



میزان فعالیت شلاته کنندگی آهن و به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در گیاه ماشک

معمولی (*Vicia hirsute*) رشد یافته در مازندران تحت سه روش استخراج

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 ی Papilionaceae دارای ۴۵ گونه در ایران است. این گیاه دارای ارزش‌ها و خاصیت‌های دارویی و غذایی مهمی است. آنتی اکسیدان‌ها نقش‌های زیادی در درمان سرطان، آلزایمر 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 این گیاه انجام شده است. عصاره گیری به سه روش التراسونیک (سونیکیت)، سوکسله و خیساندن انجام شد و بر این اساس میزان عصاره ی ناشی از خیساندن در تست شلاته کنندگی آهن، قویتر از سایر عصاره ها بود. در غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ درصد مهار $1,7 \pm 48,85$ 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: *Vicia hirsuta*، شلاته کنندگی آهن، نیتریک اکساید، روش استخراج.

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 سانتی-متر 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 روش‌های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، بخصوص در صنایع گیاهان دارویی افزایش یافته است. دلیل این موضوع نیاز به روش ایده‌ال استخراج بوده که بتواند بیشترین مقدار ترکیبات فعال بیولوژیکی را در کوتاه‌ترین زمان ممکن با پایین‌ترین قیمت بدست آورد (ابراهیم زاده و همکاران ۲۰۱۴). 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 (ابراهیم زاده و همکاران ۲۰۱۴). 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

پیکره رویشی 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.

تهیه عصاره به روش ماسیراسیون (خیساندن):

در این روش ۱۰ گرم از اندام هوایی خشک گیاه با حدود ۵۰ میلی لیتر متانل مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً متانل جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز سوم، مجموعه حلال ها توسط دستگاه روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف گردید.

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک:

در این روش، از امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس ۷۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم از اندام هوایی گیاه به همراه حلال متانول در بشر قرار داده شد. مجموعه به مدت یک ساعت در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. سپس محلول صاف گردید و متانول بدست آمده توسط دستگاه روتاری حذف گردید.

تهیه عصاره به روش سوکسله:

در این روش ۱۰ گرم از اندام هوایی گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در دستگاه قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به مدت ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرد سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه روتاری حذف گردید (ربیعی و همکاران ۲۰۱۲).

ارزیابی میزان شلات کنندگی آهن:



اندازه گیری قدرت شلاته کنندگی آهن با روش دینز انجام شد (Dinis et al 1994).

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

یون های فلزی دو ظرفیتی نقش مهمی در کاتالیز کردن فرایند های اکسیداسیون ایفا کرده و موجب تشکیل رادیکال های هیدروکسیل و تجزیه ی هیدروپراکساید از طریق واکنش فتون می شوند. لذا کاهش غلظت یون آهن دو ظرفیتی در مقابل تخریب ناشی از اکسیداسیون محافظت ایجاد خواهد کرد. شلاته کنند های آهن در بیماری های چون تالاسمی کاربرد درمانی دارند (Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., and Bekhradnia, A.R. 2008).

در گزارش دیگری که توسط (Bekhradnia S., Ebrahimzadeh M. A. 2014) انجام شد کارایی سه روش استخراج شامل عصاره پلی فنول، فراکسیون الکلونیدی و عصاره التراسونیک در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیداتیو محتوای فنولی و فلاونوئیدی گلبرگ گیاه گل گاو زبان (*Echium amoenum*) مورد بررسی قرار گرفت. علی رغم کمتر بودن میزان ترکیبات فنولی، بهترین فعالیت را در تست DPPH و به دام اندازی هیدروژن پراکساید در عصاره التراسونیک مشاهده شد. بالاترین فعالیت شلاته کنندگی آهن و احیا کنندگی در فراکسیون پلی فنول مشاهده شد. نیتریک اکساید نقش مهمی در عملکرد طبیعی فیزیولوژیک در بسیاری از سیستم ها دارد. بسیاری از اختلالات مانند سکت، سردرد، التهاب، اختلالاتی چون آلزایمر بواسطه عملکرد این ترکیب رخ می دهد (Ebrahimzadeh M.A et al., 2010). در جدول زیر نتایج حاصل از سه روش استخراج در غلظت های مختلف مشخص شده است:

جدول (۱): میزان شلات کنندگی آهن در عصاره مختلف از ماشک معمولی. هر یک از مقادیر جدول، میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می باشد.

روش عصاره گیری	غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	درصد به دام اندازی (%)
سونیکیت	۱۶۰۰	$44/50 \pm 2/1$
	۸۰۰	$36/77 \pm 1/9$
	۴۰۰	$16/42 \pm 0/9$
	۲۰۰	$9/63 \pm 0/4$
سوکسله	۱۶۰۰	$50/21 \pm 2/3$
	۸۰۰	$40/98 \pm 1/7$
	۴۰۰	$26/87 \pm 0/6$
	۲۰۰	$7/73 \pm 0/4$
خیساندن	۱۶۰۰	$51/43 \pm 1/4$
	۸۰۰	$48/85 \pm 1/7$
	۴۰۰	$20/63 \pm 0/8$
	۲۰۰	$2/03 \pm 0/2$



جدول (۲): میزان شلات با آهن EDTA به عنوان استاندارد. هریک از مقادیر جدول، میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می باشد.

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	درصد به دام اندازی (%)
۳۲	$73/20 \pm 2/41$
۱۶	$68/93 \pm 2/13$
۸	$61/04 \pm 1/22$
۴	$57/92 \pm 1/16$
۲	$49/93 \pm 1/07$

جدول (۳): میزان به دام اندازی نیتریک اکساید توسط عصاره گیاه ماشک معمولی. هریک از مقادیر جدول، میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می باشد.

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	غلظت	درصد به دام اندازی (%)
سونیکیت	۱۶۰۰	$66/06 \pm 3/17$
	۸۰۰	$62/90 \pm 2/23$
	۴۰۰	$58/25 \pm 2/14$
	۲۰۰	$45/24 \pm 1/25$
	۱۰۰	$26/31 \pm 1/16$
	۵۰	$9/70 \pm 0/92$
سوکسله	۱۶۰۰	$63/97 \pm 2/08$
	۸۰۰	$61/38 \pm 1/98$
	۴۰۰	$56/36 \pm 1/35$
	۲۰۰	$53/19 \pm 1/19$
	۱۰۰	$36/54 \pm 1/07$
	۵۰	$28/25 \pm 0/82$
خیساندن	۱۶۰۰	$52/64 \pm 2/23$
	۸۰۰	$49/92 \pm 2/19$
	۴۰۰	$48/18 \pm 1/16$
	۲۰۰	$32/01 \pm 1/01$
	۱۰۰	$24/16 \pm 0/97$
	۵۰	$12/08 \pm 0/64$

جدول (۴): میزان به دام اندازی نیتریک اکساید توسط استاندارد کوئرستین. هریک از مقادیر جدول میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف \pm انحراف استاندارد می باشد.

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	میانگین جذب	در صد به دام اندازی (%)
۸۰۰	$0/739 \pm 0/03$	۶۷/۷۸
۴۰۰	$0/761 \pm 0/03$	۶۶/۸۲
۲۰۰	$1/11 \pm 0/05$	۵۱/۶۱



۴۹/۸۶	۱/۱۵ ± ۰/۰۶	۱۰۰
۲۲/۶۲	۱/۷۷۵ ± ۰/۰۹	۵۰
۶/۱۴	۲/۱۵۳ ± ۰/۱۲	۲۵

میزان IC₅₀ برابر ۱۹۵ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

نتیجه گیری کلی

عصاره ی ناشی از خیساندن در تست شلاته کنندگی آهن، قویتر از سایر عصاره ها بود. در غلظت ۸۰۰ µg/ml درصد مهار ۱,۷ ± ۴۸,۸۵ بود. اختلاف معنی داری (P>۰,۰۵) در قدرت بدام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید بین عصاره ی حاصل از سوکسله و التراسونیک نبود اما قابل مقایسه با کوئرستین (کنترل مثبت) نبود (P<۰,۰۵).

منابع

1. Bekhradnia S., Ebrahimzadeh M. A. 2014. Antioxidant Activity of Polyphenol, Alkaloid Rich Fractions and Ultrasonic Extract of *Echium amoenum*. Chemistry Magazine Submitted.
2. Dinis, TCP. et al. 1994. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers, Archives of Biochemistry and Biophysics, 315: 161–169.
3. Ebrahimzadeh M A et al. 2014. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of *Lythrum salicaria* L. IFRJ,21(2),783-788.
4. Ebrahimzadeh M A, Hashemi Z, Jamshidi M. 2010. Evaluation of antioxidant activities of *Laurus nobilis* L.(Lauraceae) fruits, Impact of extraction methods, world of sciences journal,5(2),79-87.
5. Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., and Bekhradnia, A.R. 2008. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr. J. Biotechnol. 7 (18), 3188-3192.