



بررسی سه روش استخراج بر میزان فعالیت فنول و فلاونوئید تام و بدام اندازی نیتریک اکساید در گیاه ماشک معمولی (*Vicia hirsuta*) رشد یافته در مازندران

سمیرا منتهای درگاه^{۱*}، محمدعلی ابراهیم زاده^۲، و پژمان مرادی^۱

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد ساوه، ساوه، ایران.

۲. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

* Email: zadeh20@yahoo.com

چکیده

گیاه ماشک جزء جنس *Vicia* از خانواده *Papilionaceae* دارای ۴۵ گونه در ایران است. این گیاه دارای ارزش‌ها و خاصیت‌های دارویی و غذایی مهمی است. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش‌های زیادی در درمان سرطان، الزایمر و فعالیت‌های حفاظتی کبدی نیز از خود نشان می‌دهند. دیگر خاصیت صنعتی این گیاه فعالیت حشره کشی آن است که اخیراً گزارش شده است. با توجه به بومی بودن این گیاه این تحقیق برای اولین بار انجام شد و گزارشی بر این گونه تا این زمان یافت نشده است. به این منظور این تحقیق در آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی مازندران به منظور بررسی میزان تاثیر روش استخراج بر محتوای فنول و فلاونوئید این گیاه انجام شده است. عصاره گیری به سه روش التراسونیک (سونیکیت)، سوکسله و خیساندن انجام شد و بر این اساس میزان کوئرستین و گالیک اسید محاسبه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد استخراج با روش سوکسله بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی را داشت. از بین روش هاس استخراجی، مجددا سوکسله بالاترین راندمان استخراج را دارا بود. اختلاف معنی داری ($p > 0.05$) در قدرت بدام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید بین عصاره ی حاصل از سوکسله و التراسونیک نبود.

کلمات کلیدی: فنول، فلاونوئید، کوئرستین، گالیک اسید، نیتریک اکساید.

مقدمه

گیاه ماشک معمولی (*Vicia hirsuta*) جزء خانواده بقولات (*Fabaceae* (*Leguminosae*)) است. این یک گیاه یک ساله افراشته، بدون کرک تا کمی کرکدار می‌باشد، بلندی ارتفاع ساقه این گیاه ۷۰ تا ۹۰ سانتی‌متر است و گزارش شده است که در برخی اوقات تا بیش از یک متر نیز بالا می‌رود. نوک برگ‌ها پیچیده شده، که این ویژگی آن را به منظور بالا رفتن و قد کشیدن حمایت می‌کند. برگ‌ها حداکثر از ۱۰ جفت برگچه کشیده تشکیل یافته‌اند هر کدام در جهت طولی حداکثر ۲ سانتی‌متر شکاف خورده، مسطح، به شدت تیز، یا با نوک دندانه دار هستند. گل آذین خوشه‌ای است حد اکثر ۸ گل در نزدیکی نوک و غالباً فقط در یک سمت در بردارد. هر گل به رنگ سفید و یا آبی روشن است و فقط چند میلی‌متر طول دارد، و عمر کوتاه است. میوه یک غلاف لگومی با یک سانتی‌متر طول و نیم سانتی‌متر عرض و کرکدار می‌باشد که اغلب متراکم است. غلاف آن سبز کم رنگ نزدیک به تیره است و معمولاً حاوی دو دانه است.



عرضه روش های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، بخصوص در صنایع گیاهان دارویی افزایش یافته است. دلیل این موضوع نیاز به روش ایده ال استخراج بوده که بتواند بیشترین مقدار ترکیبات فعال بیولوژیک را در کوتاه ترین زمان ممکن با پایین ترین قیمت بدست آورد (چانهان و همکاران ۲۰۱۰). گزارشات متعددی از بکارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون ها از گیاهان مختلف در دست است. در این گزارشات بسیاری از محققین توانستند نشان دهند که روش التراسونیک بطور قابل ملاحظه ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش زمان و کاهش حجم حلال مصرفی می شود (چانهان و همکاران ۲۰۱۰). امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره های گیاهی صورت می گیرد تا اینکه به نمونه هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالادست یابند. از آنجایی که چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و اینکه هر روش در مقایسه با دیگر روش ها از محدودیت ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار است، در این پروژه از هر بخش از یک گیاه سه عصاره مختلف تهیه شده و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها با سه روش مورد ارزیابی قرار گرفت. عمل استخراج با روش کلاسیک (ماسیراسیون)، استفاده از حمام التراسونیک و همچنین با روش سوکسله انجام شد. با توجه به اینکه عوامل بسیار زیادی از جمله آب و هوا، خاک، ارتفاع، اختلاف در گونه های مختلف، روش های استخراج و روش های اندازه گیری آنتی اکسیدان ها در میزان متابولیک ثانویه گیاهی از جمله فنل تام و خواص آنتی اکسیدانی دخالت دارند. بدین منظور ضرورت انجام این تحقیق در استان مازندران قابلیت توجهی دارد. همچنین در بررسی متون در مطالعات داخلی و خارجی هیچ گزارشی از فعالیت آنتی اکسیدانی گونه ی ماشک معمولی به دست نیامد. بنابراین این تحقیق برای اولین بار به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و همچنین بررسی تأثیر روش های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه ماشک معمولی طراحی شده است.

مواد و روش ها

بیکره رویشی گیاه گیاه ماشک معمولی (*Vicia hirsuta*) از اطراف ساری جمع آوری و به تایید متخصصین سیستماتیک گیاهی رسید. بخشهای گیاه در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس پودر شدند. به منظور عصاره گیری از ۳ روش ماسیراسیون، سوکسله و التراسوند استفاده گردید.

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو_ کالتیو انجام شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو_ کالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. جذب نمونه ها پس از ۲ ساعت که نمونه ها را در تاریکی قرار دادیم، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) اندازه گیری شد. سپس نتایج بصورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد. به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره بر اساس میزان معادل «میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره» گزارش شد (ابراهیم زاده و همکاران ۲۰۱۴). آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد. میزان محتوای فلاونوئید با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید به روش اسپکتروفوتومتری برحسب کوئرتستین صورت پذیرفت (ابراهیم زاده و همکاران ۲۰۱۴). کوئرتستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده



شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره» گزارش گردید. آزمایشات ۲ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش شد.

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید:

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروکساید در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتريت تولید می نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می گیرد.

نتایج و بحث

گیاهان بطور سنتی در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون بکار می روند. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد (کای و همکاران ۲۰۰۴). ترکیبات فنولی را می توان به فنول های ساده، با یک حلقه ی آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است و ترکیبات پلی فنولی تقسیم نمود. ترکیبات فنولی متابولیت های ثانویه ای هستند که بوسیله حضور یک حلقه آروماتیک حاوی گروه هیدروکسیل آزاد شناخته می شوند. این مولکول ها تقریباً در تمام بخش های گیاه وجود دارند و در بسیاری از پروسه های فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، تشکیل ریشه، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. همچنین یکی از مهم ترین خصوصیات که به این گروه از ترکیبات نسبت داده می شود خاصیت آنتی اکسیدانی بوده که به آنها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می دهد (فلاح و همکاران ۲۰۱۲). علاوه بر این پلی فنول ها فعالیت های بیولوژیکی متفاوتی از جمله: فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق از خود نشان می دهند. معرف فولین سیو کالتیو واکنشگری است که بطور گسترده در سنجش ترکیبات فنولی که در عصاره ها وجود دارد بکار می رود. این روش بر مبنای قدرت احیا کنندگی گروه هیدروکسی فنولی بوده که با واکنشگر ترکیب شده و بخش رنگ سازی را تولید می کند که در ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین مقدار می گردد. محتوای تام فنولی موجود در عصاره های متانولی گیاه ماشک معمولی معادل میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره جهت ارزیابی میزان محتوای تام فنولی موجود در گیاه از روش فولین سیو کالتیو استفاده شد. اساس این روش اکسیداسیون-احیا است. به این صورت که در محیط قلیایی اگر در نمونه مورد نظر ترکیبات پلی فنول حضور داشته باشند، باعث احیا تنگستات و یا مولیبدات در این واکنشگر شده و رنگ آبی ظهور پیدا می کند. این روش یک متد کمی، حساس و مستقل از درجات پلی مریزاسیون می باشد. نتایج این تحقیق در خصوص بررسی تعیین محتوای فنلی در جدول ۱-۱ آمده است. نمودار ۱، منحنی استاندارد گالیک اسید به منظور تعیین محتوای فنولی را نشان می دهد.

جدول ۱. محتوای تام فنولی در اندام هوایی ماشک معمولی.

نوع عصاره	میزان جذب	معادل میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره
-----------	-----------	--



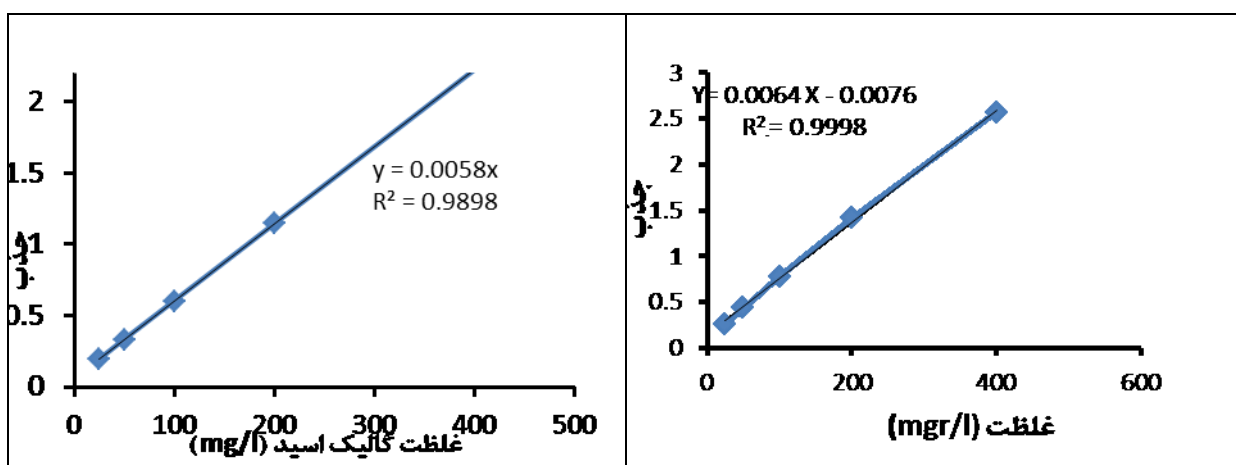
۱۱۸/۱۰۳	۰/۲۷۴	سونیکیت
۱۳۷/۹۳	۰/۳۲۰	سوکسله
۱۲۸/۸۸	۰/۲۹۹	خیساندن

مقادیر جدول میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف ± انحراف استاندارد می باشد.

بزرگترین دسته از ترکیبات پلی فنول، فلاونوئیدها هستند که توانایی مهار پراکسیداسیون چربی با روش جمع کنندگی رادیکال هایی مانند سوپراکسید، آنیون ها، رادیکال های پراکسید چربی و رادیکال های هیدروکسیل را دارند. میزان محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره ها طبق روش رنگ سنجی ارزیابی شد. معرف رنگی در این روش آلومینیوم کلراید می باشد. در شکل زیر جایگاه اتصال فلز از جمله آلومینیوم به فلاونوئید مشخص شده است که به دنبال آن رنگ ظاهر می شود (چانگ ۲۰۰۲). نتایج حاصل از بررسی محتوای تام فلاونوئید موجود در عصاره های متانولی گیاه ماشک معمولی در جدول ۲ آمده است. نمودار ۱ منحنی استاندارد کوئرستین را به منظور تعیین محتوای تام فلاونوئیدی نشان می دهد. در مقایسه روش های مختلف استخراج، سوکسله بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی را دارا بود. جدول ۲. محتوای فلاونوئیدی در اندام هوایی ماشک معمولی.

نوع عصاره	میزان جذب	معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره
سونیکیت	۰/۱۱۲	۴۶/۷۲
سوکسله	۰/۱۲۹	۵۳/۳۶
خیساندن	۰/۱۱۴	۴۷/۵

مقادیر جدول میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف ± انحراف استاندارد می باشد.

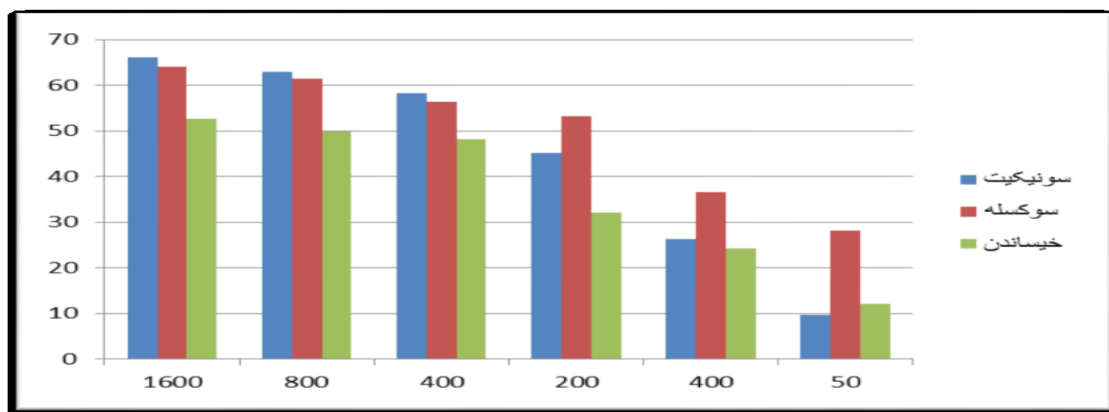


نمودار ۱- منحنی استاندارد گالیک اسید جهت تعیین محتوای تام فنولی موجود در عصاره گیاه (سمت چپ) و منحنی استاندارد کوئرستین جهت تعیین محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه (سمت راست)



استخراج با روش های مختلف راندمان های متفاوتی بدست داد. سوکسله با ۲۱/۷ درصد بالاترین راندمان استخراج را داشت. روش خیساندن با ۱۷/۶ و روش التراسونیک با ۱۳/۴ درصد به ترتیب در رده های بعدی قرار داشتند. با توجه به تکرار مجدد عمل استخراج (هر بار با حلال تازه) در روش سوکسله، بدست آمدن راندمان بالاتر استخراج کاملاً منطقی بنظر می رسد. اما استخراج با روش التراسونیک در زمان ۱ ساعت راندمانی بسیار بالاتر روش ماسیراسیون از خود نشان داد. به جهت امکان پذیر بوده این مقایسه از حلال یکسان (متانول) استفاده شده است.

نمودار(۲): میزان به دام اندازی نیتریک اکساید توسط عصاره گیاه ماشک معمولی



استخراج با روش های مختلف راندمان های متفاوتی بدست داد. سونیکیت با ۶۶/۰۶ درصد بالاترین راندمان استخراج را داشت. روش سوکسله با ۶۳/۹۷ و روش خیساندن با ۵۲/۶۴ درصد به ترتیب در رده های بعدی قرار داشتند.

نتیجه گیری کلی

روش استخراج نقش زیادی در راندمان عصاره گیری داشت. سوکسله بیسترتین راندمان را در تهیه عصاره داشت. از سویی روش استخراج نیز بطور معنی داری بر میزان استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید تاثیر داشت. عصاره ی حاصل از سوکسله دارای بالاترین محتوای فنلی و فلاونوئیدی بود. در میزان درصد به دام اندازی نیتریک اکساید نیز سونیکیت دارای بالاترین راندمان استخراج بود.

منابع



۱. مهدی قره خانی، محمد قربانی، محمدعلی ابراهیم زاده، سیدمهدی جعفری و علیرضا صادقی ماهونک. مقایسه روشهای مختلف استخراج ترکیب های فنولی و فلاونوئیدی از گیاه (*Urticadioidal*). گزنه. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۶، شماره ۳، صص. ۳۸۹-۴۰۵، ۱۳۸۹.
۲. قهرمان، احمد، فلور ایران، ۱۳۷۶، تهران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.
3. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F. Antidepressant and antihemolytic activities of *Viciasojakii*. Eur rev Mrd Pharm Sci. 2014; 18: 971-974.
4. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, B. Antioxidant activity of *viciacanesence*. Pharmacologyonline 2009; 3: 688-694.
5. Hashemi Z. and Ebrahimzadeh M. A. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *viciafaba* l. Bean and hulls. Latin American Applied Research. In press (2014).
6. MotallebiRiekandeh S., Mazandarani M., Ebrahimzadeh M. A., ZargariM. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *EryngiumCaucasicumTrautv* inflorescence. Pharmaceutical Biology. Submitted.
7. Rabiej Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis*. *Natural Product Research* 2012; 26(24):2353-2357.
8. Chunhuan He, Xiaowen Ji, Yingming Pan, Hengshan Wang, Kai Wang, Min Liang, Lizhu Yang. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb Med Chem Res (2010) 19:448-461
9. Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 74:2157-2184.
10. Falleh H *et al*. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots, *Tropical Journal of pharmaceutical research*, 2012, 11(2), 243-249.
11. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J Food Drug Analysis*, 2002, 10, 178-182.