پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی

جمهوری اسلامی ایران

معاونت پژوهش و فناوری

گروه پژوهشی فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی

عنوان طرح

بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره تام گیاه بشقابی‌شمالی (*Scutellaria tournefortii*) در مقایسه با فلاونوئیدهای استاندارد گیاهی

کد طرح:11-1713

محل اجرا:

گروه پژوهشی اکولوژی و سیستماتیک گیاهی

مسئول طرح

امینه زینالی

اسفند ماه 1393

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

جمهوری اسلامی ایران

پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی

معاونت پژوهش و فناوری

گروه پژوهشی فیزیولوژی و ژنتیک گیاهی

عنوان طرح

بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره تام گیاه بشقابی‌شمالی (*Scutellaria tournefortii*) در مقایسه با فلاونوئیدهای استاندارد گیاهی

کد طرح:11-1713

محل اجرا:

گروه پژوهشی اکولوژی و سیستماتیک گیاهی

مسئول طرح

امینه زینالی

اسفند ماه 1393

Archive of SID

www.SID.ir

عنوان طرح: بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره تام گیاه *Scutellaria tournefortii* در مقایسه با فلاونوئیدهای استاندارد گیاهی

کد طرح: 11-1713

محل اجرا: گروه پژوهشی اکولوژی و سیستماتیک گیاهی

نام مسئول: امینه زینالی، زیست شناسی گیاهی- تکوین، کارشناسی ارشد

ابوالفضل برزگر، بیوفیزیک، دکتری

همکاران:

1- جلیل بدراقی، بیوفیزیک، دکتری

2- اسدا... اسدی، بیوفیزیک، دکتری

3- میترا پارسا، بیوتکنولوژی کشاورزی، کارشناسی ارشد

تاریخ تهیه گزارش: اسفندماه 1393

Archive of SID
www.SID.ir

عنوان طرح: بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره تام گیاه *Scutellaria tournefortii* در مقایسه با فلاونوئیدهای استاندارد گیاهی

کد طرح: 11-1713

نام مسئول: امینه زینالی، زیست شناسی گیاهی- تکوین، کارشناسی ارشد

ابوالفضل برزگر، بیوفیزیک، دکتری

همکاران:

1- جلیل بدراقی، بیوفیزیک، دکتری

2- اسدا... اسدی، بیوفیزیک، دکتری

3- میترا پارسا، بیوتکنولوژی کشاورزی، کارشناسی ارشد

نام گروه پژوهشی ذی ربط: گروه پژوهشی اکولوژی و سیستماتیک گیاهی

تاریخ شروع طرح: دی‌ماه 1388

تاریخ اختتام طرح: مهرماه 1392

بودجه تصویب شده: 206,379,000 ریال

تاریخ تهیه گزارش: اسفندماه 1393

Archive of SID
www.SID.ir

مشخصات مسئول و همکاران طرح

نام و نام خانودگی	رشته تحصیلی	مسئولیت در طرح	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
امینه زینالی	زیست شناسی گیاهی- تکوین	مجری	420
ابوالفضل برزگر	بیوفیزیک	مجری	504
جلیل بدراقی	بیوفیزیک	همکار	168
اسدا... اسدی	بیوفیزیک	همکار	210
میترا پارسا	بیوتکنولوژی	همکار	210

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده فارسی

آنتی اکسیدان‌های طبیعی موجب محافظت بدن در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌شوند. گیاهان جنس *Scutellaria* از تیره نعناعیان حاوی آنتی اکسیدان‌های قوی می‌باشند.

در این پژوهش، عصاره متانولی و اتانولی بخش‌های هوایی و ریشه دو جمعیت از گونه *Scutellaria tournefortii* L. تهیه شد و ویژگی‌های آنها از لحاظ وجود فلاونوئیدهای تام، سنجش کمی میزان بایکالین و بایکالئین، و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. توان حذف رادیکال‌های آزاد خارج سلولی از طریق روش 2 و 2 دی فنیل ـ 1 ـ پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان ترکیبات فلاونوئیدی تام نمونه‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی با کلرید آلومینیم بدست آمد. سنجش کمی بایکالین و بایکالئین به روش HPLC انجام شد.

در ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی داخل سلول ابتدا اثر سمیت عصاره‌ها به روش آزمون MTT اندازه‌گیری شد. پس از آن توان حیاتی سلول‌ها در مقابل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و عصاره‌ها نیز به روش رنگ‌سنجی MTT بررسی شد.

نتایج نشان داد فلاونوئید تام عصاره‌های بدست آمده از 1/49 mg/g dw تا 6/4 mg/g dw متغیر بود. میزان بایکالین در عصاره‌های مختلف از 0/3 µg/g dw تا 50/5 µg/g dw بود، همچنین میزان بایکالئین از صفر تا 1/5 µg/g dw بدست آمد. میزان IC_{50} عصاره‌ها به روش DPPH از 73/08 µg/ml تا 387/00 µg/ml متغیر بود.

در بررسی توان حیاتی سلول‌ها IC_{50} بدست آمده در رنج 31/79 µg/ml تا 125/45 µg/ml قرار داشتند.

بهترین اثر حفاظتی در مقابل رادیکال‌های آزاد داخل سلولی IC_{50} = 31/91 µg/ml بدست آمد.

نتایج بدست آمده نشان داد گیاه *Sc. tournefortii* منبع خوب و قابل دسترسی از لحاظ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد و می‌توان از آن در صنایع دارویی، غذایی و صنعتی استفاده نمود.

کلید واژه‌ها:

Scutellaria tournefortii، توان حیاتی سلول، بشقابی شمالی، آنتی اکسیدان، فلاونوئید تام، بایکالین، بایکالئین،DPPH.

Archive of SID
www.SID.ir

پیشگفتار

منت خدای را عزوجل که به اینجانب توفیق این خدمت ناچیز را در اجرای پژوهش حاضر عطا فرمود.

گیاهان یکی از مهمترین منابع داروئی جهت درمان بیماری‌های انسانی هستند. یکی از گیاهانی که به لحاظ داروئی حائز اهمیت می‌باشد جنس *Scutellaria* و متعلق به خانواده نعنا (Lamiaceae) است. بیش از 350 گونه از این جنس شناسایی شده است که حدود 25 گونه آن در ایران انتشار دارد. این گیاه به علت داشتن متابولیت‌های ثانویه فلاونوئیدی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند انواع سرطان‌ها، HIV ، هپاتیت، سیروز کبدی، بیماری‌های قلبی عروقی و ... موثر می‌باشد.

در پژوهش حاضر، گونه *Scutellaria tournefortii* از این جنس که انحصاری ایران می باشد،جمع‌آوری و خواص آنتی اکسیدانی آن بررسی شد و قدرت آنتی اکسیدانی مواد موثره گیاه سنجش و مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین و اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی بر پایه کاهش غلظت رادیکالهای آزاد و گونه های فعال اکسیژن یا (Reactive Oxygen Species, ROS) در محیط های خارج و داخل سلولی انجام شد. مطالعات نشان می‌دهد بیماری‌های بیشماری وجود دارند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم با غلظت رادیکال‌های آزاد یا گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی و خارج سلولی (خون و مایعات مغزی نخاعی) ارتباط دارند. در این تحقیق عصاره گیاه *Scutellaria tournefortii* از نظر توانایی بدام‌اندازی (scavenging) رادیکال های آزاد خارج سلولی و داخل سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات خارج سلولی یا in vitro به کمک روش‌های اسپکتروسکوپی و در داخل سلول به کمک روش‌های MTT (اندازه گیری رنگیزه استاندارد) و cell viability انجام گرفت. در نهایت فعالیت آنتی اکسیدانی آنها در خارج از محیط سلولی و داخل سلولی مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. نتایج و روند انجام این پژوهش درگزارش حاضر و در قالب 5 فصل مجزا ارائه شده است.

در پایان وظیفه خود می‌دانم از

- مسئولان پژوهشکده علوم پایه کاربردی بواسطه در اختیار قرار دادن امکانات مورد نیاز جهت به تحقـق رسیدن اهداف پروژه

- همکاران محترم پژوهشکده ابن سینا بواسطه انجام آزمایشات تعیین سمیت سلولی

و از کلیه همکاران که در اجرای این پژوهش مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

Archive of SID
www.SID.ir

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	و
پیشگفتار	ز
فصل اول: کلیات تحقیق	1
1-1- خصوصیات گیاه‌شناسی	2
1-1-1 تیره نعناع (Lamiaceae)	2
1-1-2- شرح سرده	2
1-2- مروری بر ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در سرده *Scutellaria*	3
1-2-1- ترکیبات فنلی	4
1-2-2- فلاونوئیدها	4
1-2-3- گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید	7
1-2-4- گلیکوزیدهای ایریدوئید	7
1-2-5- دی ترپن‌ها	8
1-2-6- تری ترپنوئیدها	8
1-2-7- آلکالوئیدهای دی ترینی نئوکلرودان	8
1-2-8- آلکالوئیدها	8
1-2-9- اسانس‌ها (Essential oils)	9

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه فهرست مطالب

عنوان	صفحه
1-2-10- سایر ترکیبات	9
1-3- کاربردهای دارویی گیاه *Scutellaria*	10
1-3-1- ضد تومور	11
1-3-2- آنتی آنژیوژنزیس (Anti- angiogenesis)	12
1-3-3- محافظ کبد (Hepatoprotective)	12
1-3-4- آنتی اکسیدانت	13
1-3-5- ضد تشنج	13
1-3-6- خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی	14
1-3-7- اثرات محافظت سیستم عصبی و بهبود حافظه	14
فصل دوم: پیشینه تحقیق	16
2-1- هدف از اجرای تحقیق	17
2-2- سوابق تحقیقاتی انجام شده در ایران و جهان	20
2-3- بررسی تئوری مبنای طرح	20
2-4- روش‌های تشخیص و آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی گیاه *Scutellaria*	24
فصل سوم: روند اجرای تحقیق	25
3-1- مطالعات کتابخانه ای	26

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه فهرست مطالب

عنوان	صفحه
3-2- جمع آوری نمونه های گیاهی	26
3-2-1- مطالعه منابع و تعیین حوزه های پراکنش	26
3-2-2- تعیین ایستگاه‌های نمونه برداری و جمع آوری گونه های گیاهی	26
3-3- خشک کردن نمونه ها	26
3-4- آماده سازی نمونه گیاهی	27
3-5- استخراج ترکیبات فلاونوئیدی	27
3-6 - سنجش توتال فلاونوئیدهای عصاره های گیاهی	27
3-6-1 - تهیه منحنی استاندارد	27
3-7- آنالیز HPLC عصاره های گیاهی	28
3-8- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه *sc.tournefortii*	29
3-۸-1 تست DPPH	29
3-8-2- محاسبات	29
3-8-3- آنالیز آماری	29

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه فهرست مطالب

عنوان	صفحه
3-9- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره داخل سلول عصاره ها با استفاده از تست MTT Assay در شرایط invitro	30
3-9-1- تعیین سمیت سلولی به روش MTT	30
3-9-1-1- آزمایش MTT/Metheyl Thiazol Tetrazolium و کاربردهای آن	30
3-9-1-2- مراحل انجام تست MTT	31
3-9-2- لاین های سلولی	32
3-9-3- کشت و جدا سازی سلو ل‌های منولایر از سطح فلاسک (پاساژ سلولی)	32
3-9-4- استفاده از روش MTT assay در برروی رده سلولی	33
3-9-5- سنجش توان حیاتی سلول ها در مجاورت رادیکال های آزاد پراکسید هیدروژن به روش MTT	33
3-9-6- ارزیابی توان حیاتی سلول‌ها	34
فصل چهارم: یافته‌های تحقیق	35
4-1- نتایج حاصل از سنجش فلاونوئیدی نام در گیاه *Scutellaria teurnefortii*	36
4-1- 1- مقایسه اثر حلال در میزان ترکیبات فلاونوئیدی نام بخش هوائی و ریشه گیاه *sc.tournefortii*	36

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه فهرست مطالب

عنوان	صفحه
4-1-2- مقایسه اثر متقابل نوع حلال و جمعیت مورد بررسی در میزان ترکیبات فلاونونوئید تام	39
4-1-3- مقایسه اثر متقابل جمعیت و بخش مورد استفاده در میزان ترکیبات فلانوئیدی تام	39
4-2- نتایج حاصل از تعیین کمی فلاونوئیدهای بایکالین و بایکالئین در عصاره های گیاه *Sc.tornefortii*	39
4-2-1- مقایسه مقدار فلاونوئیدهای بایکالین و بایکالئین در بخش هوائی و ریشه گیاه *Sc.tornefortii* در دو جمعیت مورد بررسی	41
4-3 نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Sc.tornefortii*	43
4-3-1- مقایسه نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی خارج سلولی عصاره گیاه به روش DPPH	44
4-3-2- مقایسه نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی کسیدانی داخل سلولی عصاره گیاه به روش MTT	47
4-2-3-1- نتایج تست سمیت سلولی	47
4-2-3-2- نتایج تست توان حیاتی سلول‌ها در مجاورت رادیکال‌های آزاد پراکسیدهیدروژن	51
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	53
منابع	56

Archive of SID
www.SID.ir

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل 2-1- ساختمان برخی فلاونوئیدهای گیاه *Scutellaria*	17
شکل 2-2 – انواع ترکیبات حاصل از پلی فنل‌ها	19
شکل 2-3- مکانیزم جاروب رادیکالی Baicalin	21
شکل 3-1- نمونه هرباریومی گیاه *Scutellaria tournefortii*	26

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول 1-1- مشخصات رده‌بندی گیاه *Scutellaria tournefortii*	3
جدول 4-1- تجزیه واریانس دو طرفه تاثیر متقابل سه عامل نوع حلال، جمعیت و اندام مورد بررسی بر میزان محتوای فلاونوئیدی عصاره	37
جدول 4-2- محتوای فلاونوئید تام بخش‌های مختلف گیاه *Sc. tournefortii* با تاکید بر نوع حلال و جمعیت	38
جدول 4-3- آنالیز واریانس دو طرفه اثر متقابل سه عامل اندام، جمعیت و حلال بر میزان بایکالین در گیاه *Sc. tornefortii*	41
جدول 4-4- آنالیز واریانس دو طرفه اثر متقابل سه عامل اندام، جمعیت و حلال بر میزان بایکالئین در گیاه *Sc.tornefortii*	42
جدول 4-5- مقدار بایکالین و بایکالئین در بخش های مختلف گیاه *Sc.tornefortii* با توجه به جمعیت و حلال استخراجی	43
جدول 4-6- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه *Sc.tornefortii* به روش DPPH با استانداردهای بایکالین، بایکالئین، کوئرستین و اسید اسکوربیک	44
جدول 4-7 نتایج تحلیل واریانس داده های مربوط به دوزهای استفاده شده در تست آنتی اکسیدان به روش DPPH	44
جدول4-8- مقایسه توان حیاتی سلولها در مجاورت عصاره های گیاه *Sc.tournefortii*	48
جدول 4-9- تحلیل واریانس سه طرفه توان حیاتی سلول‌ها در مجاورت عصاره های گیاه *Sc.tournefortii*	48
جدول 4-10- تحلیل واریانس دو طرفه توان حیاتی سلول‌ها در مجاورت رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن	52

Archive of SID
www.SID.ir

فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار 4-1- منحنی استاندارد کوئرستین اتانولی	36
نمودار 4-2- منحنی استاندارد کوئرستین متانولی	37
نمودار 4-3- مقایسه درصد مقادیر مختلف فلاوونوئید تام در بخش‌های مختلف گیاه *Sc. tournefortii* با تاکید بر نوع حلال و جمعیت	38
نمودار 4-4- منحنی کالیبراسیون دو استاندارد بایکالین و بایکالئین	40
نمودار 4-5- کروماتوگرام حاصل از HPLC استاندارد بایکالین و بایکالئین	40
نمودار 4-6- مقایسه تغییرات مقدار بایکالین در بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *Sc. tournefortii* در دو جمعیت مورد بررسی	41
نمودار 4-7- مقایسه تغییرات مقدار بایکالئین در بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *Sc. tournefortii* در دو جمعیت مورد بررسی .	42
نمودار 4-8- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی اسید اسکوربیک	45
نمودار 4-9- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بایکالئین	46
نمودار 4-10- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بایکالین	46
نمودار 4-11- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی کوئرستین	47
نمودار 4-12- مقایسه قابلیت زیست پذیری سلول در مقابل عصاره ریشه دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین	49
نمودار 4-13- مقایسه قابلیت زیست پذیری سلول در مقابل عصاره اتانولی و متانولی بخش هوایی جمعیت کجور گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین	50

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار 4-14- مقایسه قابلیت زیست پذیری سلول در مقابل عصاره اتانولی بخش هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین	50
نمودار 4-15- مقایسه قابلیت زیست پذیری سلول در مقابل عصاره متانولی بخش هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین	51

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول

کلیات تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

1-1- خصوصیات گیاه‌شناسی

1-1-1 تیره نعناع(Lamiaceae)

1-1-2- شرح سرده

سرده *Scutellaria* با نام فارسی بشقابی از تیره نعنائیان با بیش از 350 گونه در سرتاسر جهان پراکنده شده و تحت نام عمومی *skullcap* شناخته می‌شود (1). گیاهان علفی چند ساله (بندرت یک ساله)، تعداد کمی از آنها نیز به شکل درختچه‌ای و برخی نیز آبزی، طول آنها بین 100-5 سانتی متر متغیر است. غالباً بی‌بو و از کرک‌های ساده و یا غده‌دار پوشیده شده‌اند. ساقه‌ها چهار وجهی و دارای برگ‌های متقابل هستند (2). برگ‌ها اغلب دمبرگ‌دار، کامل یا دندانه‌دار هستند. گل‌ها منفرد، در برخی محور براکته‌ها تمایز نیافته است که در این صورت گل آذین‌های خوشه‌ای یا سنبله ایجاد می‌کنند. کاسه گل، استکانی و از ناحیه خلفی-شکمی پهن، دو لبی، دارای لب‌های کامل، گرد و پهن که متصل به میوه باقی مانده و معمولاً به دو بخش زبانه مانند نامساوی تقسیم می‌شود. لب پایینی دائمی بوده و لب بالایی می‌افتد (گاه هر دو دائمی یا ریزان می‌باشند). بخش بالایی کاسه گل، عموماً در بر دارنده زوائد فلس مانند گرد و معمولاً مقعر می‌باشد که به نام بشقابک هم خوانده می‌شوند که هم طول یا درازتر از باقی مانده بخش بالایی کاسه می‌باشد. جام گل، لوله‌ای دراز، غالباً بیرون آمده، خمیده به سمت بالا و متسع شده می‌باشد. جام گل دو لبی، لب فوقانی بالا رونده یا افراشته، شدیداً متورم، کلاه خود مانند، کامل و یا حاشیه‌دار، لب پایینی پهن، کوتاه‌تر و یا بلندتر از لب بالایی می‌باشد. پرچم‌ها به تعداد چهار عدد، بالارونده و دو به دو مساوی هستند. پرچم‌های پایینی درازتر بوده، به دنبال نوعی تکامل جزئی تک حجره‌ای گردیده‌اند (3).

نام انگلیسی skullcap بیانگر شکل کاسه یا غلاف گل در پایه گل‌ها است، که شبیه کلاه خودهای مینیاتوری قرون وسطی است. از نام‌های انگلیسی رایج برای این گیاه می‌توان به Scullcap، Hoodwort، Quaker Bonnet، Helmet Flower، Greater Skullcap، American Skullcap، Blue skullcap، Blue pimpernel، Mad Dog weed اشاره کرد (4).

این سرده شامل گیاهانی دارویی است که به طور خودرو (وحشی) در طبیعت رشد می‌کنند و از روش‌های کشت معمول نیز برای تولید محصولات آن‌ها استفاده می‌شود. همچنین تعدادی از گیاهان این سرده نیز برای اهداف زینتی بوسیله بذر یا قلمه تکثیر و در مکان‌ها یا باغ‌هایی با آفتاب فراوان و آبیاری مناسب کشت می‌شوند. این گیاهان تحت نور کامل خورشید شکوفا و از نظر نیاز تغذیه‌ای محدود هستند و به خوبی خاک را زهکشی می‌کنند. بذرها در اوایل بهار کاشت می‌شوند یعنی موقعی که خطر یخزدگی بعدی وجود ندارد.

Archive of SID
www.SID.ir

این سرده در ایران 20 تا 25 گونه دارد از جمله *Scutellaria polyadenia, Scutellaria edelbergii, Scutellaria amicorum*، که 8 گونه آن بومی ایران هستند و بقیه علاوه بر ایران در شمال سوریه، عراق، تالش، آناتولی، قفقاز، ترکمنستان و افغانستان می‌روید.

یکی از گونه‌های این سرده در ایران *Sc. tournefortii* L. با نام فارسی"بشقابی شمالی"است (5). خصوصیات گیاه‌شناسی آن به شرح ذیل می‌باشد، گیاه چند ساله، با طول ساقه 50-30 سانتی متر، با کرک‌های کم پشت و نرم و خمیده به بالا در گوشه‌های ساقه ، برگ‌ها در سطح بالائی صاف و بدون مو، پشت برگها تقریبا بدون مو، اندازه متوسط برگ‌ها 3- 2/2 * 4/5 -3 سانتی متر، دندانه دار اره‌ای، نوک تیز، در قاعده نیمه قلبی یا مخروطی شکل، دمبرگ به طول 15-10 میلیمتر. گلها در گل آذین‌های خوشه‌ای به طول 25-10 میلی متر و لخت، براکته‌های 8-5 ملیمتر، کوتاه تر یا مساوی کاسه گل،کاسه در غنچه 4-8 میلی متر. جام لوله گل و لب پایینی تقریبا سفید و لب بالائی قرمز مایل به صورتی می‌باشد (3).

پراکنش جغرافیایی: این گیاه در اقلیم‌های مختلف، از سیبری تا نواحی گرمسیر جنوب آمریکا، کوههای شمال آمریکا و کانادا، در سرتاسر اروپا تا ژاپن یافت می‌شود (6). گونه *Sc.tournefortii L.* شمال ایران و آذربایجان پراکنش دارد (3 و 5).

جدول 1-1- مشخصات رده‌بندی گیاه *Scutellaria tournefortii* L.

رده	دولپه‌ای‌ها (Magnoliopsida)
راسته	لامینال‌ها (Laminales)
تیره	نعنائیان (Labiatea)
سرده	بشقابی (*Scutellaria*)
گونه	بشقابی شمالی (*Scutellaria.tournefortii*)

1-2- مروری بر ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در سرده *Scutellaria*

هر چند ترکیبات شیمیایی سرده *Scutellaria* از سال 1889 مورد توجه قرار گرفته بود ولی بر اساس مقالات منتشر شده اسکوتلارین به عنوان اولین ترکیب فلاونوئیدی در سال 1910 توسط Goldschmiedt و Lerner از گیاه *Scutellaria altissima* تخلیص گردید، در حال حاضر 295 ترکیب دیگر نیز از 35 گونه مختلف این سرده جداسازی شده است که شامل اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، فنیل‌اتانوئید گلیکوزیدها، ایریدوئید گلیکوزیدها، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فیتوسترول‌ها، کومارین‌ها، پلی‌ساکاریدها و سایر ترکیبات است (**6** و **7**).

Archive of SID
www.SID.ir

1-2-1- ترکیبات فنلی:

در بین ترکیبات شیمیایی گیاه، ترکیبات فنلی گروه مشخص و ویژه‌ای هستند که تعداد زیادی از مواد را که معمولاً دارای یک حلقه آروماتیک، یک یا چند واحد هیدروکسی، و یا مشتقات اتری و یا قندی است را دربر می‌گیرد. این ترکیبات دارای تنوع ساختاری بالایی هستند و توانایی واکنش با متابولیت‌های اولیه مثل پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها را دارند. 6 مشتق فنلی شناخته شده به نام‌های E-*p* کوماریک اسید[1]، E- کافئیک اسید[2]، E- فرولیک اسید[3]، E-*p*- کوماروئیل گلوکوزید[4]، وانیلولوزید[5] و بنزیل- β-گلوکوپیرانوزید[6] از *Sc. albida ssp. albida* تخلیص شده است (8).

1-2-2- فلاونوئیدها:

در بین هزاران ترکیب پلی فنلی که به طور طبیعی وجود دارد، فلاونوئیدها جزء گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در گیاهان آوندی به میزان بیشتر و خزه‌گیان به میزان کمتر ذخیره می‌شوند. آن‌ها در تمامی اندام‌ها و بافت‌ها، در مراحل مختلف رشد و نمو و بسته به شرایط محیطی انباشت می‌شوند. این ترکیبات دارای نقش‌های متعددی از جمله، رشد و نمو، سازش گیاه به شرایط محیطی، جلوگیری از پیری سلول‌ها، رنگ، طعم و مزه، عطر محصولات گیاهی و همچنین نقش مهمی در تغذیه و سلامتی انسان ایفا می‌کنند. آن‌ها به طور معمول در واکوئل‌های گیاهان وجود دارند و دارای ساختار شیمیایی پایه C6-C3-C6 هستند که تنها توسط اکسیداسیون کربن‌های حلقه A تا C از یکدیگر متمایز می‌شوند (9).

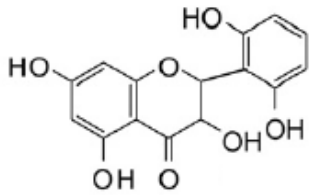
فلاونوئیدها و مشتقات آنها از ترکیبات اصلی سرده *Scutellaria* هستند. بیش از 160 ترکیب شامل فلاون‌ها، فلاونول‌ها، فلاوانون‌ها، فلاوانونول‌ها، بی‌فلاونوئیدها، فلاونولیگنان‌ها و چالکون‌ها از این گیاهان جداسازی شده است. اکثر آن‌ها روی حلقه‌های آروماتیک‌شان دارای گروه‌های متوکسیل یا هیدروکسیل در موقعیت‌های مختلف هستند.

فلاون‌ها و فلاونول‌ها: فلاون‌ها و فلاونول‌های جدا شده از گونه‌های مختلف *Scutellaria* شامل ترکیبات بایکالین[7]، بایکالئین[8]، اوروگزیلین A[9]، وگونین[10]، وگونوزید[11]، آپی‌ژنین[12]، اسکوتلارین[13]، 5، 7، 4-

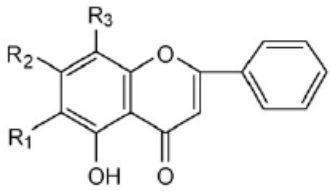
[1] E-*p*-coumaric acid
[2] E-caffeic acid
[3] E-ferulic acid
[4] E-*p*-coumaroylgluco side
[5] Vanilloloside
[6] Benzyl-β-glucopyranoside
[7] Baicalin
[8] Baicalien
[9] Oroxylin A
[10] Wogonin
[11] Wogonoside
[12] Apigenin
[13] Scutellarin

Archive of SID
www.SID.ir

تری هیدروکسی-8- متوکسی فلاون[14]، لوتئولین[15]، ویسیدولین III[16]، 2، 3، 5، 7- تترا هیدروکسی فلاون[17] و گان هانرویان[18] است که از *Sc. baicalensis*، *Sc. barbata* و *Sc. laterifolia* جداسازی شده است.



3، 5، 7، 2′، 6′- پنتا هیدروکسی فلاوانون



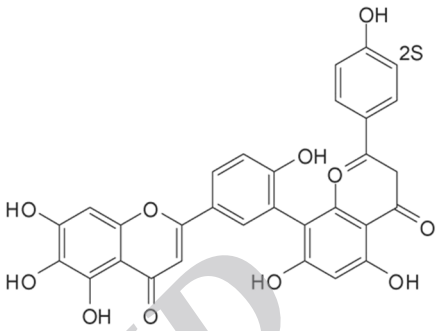
	R_1	R_2	R3
وگونین	H	OH	OCH3
وگونوزید	H	O-GluA	OCH3

فلاونون‌ها و فلاوانونول‌ها: فلاونون‌ها و فلاوانونول‌ها دارای استخلاف‌های مختلف از *Sc. baicalensis*، *Sc. amoena*، *Sc. indica*، *Sc. barbata*، *Sc. scandens* و سایر گونه‌های دیگر *Scutellaria* جداسازی شده است. 3، 5، 7، 2′، 6′- پنتا هیدروکسی فلاوانون به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان می‌تواند به طور قابل توجهی از آزاد شدن هیستامین جلوگیری کند، همچنین تولید اسید چرب دی‌هیدروکسی مشتق از آراشیدونیک اسید را در سلول‌های *LTB4*[19] تحریک شده با یونوفور کلسیم 23187 A[20] را مهار می‌کند. از طرفی به طور همزمان دارای اثرات مهاری روی میزان پراکسیداسیون لیپید القاء شده توسط کونکاناوالین A (ConA)[21] می‌باشد. بنابراین اثرات مهاری 3، 5، 7، 2′، 6′- پنتا هیدروکسی فلاوانون > وگونین > وگونوزید است (10).

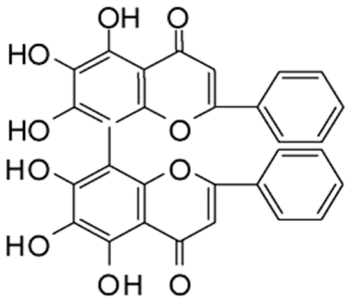
بی‌فلاونوئیدها: دو ترکیب از بی‌فلاونوئیدها در گونه‌های این سرده گزارش شده است. ترکیب 8 و 8′ بی‌بایکالئین[22] از گیاه *Sc. discolor* تخلیص شده است، ترکیباتی با این ساختار دارای دو مولکول بایکالئین متصل به کربن 8 هستند (11). آمنتوفلاون[23] از گیاه *Sc. linearis* بدست آمده و ساختارش شامل دو فلاون متفاوت است که توسط کربن (5′) و کربن (8) به هم متصل شده است (12). بی‌فلاونوئیدها عموماً در بازدانگان وجود دارند. در سرد *Scutellaria* تنها این دو ترکیب جداسازی شده است.

[14] 5,7,4-trihydroxy-8-methoxyflavone
[15] Luteolin
[16] Viscidulin III
[17] 2, 3, 5,7-tetrahydroxyflavone
[18] Ganhuangenin
[19] Leukotriene B4
[20] Calcium Ionophore A 23187
[21] Conkavanalin A
[22] 8,8-Bibaicalein
[23] Amentoflavone

Archive of SID
www.SID.ir

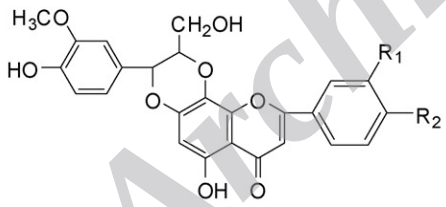


آمنتوفلاون



8 و ’8 بی بایکالئین

فلاونولیگنان‌ها: تاکنون 6 فلاونولیگنان از سرده‌های *Scutellaria* جداسازی شده است. در سال 1991، برای اولین بار *Kikuch*i و همکاران اسکوتلاپروستین‌ها[24] را از *Sc. prostrata* استخراج کردند. این ترکیبات از طریق پلی‌مریزاسیون و اتصال بین حلقه A فلاونوئیدها و لیگنان‌ها تشکیل می‌شوند (13).

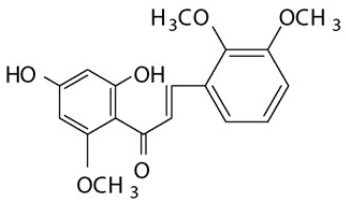


	R_1	R_2
اسکوتلاپروستین A	H	H
اسکوتلاپروستین B	H	OH

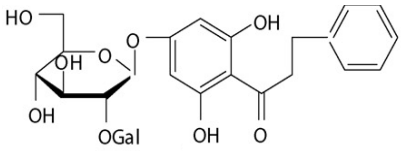
چالکون‌ها: بدلیل شکستکی پیوند شیمیایی بین کربن 1 و 2، ترکیباتی متعلق به گروه چالکون‌ها تشکیل می‌گردد. پنج چالکون اصلی از *Sc. indica* جداسازی شده است (14). آموئنین A [25] از گیاه *S. amoena* توسط Zhou و Yang در سال 2000 تخلیص شد (15). همچنین ’2،’4- دی‌هیدروکسی-2، 3،’6- تری‌متوکسی- چالکون[26]، 2، 6، ’2، ’4- تتراهیدروکسی- 6- متوکسی چالکون[27] از *Sc. discolor.* و *Sc. baicalensis* جداسازی شده است (16).

[24] Scutellaprostin
[25] Amoenin A
[26] 2′,4′-dihydroxy-2,3,6′-trimethoxy-chalcone
[27] 2,6,2′,4′- tetrahydroxy-6′- methoxychalcone

Archive of SID
www.SID.ir



2′، 4′- دی‌هیدروکسی-2، 3، 6′- تری‌متوکسی- چالکون



آموئنین A

1-2-3- گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید

10 گلیکوزید فنیل اتانوئید از جنس *Scutellaria* شناسایی شده است. 2- (3′- هیدروکسی- 4′- متوکسی فنیل) – اتیل – 1-O- α -L- را منوزیل (1←3) B- (4-D- فروزیل) گلیکوزید (163) و 2- (3′- هیدروکسی-4′- متوکسی فنیل)- اتیل -1-O-B-D- (4-D- فرولیل) – گلوکوزید (164) از *Sc.prostrata* بدست آمده اند (13).

استوزید ، لوکوسپتوزید A و مارتینوزید به ترتیب از *Sc.prostrata*، *Sc.albida ssp.albida*، *Sc.baicalensis* استخراج شده اند (8 و 17). علاوه بر آن، 2- (3- هیدروکسی 4- متوکسی فنیل)- اتیل- 1-O- α - L- رامنوزیل (1←3)-B- (4-D-فرولیل) گلیکوزید، و 4- هیدروکسی – B – فنیل اتیل – B- D- گلوکوپیرانوزید از گیاه *Sc. baicalensis* استخراج شده است (11).

1-2-4- گلیکوزید های ایریدوئید

بعد از موفقیت در کروماتوگرافی بر روی ستون های سیلیکاژل و RP-HPLC، سیزده گلیکوزید ایریدوئید از عصاره متانولی بخش‌های هوایی *Sc.albida ssp.albida* جدا شد(8). سایر گلیکوزیدهای ایریدوئید از بخش‌های هوایی *Sc.subvelutina* استخراج شده است (18).

Archive of SID
www.SID.ir

1-2-5- دی ترپن ها

این جنس منبع غنی از دی ترپن های نئوکلرودان می باشد که معمولا کارکرد هتروسیکلیک از خود نشان می دهند. این ترکیبات شامل اپوکسیدها، لاکتون ها و گروه های هیدروفوران می باشد. بیشتر این ترکیبات خاصیت دفع حشرات دارند. مخصوصاً جودرلین A ، جودرلین B ، اسکوتالبین A و اسکوتسیپرول B از *Sc.rubicunda subsp- rubicunda* مشخص شده است که خاصیت دفع حشرات علیه 5 گونه *Lepidoptera* دارد. به طور همزمان، بار باتین‌های C تا A خاصیت سمیت سلولی قابل توجهی در مقابل HONE-1 نازوفارنژال، سلول های اپیدرمی سرطان دهان و سلول های سرطانی HT29 روده ای دارد (۱۹ و ۲۰).

1-2-6- تری ترپنوئیدها

در سال 1993، زو و همکاران تری ترپنوئید اسیدی نوع اولئانان به نام اسید اسکوتلاریک را از *Sc.barbata* برای اولین بار جدا کردند (21). در سال 2006، میایچی و همکاران یک تری ترینوئید شناخته شده به نام اسید اورسولیک را از برگ‌های *Sc. strigillosa* جدا کردند (22) .

1-2-7- آلکالوئیدهای دی ترپنی نئوکلرودان

در سال 1996، اسکوتباراباتین A ، یک آلکالوئید دی ترپنی نئوکلرودان جدید از *Sc. barbata* برای نخستین بار جدا شد (23). در سال 2006، 2007 دای و همکاران اسکوتبار باتین‌ها و مشتقات آنها را از *Sc. barbata* بدست آوردند. اسکوباراباتین B فعالیت سمیت سلولی قابل توجهی در مقابل HONE1 نازوفارنژال، سلول‌های سرطانی اپیدرمی و سلول‌های سرطانی روده HT29 نشان می دهد (20) .

1-2-8- آلکالوئیدها

تنها 11 آلکالوئید از گیاه *Sc. flavescens* بوسیله ستون کروماتوگرافی با استفاده از سیلیکاژل و اکسید آلومینیوم در سال 2002 استخراج شده است(۲۴). در میان این ترکیبات، سوفورانول ، آناجیرین ، اکسی ماترین خاصیت ضد ویروسی در مقابل RSV نشان می‌دهد (24) .

Archive of SID
www.SID.ir

1-2-9- اسانس ها (Essential oils)

تنها اسانس های تعداد کمی از گونه‌های *Scutellaria* مورد بررسی قرار گرفته است. اسانس‌های گیاه *Sc. albida* ssp.*albida* از یونان بوسیله غلظت‌های بالای لینالول (52٪) و ترانس – نرولیدول (9/0%) شناسایی شده است. سایر گونه ها از یونان، *Sc. rupestris ssp. adenotricha, Sc. sieberi* نیز حاوی مقادیر زیادی لینالول، 22/7٪ و 38/8٪ می باشند (25). ترکیبات اصلی موجود در اسانس بخش هوایی گیاه *Sc. barbata* از چین هگزا هیدروفارنسیل استون، 3و 7 و 11و 15- تترا متیل -2- هگزا دکان-1- اول (7/8٪) ، منتول (7/7٪) و 1- اکتن-3-اول (7/1٪) می باشد(6).

اسانس‌های *Sc. lateriflora* از ایران از سزکوئی ترپن‌ها (78/3٪) تشکیل شده است که بتا- کادینن (27/0٪) و کالامنن (15/2٪) همراه با بتا- المن (9/2٪)، آلفاکوبن (4/1٪) و آلفاهومولن (4/2٪) ترکیبات اصلی موجود در این گیاه می‌باشند. لورنس و همکاران (1972) سزکوئی ترین‌ها را در اسانس گیاه *Sc. galericulata* و *sc. parvula* شناسایی کرده اند. در گیاه *S.galericulata* مقادیر زیادی از هیدروکربن‌های سزکوئی ترپن با کاریوفیلن (29/4٪) و ترانس – بتا- فارنسن (17/0٪) موجود می‌باشد که جزء ترکیبات اصلی آن به حساب می‌آید و در گیاه *Sc. parvula*، آلفا – بیسا بولول (20/6٪) به عنوان ترکیب اصلی همراه با ترانس – آلفا- برگاموتن (13/4٪) یافت می‌شود.(6)

ترکیبات اصلی چربی‌های ریشه *Sc. baicalensis* ، استوفنون، (E)- 4- فنیل-3- بوتن- 2-اون، 1- فنیل-1-،3- بوتاندیون، اسیدپالمتیک و اولئیک می‌باشد. لینالول (27/8٪) و کاریوفیلن (28/7٪) ترکیبات اصلی استخراج شده از *Sc. rubicunda subsp. Linnaeana* ،گیاه بومی سیسیل، می‌باشد (۶).

1-2-10- سایر ترکیبات

استات اورانتیامید از گیاه *Sc. barbata* استخراج شده است. در سال 2007، از *Sc. albida ssp.albida*، گوسیا و همکاران (8) شش مشتق فنولی شناخته شده به نام های ای- پی- کوماریک اسید، ای- کافئیک اسید، ای- فرولیک اسید، ای- پی- کومارویل گلوکوزید، وانیلولوزید و بنزیل- بتا- گلوکوپیرانوزید را استخراج کردند. علاوه بر آن، پاراکوماریک اسید استات، پارا- هیدروکسی بنزآلدئید و پارا- هیدروکسی بنزیل استون نیز از *Sc. barabata* استخراج شده است (۶).

میایچی و همکاران (22) دو فیتواسترول و پنج توکوفرول را از برگ‌های *Sc. strigillissa* بدست آوردند. از گیاه *Sc. linearis* ترکیبات بتا- سیتوسترول و بتاسیتوسترول گلوکوپیرانو بدست آمده است.

Archive of SID
www.SID.ir

دوکواسترول و دی بوتیل فتالات از *Sc. amoena* بدست آمده‌اند (۱۵). در سال 1938، پینوسیلوین و مشتقات آن ، گایلوساسین از *Sc. scandens* که بومی کشور نپال می‌باشد استخراج شده و پلی ساکاریدها، SBP، SPS4 از گیاه *Sc. barbata* بدست آمد (۱۶).

1-3- کاربردهای دارویی گیاه *Scutellaria*

برخی گونه‌های *Scutellaria* به دلیل مشخصات شیمیایی منحصر به فرد، به عنوان مدل دارویی مناسب ثبت شده‌اند از جمله *Scutellaria racemosa* دارای ژنوم نسبتا کوچک در هسته، حدود pg 0/75[28] می‌باشد (26). بنابراین به عنوان یک سیستم مدل عالی برای مطالعه تنظیم بیوشیمیایی و ژنتیکی متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. گونه‌های مختلف *Scutellaria* به طور گسترده و برای سالیان متمادی در طب سنتی چین، کره، هند، ژاپن و تعداد زیادی از کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی به صورت چای و دارو (ضد التهاب، سقط جنین، ضد اسپاسم، قابض کننده، تب‌بر، آرام بخش و مقوی معده و داروی ازدیاد قاعدگی) مورد استفاده قرار گرفته است (4).

همچنین خواص ، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سرطان و اثر آنتی‌اکسیدانی گیاهان این سرده به اثبات رسیده است (6).

گونه *Sc. pinnatifida* پراکنش محدودی در جهان دارد، لذا اطلاعات در مورد خصوصیات فیتوشیمیایی، خواص دارویی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سایر خصوصیات دیگر این گیاه در ایران اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. البته در مورد برخی از گونه‌های متعلق به این سرده اطلاعات جامع و کاملی در دسترس است. که در ذیل به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود.

یکی از گیاهانی که اغلب در TCM[29] (طب سنتی چین) مورد استفاده قرار می‌گیرد، huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) است. از سال 2000 تا به امروز بیش از 275 گزارش علمی درباره اثرات دارویی عصاره‌های huang-qin منتشر شده است. در طب گیاهی چین ریشه‌های *Sc. baicalensis* برای درمان ذات الریه، اسهال خونی، زکام و عفونت روده و همچنین برای درمان سرطان پروستات، معده و تیروئید استفاده می‌شود (6 و 2).

بایکالین، بایکالئین و وگونین از ترکیبات فلاونوئیدی اصلی در دو گیاه *Sc. baicalensis* و *Sc. lateriflora* هستند. طبق گزارش و همکاران در سال 1999، بایکالئین به طور مستقیم باعث مهار رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود (27). مطالعات آزمایشگاهی Halpern و همکاران (1995) نشان داد که بایکالین می‌تواند گونه‌های واکنشگر اکسیژن ROS[30] از جمله سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و

[28] Picogram
[29] Traditional Chinese Medical
[30] Reactive Oxygen Species

Archive of SID
www.SID.ir

رادیکال‌های هیدروکسیل را که باعث آسیب به بافت عضلانی میانی قلب می‌شوند را جمع آوری و به عنوان محافظ سلول‌ها از آسیب‌های کشنده عمل کند (28).

1-3-1- ضد تومور

گیاه *Sc.barbata* یک گیاه دارویی در طب سنتی چین می باشد که بومی بخش‌های جنوبی چین است. عصاره‌های اتانولی اثر بازدارنده رشد بر روی سلول A549 با IC_{50} از 0/21 میلی گرم بر میلی لیتر نشان می‌دهند. به طور همزمان، این عصاره در آزمایشی که سه مرحله اصلی تشکیل سرطان را نشان می‌داد، مخصوصاً در سرطان های مربوط به زنان، از خود فعالیت بازدارندگی نشان داد. عصاره‌های آبی فعالیت بازدارنده رشد بر روی A549، Pc-3 ، Panc-1 ، MCF-7, LNCap (انسانی) و Panc02، MCNeuA، LLC (موش) بر روی 8 لاین سلول‌های سرطانی نشان داده است (6).

چاو و همکاران (2004) مکانیسم ضد توموری بخش متیلن کلریدی عصاره *Sc. barbata* (MCSB) در سلول‌های سرطان خون U937 انسانی را مورد بررسی قرار دارند. تایید شده است که MCSB می‌تواند از طریق مسیر تخریب میتوکندری باعث القای مرگ برنامه ریزی شده سلول شود (6).

مرگ برنامه ریزی شده سلولهای لیومیوما (leiomyoma) که بوسیله *Sc. barbata* القا شده است به دلیل آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، به دنبال افزایش فعالیت آنزیم شبیه کاسپاز 3 (caspase 3-like) می‌باشد(6).

یو و همکاران (2007) تائید کرده‌اند که بخش‌های غیرقطبی و با قطبیت کمتر عصاره گیاه *Sc.barbata* سمیت سلولی وابسته به دوز بر روی شش لاین سلول‌های سرطانی دارند. در میان آنها، بخش کلروفورمی شدیدترین سمیت سلولی را بر روی لاین‌های سلول‌های سرطانی و کمترین اثر سمیت را بر روی لاین سلول‌های طبیعی کبدی دارد و همچنین بطور قابل توجهی از تکثیر تومور جلوگیری می‌کند (6).

عصاره آبی ریشه‌های *Sc.baicalensis* (Scutellaria Radix) بازدارندگی قابل توجهی در مقابل فعالیت MMP-2 و MMP-9 و تهاجم سلول‌های SK-Hep1، با IC_{50} از 85 ، 145 و 150 میکروگرم بر میلی لیتر نشان می‌دهد. این عصاره همچنین از رشد لاین‌های سلول‌های لنفوما و میلوما از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و به دام انداختن چرخه سلولی در غلظت‌های قابل دسترس بالینی جلوگیری می‌کند. این اثر ضد تکثیر را بوسیله صدمه رساندن به میتوکندری، تعدیل ژن‌های خانواده Bcl، افزایش سطح بازدارنده CDK نوع p27 KIP1 و کاهش سطح انکوژن c-myc انجام می‌دهد (6).

ژانگ و همکاران (1998) چهار فلاونوئید *Sc.planipes* را با *Sc. baicalensis* مقایسه کردند و نتایج نشان داد که محتوای آنها در ریشه هر دو گیاه مشابه می باشد. *Sc. palnipes* را می‌توان به عنوان یگ گیاه دارویی جدید در نظر گرفت زیرا محتوای ترکیبات اصلی آن و فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد حساسیت

Archive of SID
www.SID.ir

آنها و سمیت کامل آنها در شرایط درون شیشه (in vitro) با ترکیبات گیاه *Sc. baicalensis* تفاوت قابل توجهی ندارد. در سال 2009، مین خاصیت ضد سرطانی *Scutellaria* و ترکیبات اصلی و فعال آن مانند بایکالین (7)، بایکالئین (8) و ووگنین (21) را مورد بازبینی قرار داد. این مقاله نشان داد که گیاه *Scutellaria* فعالیت ضد سرطانی بالقوه‌ای دارد و ترکیبات فعال زیستی آن فلاون ها می‌باشند. عصاره آن تنها بازدارنده رشد سلول نیستند بلکه برای لاین‌های سلولی توموری مختلف انسانی در شرایط درون شیشه هم اثر بازدارندگی رشد نشان می‌دهند و همچنین از رشد سلول‌های توموری در شرایط در زنده (in vivo) جلوگیری می‌کنند (6).

عملکرد ضد توموری این فلاون ها بیشتر به دلیل توانایی آنها در جاروب رادیکال های اکسیداتیو، کاهش فعالیت NFKB، متوقف کردن چندین ژن مهم در تنظم چرخه سلولی، متوقف کردن بیان ژن COX-2 و جلوگیری از آلودگی ویروسی می‌باشد (6).

1-3-2- آنتی آنژیوژنزیس (Anti- angiogenesis)

وانگ و همکاران (2004) فعالیت آنتی انژیوژنزیس را در رگ های غشای کیسه خارجی جنینی جوجه (CAM) و سلولهای کشت شده اندوتلیال آئورتی گاو (BAECS) بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره آبی گیاه *Sc. baicalensis* فعالیت آنتی انژیوژنزیس شدیدی در شرایط درون شیشه دارد (6).

1-3-3- محافظ کبد (Hepatoprotective)

لین و همکاران (1997)، اثر نسبت‌های مختلف عصاره های n- هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی، n - بوتانلی و آبی از گیاه *Sc. barbata* را در سه مدل آزمایشگاهی در شرایط زنده (in vivo) بر روی کبد بررسی کردند. نتایج نشان داد که بخش کلروفرمی و n– هگزان در مقابل مسمومیت ناشی از D– گالاکتوزامین (D-GlanN) دارای پتانسیل بالایی می‌باشد و بخش کلروفرمی بیشترین اثر محافظت از کبد را در برابر سمیت کبدی ناشی از استامینوفن (APAP) دارد (6).

تن و همکاران (2006) این فرض را مطرح کردند که فعالیت آنتی فیبروزی ریشه *Sc. baicalensis* احتمالا از طریق مهار فسفوریلاسیون اتصال پروتئینی انجام می‌شود. ریشه‌ها و ساقه‌های *Sc. baicalensis* همچنین از جهش زایی میکوتوکسین آلفاتوکسین – B1 در کبد موش جلوگیری می‌کند (6) .

Archive of SID
www.SID.ir

1-3-4- آنتی اکسیدانت

عصاره‌های متانولی *Sc. baicalensis* از پراکسیداسیون لیپیدی در میکروزوم‌های کبد موش و سلول‌های قرمز خونی جلوگیری می‌کنند و ازفعالیت آمینوپیرین N- دمتیلاز و گزانتین اکسیداز به همان خوبی که که در سیستم Fe^{+3}-EDTA- H_2o_2 مشاهده شده است جلوگیری می‌کند. در مدل کاردیومیست کم خونی موضعی (ischemia) و تزریق مجدد وریدی (reperfusion)، 1 میلی گرم بر میلی لیتر عصاره *Sc. baicalensis* سریعا مقدار اکسیدانت‌های تولید شده طی کاهش موقت اکسیژن بدن را نسبت به بازدارنده آنتی مایسین A جایگاه سوم میتوکندریایی کاهش می‌دهد. مرگ سلول بعد از کم خونی موضعی / تزریق مجدد وریدی در سلول‌های تیمار نشده با عصاره *Sc. baicalensis* از ۴۷± ۳ % به ۲۶± ۲% در سلول‌های تیمار شده با عصاره *Sc. baicalensis* کاهش پیدا کرد. بعد از عملکرد *Sc. baicalensis* مرگ سلول‌ها از $49 \pm 6\%$ در سلول‌های تیمار نشده به $23 \pm 4\%$ در سلولهای تیمار شده ($p<0/001$) کاهش پیدا کرد (27). سلول‌های عصبی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار داشتند و با فلاون‌های استخراج شده از عصاره‌های آبی *Sc. baicalensis* تیمار شده بودند نیز مورد مشاهده قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌های فلاونی (50 میکروگرم بر میلی لیتر) از سلول‌ها محافظت می‌کنند و میزان زنده مانی سلول را تا $85 \pm 5\%$ و میزان Bcl-2 را در داخل سلول ها افزایش می‌دهند (6).

1-3-5- ضد تشنج

وانگ و همکاران (2000) اثر ضد تشنجی عصاره آبی *Sc. baicalensis* (ED50: 3/6 گرم بر کیلوگرم) را در شرایط درون موجود زنده (in vivo) و اثر افزایشی آن بر جذب $^{36}cl^-$ با آزمایش ماکزیمال الکتروشوک انجام دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی در مقابل حمله‌های ناگهانی شدید، فعالیت ضد تشنجی دارند و این اثر تشنجی بخاطر فعال‌سازی جایگاه اتصال گیرنده‌های GABAA بنزودیازپین نمی‌باشد و احتمالاً این عمل از طریق جلوگیری از سرعت حمله ناگهانی صورت می‌گیرد (6).

مطالعه زانگ و همکاران (2009) نشان می‌دهد که عصاره تام (محلول اتانول و آب) *Sc. lateriflora* فعالیت ضد تشنجی ملایمی در دو مدل جانوری دارند (6).

1-3-6- خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی

عصاره‌های آبی 10٪ گیاه *Sc. baicalensis* خواص ضد قارچی در مقابل سویه‌های *Aspergillus fumigatus*، *Candida albicans*، *Geotrichum candidum*، *Rhodotorula rubra* دارند و بیشترین خاصیت ضد قارچی را در مقابل *candida albicans* از خود نشان می‌دهند. عصاره‌های اتانولی گیاه *Sc.*

Archive of SID
www.SID.ir

baicalensis می‌تواند فعالیت ضد میکروبی چهار آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین G، جنتامایسین، سیپروفلوکسین، سفتریاکسون) را بر روی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط درون شیشه بهبود ببخشد (6).

فعالیت ضد ویروسی عصاره‌های آبی گیاه *Sc. baicalensis* , *Sc. indica* در مقابل ویروس سن سیتیومی تنفسی انسانی (RSV) با استفاده از آزمایش cytophatic effect (CPE) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاکی از فعالیت ضدRSV با غلظت های بازدارنده 50 درصدی (IC50)، 31/3 ، 62/5 میکروگرم بر میلی لیتر بود (Li و همکاران،2004). به علاوه عصاره های آبی *Sc. baicalensis* بازدارندگی قابل توجه 90 درصدی در غلظت 200 میلی گرم بر میلی لیتر در مقابل فعالیت آنزیم پروتئاز HIV-1 نشان دادند (6).

1-3-7- اثرات محافظت سیستم عصبی و بهبود حافظه

فلاونوئیدهای استخراج شده از بخش هوایی *Sc. baicalensis* که به صورت خوراکی به میزان 35 میلی گرم بر کیلوگرم و به مدت 19 تا 20 روز مصرف شده بودند به طور قابل توجهی کاهش یادگیری و حافظه را کاهش می‌دهند، صدمات عصبی را تقلیل می‌بخشند و ناهنجاری متابولیت انرژی ناشی از کم خونی را در موش‌ها بهبود می‌بخشند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که فلاونوئیدهای *Sc. baicalensis* برای درمان زوال عقل سودمند هستند. به طور همزمان آنها اثر محافظتی قابل توجهی بر روی کم خونی موضعی مغزی که در اثر آسیب مغزی حاصل می‌شود از خود نشان می‌دهند (6).

هئو و همکاران (2009) پیشنهاد کردند که *Sc. baicalensis* اثرات محافظت سیستم عصبی قابل توجهی در مدل Ibo دارد. بعد از مصرف 30 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی 70٪ گیاه *Sc. baicalensis* ، تعداد سلولهای سیستم ایمنی عصبی برای کولین استیل ترانسفراز (ChAT) در هیپوتالاموس افزایش پیدا کرد در حالیکه سلولهای تولید کننده GABA و گلوتامات افزایش نداشتند. علاوه بر آن، عصاره‌ها میزان زنده مانی لاین سلولی اجدادی هیپوکامپوسی، HiB5 ، و تمایز آن به سلول ایمنی CHAT را افزایش می‌دهند. به طور همزمان باعث افزایش بیان گیرنده های NMDA و کاهش میکروگلیا های فعال شده در هیپوکامپوس نیز در مدل Ibo مشاهده شده است (29).

کیم و همکاران (2001)، پیشنهاد کردند که عصاره متانولی *Sc. baicalensis* ، از تولید $TNF-\alpha$ و NO میکروگلیایی جلوگیری می‌کند و سلول‌های Pc12 را از سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن در شرایط درون شیشه محافظت می‌کند (6).

Archive of SID
www.SID.ir

فصل دوم

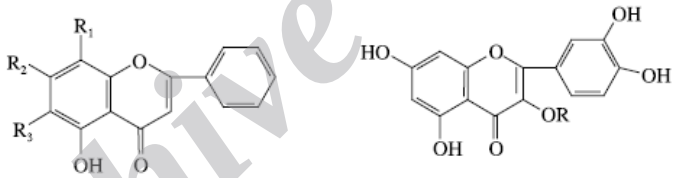
پیشینه تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

2-1- هدف از اجرای تحقیق

جنس *Scutellaria* با حدود بیش از 350 گونه از تیرهLabiateae می‌باشد. این گیاه در مناطق مختلف جهان از جمله سیبری، آمریکای شمالی و مرکزی، سطح وسیعی از اروپا و تمام آسیا، پراکنش دارد. گونه‌هایی از این جنس در طب سنتی چین، ژاپن و آمریکا برای درمان بیماری‌های عصبی، بیماری‌های مزمن مانند هپاتیت، سیروز کبدی، یرقان، اضطراب و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های مختلف جنس *Scutellaria* از جمله *Sc. Baicalensis* ، *Sc. Lateriflora*، *Sc. racemosa*، *Sc. barbata*، *Sc. planipes*، *Sc. galericulata* منبع عظیمی از ترکیبات فیتوشیمیایی هستند. مهمترین متابولیت‌های ثانویه موجود در این گیاهان ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشند. فلاونوئیدهای مهم موجود در این گیاه، baicalin، Baicalein، wogonin، *Scutellarin*، Luteolin، Apigenin، Oroxylin، Scullcap flavone و ... می‌باشد (6). این ترکیبات در بخش‌های مختلف گیاه از جمله ریشه، برگ‌ها، و ساقه‌ها یافت می‌شود. میزان فلاونوئیدها در بخش‌های متفاوت گیاه در گونه‌های مختلف تفاوت دارد. به طور مثال بخش‌های هوایی گیاه *Sc.baicelensis* تقریباً فاقد ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد در حالیکه در گیاه *Sc.laterifloa* بخش‌های هوایی (ساقه) گیاه بیشتر از ریشه حاوی ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد (27).



B: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$
BG: $R_1 = H, R_2 =$ O-glucuronyl, $R_3 = OH$
W: $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$
WG: $R_1 = OCH_3, R_2 =$ O-glucuronyl, $R_3 = H$
O: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$

Quercetin: R = H
Rutin: R = rhamnoglucoside

شکل 2-1- ساختمان برخی فلاونوئیدهای گونه‌های *Scutellaria*

BG: Baicalein glucuronide B : Baicalein

WG: Wogonin glocuronide W:Wogonin

O:Oroxylin

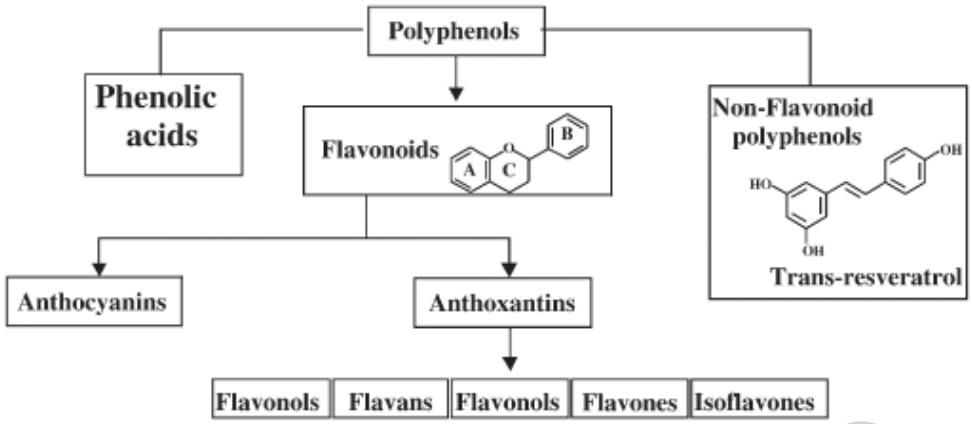
Archive of SID
www.SID.ir

شیوع بیماری‌های قلبی عروقی، انواع سرطان‌ها و بیماری عصبی که با رادیکال‌های آزاد موجود در بدن مرتبط می‌باشد. همچنین فراوانی ترکیبات آنتی اکسیدانی فلاونوئیدی درگیاهانی مثل *Scutellaria* و هزینه بالای سنتز شیمیایی آنتی اکسیدان‌ها، توجه به گیاهان داروئی و استفاده از این ترکیبات طبیعی سرشار از آنتی اکسیدانها را اهمیت می‌بخشد.

بیش از 70 درصد از بیماری‌های انسانی به رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مربوط می‌شود که از آن جمله می‌توان به انواع بیماری‌های سرطانی، بیماری‌های قلبی-عروقی (atherosclerosis)، فشار خون، سکته‌های قلبی و مغزی، بیماری‌های تخریب عصبی (neurodegenerative) مثل آلزایمر و یا پارکینسون و در نهایت پیری زودرس و بیماری‌های مربوط به پیری اشاره کرد. در تمامی این موارد مقدار رادیکال‌های آزاد و گونه های فعال اکسیژن ROS در بدن شخص افزایش می‌یابد. جلوگیری و درمان این بیماری ها ارتباط تنگاتنگی به حضور آنتی اکسیدان‌ها در خون و مایعات مغزی نخاعی دارد. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که اکثر پلی فنل ها اثرات محافظتی نورونی (neuroprotection) بیشتری در مقایسه با ویتامین‌های آنتی اکسیدان در مقابل گونه‌های فعال اکسیژنی دارند. مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد رژیم‌های غذایی سرشار از میوه و سبزیجات ریسک بوجود آمدن بیماری‌هایی مثل سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و تخریب سیستم عصبی را کاهش می‌دهد. اما تا بحال بطور واضح مشخص نشده که کدام ماده و یا ترکیب کدام یک از آنها واقعا عمل محافظتی مذکور را انجام می‌دهد و مکانیسم عمل آن چگونه است (30).

فلاونوئید ها ترکیباتی هستند که قدرت فوق العاده‌ای در جاروب رادیکالی دارند. گزارشات حاکی از این است که مصرف میوه و سبزیجات شروع آلزایمر را به تاخیر می‌اندازد. تاکنون هزاران نوع پلی فنل از گیاهان شناسایی شده است و همچنان‌که در شکل 2-2 نشان داه شده است در واقع گیاهان هزاران ترکیب فنلی و پلی فنلی بعنوان متابولیت ثانویه تولید می‌کنند که آنها برای اکثر فرایند های فیزیولوژی گیاهی ضروری هستند. با وجود این اکثر تحقیقات انجام شده در مورد پلی فنل‌ها و تاثیر مثبت آنها در سلامت انسان بر روی فلاونوئید ها بوده است. فلاونوئیدها بسیار متنوع هستند ولی در ساختمان همه آنها ترتیب C6-C3-C6 حفظ شده است که به صورت دو حلقه آروماتیک توسط یک حلقه اکسیژن‌دار بهم متصل هستند. فلاونوئید ها در اکثر میوه ها، سبزیجات، آجیل ها و نوشیدنی هایی مثل چای سبز به وفور یافت می‌شوند. گستردگی تنوع فلاونوئیدها در شکل 2-2 آمده است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 2 -2– انواع ترکیبات حاصل از پلی فنل ها. مهمترین ترکیبات حاصل از پلی فنل ها مربوط به فلاونوئیدهاست.

Sc. galericulata ازگیاهانی است که در طب سنتی ایران به عنوان تقویت کننده و ضد مالاریا استفاده می‌شود. از گونه‌های مختلف *Scutellaria* در مناطق مختلف جهان برای درمان انواع بیماریها استفاده می‌شود. در ایران بر روی این گیاه تاکنون گزارشی که حاوی تحقیق بر متابولیت‌های ثانویه آن باشد، ارائه نشده است. از طرفی اهمیت جهانی گیاه *Scutellaria* که تاکنون بیش از 300 گزارش در خصوص ترکیبات موجود در آن و اثرات داروئی و خواص آنتی اکسیدانی آن وجود دارد، لزوم توجه به این گیاه داروئی را مورد اشاره قرار می‌دهد. از حدود 25 گونه *Scutellaria* که در ایران پراکنش دارد نزدیک به 10 گونه انحصاری ایران و 15 گونه دیگر نیز بومی ایران بوده و در مناطق مختلف کشور پراکنش دارند. برخی گونه‌های اندمیک ایران جزء گونه‌های در معرض خطر انقراض می‌باشند. با توجه به اهمیت داروئی گیاه در این طرح دو جمعیت از گونه *Scutellaria tournefortii* که اندمیک (انحصاری) ایران می‌باشد جهت ارزیابی و سنجش میزان ترکیبات فلاونوئیدی ، قدرت آنتی اکسیدانی و توانایی جاروب (scavenging) رادیکال‌های آزاد در محیط‌های داخلی و خارج سلولی استفاده شد و در نهایت قدرت جاروب رادیکالی آنها در هر دو محیط مذکور بررسی شد. همچنین فلاونوئیدهای استاندارد (سنتتیک)گیاهی شامل Baicalin, Quercetine و Baicalein از نظر قدرت آنتی اکسیدانی و توانائی جاروب (scavenging) رادیکال‌های آزاد با ترکیبات فلاونوئیدی عصاره تام گیاه *Scutellaria tournefortii* مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

2-2- سوابق تحقیقاتی انجام شده در ایران و جهان

مطالعات متعددی در خصوص خواص آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها و گیاه *Scutellaria* انجام شده است که به تعدادی از آنها در فصل اول و همچنین بند 2-3 اشاره شده است. گونه‌هایی از *Sc. Scutellaria baicalensis، Sc. Barbata، Sc.lateriflora، Sc. Racemosa، Sc. Planipes Sc. Litwinowii, Sc. Ramosissima, Sc. Immaculata, Sc. Lindbergii* که در چین، ژاپن، آمریکا، اروپا، مورد بررسی ترکیبات فلاونوئید و خواص داروئی قرار گرفته‌اند (30، 31، 32، 33، 34، 35). در ایران هیچ گونه گزارشی از مطالعه و بررسی گیاه *Scutellaria* و متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فلاونوئیدی) آن وجود ندارد. ضمن اینکه گونه *Scutellaria tournefortii* انحصاری (endemic) ایران بوده و فقط در ایران انتشار دارد، مطالعه حاضر از نظر گیاه مورد بررسی کاملاً جدید و بکر می‌باشد همچنین آزمایشات بررسی خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاه و فلاونوئیدهای دیگر مورد بررسی روش جدیدی می‌باشد.

مطالعات زیادی در مورد خصوصیات آنتی اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی انجام شده است. مطالعات قبلی نشان داده است که حلقه A و B و گروه‌های هیدروکسیل موجود در حلقه‌های مذکور تعیین کننده قدرت آنتی اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی است (36). مطالعات انجام شده در شرایط کاملا متفاوت با محیط طبیعی داخل سلولی انجام گرفته است. معمولا فلاونوئیدها به خاطر ساختمان ویژه ای که دارند در محیط های آبی نامحلول هستند لذا مهمترین سوالی که در این زمینه وجود دارد این است که آیا آنها قادر به عبور از مهمترین سد سلول یعنی غشا هستند یا نه؟ اگر از غشا عبور می کنند آیا قادر هستند در داخل سلول که یک محیط کاملا قطبی است مثل محیط آزمایشگاهی فعالیت کنند یا نه؟ این قسمت از مطالعات در کنار مطالعات بکر و قابل تمایز گیاهان بومی ایرانی از نکات قابل توجه و جدید طرح حاضر است.

3-2- بررسی تئوری مبنای طرح

گیاهان یکی از مهمترین منابع داروئی جهت درمان بیماریهای انسانی هستند. طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی 80٪ از جمعیت جهان به درمان اولیه از طریق گیاهان داروئی توجه و اعتقاد ویژه‌ای دارند.

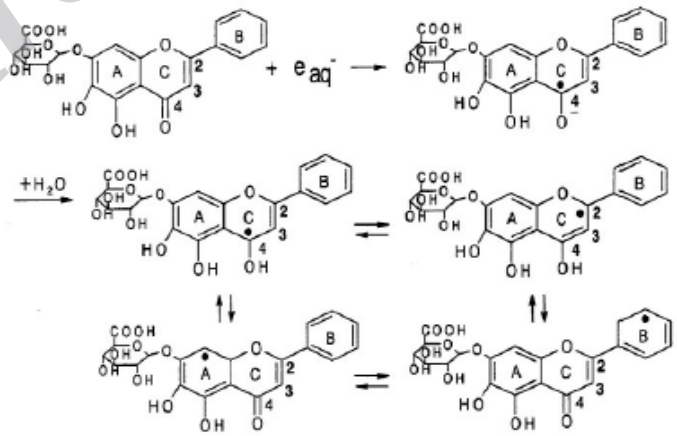
یکی از گیاهانی که به لحاظ داروئی حائز اهمیت می‌باشد، جنس *Scutellaria* و متعلق به خانواده لامیاسه (Lamiaceae) است. این گیاه به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه فلاونوئیدی در درمان بسیاری از بیماریها از جمله سرطان پروستات، جلوگیری از فعالیت آنزیمی ویروس HIV در لاین‌های سلولی لنفوئید، در برابر جهش زائی آفلاتوکسین القا شده به سلول‌های B1 کبدی، ممانعت از فیبروزکبدی، درمان سیروز کبدی و هپاتیت و بیماریهای اعصاب و روان، بیماریهای قلبی عروقی و ... کاربرد دارد (37، 38، 39، 40). از

Archive of SID
www.SID.ir

آنجا که سنتز شیمیایی ترکیبات فلاونوئیدی سخت و بسیار گران می‌باشد، دسترسی به این منابع از طریق گیاهان و به صورت طبیعی آسان‌تر می‌نماید.
Baicalein، Wogonin، baicalein glucuronide، Wogonin glucuronide, Scutellarin ترکیبات فلاونوئیدی اصلی گیاه می‌باشند که خواص درمانی زیادی دارند و مهمترین آنها می‌تواند مربوط به جاروب رادیکال‌های آزاد و محافظت از بافت‌ها در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باشد (6).

گونه‌ای از Scultellaria که در طب سنتی چین و ژاپن از زمان‌های خیلی قبل برای بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود،گیاه *Sc.baicalensis* (SB) می‌باشد. بیشترین ترکیبات *Sc.baicalensis* گروهی از پلی‌هیدروکسی فنل‌ها شامل Baicalin، Baicalein ، Wogonin ، Scutellarin و ... می‌باشد. این ترکیبات گروهی از فلاوونوئیدها (فلاونی) می‌باشند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه SB را سبب می‌شوند (41).

فلاون‌ها جاروب‌کننده‌های موثر رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و آنیون‌های سوپراکسید می‌باشند. مثالی از واکنش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات جاروب کردن الکترون‌های هیدراته شده (رادیکال‌های e^-_{aq}) توسط Baicalin (یکی از ترکیبات عصاره گیاه SB) می‌باشد. رادیکال‌ها e^-_{aq} زمانی که سلول‌ها در معرض نور ماوراءبنفش یا پرتوهای یونیزه دیگری با اشعه گاما قرار می‌گیرند، تشکیل می‌شوند. بنابراین استفاده از عصاره گیاه SB (فلاوونوئیدها و اسیدهای فنلی) در بیمارانی که رادیوتراپی می‌شوند سبب جاروب کردن رادیکال‌ها e-aq می‌شوند. e^-_{aq} در ابتدا به گروه‌های کتونی فلاوونوئیدها حمله می‌کند و تشکیل رادیکال یونی کتیل را می‌دهد. رادیکال یونی کتیل ناپایدار است و سریعاً پروتونه شده و به ترکیب ناپایدار دیگری تبدیل می‌شود که چندین حالت رزونانسی دارد. مکانیسم واکنش Baicalin با e^-_{aq} در شکل زیر نشان داده شده است (40).



شکل 2-3- مکانیزم جاروب رادیکالی Baicalin (40)

Archive of SID
www.SID.ir

تاثیرات آنتی اکسیدانی عصاره گیاه SB با مطالعات in vivo و in vitro به اثبات رسیده است. محققان قدرت جاروب رادیکالی baicalein را در in vitro بررسی کرده و جاروب رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید را به روش EPR ارزیابی کرده‌اند. داده‌های EPR نشان داده است که baicalin و baicalein رادیکال‌های هیدروکسیل، DPPH و آلکیل را بسته به دوز استفاده جاروب می‌کند. Wogonin و Wogonoside تاثیری بر رادیکال‌های اخیر نداشتند. این نتایج نیاز به مطالعه فعالیت‌های ترکیبات خاص یک عصاره را برای شناسائی موثرترین ترکیب نشان می‌دهد. در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های معمول مانند ویتامین E، baicalein به طور مشخص در فرآیند تاثیر آنتی‌اکسیدانی در جاروب رادیکال‌های آزاد سلول‌های فیبروبلاست موثرتر بود (40).

زمانی که تحت استرس‌های اکسیداتیو مقدار زیادی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آزاد می‌شود، دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلولی از کار می‌افتند، عصاره‌های گیاهی آنتی‌اکسیدانی می‌توانند محافظت از سلول را تامین کنند. ساختمان فلاونوئیدی و وزن پایین مولکولی آنها سبب می‌شود که چنین مولکول‌هایی دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلول شوند و لذا این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیماری‌های قلبی خیلی عالی هستند (40).

رادیکال‌های آزاد طی واکنش های زنجیری آبشاری باعث اکسایش ترکیبات آلی می‌شوند. رادیکال‌ها بعد از بوجود آمدن در واکنش (1) بسرعت اکسید شده و پراکسید رادیکال تشکیل می‌دهند (واکنش 2). تا این مرحله با رادیکال‌های ایجاد شده نمی توان کاری انجام داد زیرا سرعت واکنش رادیکال آزاد با اکسیژن بسیار بالاست و در حدود 10^9 $M\text{-}1s\text{-}^1$1 است در حالی که سرعت الکترون‌دهی و احیاء رادیکالی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها در محدوده 10^6 M-1s-1 قرار دارد. بنابراین پراکسید رادیکال بوجود آمده با سرعت نسبتا کند با مولکول‌های آلی دیگر وارد واکنش شده و مولکول‌های جدیدی را مورد هدف قرار می‌دهد و این واکنش به واکنش زنجیری اکسایش رادیکالی معروف است.

(1) $RH \rightarrow R^{\circ}$ (initiation)

(2) $R^{\circ}+O_2 \rightarrow RO_2^{\circ}$ (O_2 addition)

(3) $RO_2^{\circ}+ RH \rightarrow ROOH+ R^{\circ}$ (chain reaction)

(4) $RO_2^{\cdot} + ArOH \rightarrow ROH + ArO^{\cdot}$

واکنش زنجیری 3 با سرعت معادل با $M\text{-}1s\text{-}^1$ 10مولکول‌های سالم دیگر را در گیر می‌کند. اگر در نظر بگیریم مولکول مورد نظر چربی باشد طبق واکنش های 3-1 زیر سریعا اکسید و تخریب خواهد یافت. اگر در محیط واکنش مولکول‌هایی با توانایی جاروب رادیکالی (ArOH) وجود داشته باشد قادر خواهد بود با RO_2° حاصل از واکنش 2 را احیاء و مانع بوجود آمدن واکنش 3 شود. این واکنش که باعث می‌شود واکنش زنجیری رادیکالی شکسته شود، به شکننده واکنش یا "chain breaking reaction" معروف است (واکنش 4).

Archive of SID
www.SID.ir

جاروب مستقیم رادیکال‌های تنها مکانیسم فعالیت عصاره گیاه SB نیست. این عصاره و ترکیبات آن به صورت مکانیسم غیرمستقیم هم خواص آنتی‌اکسیدانی خود را نشان داده‌اند. ثابت شده است، با وجود اینکه Wogonin به صورت مستقیم قدرت جاروب رادیکال‌ها را ندارد اما می‌تواند به طور شاخص از فعالیت آنزیم Xanthine Oxidase جلوگیری می‌کند (40).

علاوه بر بیماری‌های قلبی استرس‌های اکسیداتیو مرتبط با بیماری‌های عصبی نیز هستند. فلاون‌های عصاره *Sc. baicalensis* استرس اکسیدان‌ها را تضعیف و از سلولی عصبی در مقابل تخریب اکسیدان‌ها محافظت می‌کنند و می‌تواند در درمان صدمات مغزی مرنبط با رادیکال‌های آزاد استفاده شود. همچنین baicalein می‌تواند در درمان واکنش‌های التهابی و آپو پتوز سلولی سیستم اعصاب مرکزی مفید باشد (40).

در بیماران سرطانی که شیمی درمانی می شوند Cisplatin که یکی از ترکیبات درمانی آنها را شامل می‌شود موجب تهوع و استفراغ بیمار می‌گردد. این ماده رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن را تولید می‌کند. اخیرا مشاهده شده که پیش تیمار بیماران سرطانی با عصاره گیاه SB در مدل‌های حیوانی تهوع ناشی از Cisplatin را کاهش داده و نقش درمانی ایفاء می‌کند (40).

بررسی مطالعات و پژوهش‌های انجام گرفته در مورد رادیکالهای آزاد نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد به سادگی به کمک روش‌های اسپکتروسکوپی و الکتروشیمیایی قابل ردیابی هستند. در صورت احیاء آنها به توسط آنتی اکسیدان‌ها خصوصیات جذب و نشر نوری رادیکال مورد مطالعه تغییر می‌یابد. در این تحقیق از این خاصیت استفاده کردیم تا در مورد قدرت آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها در محیط خارج سلولی و داخل سلولی مطالعاتی انجام دهیم. برای مطالعات قدرت آنتی اکسیدانی، از رادیکال‌های آزاد و نسبتا پایدار همچون Galvinoxyl و یا DPPH استفاده می‌کنند. در این پروژه نیز از رادیکال‌های مذکور برای ارزیابی توان آنتی اکسیدانی عصاره‌های گونه *Scutellaria tournefortii* برای ارزیابی استفاده شد. در مورد توان محافظت سلول در برابر رادیکال‌های آزاد از روش‌های استاندارد dcf و cell viability از طریق MTT Assay انجام گرفت. روش dcf یک روش استاندارد شناخته شده برای ارزیابی ROS داخل سلولی است. غلظت ROS داخل سلولی را ازطریق الیزا ریدر (Elisa Reader) می‌توان با رنگیزه dcf دنبال کرد. اگر آنتی اکسیدانی قدرت جاروب رادیکالی بالایی داشته باشد می‌توان انتظار داشت غلظت ROS داخل سلولی شدیدا کاهش یابد ولی باید در نظر داشت که این کل ماجرا نیست بلکه مولکول مورد نظر باید قدرت نفوذ پذیری از غشاء را داشته باشد. علاوه بر اینکه از طریق متد dcf مقدار ROS داخل سلولی اندازه گیری می‌شود، القاء مرگ سلولی توسط رادیکال‌های آزاد و قدرت حفاظت سلول‌ها در مقابل مرگ القائی به کمک انواع فلاونوئیدها ارزیابی قرار خواهد گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

2-4- روش‌های تشخیص و آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی گیاه *Scutellaria*

واضح است که فلاونوئیدها ترکیبات اصلی و موثر جنس *Scutellaria* می باشند. از یک یا تعداد بیشتری از فلاونوئیدها معمولاً برای تجزیه کمی و کیفی *Suctellaria* استفاده می‌شود. بایکالین (7)، فلاونوئید اصلی با بیشترین مقدار، به منظور کنترل کیفیت مواد دارویی و آماده سازی آنها مورد استفاده قرار می گیرد. به عنوان مثال، فارماکوپه چین پیشنهاد می کند که محتوای بایکالین در ریشه گیاه *Scutellaria* باید بیش از 9٪ باشد. در سال 2002، شش فلاون در 25 نمونه از *Sc. baicalensis*، از مناطق جنوبی روسیه تا شمال چین، بوسیله HPLC آنالیز شد تا اختلاف بین گیاهان بومی و غیر بومی را نشان دهد. در این مطالعه، فلاونوئیدهای گلیکوزیدی و آگلیکون ها بوسیله فاز متحرک $MeoH-H_2O - CH_3COOH$ (0/2: 59 : 41) و $MeOH-H_2O-CH_3COOH$ (0/2: 50: 50) تعیین شدند. طول موج تشخیصی 275 نانومتر بود. نتایج نشان می‌دهد که محتوای بایکالین (7) 6٪ تا 9٪، ووگونین (20) 2 تا 8٪، بایکالئین (8) 0/1 % - 1/6٪، ووگونوزید (21)0/3-0/01 درصد، ویسیدولین I (100) و مقادیر کمیاب اوروکسیلین A (16) می باشد. گیاهان بومی و غیر بومی اختلاف مشخصی در نسبت کامل ترکیبات نشان ندادند. نسبت بایکالین و ووگونوزید زیر 3 و نسبت بایکالین و بایکالئین، بایکالین و ووگونین بین بیست و پنجاه بود. در نهایت این نسبت‌ها برای ارزیابی کیفیت *Sc. baicalensis* پیشنهاد شده است (6).

آنالیز شیمیایی انگشت نگاری(fingerprint) بوسیله WHO (1991)، SFDAC (2000) به عنوان یک روش جهت ارزیابی کمی ترکیبات گیاهان دارویی معرفی و مورد قبول قرار گرفت. این روش به عنوان یک وسیله سریع قابل اطمینان برای تشخیص و شناسایی داروهای گیاهی شناخته می‌شود. سانگ و همکاران (2006) از سیستم گرادیان متحرک به منظور مقایسه *Sc. baicalensis* از 30 منطقه مختلف کاشته شده در چین استفاده کردند. نتایج نشان می‌دهد که این شباهت با زیستگاه گیاه رابطه دارد. تمام نمونه‌های آزمایش شده دارای 8 پیک یکسان بودند که به عنوان ویژگی انگشت نگاری ها شناخته شدند (6).

با این حال، محتوای هر پیک اختلاف زیادی در بین نمونه ها نشان داد. درجات مشابهی از HPLC انگشت نگاری ها به منظور مقایسه داروهای گیاهی از زیستگاه‌های مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

با ترکیب MS, DAD, HPLC به منظور آنالیز گیاهان دارویی، تشخیص و شناسایی ترکیبات فعال زیستی و ترکیبات شناساگر در ماتریکس های پیچیده حتی با ترکیبات طبیعی که ساختار مشابهی دارند، قابل درک خواهد بود. در سال 2005، هوردوات و همکاران، این روش را به منظور آنالیز هشت فلاون (ووگونین، بایکالین، بایکالئین، اسکوتلارئین، آپیژنین-7- گلوکورونید، اسکوتلارین، آپیژنین، کریسین و 6-هیدروکسی فلاون) در داخل ریشه و بافت‌های هوایی *Sc. baicalensis* توسعه دادند. تشخیص ماده مورد تجزیه با استفاده از زمان بازداری، طیف سنجی جرمی و UV-vis برای استانداردهای تجاری تائید شده است. هر دو روش UV-vis و طیف سنجی جرمی برای فلاون های گلیکوزیله شده شکل گرفته است (6).

Archive of SID
www.SID.ir

فصل سوم

روش اجرای تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

3-1- مطالعات کتابخانه ای

همزمان با تصویب طرح، مطالعات کتابخانه‌ای و فاز مطالعاتی طرح جهت بررسی جنس *Scutrllaria* و پراکنش آن در ایران، همچنین کاربردهای دارویی آن در ایران و جهان انجام گرفت. با تعیین انتشار جغرافیایی گونه *Sc. tournefortii* و مطالعات گیاه‌شناسی آن اقدام لازم جهت جمع آوری جمعیت‌های مختلف گونه مورد مطالعه انجام شد.

3-2- جمع آوری نمونه های گیاهی

3-2-1- تعیین حوزه های پراکنش

به منظور تعیین منطقه‌ها و ایستگاه‌های نمونه برداری به بررسی پراکنش گیاه بشقابی شمالی در مناطق مختلف ایران پرداخته شد. بدین منظور از منابع مرجع فلور ایرانیکا که به معرفی و شناسایی گیاهان ایران پرداخته و محدوده پراکنش هر گونه را مشخص کرده استفاده گردید.

3-2-2- تعیین ایستگاه‌های نمونه برداری و جمع آوری گونه های گیاهی

مطابق با پیش بینی انجام شده در پرسشنامه طرح و پس از تعیین مناطق پراکنش گیاه *Sc. tournefortii* دو جمعیت از گونه از استان‌های مازندران و گیلان در فصل تابستان جمع آوری و جهت انجام آزمایشات مربوطه گیاه در سایه خشک شد. همچنین نمونه هرباریومی از گونه *Sc. tournefortii* تهیه و در هرباریوم گروه نگهداری می شود.

جدول3-1- مشخصات جغرافیایی نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده گیاه بشقابی شمالی(*Scutellaria tournefortii*)

نام گونه	شماره هرباریومی	محل جمع‌آوری	سال	ارتفاع منطقه از سطح دریا
Scutellaria tournefortii	10817	مازندران، نوشهر، کجور،دشت لاشک	1389	1850 متر
	10826	مازندران، نوشهر، کجور،دشت لاشک	1390	1850 متر
	2508	گیلان، جاده اسالم به خلخال، روستای خرجگیل	1389	350 متر

Archive of SID
www.SID.ir

شکل 3-1- نمونه هرباریومی گیاه *Scutellaria tournefortii*

3-3- خشک کردن نمونه ها

بعد از جمع آوری نمونه های مورد نظر آنها را در پارچه‌های نخی که بدین منظور تهیه گردیده بودند قرار داده تا به محل خشک کردن نمونه های گیاهی منتقل گردد. پس از انتقال نمونه‌های گیاهی آنها را در مناطقی که دارای سایه بوده و در عین حال تبادل هوا هم به خوبی صورت گیرد در معرض هوا خشک گردید. به طور معمول حدود یک هفته گیاهان در این شرایط خشک شدند.

4-3- آماده سازی نمونه گیاهی

پس از جمع آوری و خشک کردن گیاه در سایه بخشی از نمونه‌های گیاهی به صورت کامل و قسمتی دیگر از نمونه‌ها با جدا کردن بخش هوایی و ریشه جداگانه آسیاب و در ظروف درب دار جمع آوری و در محل تاریکی نگهداری شدند. نمونه‌ها به تدریج جهت استخراج عصاره و آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

5-3- استخراج ترکیبات فلاونوئیدی

استخراج ترکیبات فلاونوئیدی گیاه *Sc. tournefortii* با دو حلال اتانول 80٪ و متانول 80٪ انجام گرفت. بدین منظور 0/5 گرم نمونه خشک از قسمت‌های مختلف گیاه یا گیاه کامل را وزن کرده و ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی آن با 50 میلی لیتر حلال به مدت 20 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی گراد و با فرکانس

Archive of SID
www.SID.ir

٤٠ khz با حمام اولتراسونیک استخراج شد. نمونه‌ها بعد از سانتریفوژ با کاغذ واتمن شماره 1 صاف و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (41).

6-3 - سنجش توتال فلاونوئیدهای عصاره های گیاهی

مقدار توتال فلاونوئید عصاره های با آزمون رنگ‌سنجی با آلومینیوم کلراید و طبق روش Atanassova انجام شد. یک بخش (1ml) از عصاره یا محلول استاندارد را برداشته و دریک بالن ژوژه 10mlکه حاوی 4ml آب مقطر یونیزه است می‌ریزیم. سپس 0/3 ml، $NaNo_2$، ٥% به آن اضافه می شود. پس از گذشت 5 دقیقه 0/3ml، $AlCl_3$، ١٠% به محلول اضافه می شود. در دقیقه ششم NaOH،٢ ml یک مولار اضافه می شود و سپس محلول به حجم رسانده می شود. محلول به خوبی تکان داده شده، و بعد جذب آن در ٤١٥ nm در مقایسه با شاهد با اسپکتروفتومتر UV-vis مدل خوانده شد (42).

محتوای توتال فلاونوئید گیاهان خشک معادل میلی گرم کوئرستین به گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (mgQu/grdw)

1-6-3 - تهیه منحنی استاندارد

جهت تهیه منحنی استاندارد رقت‌های سریال از محلول استاندارد متانولی یا اتانولی کوئرستین با غلظت های 0، 2/5، 5، 10، 20، 40، 80 میکرو گرم بر میلی لیتر تهیه و به روش ذکر شده در بند 6-3 محلول آماده سازی شده و جذب آن در طول موج 415 nm خوانده شد. سپس منحنی استاندارد با نرم افزار Excel رسم شد.

7-3- آنالیز HPLC عصاره های گیاهی

جهت شناسایی کمی مقایسه بایکالین و بایکالئین در عصاره‌های گیاهی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. جهت تعیین روش HPLC، روش های مختلف ذکر شده در منابع مورد بررسی قرار گرفت. سرانجام از روش Gaoj و همکاران 2008 استفاده شد (43).

سیستم کروماتوگرافی :HPLC

پمپ مدل K-1001، شیر تزریق با لوپ 20 µl مدل D-14163، آشکارساز UV مدل K-2800 و ستون C18 Eurospher(٢٥٠mmx ٤/٦ mmx ٥ µm) و نرم افزار Chromgate

سرعت جریان حلال 1ml/min و فاز متحرک شامل دو حلال (فرمیک اسید٪0/1 + آب) :A و (متانول) :B که با توجه به زمان نسبت آنها به ترتیب جدول 3-1 تغییر می کرد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 3-2- نسبت حلال‌های HPLC در طول زمان آنالیز

زمان (دقیقه)	حلال A (%)	حلال B (%)
0	55	45
2	55	45
10	40	60
30	30	70
35	55	45

مقدار تزریق: 20 µL و طول موج مورد بررسی 270nm بود.

زمان بازداری Baicalein: 15.96 min و Baicalin: 27.11 min

برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا محلول‌های استاندارد متانولی و اتانولی بایکالین و بایکالئین با غلظت‌های 7/5، 15، 30، 60، 120 و 240 نانوگرم در میلی لیتر تهیه و کروماتوگرام آنها توسط دستگاه گرفته شد. با استفاده از سطح زیر منحنی به دست آمده برای غلظت‌های فوق الذکر منحنی استاندارد سطح/ غلظت در طول موج 270 نانومتر رسم شد.

در نهایت با استفاده از سطح زیرمنحنی و شیب استاندارد، غلظت بایکالین و بایکالئین موجود در عصاره‌های گیاهی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{غلظت بایکالئین (ng/ml)} = \frac{\text{سطح زیر منحنی} + 381096}{62825}$$

$$\text{غلظت بایکالین (ng/ml)} = \frac{\text{سطح زیر منحنی} + 710335}{34335}$$

3-8- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه *Sc. tournefortii*

3-۸-1 تست DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها به روش تست DPPH تعیین شد (44 و 45). بدین منظور رقت های سریال از عصاره‌های متانولی و اتانولی و همچنین استانداردهای اسید اسکوربیک، بایکالین، بایکالئین و

Archive of SID
www.SID.ir

کوئرستین تهیه شدند. رادیکال DPPH، غلظت 1 mM تهیه شد. 0/3 ml از محلول رادیکال DPPH و ml 1 از غلظت های مختلف عصاره به همراه ۲/۷ ml حلال اتانول یا متانول خالص مخلوط شدند. پس از 15 ثانیه vortex، نمونه ها 30 دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس جذب نمونه ها در 517nm بوسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. درصد بازداری رادیکال DPPH نمونه ها براساس فرمول Duh & yen محاسبه شد.

$$\%Inhibition = [(A_0-A_s)/A_0].100$$

A_0: جذب شاهد (حاوی تمام عوامل به جز نمونه)

A_s: جذب نمونه مورد آزمایش

اسید اسکوربیک به عنوان شاهد مثبت با غلظت‌های (2، 4، 6، 8، 10 و 12) میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شد.

3-8-2- محاسبات

درصد مهارکنندگی برای استاندارد و نمونه ها تعیین و میزان IC50 (غلظتی از استاندارد یا عصاره گیاهی که در آن غلظت 50 درصد مهارکنندگی اتفاق می افتد) با استفاده از نرم افزار Excel و رسم نمودار خطی با ضریب رگرسیون بالای 0/9 محاسبه شد.

3-8-3- آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شدند. جداول آنالیز واریانس (ANOVA برای تجزیه و تحلیل معنی دار بودن تفاوت بین عصاره‌های متانولی و اتانولی بخش‌های مختلف گیاه با استفاده از آزمون T مورد بررسی قرار گرفتند.

3-9- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی داخل سلولی عصاره‌ها با استفاده از تست MTT در شرایط invitro

3-9-1- تعیین سمیت سلولی به روش MTT

3-9-1-1- آزمایش MTT/Metheyl Thiazol Terazolium و کاربردهای آن

اندازه گیری رشد و تکثیر سلول‌ها، کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. یکی از قدیمی ترین روش‌ها رنگ آمیزی سلول با استفاده از تریپان بلو است که حساسیت کافی نداشته و نیاز به بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

میکروسکوپی دارد. روش‌های دیگری نظیر اندازه گیری میزان کل اسیدهای هسته ای و میزان پروتئین دراثر تجزیه سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی باشد.

اندازه‌گیری جذب مواد رادیو اکتیو توسط سلول‌های در حال رشد روش دقیقی است. ترکیباتی نظیر تیمیدین نشاندار شده با تریتیوم و 5- برمودئواکسی اوریدین هنگام پرولیفراسیون سلول وارد ساختمان هسته سلول شده و باعث نشاندار شدن سلول ها می‌گردند. اما از مشکلات این روش‌ها می‌توان به وقت گیر بودن و برداشت نمودن سلول‌ها پس از تحریک سلولی اشاره نمود. بعلاوه مشکلات مربوط به کار با مواد رادیواکتیو مانند دفع مواد باقی مانده و حفاظت از اشعه را نیز باید به آن اضافه نمود.

در سال 1983 آزمایش MTT بعنوان جایگزینی برای روش‌های رادیو اکتیو پیشنهاد شد. در این روش آنزیماتیک از نمک های محلول تترازولیوم (مهمترین آنها MTT می باشد) به عنوان سوبسترای واکنش استفاده می‌گردد. با استفاده از این آزمایش ساده و دقیق می توان پاسخ سلول‌های مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیائی ارزیابی کرد این روش نسبت به سایر روش‌های بررسی پرولیفراسیون سلولی ساده‌تر بوده و باامکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجرا است. بعلاوه کلیه مراحل آزمایش در پلیت های 96 خانه ای کشت سلول انجام شده و نتایج با دستگاه ELISA Reader قرائت می‌گردد، لذا تعداد زیادی نمونه را می‌توان همزمان آزمایش نمود.

آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیاء شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیائی 3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-dipheny1-tetrazolium bromide(MTT) بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. در این روش بر خلاف سایر روش ها مراحل شستشو و برداشت کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند حذف شده اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلول تا قرائت نتایج با فتومتر، در یک میکروپلیت انجام می شود لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالاست.

3-9-1-2- مراحل انجام تست MTT

بطور کلی سلول‌ها در محیط کشت به دو صورت چسبیده به کف پلیت (Adherence Cell) (سلول‌های توموری و فیبروبلاست‌ها) و شناور(Suspended Cells) دیده می شوند که مراحل انجام آزمایش MTT در مورد آنها تفاوت‌های جزئی با یکدیگر می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

الف- سلول های چسبیده به کف پلیت (Adherence Cell)

تعداد 5000 سلول (در رفرانس های مختلف مقادیر مختلفی قید شده است) را در هر یک از چاهک‌ها کشت داده و اجازه داده شود سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و پایدار گردند. سپس مقادیر مناسبی از ماده‌ای که را می‌خواهیم تاثیر آن را بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها بررسی نمائیم (میتوژن ها و یا داروها)، در هر چاهک ریخته و پلیت را برای مدت زمان مشخصی (بر اساس پروتکلی که برای اثر آن ماده وجود دارد) در انکوباتور CO_2 انکوبه می نمائیم. پس از آن محیط کشت روئی را دور ریخته و به هر چاهک 200 میکرولیتر محیط کشت حاوی ۰/5 mg/ml محلول MTT (در برخی از رفرانس‌ها 200 میکرولیتر محیط کشت را بصورت جداگانه اضافه نموده و سپس از محلول غلیظ MTT (5 mg/ml) به ازاء هر 100 میکرولیتر محیط کشت، 10 میکرولیترMTT) اضافه نموده و برای 4-2 ساعت در انکوباتور CO_2 قرار می دهیم، در طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز، یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ براحتی قابل تشخیص می‌باشد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال‌تر هستند رابطه مستقیم دارد.کریستال‌های فورمازان در آب غیر محلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO و یا ایزوپروپانل اسیدی بحالت محلول درآیند. لازم بذکر است که در مورد این سلول ها در ابتدا باید محیط کشت را خارج نمود و سپس به هر چاهک 100 میکرولیتر از یکی از محلول‌های فوق را اضافه نمود. در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده را می توان در طول موج 570 nm قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد، تعداد سلول‌ها را محاسبه نمود. برای هر رده سلولی ارتباط خطی میان تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهائی وجود دارد. لذا جهت بررسی هر نوع سلول بایستی منحنی استاندارد مربوط به همان رده سلولی را رسم نمود.

ب- سلول های شناور(Suspended Cells)

انجام آزمایش بر روی این سلول‌ها یک اختلاف جزئی با سلول های چسبیده دارد. در مورد سلول‌های هیبریدوما تعداد500 سلول در هر چاهک برای انجام آزمایش مناسب است. اما در مورد لنفوسیت‌های انسانی تعداد سلول‌ها باید به مراتب بیشتر باشد (25000 تا 250000 سلول در هر چاهک تا رنگ مناسبی در درون هر چاهک ایجاد گردد. در مورد این سلول‌ها باید پس از اتمام مراحل کار کشت سلولی پلیت را در سانتریفوژ مخصوص قرار داده و در دورrpm 2000-1000 سانتریفوژ نمود تا سلول‌های معلق در کف پلیت رسوب نمایند. در صورت لزوم می‌توان سلول‌ها را با الکل یا فرمالدئید در کف پلیت فیکس نمود. عمل فیکساسیون بایستی در زمان کوتاهی انجام شود تا خصوصیات آنزیمی سلول‌ها حفظ گردد. سپس سلول‌ها را با PBS سرد شستشو داده و بر روی آنها که محیط کشت را خارج نمایید. به هر چاهک 100 میکرولیتر از محلول‌های DMSO و یا ایزوپروپانل اسیدی را اضافه می‌نماییم. در نهایت میزان شدت رنگ حاصل را در طول موج 570 nm و طول موج رفرنس 630 قرائت نمایید.

Archive of SID
www.SID.ir

3-9-2- لاین های سلولی

برای بررسی سمیت سلولی عصاره از یک لاین سلولی Hela استفاده شده است. این لاین سلولی از بانک سلول موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه گردیده است. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 به همراه 10٪ سرم FBS? 100 واحد در میلی لیتر آنتی بیوتیک استرپتومیسین و پنی سیلین و یک میکرو گرم در میلی لیتر ضد قارچ فوندیزون رشد و تکثیر داده شدند.

3-9-3- کشت و جدا سازی سلو ل‌های منولایر از سطح فلاسک (پاساژ سلولی):

سلول Hela درون یک فلاسک در محیط RPMI 20 درصد کامل شده کشت داده شد. سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی و آلودگی توسط میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت عدم آلودگی جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. مراحل اجرای آزمایش به شرح ذیل می‌باشد:

ابتدا محیط کشت داخل فلاسک را کاملا تخلیه نموده سپس سلول‌ها توسط محیط کشت بدون سرم شستشو داده و آنگاه 3 میلی لیتر محلول Trypsin-EDTA 0/05% به فلاسک اضافه و به مدت 2 دقیقه در انکوباتور CO_2 در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس جداره فلاسک با پیپت و محیط کشت پیپتاژ شده تا تمام سلول‌ها از سطح فلاسک جدا و در محیط کشت داخل فلاسک شناور شدند. جهت محاسبه تعداد و درصد سلول‌های زنده سوسپانسیون سلولی به لوله استریل انتقال یافت. به منظور فراهم نمودن ذخایر سلولی برای انجام تحقیقات در آینده مقادیر مازاد بر مصرف سلول‌ها فریز شدند و مابقی جهت انجام تست‌ها طبق محاسبات به داخل پلیت‌های کشت 96 حفره‌ای انتقال یافت و سپس انکوبه شد. حداقل پس از 24 ساعت چسبندگی سلول‌ها به کف پلیت‌ها و تکثیر آنها مشهود بود. سلول‌ها از وضعیت پایداری برخوردار بودند.

رده‌های سلولی با غلظت (1×10^4 cell/well) در محیط کشت به داخل پلیت‌های کشت 96 حفره ای انتقال یافت.

3-9-4- بررسی اثر عصاره تام فلاونوئیدی بر روی سلول های Hela

سلول Hela (1×10^4cell/well) در حجم محیط کشت 100 µl در داخل پلیت های کشت 96 حفره ای کشت داده شد. پس از 24 ساعت عصاره‌های رقیق شده در محیط کشت و به میزان 100 میکرولیتر در هر چاهک پلیت 96 حفره‌ای با سه تکرار ریخته و در انکوباتور CO_2 و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از 24 ساعت انکوباسیون سوپرناتانت چاهک‌ها را به آرامی خارج نموده و به هر چاهک 200 میکرولیتر از محلول MTT با غلظت 5 میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد و درون انکوباتور CO_2 انکوبه شدند. درون چاهک‌ها به آرامی تخلیه و به هر

Archive of SID
www.SID.ir

چاهک DMSO اضافه و چندین بار مخلوط شدند. توان حیاتی سلول ها به وسیله سنجش فورمازان تولید شده از احیای MTT در طول موج 570 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

3-9-5- بررسی اثر حفاظتی عصاره تام فلاونوئیدی بر سمیت القاء شد توسط H_2O_2

توان حیاتی سلول‌ها از طریق تست MTT تخمین زده شد. سلول‌های Hela در پلیت‌های 96 چاهکی با غلظت $1x10^4$ cell/ml کشت شدند. پس از 24 ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های گیاهی تیمار شدند و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و یک اتمسفر انکوبه شد. پس از 24 ساعت، 100 میکرولیتر H_2O_2 200 میلی مولار اضافه شد. سپس سلول‌ها برای 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن محیط کشت را بصورت کامل خارج نموده و 200µL از محلول استوک MTT با غلظت 5 mg/ml به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از 4 ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها برای 5 دقیقه با دور 800 xg سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد.

کریستال‌های فورمازون در هر چاهک با 100µL محلول DMSO حل شد و جذب آنها در 570 نانومتر یه روش الیزاریدر خوانده شد. ارتباط توان حیاتی سلول‌ها بر اساس مطابقت مقدار MTT تبدیل شده به نمک غیرفعال فورمازون ارزیابی شد.

چگالی نوری فورمازون تولید شده در سلول‌های شاهد به عنوان وجود 100٪ توان حیاتی سلولی در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های توانمند نسبت به شاهد بیان شدند (46).

3-9-6- بررسی های آماری

تجزیه و تحلیل داده ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel و Spss صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های مورد مطالعه از تست آماری ANOVA استفاده شد تمامی آزمایش‌ها بصورت سه بار تکرار انجام شده است و نتایج به صورت درصد کنترل بیان گردیده است

Archive of SID
www.SID.ir

فصل چهارم

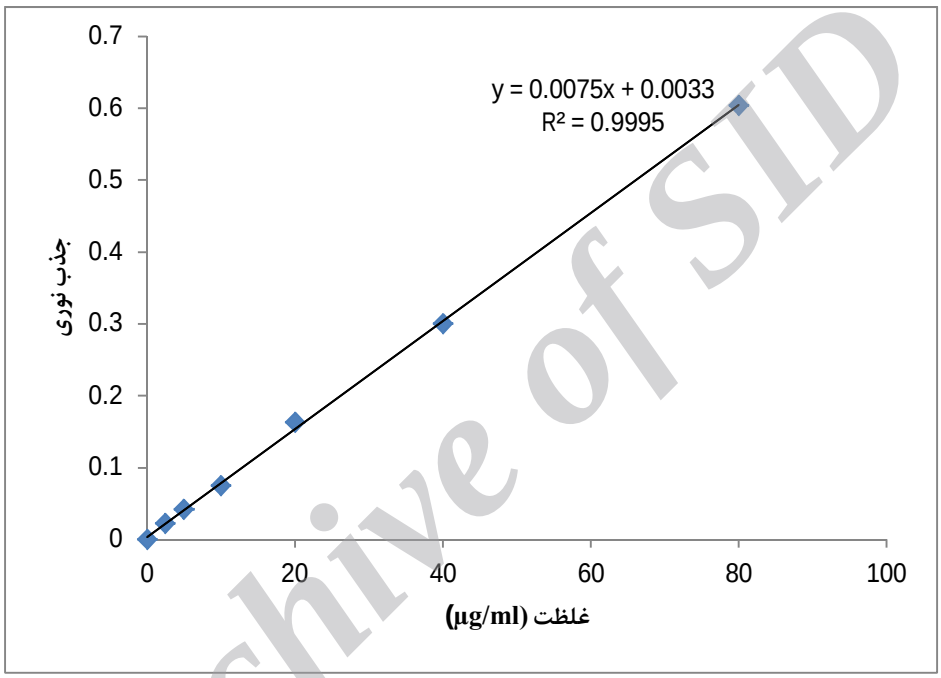
یافته‌های تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

4-1- نتایج حاصل از سنجش فلاونوئید تام در گیاه *Scutellaria teurnefortii*

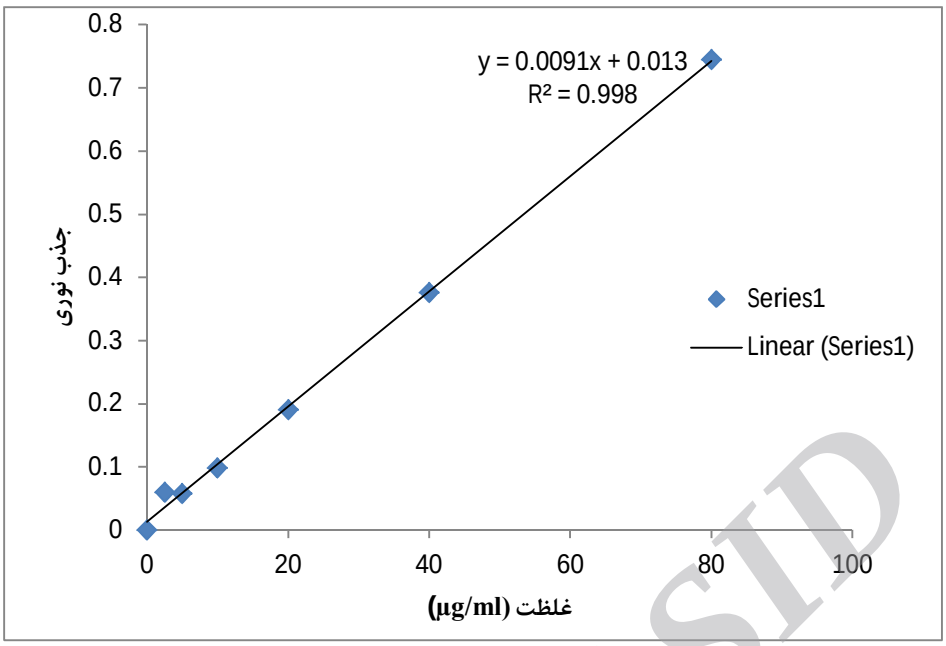
همانطور که در روش اجرای تحقیق اشاره شد جهت سنجش فلاونوئید تام عصاره‌های گیاهی بدست آمده از گیاه *Sc.tournefortii* از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این روش با استفاده از استاندارد کوئرستین منحنی استاندارد رسم شد (نمودار 4-1). سپس میزان فلاونوئید تام عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب مقدار کوئرستین درگرم وزن خشک گیاه محاسبه شد.



نمودار 4-1- منحنی استاندارد کوئرستین اتانولی

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار 4-2- منحنی استاندارد کوئرستین متانولی

آنالیز واریانس دو طرفه داده های حاصل از اندازه گیری محتوای فلاونوئیدی عصاره ها نشان داد که نوع حلال و بخش مورد استفاده در عصاره گیری و اثر متقابل آنها بر میزان فلاونوئید تام در بخش هوایی و ریشه *Sc.tournefortii* در هر دو جمعیت مورد بررسی در سطح 5% >p اثر معنی داری داشت. (جدول 4-1)

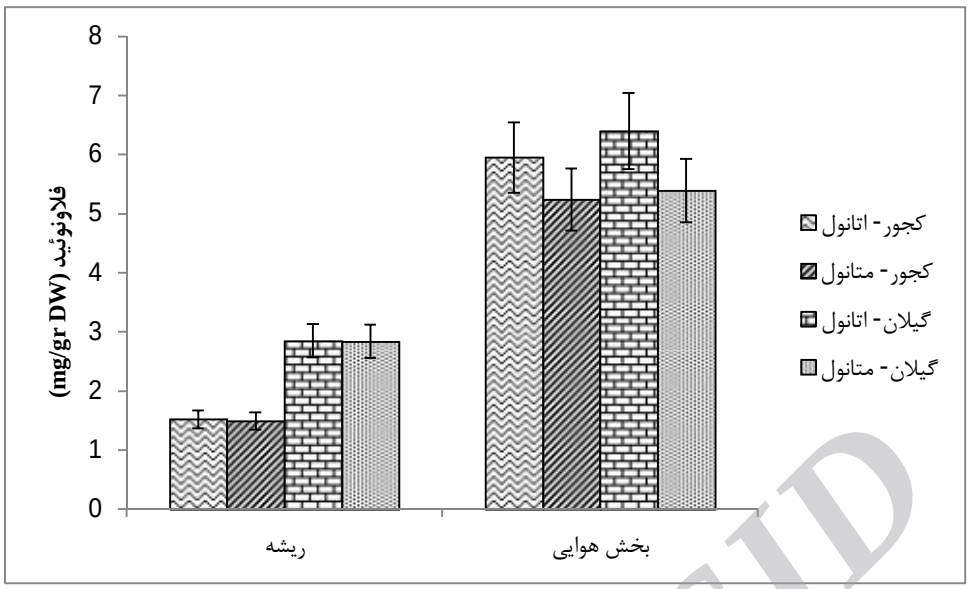
جدول 4-1- تجربه واریانس دو طرفه تاثیر متقابل سه عامل نوع حلال، جمعیت و اندام مورد بررسی بر میزان محتوای فلاونوئیدی عصاره

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	7	84/91	12/131	70/851 *
حلال (A)	1	1/097	1/097	6/405 *
جمعیت(B)	1	3/961	3/961	23/135*
اندام (C)	1	77/078	77/078	450/186 *
جمعیت× (B) اندام (C)	1	1/691	1/691	9/875 *
حلال × (A) اندام (C)	1	0/996	0/996	5/819 *
حلال × (A) جمعیت(B)	1	0/041	0/041	0/239
حلال × (A) جمعیت× (B) اندام (C)	1	0/051	0/051	0/300
خطای آزمایشی	16	2/739	0/171	
کل	24	465/042		

F= 2.66

علامت "*" نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در سطح P <0/05 می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار 4-3- مقایسه درصد مقادیر مختلف فلاوونوئید تام در بخش‌های مختلف گیاه *Sc. tournefortii* با تاکید بر نوع حلال و جمعیت

جدول 4-2- محتوای فلاونوئید تام بخش‌های مختلف گیاه *Sc. tournefortii* با تاکید بر نوع حلال و جمعیت

اندام مورد استفاده	جمعیت	حلال	محتوای فلاونوئید تام (mg/gr.DW)
بخش هوائی	کجور	اتانول ٪80	5/95
بخش هوائی	گیلان	اتانول ٪80	6/4
بخش هوائی	کجور	متانول ٪80	5/24
بخش هوائی	گیلان	متانول ٪80	5/39
ریشه	کجور	اتانول ٪80	1/52
ریشه	گیلان	اتانول ٪80	2/85
ریشه	کجور	متانول ٪80	1/49
ریشه	گیلان	متانول ٪80	2/84

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین آنالیز واریانس دو طرفه داده‌های حاصل از اندازه گیری محتوای فلاونوئیدی عصاره ها نشان داد که محتوای ترکیبات فلاونوئیدی عصاره نسبت به نوع حلال و جمعیت مورد بررسی در سطح 5% >p تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد. (جدول 4-1).

نتایج حاصل از سنجش فلاونوئید تام عصاره‌های تهیه شده از دو جمعیت کجور و گیلان نشان داد که اتانول ٪80 کارایی بالاتری در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی در هر دو جمعیت داشت (نمودار 4-3).

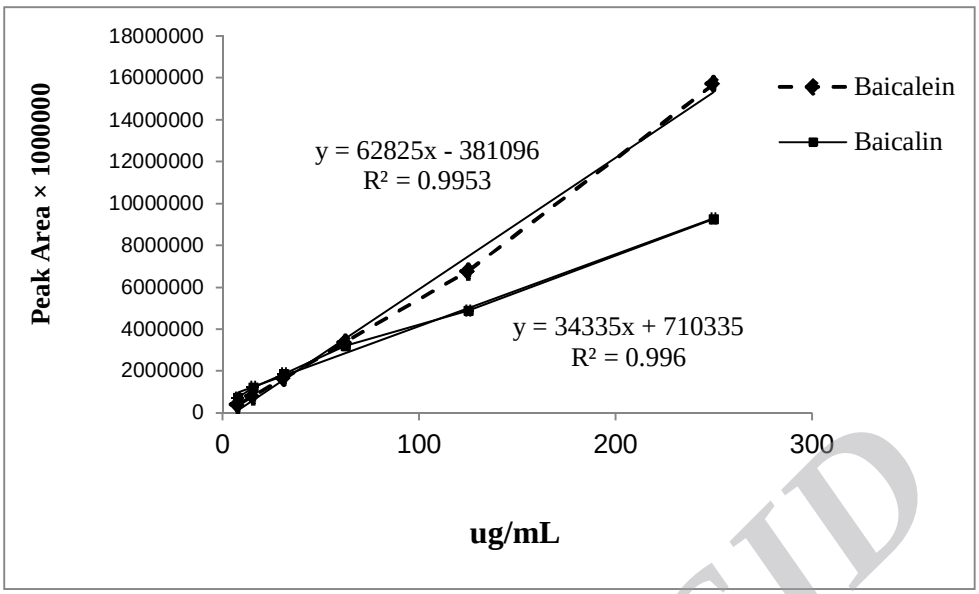
نتایج حاصل از اندازه گیری محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ها نشان داد محتوای فلاونوئیدی آنها در اندام مختلف (هوایی، ریشه) دو جمعیت کجور و گیلان گیاه *Sc.tornefortii* تفاوت معنی داری را در سطح 5% >p دارند (جدول 4-1).
همچنین نتایج نشان داد که اثر توام سه عامل حلال، جمعیت و اندام در محتوای ترکیبات فلاونوئیدی عصاره همانطور که در جدول 4-1 و نمودار 4-3 مشاهده می شود تفاوت معنی دار نداشت. (5% >p).

4-2- نتایج حاصل از تعیین کمی فلاونوئیدهای بایکالین و بایکالئین در عصاره‌های گیاه *Sc.tornefortii*

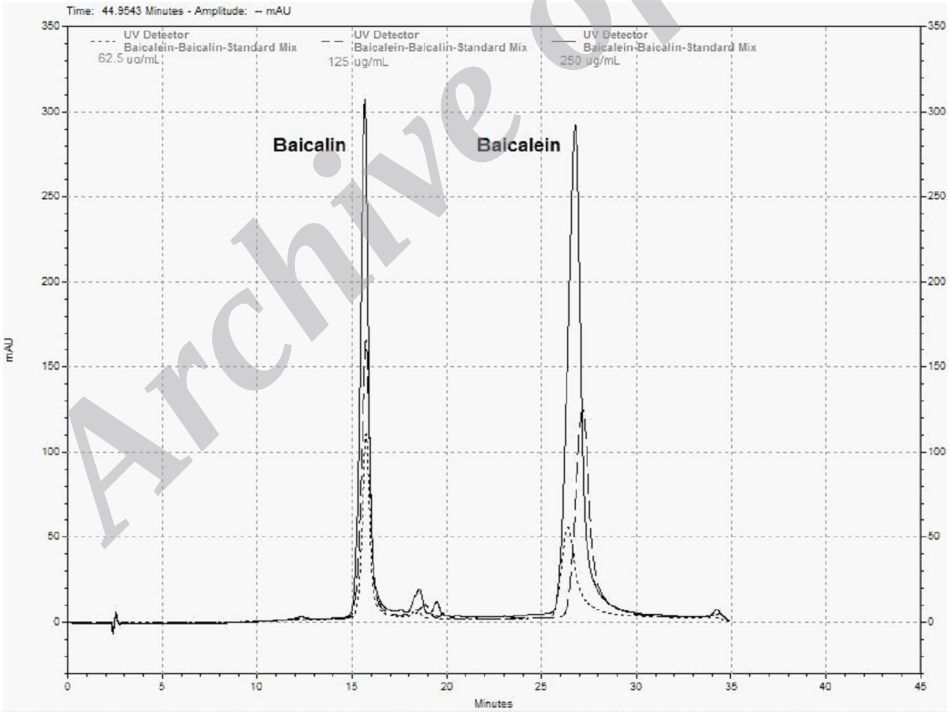
همانطور که در فصل سوم اشاره شد، از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) برای اندازه گیری تغییر مقدار بایکالین و بایکالئین استفاده شد.
بدین منظور ابتدا منحنی استاندارد تهیه شد (نمودار 4-4). این نمودار خطی بوده و از فرمول خطی بدست آمده با ضریب رگرسیون بالای 0/99 برای محاسبه غلظت بایکالین و بایکالئین عصاره‌های فلاونوئیدی با استفاده از سطح زیر منحنی حاصل استفاده شد. لازم به ذکر است زمان بازداری[31] بدست امده برای بایکالین حدود 27/11 دقیقه و برای بایکالئین حدود 15/96 دقیقه می باشد (نمودار 4-5).

[31]- Retention Time (RT)

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار 4-4- منحنی کالیبراسیون دو استاندارد بایکالین و بایکالئین



نمودار 4-5- کروماتوگرام حاصل از HPLC استاندارد بایکالین و بایکالئین

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز واریانس دو طرفه نتایج حاصل از اندازه گیری میزان بایکالین و بایکالئین در عصاره حاصل از بخش‌های هوائی و ریشه گیاه در دو جمعیت کجور و گیلان در سطح $p< 1\%$ تفاوت معنی داری را نشان داد (جدول 4-3 و جدول 4-4).

جدول 4-3- آنالیز واریانس دو طرفه اثر متقابل سه عامل اندام، جمعیت و حلال بر میزان بایکالین در گیاه *Sc. tornefortii*

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	7	7282/671	1040/382	3992/637 *
حلال (A)	1	20/332	20/332	78/027 *
جمعیت(B)	1	910/818	910/818	3495/414*
اندام (C)	1	5358/978	5358/978	20565/927 *
جمعیت× (B) اندام (C)	1	643/046	643/046	2467/794 *
حلال × (A) اندام (C)	1	31/809	31/809	122/072 *
حلال × (A) جمعیت(B)	1	63/733	63/733	244/586 *
حلال × (A) جمعیت× (B) اندام (C)	1	253/955	253/955	974/595 *
خطای آزمایشی	16	4/169	0/261	
کل	24	16527/468		

F=4/03

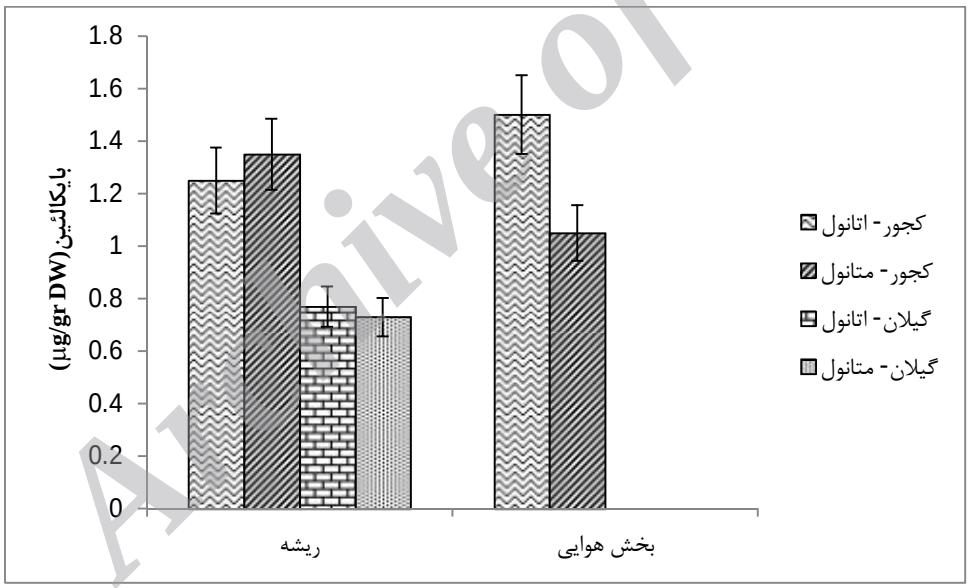
نمودار 4-6- مقایسه تغییرات مقدار بایکالین در بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *Sc. tournefortii* در دو جمعیت مورد بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 4-4- آنالیز واریانس دو طرفه اثر متقابل سه عامل اندام، جمعیت و حلال بر میزان بایکالئین در گیاه *Sc.tornefortii*

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	7	6/997	1/000	388/193 *
حلال (A)	1	0/058	0/058	22 /531 *
جمعیت(B)	1	4/987	4/987	1/937
اندام (C)	1	0/913	0/913	354/408 *
جمعیت× (B) اندام (C)	1	0/778	0/778	301/981 *
حلال × (A) اندام (C)	1	0/096	0/096	37/385 *
حلال × (A) جمعیت(B)	1	0/037	0/037	14/298 *
حلال × (A) جمعیت× (B) اندام (C)	1	0/129	0/129	50/123 *
خطای آزمایشی	16	0/041	0/003	
کل	24	23/605		

F=4/03



نمودار 4-7- مقایسه تغییرات مقدار بایکالئین در بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *Sc. tournefortii* در دو جمعیت مورد بررسی

همانطور که در جدول 4-5 و نمودار 4-6 مشاهده می‌شود میزان بایکالین در بخش هوائی دو جمعیت مورد مطالعه و با توجه به نوع حلال به طور قابل توجهی از مقدار آن در ریشه عصاره‌های بدست آمده بالاتر می‌باشد. همچنین مقدار بایکالئین (جداول 4-5 و نمودار 4-7) در بخش‌های مختلف عصاره‌های

Archive of SID
www.SID.ir

بدست آمده از دو جمعیت مورد مطالعه و با حلال‌های متفاوت نسبت به بایکالین بسیار پایین می‌باشد. نتایج نشان می دهد ترکیب فلاونوئیدی غالب در گیاه *Sc.tornefortii* بایکالین می‌باشد.

جدول 4-5- مقدار بایکالین و بایکالئین در بخش های مختلف گیاه *Sc.tornefortii* با توجه به جمعیت و حلال استخراجی

اندام مورد استفاده	جمعیت	حلال	بایکالین (µg/g.DW)	بایکالئین (µg/g.DW)
بخش هوائی	کجور	اتانول ٪80	22/8	1/5
بخش هوائی	گیلان	اتانول ٪80	34/2	0
بخش هوائی	کجور	متانول ٪80	30/8	1/05
بخش هوائی	گیلان	متانول ٪80	50/5	0
ریشه	کجور	اتانول ٪80	Trace	1/25
ریشه	گیلان	اتانول ٪80	17/9	0/77
ریشه	کجور	متانول %80	0/3	1/35
ریشه	گیلان	متانول ٪80	0/5	0/73

میزان بایکالین در بخش‌های هوائی عصاره‌های اتانولی و متانولی در سطح $p< 1\%$ دارای اختلاف معنی داری می باشد. همچنین در خصوص میزان بایکالئین تفاوت معنی‌داری در نمونه‌های مختلف وجود دارد (نمودار 4-7).

مقدار بایکالین در بخش هوایی عصاره متانولی جمعیت کجور نسبت به جمعیت گیلان تفاوت قابل توجهی دارد و آنالیز واریانس دو طرفه نیز تفاوت معنی داری را در این خصوص نشان می‌دهد (جدول 4-3).

4-3 نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Sc.tornefortii*

با افزایش غلظت ترکیبات فلاونوئید یک عصاره میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره افزایش پیدا می‌کند. برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های بدست آمده از گیاه از دو روش خارج سلولی که با تست DPPH انجام شده و روش داخلی سلولی که به روش MTT Assay و مجاورت سلول‌ها با رادیکال‌های آزاد پر اکسید هیدروژن و عصاره‌های مورد مطالعه انجام شده نتایج بررسی و ثبت شده است.

در روش پاکسازی رادیکال‌های آزاد خارج سلولی (DPPH) و داخل سلولی (H_2O_2) میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها معمولا با IC_{50} بیان می‌شود. IC_{50} مقدار ماده موثره برای کاهش 50٪ غلظت رادیکال‌های آزاد اولیه تعریف می‌شود. بدیهی است هر چه عدد IC_{50} کوچکتر باشد، قدرت آنتی اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌شود. در این آزمون به عنوان کنترل مثبت از آنتی اکسیدان اسیداسکوربیک

Archive of SID
www.SID.ir

و استانداردهای بایکالین و بایکالئین و کوئرستین جهت مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی آنها با عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش استفاده شد.

4-3-1- مقایسه نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی خارج سلولی عصاره گیاه به روش DPPH

جدول 4-6- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه *Sc.tornefortii* به روش DPPH با استانداردهای بایکالین، بایکالئین، کوئرستین و اسید اسکوربیک

اندام مورد استفاده	جمعیت	حلال	فلانوئید تام mg/grdw	بایکالین µg/gdw	بایکالئین µg/gdw	IC50 µg/ml
بخش هوائی	کجور	اتانول ٪80	5/95	22/8	1/5	134/78
بخش هوائی	گیلان	اتانول ٪80	6/4	34/2	0	263/02
بخش هوائی	کجور	متانول ٪80	5/24	30/8	1/05	102/22
بخش هوائی	گیلان	متانول ٪80	5/39	50/5	0	181/67
ریشه	کجور	اتانول ٪80	1/52	-	1/25	387/00
ریشه	گیلان	اتانول ٪80	2/85	17/9	0/77	73/08
ریشه	کجور	متانول ٪80	1/49	0/3	1/35	134/32
ریشه	گیلان	متانول ٪80	2/84	0/5	0/73	241/70
بایکالین	-	-	-	-	-	34/05
بایکالئین	-	-	-	-	-	19/06
کوئرستین	-	-	-	-	-	5/73
اسید اسکوربیک	-	-	-	-	-	11/13

جدول 4-7- نتایج تحلیل واریانس داده های مربوط به دوزهای استفاده شده در تست آنتی اکسیدان به روش DPPH

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	3	33130/103	11043/368	836/427 *
جمعیت(B)	1	26179/087	26179/087	1/983
اندام (C)	1	6365/953	6365/953	482/159 *
جمعیت× (B) اندام (C)	1	585/064	585/064	44/313 *
خطای آزمایشی	8	105/624	13/203	
کل	12	359846/633		

F=7/59

Archive of SID
www.SID.ir

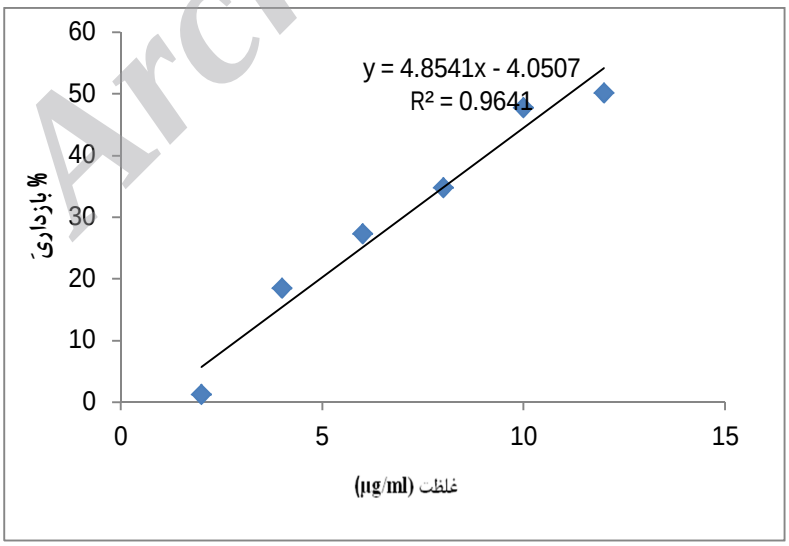
میزان مهار غلظت های مختلف عصاره‌ها در جدول 4-6 و IC_{50} برای عصاره های اتانول و متانولی بخش‌های مختلف گیاه *sc. tournefortii* در دو جمعیت کجور و گیلان آورده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود به ترتیب عصاره ریشه جمعیت گیلان با IC_{50} =73/08 µg/ml و سپس بخش هوایی جمعیت کجور با IC_{50} =1023/22 µg/ml بیشترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را دارا هستند.

آنالیز واریانس (جدول 4-7) نتایج حاصل از تست DPPH نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نسبت به جمعیت و بخش مورد استفاده گیاه حساس بوده و در سطح احتمال 1% اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های بخش‌های مختلف دو جمعیت مورد مطالعه مشاهده می‌شود.

در مقایسه با استانداردهای استفاده شده، کوئرستین بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان داد. کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره‌های آزمایش شده مربوط به عصاره ریشه جمعیت کجور با IC_{50} =387/00 µg/ml مشاهده شد.

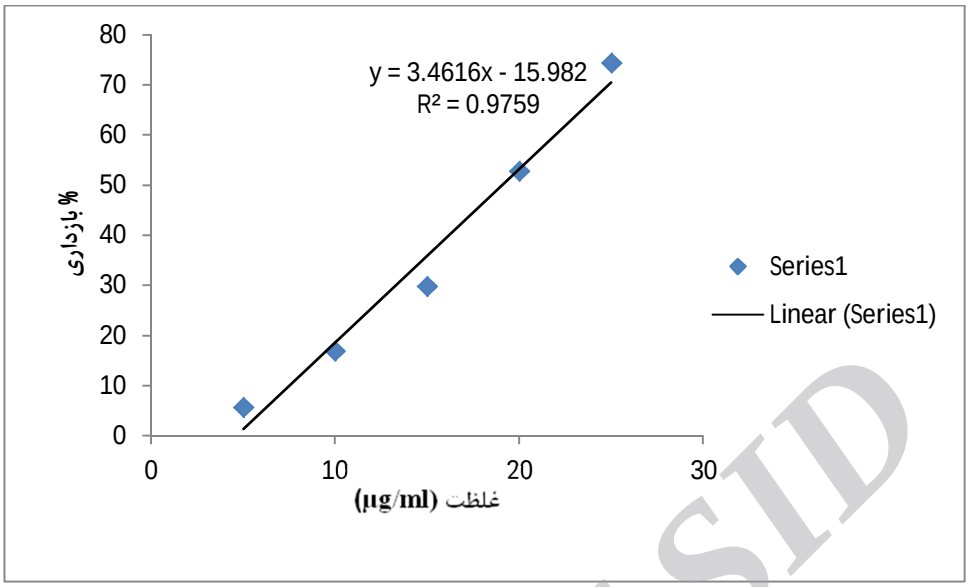
نمودارهای 4-8 الی 4-11 ظرفیت تام آنتی اکسیدانی استانداردهای اسید اسکوربیک، کوئرستین، بایکالین و بایکالئین را نشان می‌دهد.

همانطور که در جدول 4-7 مشاهده می شود مقدار F بسیار بالا بوده و در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. این بدین معنی است که می‌توان با اطمینان 99 درصد گفت که حداقل یکی از تیمارها با بقیه دارای تفاوت معنی دار می‌باشد.

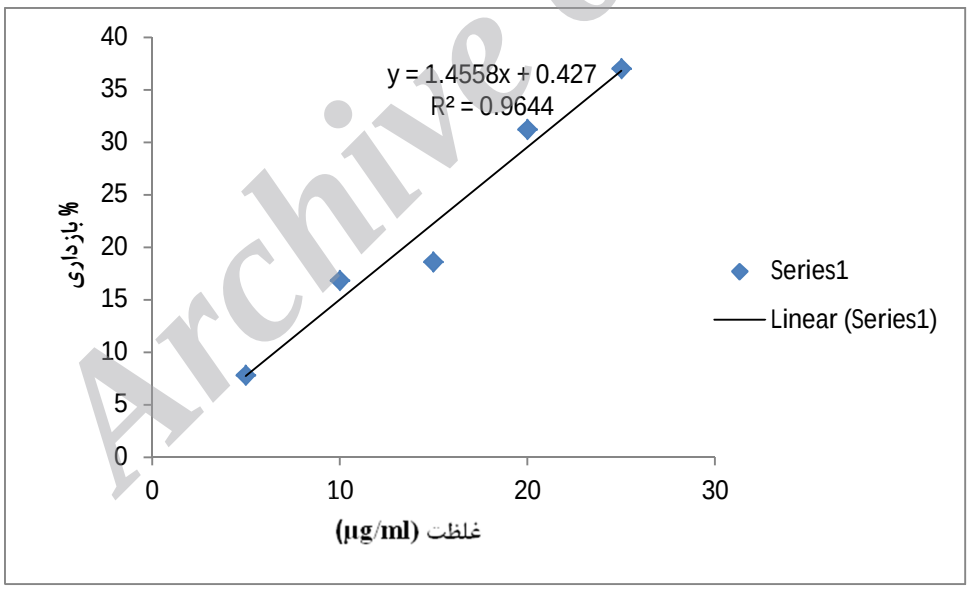


نمودار 4-8- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی اسید اسکوربیک

Archive of SID
www.SID.ir

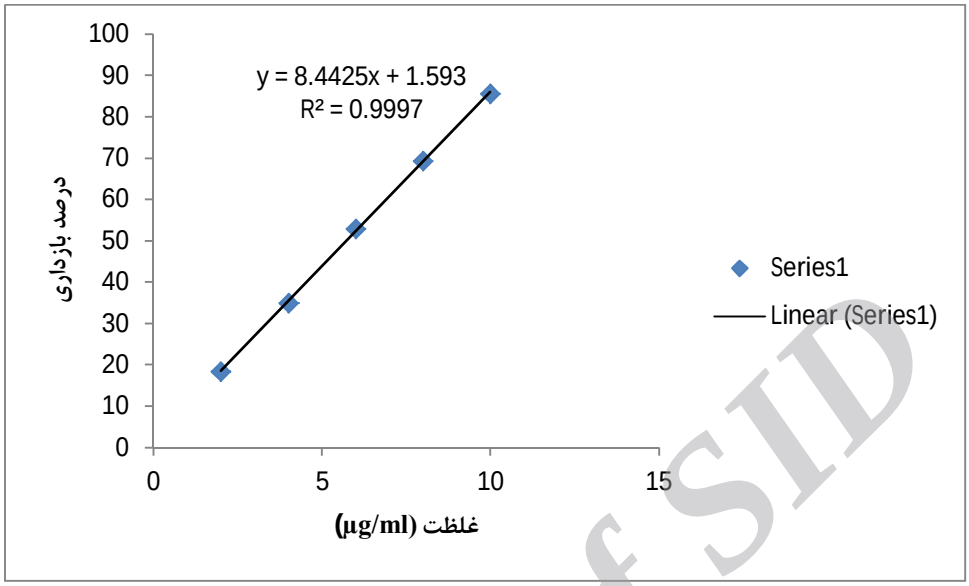


نمودار 4-9- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بایکالئین



نمودار 4-10- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بایکالین

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار 4-11- منحنی استاندارد ظرفیت تام آنتی اکسیدانی کوئرستین

4-3-2- نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی کسیدانی داخل سلولی عصاره گیاه به روش MTT

4-3-2-1- نتایج بررسی اثر عصاره تام فلاونوئیدی بر سلول های Hela

برای بررسی سمیت سلولی عصاره‌ها از روش MTT استفاده شد. در این روش آنزیماتیک از نمک‌های محلول تترازولیوم (مهمترین آنها MTT می‌باشد) به عنوان سوبسترای واکنش استفاده می‌شود. با استفاده از این آزمایش ساده و دقیق می‌توان پاسخ سلولهای مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیایی ارزیابی کرد. این روش نسبت به سایر روش‌های بررسی پرولیفراسیون سلولی ساده تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجرا است.

نتایج سمیت سلولی نشان می دهد که 50٪ کشندگی عصاره‌های گیاه *sc.tournefortii* بر روی سلول‌های HELA در حدود µg/ml 28/45 در عصاره اتانولی بخش هوایی جمعیت گیلان تا µg/ml 125/45 در عصاره ریشه اتانولی جمعیت کجور متغیر می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول4-8- مقایسه توان حیاتی سلولها cell viability در مجاورت عصاره های گیاه *sc.tournefortii*

اندام مورد استفاده	جمعیت	حلال	IC_{50} cell viability(µg/ml)
بخش هوایی	کجور	اتانول 80%	34/37
بخش هوایی	گیلان	اتانول 80%	28/45
بخش هوایی	کجور	متانول 80%	38/13
بخش هوایی	گیلان	متانول 80%	40/55
ریشه	کجور	اتانول 80%	125/45
ریشه	گیلان	اتانول 80%	31/79
ریشه	کجور	متانول 80%	57/15
ریشه	گیلان	متانول 80%	44/78
بایکالین			43/10
بایکالئین			55/42

جدول 4-9- تحلیل واریانس سه طرفه توان حیاتی سلول‌ها(cell viability) در مجاورت عصاره های گیاه *Sc.tournefortii*

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	7	21079/082	3011/297	*230/902
حلال (A)	1	624/750	624/750	* 47 /905
جمعیت(B)	1	4657/356	4657/356	357/119
اندام (C)	1	5306/508	5306/508	* 406/895
جمعیت× (B) اندام (C)	1	3853/961	3853/961	* 295/516
حلال × (A) اندام (C)	1	1696/297	1696/297	* 130/069
حلال × (A) جمعیت(B)	1	2812/985	2812/985	* 215/695
حلال × (A) جمعیت× (B) اندام (C)	1	2127/225	2127/225	* 163/112
خطای آزمایشی	16	208/664	13/041	
کل	24	80875/456		

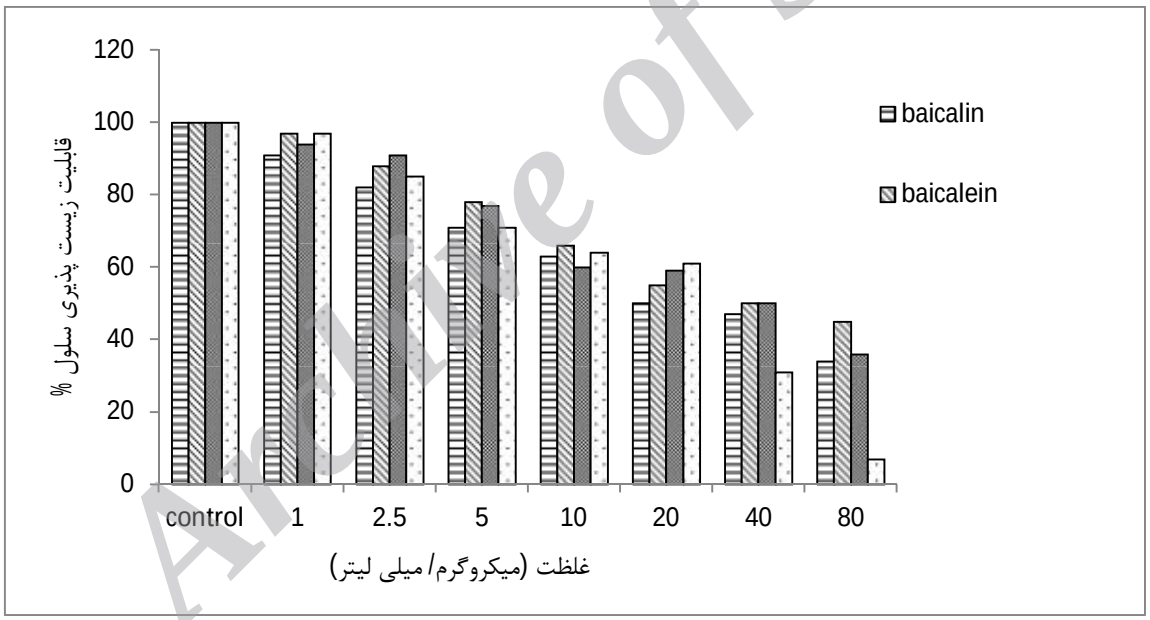
F=3/49

Archive of SID
www.SID.ir

نمودارهای 4-12 الی 4-15 توان حیاتی سلول‌های HELA را در مقابل عصاره‌های اتانولی و متانولی بخش‌های هوایی و ریشه دو جمعیت مورد بررسی در این تحقیق را در مقایسه با استانداردهای بایکالین و بایکالئین نشان می‌دهد.

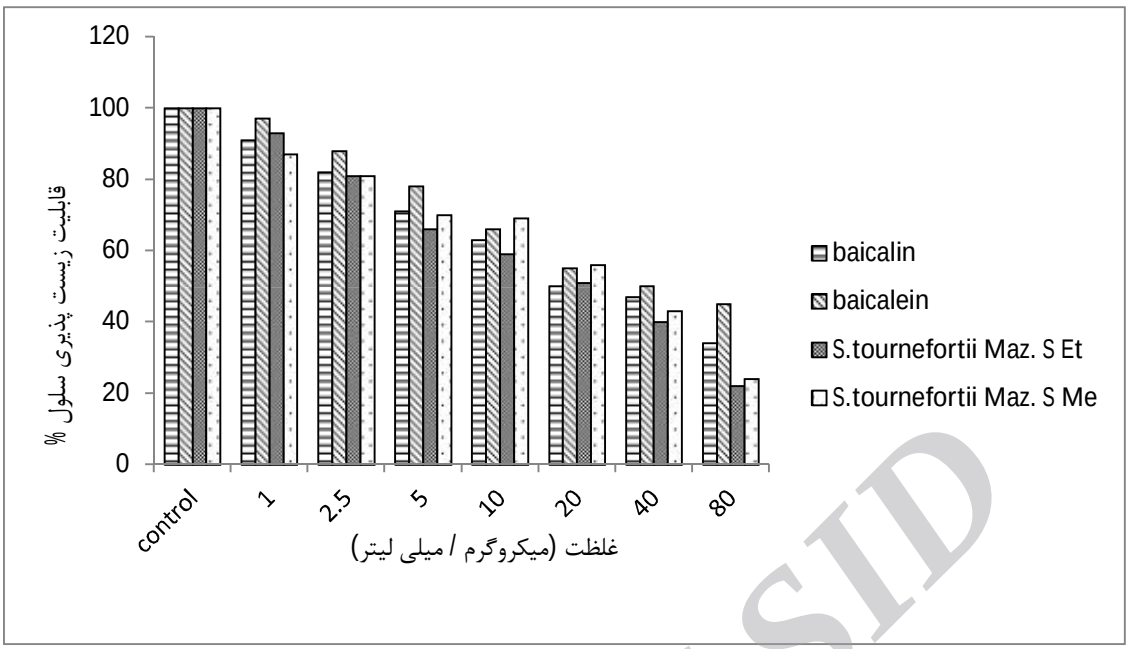
در نمودار 4-13 عصاره اتانولی بخش هوایی جمعیت مازندران در غلظت‌های مختلف که دارای توان حیاتی بالاتری نسبت به استاندردها و عصاره متانولی همان جمعیت در نمودارهای 4-14 نیز عصاره اتانولی بخش هوایی جمعیت مازندران (کجور) نسبت به عصاره اتانولی بخش هوایی جمعیت گیلان و همچنین استانداردها دارای توان حیاتی بالاتری برای سلول‌ها می‌باشد.

در نمودار 4-15 عصاره متانولی بخش هوایی جمعیت مازندران در غلظت‌های 2/5، 5، 10 و 20 میکروگرم بر میلی لیتر دارای درصد بالاتری از توان حیاتی می‌باشند.

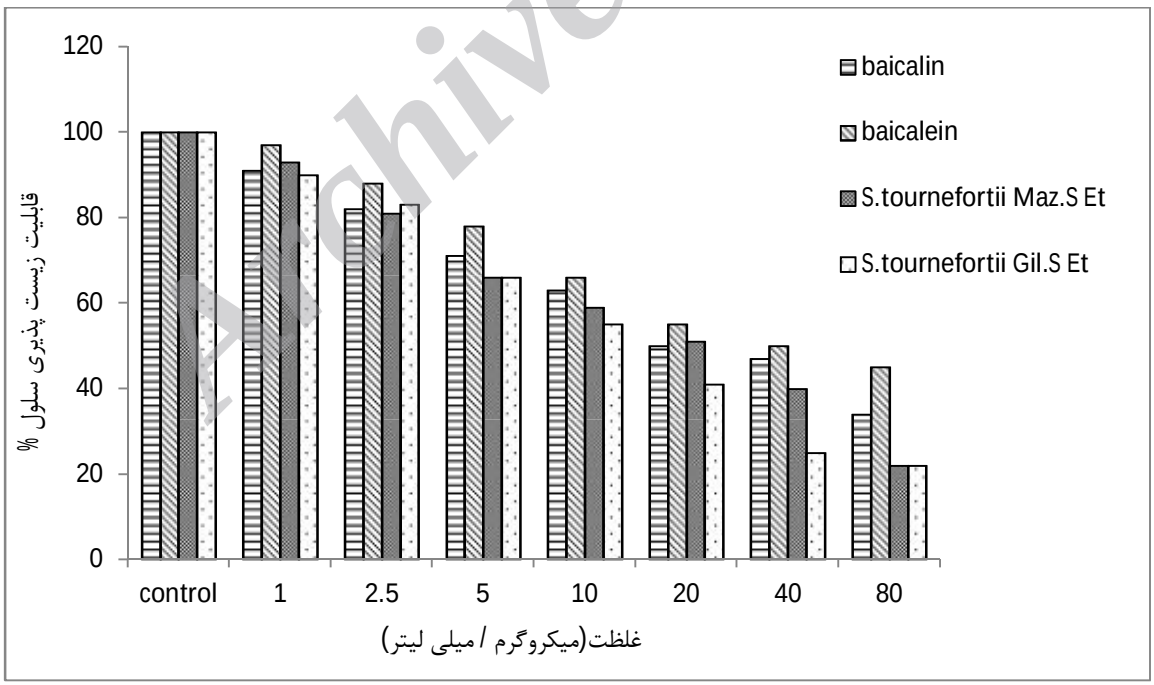


نمودار 4-12- مقایسه توان حیاتی سلول در مقابل عصاره ریشه دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین

Archive of SID
www.SID.ir

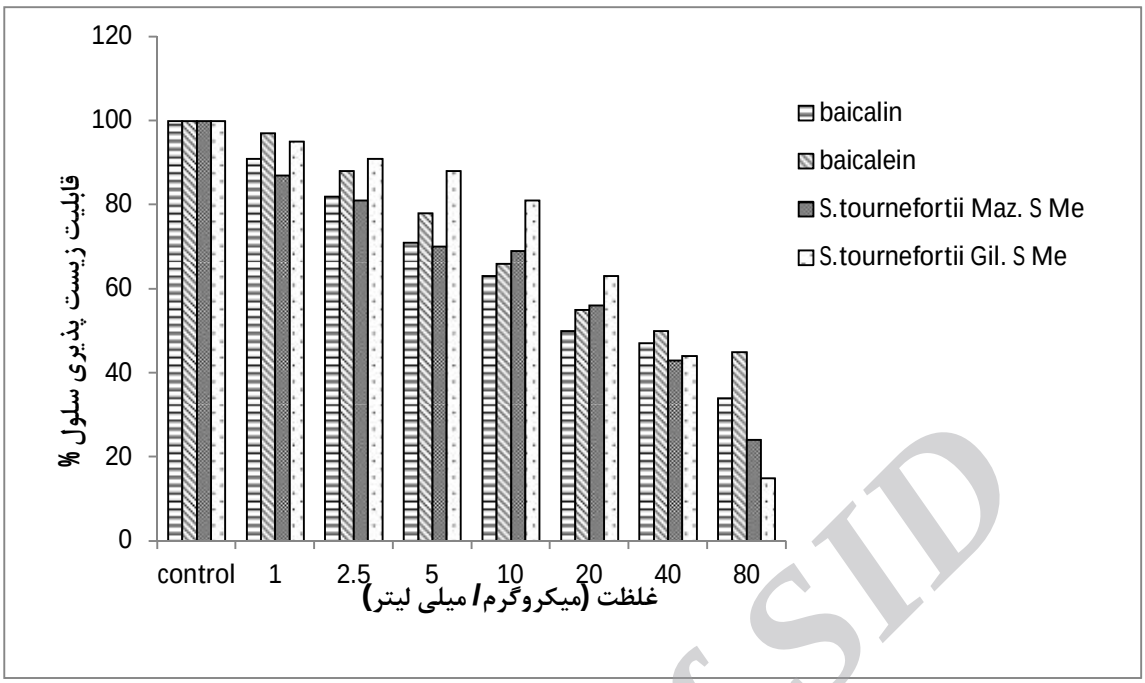


نمودار 4-13- مقایسه توان حیاتی سلول در مقابل عصاره اتانولی و متانولی بخش هوایی جمعیت کجور گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین



نمودار 4-14- مقایسه توان حیاتی سلول در مقابل عصاره اتانولی بخش هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار 4-15- مقایسه توان حیاتی سلول در مقابل عصاره متانولی بخش هوایی دو جمعیت گیاه بشقابی در مقایسه با استاندارد بایکالین و بایکالئین

4-3-2-2- نتایج بررسی اثر حفاظتی عصاره تام فلاونوئیدی بر سمیت القاء شده توسط H_2O_2

پس از سنجش توان حیاتی سلولها با روش MTT، مشاهده شد که H_2O_2 با غلظت200 µg/ml به طور معنی داری پس از 24 ساعت باعث القای مرگ سلولی شده و میزان جذب نوری که توسط سلول‌های زنده صورت می گیرد را کاهش داده است.

با توجه به تائید جاروب رادیکال‌های آزاد DPPH که عصاره نشان داده است. اثر حفاظت سلولی چند نمونه از عصاره‌های گیاه *S.tournefortii* که اثرات سیتوتوکسیک کمتری نسبت به بقیه داشته اند بر تخریب سلول‌های آغشته به H_2O_2 با استفاده از روش رنگ سنجی MTT اندازه گیری شدند. همانطور که در شکل نشان داده شده توان حیاتی سلولهای تیمار نشده با H_2O_2 به میزان 100٪ است در حالی‌که در سلول‌های تیمار شده با H_2O_2 توان حیاتی سلول‌ها (IC_{50}) تا 45/21٪ کاهش پیدا کرده است. عصاره متانولی بخش هوایی جمعیت کجور بهترین اثر حفاظتی را (IC_{50}=31/91) را نشان داد.

آنالیز واریانس دوطرفه (جدول 4-10) بررسی توان حیاتی سلول‌ها در مجاورت رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن نشان می‌دهد که با احتمال 5% >p بین عصاره جمعیت مورد بررسی و نوع حلالی که برای استخراج عصاره بکار رفته، تفاوت معنی دار وجود دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 4-10- تحلیل واریانس دو طرفه توان حیاتی سلول‌ها (cell viability)
در مجاورت رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	F
تیمار	3	205/300	68/433	* 19/289
حلال(B)	1	23/857	23/857	*6/727
جمعیت(C)	1	71/151	71/151	* 20/055
جمعیتB) × (حلال (C)	1	110/292	110/292	* 31/087
خطای آزمایشی	8	28/383	3/548	
کل	12	15895/315		

F=4/07

Archive of SID

www.SID.ir

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از گیاهان دارویی مستلزم، شناخت دقیق و علمی ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست، زیاد وجود ترکیبات شیمیایی موجب اثرات درمانی در گیاهان می‌شود. در این تحقیق آزمایشات انجام شده وجود ترکیبات فلاونوئیدی را تایید می‌نماید.

در تمامی گیاهان وجود ترکیبات فلاونوئید و فنلی در متانولیت های ثانویه گیاه با فعالیت آنتی اکسیدانی آن رابطه مستقیم دارد.

ترکیبات فلاونوئیدی متعددی تاکنون در گونه های مختلف جنس *Scutellaria* شناخته شده است، در بررسی عصاره تام فلاونوئیدی دو جمعیت *Sc.tournefortii* همانطور که در جدول 4-1 مشاهده می‌شود عصاره‌های اتانولی در هر دو جمعیت در بخش‌های هوایی و ریشه بیشتر از عصاره متانولی می‌باشد. این می‌تواند ناشی از قطبیت بیشتر اتانول و قدرت آن در استخراج ترکیبات بیشتر قطبی باشد. Devprakash و همکارانش (2011) در مطالعه اثر آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی و آبی گیاه *Tephrosia purperea* مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری را در عصاره آبی نسبت به عصاره اتانولی بدست آورد. که با نتایج پژوهش حاضر در تاثیر قطبیت حلال بر روی استخراج متانولیت های ثانویه (فلاونوئیدها) همسوئی دارد (45).

در این تحقیق آزمایش‌های فیتوشیمی وجود ترکیبات فلاونوئیدی را در عصاره های متانولی و اتانولی 80٪ تایید نمود و نتایج آزمایش‌های سنجش ترکیبات فلاونوئیدی وجود مقادیر بالای این ترکیبات را در عصاره‌های مختلف (جدول 4-1) نشان داد.

در بررسی دیگری که توسط Sheng li و همکارانش در سال 2009 روی ترکیبات توتال فلاونوئیدی گیاه *Sc.lateriflora* انجام گرفت بیشترین مقدار فلاونوئید تام به میزان 0/745% گزارش شده است. در پژوهش حاضر بیشترین مقدار فلاونوئید تام در عصاره اتانولی بخش هوایی جمعیت کجور به مقدار 0/64% بدست آمد (47). فضلی بزاز و همکاران (2013) در بررسی فلاونوئیدتام عصاره های متانولی و اتیل استات و گیاه *Scutellaria lindbergii* Rech.f. دریافتند که میزان فلاونوئید تام در عصاره متانولی گیاه 33/72mgQe/gde می باشد (48).

در پژوهش حاضر در بررسی ترکیبات عمده فلاونوئیدی گیاه*Sc.tournefortii* پس از سنجش فلاونوئید تام عصاره های اتانولی و متانولی با توجه به اهمیت دو ترکیب فلاونوئیدی بایکالین و بایکالئین در طب سنتی و کاربردهای آن این دو ترکیب به روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) مورد سنجش کمی نیز قرار گرفت. همانطور که در نتایج مشاهده شد (جدول 4-4) مقدار بایکالین در نمونه های مورد مطالعه در بخش هوایی گیاه از 30/8 µg/gdrgw گیاه تا 50 µg/gdrgw (جمعیت گیلان) متغیر بود. در حالیکه میزان بایکالین در ریشه عصاره متانولی و اتانولی نمونه های استخراج شده پایین بود به استثناء عصاره اتانولی جمعیت گیلان که میزان 17/9 µg/grdrgw گیاه بود.

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین مقدار بایکالئین در کلیه عصاره های استخراج شده بین 0 تا 1/5 µg/grdrgwگیاه متغیر بوده و به نسبت بایکالین پایین می‌باشند. Bochorakova و همکارانش در سال 2003 در مطالعه ای بر روی ترکیبات فلاونوئیدی ریشه *Sc. baicalensis* دریافتند که مقدار بایکالئین در ریشه گیاه *Sc. baicalensis* و ریشه گیاه *Sc. tournefortii* پایین می باشد (49).

همچنین در مطالعه دیگری که توسط Makino و همکارانش در سال 2008 انجام گرفته است. در مقایسه ترکیبات فلاونوئیدی عمده *Sc.baicalensis* و *Sc.lateriflora* دریافتند که مقدار بایکالین در ریشه گیاه *Sc.baicalensis* بالا و در حدود 11/4٪ می‌باشد. در حالیکه در گیاه *Sc.lateriflora* در بخش هوایی نسبت به ریشه مقدار بایکالین بیشتر می باشد. به طور کلی در گیاه*Sc.baicalensis* مقدار بایکالین در ریشه نسبت به گونه دیگر *Sc.lateriflora* بیشتر می‌باشد. همچنین مقدار بایکالئین در بخش هوایی و ریشه هر دو گونه مطالعه شده بسیار پایین بود (50). این مطالعه با پژوهش ما در طرح حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگری که توسط LAI و همکارانش در سال 2001 انجام گرفته است در سنجش ترکیبات بایکالین و بایکالئین ریشه گیاه *Sc.baicalensis* مقدار بایکالین در نمونه های مختلف آنالیز شده نسبت به بایکالئین بالا بود (51). بیشترین مقدار بایکالین در نمونه ها 79 mg/g.drg.w گیاه بود. در حالی‌که در مطالعه ما بیشترین مقدار بایکالین در عصاره بخش هوایی جمعیت گیلان معادل 50/5 µg/gr.dry.w بود.

امروزه محققین علاقه زیادی به مطالعه خواص آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی و استفاده از آن به جای آنتی اکسیدان‌های مصنوعی دارند. آنتی اکسیدان‌های طبیعی سالم‌تر و فواید بیشتری نیز دارند. علاوه بر آن‌که دارای اثرات جانبی مضر آنتی اکسیدان‌های مصنوعی را ندارند.

در مطالعه‌ای که توسط Huang و همکاران (2006) انجام گرفته است. میزان بازداری استاندارد بایکالئین µM 13/4= IC_{50} بدست آمد. همچنین میزان بازداری اسید اسکوربیک µM 48/4= IC_{50} بدست آمد (30). همچنین فضلی بزاز و همکاران (2013) در بررسی خواص آنتی اکسیدانی، میزان IC50 عصاره متانولی گیاه *Sc. lindbergii* را به روش DPPH به میزان 3/03mg/ml اعلام کردند (48).

در پژوهش حاضر میزان IC_{50} برای استاندارد بایکالین در تست DPPH به مقدارml/ µg 19/06 و برای اسید اسکوربیک ml/ µg 11/13 بدست آمد که با مطالعه نتایج فعالیت جاروب رادیکال‌های آزاد (ROS) داخل سلولی نشان داد که پیش تیمار سلول با عصاره می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد را در سلول آغشته به H_2O_2 کاهش دهد. حفاظت سلولی عصاره در مقابل مرگ یا تخریب سلول‌های آغشته به H_2O_2 با تایید توان حیاتی سلول مشاهده می‌شود. مطالعات Yang و همکاران (2011) این نتایج را تایید می‌کند (46).

Archive of SID
www.SID.ir

فهرست منابع

1- Willis, J. C., 1966, A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns, 7th Edition. Cambridge (UK) University Press 1214.

2- Jiangsu New Medical College., 1977, Dictionary of Chinese Materia Medical Science and Technology, Press of Shanghai, Shanghai (in Chinese).

3- Rechinger KH. Flora Iranica, 150. Akademische Druck. Verlagsanstalt, Graz, Austria. ;1982: pp: 2, 48, 78.

4- Joshee, N., Patrick, T. S., Mentreddy, R. S., Yadav, A. K., 2002. Skullcap: Potential Medicinal Crop., In: Janick, J., Whipkey, A, Editors. Trends in new Crops and new Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 580-586.

5- Mozaffarian V, A Dictionary of Iranian Plants Names, Tehran: Farhang Moa'ser ; 1375: 671.

6- Shang Xiaofei, Xirui He , Xiaoying He, Maoxing Li, Ruxue Zhang, Pengcheng Fan, Quanlong Zhang, Zhengping Jia; 2010 , the genus *Scutellaria* an ethnipharmacological and phytochemical reriew; Journal of E□thnopharmalogy 128 (279-313)

7- Malikov N.M., Yuldashev. M.P. ; 2002, phenolic compounds of plents of the *Scutellaria* L. Genus; Distribution, struchure, and properties; chemistry of natural compounds. Vol . 38 No. 4.

8- Gousiadou, C., Karioti, A., Heilman, J., Skaltsa, H.; 2007, Eridoids from *Scutellaria Albida* ssp. *Albida*. Journal of Phytochemistry, 68: 1799-1804.

9- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., Lauvergeat, V.; 2011, Recent advances in the Transcriptional regulation of the Flavonoid Biosynthetic Pathway. Journal of Experimental Botany, 62: 2465-2483.

10- Lim, B. O., 2003, Effects of Wogonin, Wogonosids, and 3, 5, 7, 2', 6'- Pentahydroxy Flavone on Chemical Mediator Production in Peritoneal exduate Cells and Immunoglobulin E of rat Mesenteric Lymph Node Lymphocytes. Journal of Ethnopharmacology, 84: 23-29.

11- Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H., Namba, T. 1985, Studies on the Nepalese Crude drugs. V. on the Flavouoid Constituents of the root of *Scutellaria discolor* Colber (1). Journal of Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 33: 4457-4463.

12- Hussain, H., Ahmad, V.U., Anwar, S., Miana, G.A., Krohn, K., 2008. Chemical constituents of *Scutellaria linearis*. Biochemical Systematics and Ecology 36, 490–492.

Archive of SID
www.SID.ir

13- Kikuchi, Y., Miyaichi, Y., Yamagnchi, Y., Kizu, H., Tomimori, T., 1991 a, Studies on the Nepalese crude druges XIV. On the Phenolic Compounds From the Root of *Scutellaria Prostrata* SACQ, ex BENTH, Chemical and Pharmaceutical Balletin, 39: 1047-1050.

14- Miyaichi, Y., Kizu, H., Tomimori; T., Lin, C. C., 1989, Studies on the constituents of *Scutellaria* species on the flovonoid constituents of the aerial parts of *Scutellaria Indica* L. ; Journal of Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 39: 794-797.

15- Zhou, Z. H., and Yang C. R., 2000, Five new flavonoid glycosides from *Scutellaria amoena*. Journal of Acta Botanica Yunnanica, 22: 475-481.

16- Li, Z. D. and Wei H. Q.; 1994, Chemical compounds of the genus *Scutellaria* world; Journal of Phytochemistry, 9: 46.

17- Zhou Y., Hirotani M., Yoshikaue t., Furuya T.; 1997, Flavonoids and phenylethanoids from hairy root cultures of *Scutellaria baicelensis*. Journal of Phytochemistry, 44 (1): 83-87.

18- Franzyk. H., Rasmussen S. H., Jensen S.; 1998, Ozonolysis of protected iridoid glucosides. European Journel of Organic Chemistry, 365-370.

19- Bruno M., Vassallo N., Simmonds M. S. J.; 1999, A diterpenoid with antifeedant activity from *Scutellaria rubicanda*. Sournal of Phytochemistry, 50: 973-976.

20- Dat S. J, Chen M., Liu K., Jiang Y. T., Shen L. ; 2006 a, Four new neo-clerodene diterpenoid alkaloids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 54: 869-872.

21- Zhu, P. Y., and Lin G. Q., 1993, Isolation and identification of the diterpenoid and flavone in *Scutellaria barbata* D, Don. Journal of Plant Resources and Environment, 2: 63-64.

22- Miyaichi Y., Morimoto T. , yaguchi k. , kizu H.; 2006, studies on the constituents of *scutellaria* species (xxi): constituents of the leaves of *Scutellaria strigillosa* hemsley; J. Nat. Med., 60: 157-158

23- Wang Z. Q., and Li Y. W., 1996, Scutebarbatine A, a new neoclerodane- Type diterpenoid alkaloid from *Scutellaria batbata*. Journal of Chinese Chemical Letters, 7: 333-334.

Archive of SID
www.SID.ir

24- Ma, S. C., Du J., But P. P. H., Deng X. L., Zhang Y. W., Doi V. E. C., Xu H. X., Lee S. H. S., Lee S. F., 2002, Antiviral chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. Journal of Ethnopharmacology, 79: 205-211.

25- Skaltsa H. H., Lazari, D. M., Kyriazopolilos P., Golegou S., Triantaphyllidis S., Sokovic M., Kypriotakis, Z.; 2005, Composition and antimicrobial Activity of the essential Oils of *Scutellaria sieberia* Benth. And *Scutellaria rupestris* Boiss et Heldr. ssp. *adenotricha* (Boiss. Et Heldr.) Greuter et Burdet from Greece. Journel of Essential Oil Research 17: 232.

26- Cole. J. B.; Saxena P. K.; Murch S. J.; 2007, Medicinal biothechnology in the genus *Scutellaria*. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant, 43: 318-327.

27- Shao Z. H., Li C. Q., Hock T. L. V., Becker L. B., Schumacker P. T., Wu J. A., Attele A. S. Yuan C. S.; 1999, Extract fram *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 31: 1885-1895.

28- Halpern H. J., Yu C., Barth E., Peric M., Rosen G. M, 1995, In situ detection by spin trapping of hydroxyl radical markers produced from ionizing radiation in the Tumor of the Living Mouse. Journal of Proceeding of the National Academy of Sciences of United State of American, 95: 796-800.

29- Heo H., Shin Y. S., Cho W. H., Choi Y. S., Kim H. Kwon Y. K., 2009, Memory improvement in ibotenic acid induced model rats by extracts of *Seutellaria baicalensis*. Journal of Ethnopharmacology, 122: 20-27.

30- Huang wen- hisn, lee an- rong, and yang ching- huey, 2006, Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxy flavonoids of *Scutellaria baicalensis* georgi. Biosci., Biotechnol. Biochem., 70 (10), 237-2380.

31- Cole I., Cao J., Alan A. R., Saxena P. K., Murch S. J., 2008, Comparisons of *Scutallaria baicalensis, Scutellaria lateriflora*, and *Sc. racemosa*: genom size, antioxdant potential and photochemistry. Planta Med. 74: 474-481.

32- Bochorakva H., Paulova H., Slanina J., Musil P., Tabarska E.; 2003, Main flavonoids in the root of *Scutellaria baiealensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties. Phytotherapy Research, 17, 640-644.

33- Wang Gang, Wang Fei and Liu ji-kai, 2011, Two new phenols from *Scutellaria barbata*. Molecules , 16,1402-1408.

Archive of SID
www.SID.ir

34- Zhrang you- Yu, Gao Yun- Zhen, Ageta Hivo yuki, Harigaya Yoshihiro, Onda masayuki, Hashimoto K., Ikeya Y., Okada M. and Maruno M. , 1997, Studies on the constituents of roots of *Scutellaria planipes*; Planta Medica 63: 536-539.

35- Tayarani- Najaran Z., Emami S. A., Asili J., Mirzaei A. and Mousavi S. H.; 2009, Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of *Scutellaria litwinowii* root extract on cancer cell lines. E CAM; Page 1-9 doi: 10.1093/ecam/ nep 214.

36- D. B. Mcphail, R. C. Hartly, P. T. Gardner, and G. G. Duthie; 2003, Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity of flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. J. Agric. Food Chem., 51, 1684-1690.

37- Shang Y. Z, Qin B. W., Cheng J. J, miao H.; 2006, Preventation of oxidative in jury by flavonoids from stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi in PC 12 cells; Phytotherapy Research 20, 53-57.

38- Dai sheng- Jun, Liang D. D, Ren Y. Lin K. and Shen L.; 2008, New neo- clerodane diterpenoid alkaloids from *Scutelloria barbata* with cytotoxic activities. Chem. Pharm. Bull. 56 (2) 207-209.

39- Chen Lin- Geeng, Hang L. 20, Tsai kun- Wei; Pan Y. S., Tsai Y. D.; 2008, Wogonin, a bioactive flavonoid in herbal tea, inhibits inflammatory cyclooxygenase- 2 gen expression in human lung epithelial cancer cells. Mol. Nutr. Res., 52- 000-000.

40-Wang C. Z, Mehendale S. R., Yaan C., 2007, Commonly used antioxdont Botanical: active constituents and their potential role in cardiovascular illness. The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 35, No. 49, 543-558.

41- Olennikov D.N. , Chirikova N.K., and Tankhaeva L.M, 2010, Phenolic compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi; Russian Journal of Bioorganic Chemistry, vol. 36, No. 7, pp. 816-824

42- Atanassova M. and Georgieva S.; 2010, Comparative polyphenol composition and antioxidant capacity of the Bulgarian plants (dry herbs). Electronic Journal of Environmental, Agri Cultural and Food Chemistry (EJEAFCHE), 9(9): 1514-1523.

43- Gao J, Sanchez-Medina A., Pendry BA., Hughes MJ., Webb Gf., Corroren O.; 2008, Validetion of a HPLC method for flavonoid biomarkers in Skullcop (*Scutellaria*) and its use to illustrate wide variability in the quality of commercial tinctures. J Pharm Pharmaceut Sci, 11(1): 77-87.

Archive of SID
www.SID.ir

44- Avani Patel; Amit P., N. M. Patel; 2010, Estimation of flavonoid polyphenolic content and in vitro antioxidant capacity of leaves of *Tephrosia Purpurea* L. (Leguminosae); International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR); Vol. 1(1), 66-77.

45- Devprakash, K. K. Sreenivasan, T. Subburaja; 2011, Camparative antioxidant studies of ethanol extract and fresh aqueous extract of *Tephrosia Purpurea*; Pharma Seience Monitor, Online Published; IC Value 4.01, 2064-2077.

46- Yang Xiudong, Kang Min-Cheol, Lee Ki-Wan, Sung-Myung Kang, Won-Woo Lee and You-Jin Jeon; 2011, Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum;* ,Algae , 26(2):201-208.

47- Sheng Li, Kun Tang, Xinglian Yan; 2009, Comparison of ultrasonic alcohol extraction and the ultrasonic alkali extraction of the flavonoids from *Scutellaria Barbata*. Modern Pharmaceutical Research, Vol. 2, No. 4.

48- Fazly Bazzaz B. S., Arab A., Asila J, Hasanzadeh- Khayyat M., Sahebkar A.; 2013, Antimicrobial and antioxidant acitivies of methanol, dichloromethane and ethyl acetate extracts of *Scutellaria lindbergii* Rech. F.; Chiang Mai J. Sci. 40 (1):49-59.

49-Bochorakove Hana, Paulova Hana, slanina Jiri, Musil pavel, taborska Eva; 2003, Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in europ and their comparative antiradical properties. Phytotherapy research, 17 , 640-644.

50- Makino T., Hishida A., Goda Yukihiro, Mizukami Hajime; 2008, Comparison of the major flavonoid content of *Sc. Baicalensis, Sc. Lateriflora*, and their commercial products. J. Nat. Med. 62: 294-299.

51- Lai M., Chen C. C., Hsiu S., Chao D. L.; 2001, Analysis and comparison of baicalin, baicalein and wogonin contents in traditional decoctions and commercial extracts of Scutellariae Radix. Journal of Food Drag Analysis, Vol. 9 No. 3: 145-149.

Archive of SID
www.SID.ir

Abstract

Natural antioxidants protect the body against oxidative stress caused by free radicals. *Scutellaria* genus belongs to the Lamiaceae family with powerful antioxidant effects.

In this study, methanol and ethanol extracts of aerial parts and roots of two population of *Scutellaria tournefortii* L. were prepared and assayed some factors such as total flavonoids, quantitation of Baicalin and Baicalein, and antioxidant properties.The ability of scavenging of free radicals extracellular was measured by 2-2- diphenyl- picril Hydrazyl (DPPH).

The total flavonoids content of samples was determined by aluminium chloride method. Quantification determination of baicalin and baicalein were performed by HPLC.

The evaluating of the antioxidant properties in intracellular, cytotoxic properties were assayed using the MTT method. Moreover scutellaria`s extracts was found to evaluating protective effects against H_2O_2- induced cell damage which were determined via MTT.

The results showed total flavonoid extracts were from 1.49 mg/g.dw to 6.4 mg/gdw. Baicalin content of the various extracts were 0.3 mg/g dw to 50.5 mg/g dw. Also Baicalein contents were 1.5 mg/g dw Respectively. IC_{50} of extracts was variable from 73.08 µg/ml to 387.00 µg/ml in DPPH.

Study of cell viability showed that IC_{50} for Hella cell line was from 79/31 µg/ml to 125/45 µg/ml.

The best protection effect against of intracellular reactive oxygen species scavenging was IC_5= 31/91 µg/ml.

Results showed that the *Scutellaria tournefortii* is high potential and accessible source of antioxidants to the food and pharmaceutical industy.

Archive of SID
www.SID.ir

Key words: *Scutellaria tournefortii,* total flavonoids, Baicalin, Baicalein, antioxidant, DPPH, cell viability

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاددانشگاهی

جمهوری اسلامی ایران

Final Report:

Study of Antioxidant Properties of crude extract from *Scutellaria tournefortii* in comparison with standards herbal flavonoids

Code No. :

1713-11

Rsearch Group:

Plant physiology and genetic

Principle investigator(By):

Amineh Zeinali

Date:

February 2015

Archive of SID

www.SID.ir