکنش بدون عصاره *الکمیلا پرسیکا* (اما مقادیر هم‌حجم آب مقطر) به‌عنوان کنترل به کار گرفته شد. پس از سپری‌شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵میلی‌لیتر واکنشگر گریس (شامل سولفانیل‌آمید ۱%، نفتیل‌اتیلن‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلرید ۰/۱% در اسیدفسفریک ۲%) اضافه شد[27]. جذب مخلوط در ۵۴۶نانومتر در مقابل کنترل، قرائت و کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به‌دام‌اندازی هم طبق فرمول محاسبه فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد، تعیین و براساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه کلی، آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها و تفاوت قدرت احیاکنندگی بین گروه‌ها و آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری تکراری برای بررسی قدرت احیاکنندگی تحلیل شدند. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

یافته‌ها

درصد بازده عصاره‌های بخش هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* با سه روش پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک متفاوت بود، به‌طوری که از ۴۰گرم وزن خشک گیاه *الکمیلا پرسیکا* پس از عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون، مقدار ۸/۵گرم عصاره با بازده ۲۱/۲۵% به دست آمد. در روش پلی‌فنولیک از ۴۰گرم وزن خشک گیاه، مقدار ۰/۶۸گرم عصاره با بازده ۱/۷% و در روش اولتراسونیک از ۲۵گرم وزن خشک گیاه، مقدار۴/۱۳گرم عصاره با بازده ۱۶% به دست آمد.

محتوای فنول و فلاونوئید تام عصاره‌ها: محتوای تام فنولی با متد فولین‌سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک‌اسید به‌صورت $Y=0.0054X+0.0583$, $R^2=0.999$ محاسبه شد. محتوای تام فنولی برای عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری داشت (p=۰/۰۱۹). بیشترین محتوای فنولی تام برای روش پرکولاسیون مشاهده شد که با روش پلی‌فنولیک اختلاف معنی‌داری نشان داد (p=۰/۰۱۷). بین روش اولتراسونیک و پلی‌فنولیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(p=۰/۱۲۸؛ جدول ۱).

محتوای فلاونوئید تام نمونه‌ها با معادله خط استاندارد کوئرستین به‌صورت $Y=0.0064X-0.0076$, $R^2=0.999$ محاسبه شد. محتوای تام فلاونوئید موجود در عصاره متانولی حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری داشتند (p=۰/۰۰۹). بیشترین محتوای فلاونوئید تام برای روش پرکولاسیون مشاهده شد که با روش پلی‌فنولیک اختلاف معنی‌داری نشان داد (p=۰/۰۱۸). بین روش اولتراسونیک و روش پرکولاسیون اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۱۰)، در صورتی که بین روش اولتراسونیک و روش پلی‌فنولیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۴۱۵؛ جدول ۱).

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH: فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH در تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش یافت، به‌طوری که در غلظت ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر درصد مهار برای عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک به‌ترتیب ۸۱/۹±۱/۰۲، ۷۹/۲۸±۱/۸۲ و ۸۷/۹۱±۱/۶۱ بود (نمودار ۱). فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH بین تمامی روش‌های استخراج و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). عصاره به‌دست‌آمده از روش پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری با روش پلی‌فنولیک نشان داد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱)، اما با اولتراسونیک تفاوت معنی‌داری نداشت (p=۰/۲۹۹). عصاره حاصل از روش پلی‌فنولیک تفاوت معنی‌داری با روش پرکولاسیون و اولتراسونیک داشت (p=۰/۰۰۱). عصاره حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH بیشتری از عصاره‌های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون داشت (نمودار ۱).

سنجش میزان شلاته‌کنندگی آهن II: عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* دارای قابلیت اتصال به آهن بود. با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار بیشتر شد، به‌طوری که در غلظت ۸۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر درصد شلاته‌کنندگی عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک به‌ترتیب ۵۷/۸۵±۲/۵۰، ۶۴/۴۳±۱/۱۰ و ۷۰/۷۸±۱/۸۹ بود. میزان شلاته‌کنندگی بین تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). میزان IC_{50} عصاره روش پلی‌فنولیک نسبت به عصاره‌های اولتراسونیک و پرکولاسیون دارای قدرت شلاته‌کنندگی بیشتری بود و اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۰۱)، در حالی که با استاندارد EDTA اختلاف معنی‌داری نداشت (p=۰/۲۱۱). همچنین تفاوت معنی‌داری بین عصاره حاصل از استخراج روش‌های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده شد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱).

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید: همه عصاره‌ها در مسیر وابسته به غلظت، فعالیت به‌دام‌اندازی نتیریک‌اکساید نشان دادند، به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها، درصد مهار بیشتر شد. فعالیت به‌دام‌اندازی نتیریک‌اکساید بین تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). میزان IC_{50} عصاره روش اولتراسونیک نسبت به عصاره‌های پلی‌فنولیک و پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p=۰/۰۰۱؛ جدول ۱). عصاره پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری با عصاره پلی‌فنولیک (p=۰/۱۶۰) و استاندارد کوئرستین (p=۰/۲۰۲) نشان نداد. عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون فعالیت به‌دام‌اندازی و مهار رادیکال نیتریک‌اکساید داشتند. عصاره حاصل از روش

Archive of SID
www.SID.ir

پلی‌فنولیک فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید بیشتری از عصاره‌های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون نشان داد. در مجموع عصاره‌ها فعالیت ضعیفی در به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید بین غلظت ۰/۱ تا ۱/۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (جدول ۱).

مقادیر IC_{50} آزمون DPPH برای ویتامین C برابر ۵/۰±۰۵/۱۲میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقادیر IC_{50} آزمون شلاته‌کنندگی برای EDTA برابر ۶۹/۳۰±۱۴/۲میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر IC_{50} آزمون به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید برای کوئرستین برابر ۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۵میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها: در بررسی قدرت احیاکنندگی، جذب نور با قدرت احیاکنندگی رابطه مستقیمی داشت. بین قدرت احیاکنندگی تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0/001$). قدرت احیاکنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد شد، به‌طوری که عصاره پلی‌فنولیک نسبت به سایر عصاره‌ها جذب بیشتری داشت، یعنی با افزایش غلظت قدرت احیاکنندگی بیشتر شد و تفاوت معنی‌داری با بقیه روش‌ها نشان داد ($p=0/001$). همچنین تفاوت معنی‌داری بین عصاره حاصل از استخراج روش‌های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده نشد ($p=0/996$؛ نمودار ۲).

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید: همه عصاره‌ها در مسیر وابسته به غلظت، فعالیت به‌دام‌اندازی نتیریک‌اکساید نشان دادند، به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها، درصد مهار بیشتر شد. فعالیت به‌دام‌اندازی نتیریک‌اکساید بین تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/001$). میزان IC_{50} عصاره روش اولتراسونیک نسبت به عصاره‌های پلی‌فنولیک و پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p=0/001$؛ جدول ۱). عصاره پرکولاسیون تفاوت معنی‌داری با عصاره پلی‌فنولیک ($p=0/160$) و استاندارد کوئرستین ($p=0/202$) نشان نداد. عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* حاصل از روش‌های پلی‌فنولیک، اولتراسونیک و پرکولاسیون فعالیت به‌دام‌اندازی و مهار رادیکال نیتریک‌اکساید داشتند. عصاره حاصل از روش پلی‌فنولیک فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید بیشتری از عصاره‌های حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون نشان داد. در مجموع عصاره‌ها فعالیت ضعیفی در به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید بین غلظت ۰/۱ تا ۱/۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (جدول ۱).

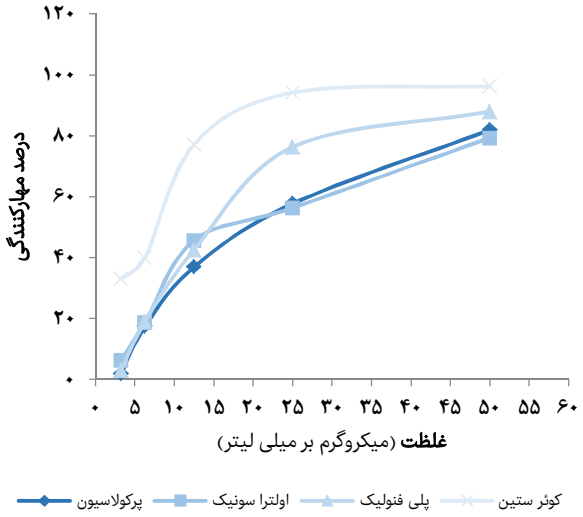
مقادیر IC_{50} آزمون DPPH برای ویتامین C برابر ۵/۰±۰۵/۱۲میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقادیر IC_{50} آزمون شلاته‌کنندگی برای EDTA برابر ۶۹/۳۰±۱۴/۲میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر IC_{50} آزمون به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید برای کوئرستین برابر ۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۵میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها: در بررسی قدرت احیاکنندگی، جذب نور با قدرت احیاکنندگی رابطه مستقیمی داشت. بین قدرت احیاکنندگی تمامی روش‌ها و همچنین استاندارد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0/001$). قدرت احیاکنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت زیاد شد، به‌طوری که عصاره پلی‌فنولیک نسبت به سایر عصاره‌ها جذب بیشتری داشت، یعنی با افزایش غلظت قدرت احیاکنندگی بیشتر شد و تفاوت معنی‌داری با بقیه روش‌ها نشان داد ($p=0/001$). همچنین تفاوت معنی‌داری بین عصاره حاصل از استخراج روش‌های پرکولاسیون با اولتراسونیک مشاهده نشد ($p=0/996$؛ نمودار ۲).

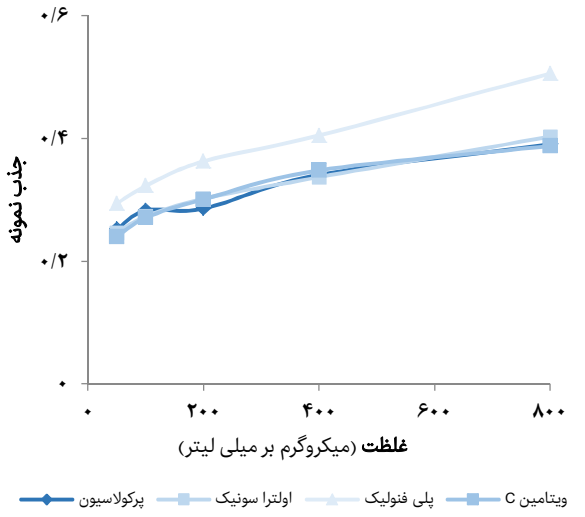
جدول ۱) بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* با روش‌های پلی‌فنولیک، اولتراسونیک، پرکولاسیون و استاندارد

فعالیت	پلی‌فنولیک	اولتراسونیک	پرکولاسیون	استاندارد
فعالیت به‌دام‌اندازی DPPH (IC_{50}؛ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۱۴/۲۲±۰/۳۲^{b}	۱۷/۰±۴۰/۶۵^{c}	۱۸/۰±۱۹/۱۸^{c}	۵/۰±۰۵/۱۲^{a}
میزان شلاته‌کنندگی آهن (IC_{50}؛ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۵۰/۷۱±۵/۶۳^{a}	۵۷۲/۵۵±۲۶/۷۰^{b}	۶۸۹/۴۳±۱۸/۸۳^{c}	۱۴/۲±۶۹/۳^{a}
فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال NO (IC_{50}؛ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۰/۰۲±/۰۰۱^{a}	۳/۱۹±۰/۳۲^{b}	۰/۵۱±۰/۰۳^{a}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۰۵^{a}
فنل تام (میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره)	۲۸۶/۲۶±۲/۰۶ ^{a}	۳۱۰/۶۸±۸/۳۳ ^{ab}	۳۴۰/۳۱±۶/۱۱^{b}	–
فلاونوئید تام (میلی‌گرم کوئرستین‌اسید در گرم عصاره)	۱۲/۴۸±۰/۳۲^{a}	۱۱/۰±۸۹/۰۸^{a}	۱۵/۰±۲۵/۴۷^{b}	–

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است



نمودار ۱) مقایسه قدرت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک گیاه *الکمیلا پرسیکا*



نمودار ۲) مقایسه قدرت احیاکنندگی عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا*

www.SID.ir

بحث

هدف پژوهش حاضر، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد عصاره *الکمیلا پرسیکا* با روش‌های پرکولاسیون، پلی‌فنولیک و اولتراسونیک بود. فنول‌ها و پلی‌فنول‌ها به‌طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی با ریشه گیاهی یافت می‌شوند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مواد به گروه‌های آروماتیک و هیدروکسیل فراوان موجود در ساختارشان نسبت داده می‌شود. مطالعات نشان داده که مصرف غذاها و نوشیدنی‌های غنی از محتوای فنولی با کاهش خطر ابتلا به تصلب شرایین و بیماری‌های قلبی- عروقی در ارتباط بوده است[28]. نتایج حاصل از تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر میزان محتوای فنول تام در این تحقیق نشان داد که عصاره پرکولاسیون با میانگین ۶/۱±۳۴۰/۳۱ و پلی‌فنولیک با میانگین ۲/۰۶±۲۸۶/۲۶میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان محتوای فنول تام را داشتند. مطالعه *مزدستان* و همکاران نشان داده است که در عصاره برگ گیاه مورد (*Myrtus communis*) بالاترین میزان فنولی تام، مربوط به روش سوکسیله و کمترین آن مربوط به روش اولتراسونیک بود[29] که مطالعه حاضر با آن همخوانی نداشت.

فلاونوئیدها بزرگ‌ترین دسته پلی‌فنول‌ها هستند که به‌طور گسترده در رژیم غذایی انسان وجود دارند و ارتباط معکوسی بین جذب فلاونوئیدها و رژیم غذایی و خطر بیماری قلبی- عروقی وجود داشته است. بیشترین میزان محتوای فلاونوئید عصاره‌های متانولی اندام هوایی *الکمیلا پرسیکا* به‌ترتیب با روش پرکولاسیون، پلی‌فنول و اولتراسونیک به دست آمد. مطالعه عصاره برگ و گل گیاه خون‌فام (*Lythrum salicaria*) نشان داده که محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی عصاره پلی‌فنولیک بیشتر از عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون بوده است[30]، در صورتی که در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید به‌ترتیب مربوط به پرکولاسیون و اولتراسونیک بود. با توجه به میزان فنول در عصاره گیاه *الکمیلا پرسیکا* به نظر می‌رسد که میزان فنول ارتباط بیشتری با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمینه اهدای هیدروژن یا اهدای الکترون دارد. بنابراین میزان فنول تام در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های اندام هوایی این گیاه را توجیه کند. وجود ترکیبات فنولیک همانند فلاونوئیدها، فنولیک‌اسید و تانن‌ها در عصاره اندام هوایی گیاهان جنس الکمیلا مانند *الکمیلا مولیس* (*Alchemilla mollis*) و برگ گوشته (*Alchemilla vulgaris*) و نقش آنتی‌اکسیدانی آنها تاییدکننده پتانسیل بالای این جنس در فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است[31, 32].

مدل به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH یک روش سریع، آسان و دقیق برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی بوده است[33]. DPPH یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاشدن و تولید مولکول پایدار از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. DPPH در ۵۱۷نانومتر جذب دارد و به‌علت داشتن الکترون منفرد، دارای رنگ ارغوانی است و قدرت آنتی‌اکسیدانی آن به درصد کاهش رنگ ارغوانی به رنگ زرد بستگی دارد. هر چه تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه فنیل آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد، تعداد اتم هیدروژن بیشتری برای واکنش با رادیکال DPPH و پایدارکردن آن وجود دارد[34]. همان طور که در جدول ۱ مشاهده شد، همه عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی در به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH نشان دادند. در مقایسه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و کنترل مثبت کوئرستین به‌ترتیب در کوئرستین، پلی‌فنول، اولتراسونیک و پرکولاسیون بیشتر بود. در این تحقیق مشخص شد که فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH در استاندارد و عصاره‌ها با بیشترشدن غلظت، افزایش و رنگ نمونه کاهش یافت. بر پایه نتایج، عصاره حاصل از پلی‌فنول فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون از خود نشان داد. بنابراین فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌ها ممکن است به توانایی دهندگی هیدروژن نسبت داده شود که نشان‌دهنده نقش فنول و فلاونوئید در عصاره‌ها است. مطالعه *ترندافیلووا* و همکاران روی فراکشن اتیل‌استات *الکمیلا مولیس* نشان داده است که توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH خوبی دارند. مقدار IC_{50} فراکشن اتیل‌استات *الکمیلا مولیس* برابر ۱/۸±۹/۸میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمده است[17] که نسبت به عصاره متانولی روش‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک این تحقیق کمتر بود.

در اندازه‌گیری قدرت شلاته‌کنندگی آهن II شناساگر موجود در این واکنش، فروزین با آهن II موجود در محیط، کمپلکس قرمزرنگی تشکیل می‌دهد. غلظت آهن محیط در حضور عوامل شلات‌دهنده کاهش می‌یابد و رنگ قرمز کمپلکس آهن- فروزین کم می‌شود. در این روش EDTA و عصاره‌ها دارای اثر شلاته‌کنندگی هستند و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته می‌کنند و جذب کمپلکس آهن- فروزین به‌صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد. در این پژوهش تمامی عصاره‌ها توانایی شلاته‌کنندگی نسبتاً ضعیفی در مقایسه با استاندارد از خود نشان دادند. فعالیت شلاته‌کنندگی استاندارد و عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش و نیز رنگ نمونه کاهش یافت. توانایی شلاته‌کنندگی عصاره‌های متانولی و کنترل مثبت EDTA به‌ترتیب در EDTA، پلی‌فنول، اولتراسونیک و پرکولاسیون بود. بر پایه این نتایج، عصاره حاصل از پلی‌فنول فعالیت بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون از خود نشان داد. در مجموع قدرت شلاته‌کنندگی قوی از این سه عصاره مشاهده نشد. علی‌رغم این که از میزان فنول و فلاونوئید مناسبی برخوردار بودند، نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید در استاندارد کوئرستین و عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت، نیتریت کمتری تولید شد و رنگ نمونه کاهش یافت. درصد مهار رادیکال نیتریک‌اکساید بین تمامی روش‌های استخراج و همچنین استاندارد در غلظت ۰/۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری داشت، به‌طوری که در غلظت ۰/۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استاندارد کوئرستین (۰/۵۷±۸۵/۶۲) تفاوت معنی‌داری نسبت به عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک به‌ترتیب ۰/۹۱±۳۷/۴۵، ۲/۸۳±۴۶/۱۱ و ۲/۴۱±۲۵/۰۸ نشان داد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین عصاره‌های پرکولاسیون و اولتراسونیک مشاهده نشد، در صورتی که عصاره پلی‌فنولیک تفاوت معنی‌داری با عصاره‌های پرکولاسیون و اولتراسونیک نشان داد. در مقایسه فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید عصاره‌های متانولی و کنترل مثبت کوئرستین به‌ترتیب پلی‌فنولیک، پرکولاسیون و اولتراسونیک قرار داشتند. بر پایه نتایج، عصاره حاصل از پلی‌فنول، فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید بیشتری از عصاره حاصل از اولتراسونیک و پرکولاسیون داشت. فعالیت به‌دام‌اندازی نیتریک‌اکساید به‌وسیله ترکیبات فلاونوئیدی و دی‌ترپن توسط *هاجو* و همکاران مورد تایید قرار گرفته است[35].

قدرت احیاکنندگی به‌عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می‌رود. در این پژوهش، قدرت احیاکنندگی تمامی عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری در مقایسه با

Archive of SID
www.SID.ir

استاندارد نشان داد. عصاره‌ها در غلظت ۸۰۰-۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر قدرت احیاکنندگی نسبتاً خوبی را نشان دادند، به‌طوری که میزان جذب در طول موج ۷۰۰نانومتر و در بالاترین غلظت یعنی ۸۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برای عصاره‌های پرکولاسیون، اولتراسونیک و پلی‌فنولیک ۰/۰۰۶±۰/۳۹۲، ۰/۰۰۸±۰/۴۰۳ و ۰/۰۱±۰/۵۰۶ به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد قدرت احیاکنندگی استاندارد و تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت. قدرت احیاکنندگی عصاره‌های متانولی و کنترل مثبت آسکوربیک‌اسید به‌ترتیب در پلی‌فنولیک، اولتراسونیک، پرکولاسیون و آسکوربیک‌اسید بود. از آنجایی که قابلیت احیاکنندگی عصاره پلی‌فنولیک نسبت به سایر عصاره‌ها قوی‌تر بود و حتی در مقایسه با آسکوربیک‌اسید میزان احیاکنندگی بیشتری را نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره پلی‌فنولیک با کمک اهدای الکترون موجب ختم واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شود.

کای و همکاران ارتباط خطی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول تام را در بسیاری از گیاهان گزارش کرده‌اند، در حالی که این ارتباط خطی در مطالعه حاضر و برخی از مطالعات دیگر مشاهده نشد[36]. مطالعات *ه* و همکاران نشان داده است که روش استخراج اولتراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاه‌تر در مقایسه با روش سنتی می‌شود[37]. مطالعات روی گیاه *هیوسیاموس اسکواروسوس* (*Hyoscyamus squarrosus*) نشان داده است که عصاره اولتراسونیک در به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH و به‌دام‌اندازی نتیریک‌اکساید بهتر از ماسیراسیون عمل می‌کند[38]. مطالعات *جمشیدی* و همکاران روی برگ و قسمت‌های هوایی گیاه *لیتروم سالیکاریا* (*Lythrum salicaria*) با سه روش مختلف نشان داده که به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH و نیتریک‌اکساید عصاره پلی‌فنولیک بیشتر از عصاره اولتراسونیک و پرکولاسیون بوده و همچنین قدرت احیاکنندگی پلی‌فنولیک بیشتر از آسکوربیک‌اسید گزارش شده است[30] که نتایج پژوهش حاضر با آن همخوانی داشت. مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روی برگ و میوه خربزه *کوکومیس ملو* (*Cucumis melo*) نشان داده است که عصاره سوکسیله بیشترین میزان فنول و فلاونوئید و همچنین فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH و نیتریک‌اکسایدی بیشتری از عصاره‌های دیگر دارد[39]. نتایج پژوهش نشان داد که عصاره‌های مختلف بخش هوایی این گیاه در تمامی مدل‌های مورد مطالعه، سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. مطالعات تکمیلی در مورد شناسایی، جداسازی و بررسی ترکیبات موثره این گیاه می‌تواند زمینه احتمالی استفاده از این گیاه را در مورد فعالیت‌های دارویی برای درمان بیماری‌ها فراهم کند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به این نکته اشاره کرد که به‌لحاظ تنوع جغرافیایی و اقلیمی گونه‌های گیاهی در فلور ایران و تاثیر فرآیندهای مختلف و حتی شرایط محیطی مختلف، محل رویش آزمایش‌های کمّی و کیفی مواد موثره این گیاه ضروری است و اصلاح و جداکردن این دسته از گیاهان، کاری پُرهزینه و وقت‌گیر و تشخیص مواد موثره گیاهان دارویی کاری بسیار مشکل است. بنابراین از روی فرآیندهای متابولیک پیچیده درون گیاه نمی‌توان سریعاً در مورد ویژگی‌های مواد موثره نظرات جامع و کاملی ارایه نمود. از جمله پیشنهادات این تحقیق، شناسایی، جداسازی ترکیبات موثره و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موثره در شرایط "*محیط زنده*" (in vivo) و همچنین به‌کاربردن روش‌های پیشرفته دیگر استخراج و استفاده از حلال‌های غیرقطبی در کنار حلال‌های قطبی است، به این علت که شاید ترکیبات دیگری در گیاه وجود دارد که در فاز قطبی جدا نشده باشد.

نتیجه‌گیری

عصاره‌های پلی‌فنولیک بیشترین فعالیت را در به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH، به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک‌اکساید، قدرت احیایی و توانایی شلاته‌کنندگی آهن در مقایسه با اولتراسونیک و پرکولاسیون دارند. بخش‌های هوایی گیاه *الکمیلا پرسیکا* دارای مقادیر بالایی از ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدانی از جمله فنول و فلاونوئید است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از جناب آقای دکتر *بهمن اسلامی* که در جمع‌آوری و شناسایی نمونه، دکتر *طراوتی* که در تجزیه و تحلیل آماری و همچنین کارشناس آزمایشگاه، خانم *عظیمی* که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند، نهایت تشکر به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشد است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: باقر سیدعلی‌پور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ زهرا دادویی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی (۳۰%)؛ محمدعلی ابراهیم‌زاده (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۳۰%)

منابع مالی: این پژوهش تحت حمایت مالی سازمان یا نهادی نبوده است.

منابع

1- Takabe W, Niki E, Uchida K, Yamada S, Satoh K, Noguchi N. Oxidative stress promotes the development of transformation: Involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. Carcinogenesis. 2001;22(6):935-41.

2- Lamina S, Ezema CI, Theresa AI, Anthonia EU. Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. Oxid Antioxid Med Sci. 2013;2(2):83-91.

3- Bovicelli P. Radical-scavenging polyphenols: New strategies for their synthesis. J Pharm Pharmacol. 2007;59(12):1703-10.

4- Ordoñez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. Food Chem. 2006;97(3):452-8.

5- Kumaran A, Joel karunakaran R. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chem. 2006;97(1):109-14.

6- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med. 2002;113(Suppl 9B):71S-88.

7- Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2003;2(2):95-107.

8- Zolfaghari B, Yekdaneh A. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. J Herb Drugs. 2010;1(1):51-5. [Persian]

9- Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food Chem. 2008;106(2):804-10.

www.SID.ir

10- Yang B, Zhao M, Shi J, Yang N, Jiang Y. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. Food Chem. 2008;106(2):685-90.
11- Beygom Faghir M, Mehrmanesh A, Attar F. Leaf and petiole anatomical characters of the genus Alchemilla (Rosaceae) in Iran and their use in Numerical analysis. Taxon Biosyst. 2016;8(28):1-20
12- Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoid compounds identified in Alchemilla L. species collected in the North-eastern Black Sea region of Turkey. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2012;9(3):418-25.
13- Schimmer O, Eschelbach H. Esculetin in Alchemilla speciosa: Identification and antimutagenic properties. Pharmazie. 1997;52(6):476-8.
14- Türk M, Kaya B, Menemen Y, Oğuztüzün S. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus Alchemilla L. species on HeLa cells in vitro. J Med Plants Res. 2011;5(18):4566-71.
15- Grytsyk LM, Tuchak NI, Stasiv TG, Grytsyk AR. Amino acid composition of the Alchemilla L. genus plants and Nepeta cataria L. Pharm Innov Int J. 2013;2(4):50-3.
16- Shrivastava R, Cucuat N, John GW. Effects of Alchemilla vulgaris and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. Phytother Res. 2007;21(4):369-73.
17- Trendafilova A, Todorova M, Nikolova M, Gavrilova A, Vitkova A. Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of Alchemilla mollis. Nat Prod Commun. 2011;6(12):1851-4.
18- Makau JN, Watanabe K, Kobayashi N. Anti-influenza activity of Alchemilla mollis extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. Drug Discov Ther. 2013;7(5):189-95.
19- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JP, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. Phytochem Anal. 2002;13(1):8-17.
20- Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Nat Prod Res. 2012;26(24):2353-7.
21- Sun J, Yao J, Huang S, Long X, Wang J, García-García E. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of Kadsura coccinea (Lem.) A.C. Smith. Food Chem. 2009;117(2):276-81.
22- McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chem. 2001;73(1):73-84.
23- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 2002;10(3):178-82.
24- Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turk J Biol. 2008;32:43-9.
25- Yen G, Chen H. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem. 1995;43(1):27-32.
26- Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Arch Biochem Biophys. 1994;315(1):161-9.
27- Sreejayan, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. J Pharm Pharmacol. 1997;49(1):105-7.
28- Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Curr Opin Lipidol. 2005;16(1):77-84.
29- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015;25(127):10-24. [Persian]
30- Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of Lythrum salicaria L. (Lythraceae). Int Food Res J. 2014;21(2):783-8.
31- Ertürk S, Şeker Karatoprak G, Koşar M. Antioxidant properties and phenolic composition of alchemilla mollis from Turkey. Planta Medica. 2011;77(12):PL45.
32- Jonadet M, Meunier MT, Villie F, Bastide JP, Lamaison JL. Flavonoids extracted from Ribes nigrum L. and Alchemilla vulgaris L.: 1. In vitro inhibitory activities on elastase, trypsin and chymotrypsin. 2. Angioprotective activities compared in vivo. J Pharmacol. 1986;17(1):21-7. [French]
33- Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. Food Rev Int. 2008;24(4):392-415.
34- Torres De Pinedo A, Peñalver P, Morales JC. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. Food Chem. 2007;103(1):55-61.
35- Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Martinek T, Dervarics M, Zupkó I, et al. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus-castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. Phytother Res. 2007;21(4):391-4.
36- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 2004;74(17):2157-84.
37- He Ch, Ji X, Pan Y, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of Agrimonia pilosa Ledeb. Med Chem Res. 2010;19(5):448-61.
38- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of Hyoscyamus squarrosus leaves. Pharmacologyonline. 2009;2:796-802.
39- Forouzani M, Askari M, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from Cucumis melo L. fruit and leaves. Int J For Soil Eros. 2013;3(3):95-9.

Archive of SID
www.SID.ir