Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

مقاله پژوهشی

ارتباط بین تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مقادیر متفاوت ترکیبات فنولی

زیبا میرزایی[1]، غلامرضا دهقان[2]

تاریخ دریافت ۱۳۹٤/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۱/۲۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: هدف از این مطالعه مقایسه‌ی تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد در شرایط in vitro توسط عصاره‌های متانولی بخش‌های مختلف گیاهان بارهنگ، شبدر، کندر و گردو است.

مواد و روش کار: برای این کار عصاره‌ها با روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی FRAP، DPPH وABTS مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. محتوای فنول و فلاونوئید تام نیز در نمونه‌های گیاهی ذکر شده با روش‌های اسپکتروفتومتری UV/Vis تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که IC_{50} در مهار رادیکال پایدار DPPH برای عصاره استخوان مغز گردو ۲/۹۳ است. بررسی سنجش‌های ABTS وFRAP نیز نشان داد که عصاره‌های استخوان مغز گردو، پوسته سبز گردو و بارهنگ نسبت به عصاره‌های دیگر فعال‌تر بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهند. بررسی محتوای فلاونوئیدی و فنولی تام عصاره‌ها نیز بیانگر این است که به ترتیب عصاره بارهنگ دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی و همچنین همه عصاره‌ها به‌جز کندر دارای بیشترین محتوای فنولی می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد. شبدر باوجود بالا بودن میزان ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم‌تر از حد انتظاری نشان داد. نتیجه آن‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی فقط بر اساس محتوای فنولی آن‌ها توضیح داده نمی‌شوند. بلکه نیازمند موارد دیگر نیز هستند؛ و با توجه به این‌که ترکیبات فنولی با ساختار مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوعی دارند. درنتیجه به‌طورقطع نمی‌توان گفت همیشه رابطه مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نمونه‌ها وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدان، DPPH، ABTS، FRAP، فلاونویید تام

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره چهارم، ص ۳۲۹-۳۲۱، تیر ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم تلفن: ۰۹۱۴۳۲۲۳۸۳۲

Email: ziba.mirzaee@znu.ac.ir

مقدمه

گیاهان به‌عنوان منبع عظیم ترکیبات فعال زیستی بوده و فارغ از هر نوع چالش درزمینه‌ی گیاهان دارویی عقیده‌ی جمعی پژوهشگران و دانشمندان بر اهمیت آن‌ها در تهیه‌ی ترکیبات دارویی و بهداشتی تأکید دارد. استقبال مردم از گیاهان دارویی هم بر مفید بودن طب سنتی بر پایه‌ی گیاه‌درمانی صحه می‌گذارد. گرایش و توجه ویژه به سمت گیاهان دارویی بیشتر به خاطر اثرات امیدبخش گیاهان در پیشگیری یا درمان بیماری‌های قلبی- عروقی، بیماری‌های التهابی و سرطان‌های مختلف بوده است. تحقیقات در زمینه‌های گیاهان دارویی به حدی موردتوجه بوده است که در سال ۱۹۹۳ میلادی در انستیتو بین‌المللی سلامت NIH شاخه‌ی جدیدی به نام دفتر طب مکمل و جایگزین تأسیس شد. تا از محققانی که درزمینه‌ی طب گیاهی فعالیت می‌کنند، حمایت کنند (۱۶).

کشور پهناور ایران به دلیل داشتن شرایط خاص جغرافیایی بر روی کره زمین دارای اقلیم‌های متنوعی است و گونه‌های گیاهی متعددی در آن انتشار دارند که هر یک از اجتماعات گیاهی منتشر در آن دارای ترکیب معینی از گونه‌های مختلف می‌باشد. تعداد بسیار زیادی از گیاهان را گونه‌هایی تشکیل می‌دهند که از دیرباز تحت عنوان گیاهان معطر و دارویی شناخته شده‌اند و امروزه گرایش به‌سوی داروهای استخراج‌شده از این گیاهان رو به افزایش است. با سیر تحولات علمی، تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با طبیعی در راستای حذف و یا کاهش ترکیبات شیمیایی

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی- بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان (نویسنده مسئول)

[2] دانشیار دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

و سنتزی در مواد غذایی، انجام شده است. در همین زمینه تلاش زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است.امروزه در صنعت از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانندBHT، BHA یا TBHQ برای به تأخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدها استفاده می‌شود، اما به دلیل اثرات بد تغذیه‌ای و سرطان‌زا بودن این ترکیبات استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موردتوجه محققین قرار گرفته است. از طرفی میزان و نوع ترکیبات شیمیایی گیاهان تحت شرایط مختلف اقلیمی متفاوت می‌باشد. در کشور ما نیز با توجه به تنوع زیاد آب و هوایی و شرایط اکولوژیکی حاکم بر رویشگاه‌ها، توزیع کمی و کیفی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان علفی و درختی مناطق مختلف متفاوت می‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت این ترکیبات برای بشر و افزایش عوامل تولیدکننده رادیکال‌های آزاد و مواد اکسیدان، بررسی وجود مواد آنتی‌اکسیدان و ارتباط عوامل محیطی با تولید و تجمع این ترکیبات در گیاهان می‌تواند بسیار مفید باشد. گیاهان منبع غنی از ترکیبات پلی فنولی می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی این توانایی را دارند که رادیکال‌های آزاد را، قبل از اینکه واکنش‌های زنجیری اکسایشی را در غشای سلول و یا بخش‌های حاوی لیپید در سلول راه بیندازند، پاک‌سازی کنند. جمع‌آوری گونه‌های واکنش‌گر رادیکالی اثر شاخصی بر پایه‌ی ترکیبات سلولی آسیب‌پذیر داشته و موجب تأمین سلامتی سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شود. درواقع عملکرد به‌موقع آنتی‌اکسیدان‌ها در مهار واکنش‌های اکسایشی رادیکال‌ها ضامن سلامتی موجود است. امروزه گیاهان به‌عنوان یکی از منابع مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدان مطرح بوده و ازنظر پژوهش‌های بالینی موقعیت ممتازی دارند (۷، ۹، ۱۰).

عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی، به‌طور فزاینده‌ای در صنعت مواد غذایی موردتوجه قرار گرفته‌اند. زیرا این مواد قادر به تأخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدها بوده و ازاین‌رو منجر به بهبود کیفیت و ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی می‌شوند (۱۷). منشأ بسیاری از مواد دارویی و درمانی به دلیل متابولیسم ثانویه گیاهان است و ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و دارویی جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان به شمار می‌روند (۵). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی را در جلوگیری از بروز سرطان از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی دارند. خواص آنتی‌اکسیدانی سلولی را می‌توان از طریق رژیم غذایی بهبود بخشید (۶).

داروهای سنتزی و شیمیایی در کنار وظیفه‌ی اصلی خود یعنی درمان یک نوع بیماری عوارض جانبی نیز نشان می‌دهند. به‌طوری‌که برخی از داروهای مهم صنعتی بعد از چند سال از طرف سازمان بهداشت جهانی کاملاً مضر اعلام‌شده و از گردونه خارج می‌شود. این مشکل برای همه‌ی داروها وجود دارد و ترکیباتی که در شیمی‌درمانی و برای سرکوب سرطان به کار می‌روند، اثرات مخرب جبران‌ناپذیری دارند و اکثراً بافت‌های حساس بدن مثل کلیه، کبد و مغز استخوان را مورد هجوم قرار می‌دهند. گیاهان دارویی ازنظر محتوای شیمیایی (فیتوشیمی) و نیز راهکارهایی برای درمان بیماری‌ها جایگزین مناسبی برای داروهای سنتزی می‌تواند باشد. در صورت شناسایی گونه‌های مختلف گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و بررسی اینکه چه اندام‌هایی از گیاهان دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند، زمینه را در تولید داروهایی که بدن را در برابر رادیکال‌ها محافظت می‌کند، مساعد می‌کند؛ و هم‌چنین با کسب اطلاعات کافی در زمینه ارائه رژیم غذایی گیاهی مناسب کمک می‌کند (۱۳، ۱۵).

در این پژوهش از اجزای مختلف چهار گیاه، برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. هدف از انتخاب این گیاهان، مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف گیاهان اعم از اندام‌های هوایی و میوه و صمغ می‌باشد که در طب سنتی نیز به‌عنوان داروهای آنتی دیابتی مصرف می‌شوند. اندام‌های هوایی گیاهان علفی (بارهنگ)(plantago. major (Pl، (شبدر) (Tr) trifolium. subterraneum و بخش‌هایی از میوه درخت (گردو) Juglans. regia اعم از پوست سبز میوه تحت عنوان پوشینه گوشتی روی میوه (اپی کارپ) (Ju.h) و استخوان‌های مغز میوه (Ju) تحت عنوان دیواره بزرگ و کوچک درونی و همچنین صمغ درخت (کندر)(Boswellia. thurifera (Bo موردمطالعه قرار گرفت (۳).

ازنظر ترکیبات شیمیایی، کندر دارای حدود ۲۵ درصد صمغ غیرمحلول در الکل و یک رزین و مقداری اسانس است، قسمت غیرمحلول آن در الکل دارای مواد آرابین و باسورین است و قسمت محلول آن در الکل دارای رزینی به نام اولیبانورزن، یک اسید آزاد به نام اسید بوسولیک، یک ماده‌ی تلخ و اسانس می‌باشد. همچنین در اسانس کندر علاوه بر پینن، دیپانتن و فلاندرن مقداری از یک نوع الکل به نام اولیبانول وجود دارد (۱). پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره کندر توسط (Baratta, et al.1998) ارزیابی شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان داده است (۱۹).

ترکیبات پوسته سبز میوه گردو دارای امولسیون، قند و اسیدهای آلی ازجمله اسیدسیتریک، اسید مالیک، فسفات‌ها و اگزالات کلسیم، نشاسته، املاح، تانن، ژوگلون و ژوگلاندین می‌باشد. همچنین پوست سبز میوه گردو دارای ۰/۹۵ درصد پتاسیم، ۰/۸۴ درصد ازت، ۰/۷۸ درصد فسفر، ۰/۴۹ درصد کلسیم و ۰/۱۰ درصد منیزیم می‌باشد (۲). طی مطالعه‌ای از پوسته سبز گردو ۱۶ ترکیب جداسازی شده است که ۵ تای آن‌ها شامل فنولیک اسید بوده است (۲۳).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

برگ و ریشه گیاه بارهنگ دارای موسیلاژ، صمغ، اسیدهای آلی، انورتین، امولسیون، تانن، گلوکزیدی به نام اوکوبین (Aucubine) است. همچنین دانه گیاه مقدار زیادی موسیلاژ دارد که در اثر هیدولیز، Lآرابینوز، D –گالاکتوز، اسیدگالاکتورونیک، L - رافنوز و گزیلوز تولید می‌کنند (۱). عصاره بارهنگ دارای عوامل فعال فارماکولوژیکی ازجمله آلکالوئیدها و فلانوئیدها می‌باشد (۲۴). ثابت شده است که این ترکیبات به‌عنوان از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌کنند. بنابراین شاید بتوان اظهار داشت که بارهنگ بدین طریق موجب بازسازی جزایر پانکراس می‌شود (۲۵). در این راستا تحقیقی نیز باهدف بررسی تأثیر عصاره برگ بارهنگ بر تغییرات بافتی پانکراس و کلیه در موش‌های نر دیابتی صورت گرفته است که نتیجه نشانگر این است که عصاره بارهنگ می‌تواند اثر هایپوگلایسمی خود را از طریق بازسازی جزایر پانکراس اعمال کند و همچنین قادر به بهبود عوارض کلیوی ناشی از دیابت نیز می‌باشد (۲۶).

جنس trifolium شامل حدود ۳۰۰ گونه گیاهی است که گونه trifolium. subterraneum. در این تحقیق موردبررسی قرار گرفت. بر اساس تحقیقات بانک ژن گیاهی و ذخایر توراثی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، در ایران حدود ۵۴ گونه شبدر تاکنون شناخته شده است. مواد موجود در شبدر می‌توانند برای انسان خواص دارویی داشته باشند و مفید باشند مثلاً کومارین موجود در شبدر شیرین می‌تواند سبب توقف رشد سلول‌های سرطانی مثانه شود. همین‌طور فورمونتین موجود در شبدر قرمز از ارزش دارویی خاصی برخوردار است، آزمایش انجام‌گرفته در سال ۲۰۱۰ نشان داده است که فورمونتین می‌تواند از رشد سلول‌های سرطان سینه در زنان جلوگیری کند، اما مصرف آن سبب مشکلات جنسی در مردان می‌شود (۲۷).

مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی سرشاخه گلدار گیاه شبدر زیرزمینی نیز کومارین، اسید ملی‌لوتیک و اسانس می‌باشد (۱). طبق تحقیقات اخیر گونه شبدر حاوی ترکیباتی از قبیل فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، اسیدهای فنولیک و clovamides ها هستند؛ که بیانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های ضدالتهابی و مهارکننده آنژیوژنز و ویژگی‌های ضد سرطانی می‌باشد. شبدرهای دیگر از قبیل *T. pretense* به نظر می‌رسد که منبعی از مواد شیمیایی مختلف از قبیل ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدهای مختلف است. اگرچه استفاده درمانی این‌گونه شبدرها به‌طور عمده به دلیل فقدان شواهد کلینیکی کم است. بنابراین تحقیقات زیادی در این زمینه لازم است. تابه‌حال آنالیز شیمیایی شبدرها که توسط.Oleszek et al انجام گرفته است؛ که بر اساس محتوای شیمیایی شبدرها در ۵ دسته تقسیم شده‌اند؛ که گونه موردبررسی در این تحقیق نیز در دسته اول قرار دارد و دارای بالاترین مقدار ایزوفلاون (۵۱-۹۷ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) می‌باشد (۲۸).

مواد و روش کار

مواد گیاهی: اندام‌های هوایی دو گیاه علفی بارهنگ و شبدر و بخش‌هایی از میوه درخت گردو از منطقه مراغه استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید، به کمک تیم گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان شرقی شناسایی شدند. صمغ درخت کندر نیز از عطاری شهر مراغه تهیه گردید.

تهیه عصاره متانولی:

اندام‌های هوایی دو گیاه علفی بارهنگ و شبدر و پوست سبز میوه گردو تحت عنوان پوشینه گوشتی روی میوه (اپی کارپ) و استخوان‌های مغز میوه گردو تحت عنوان دیواره بزرگ و کوچک درونی، به‌طور جداگانه به‌دوراز تابش نور در دمای اتاق کاملاً خشک گردید. نمونه گیاهی کندر نیز به‌صورت صمغ بود نیازی به خشک‌کردن نداشت و سپس در آسیاب به‌صورت پودر درآورده شد. نمونه‌ها به‌طور جداگانه در بشرها ریخته شده و به روش خیساندن (Maceration) عصاره‌گیری شدند. حلال هرکدام از نمونه‌ها توسط دستگاه سوکسله جدا گشت. بقیه متانول در بن ماری با درجه حرارتC ۵۰ تبخیر شده و عصاره قیر مانندی حاصل شد.

سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به روش DPPH:

این روش بر اساس توانایی ترکیب موردنظر در دادن الکترون یا هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH و درنتیجه مهار رادیکال آزاد DPPH استوار است و بر پایه گزارش shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام شده است. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)یک رادیکال آزاد پایدار است که می‌تواند یک الکترون یا هیدروژن را قبول کند و به یک مولکول خنثی و پایدار تبدیل شود. این ماده به دلیل دارا بودن الکترون منفرد دارای جذب قوی در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد؛ که در این مرحله، محلول متانولی آن به رنگ بنفش پررنگ است. در حضور آنتی‌اکسیدان این تک الکترون می‌تواند به‌صورت جفت الکترون دربیاید. نسبت به تعداد الکترون دریافتی، جذب به‌صورت وابسته به غلظت کاهش می‌یابد. رنگ محلول در این مرحله به زرد یا بی‌رنگ تغییر می‌کند. با استفاده از این تغییر جذب می‌توان توانایی ترکیبات مختلف را به‌عنوان مهارکننده رادیکال آزاد سنجید. درواقع میزان تغییر در جذب هر نمونه به قدرت و توانایی جاذب رادیکال بستگی دارد (۱۱، ۲۲، ۱۴).

عمل احیا شدن DPPH و کاهش جذب در طول‌موج 517 nm، در دمای اتاق و پس از گذشت ۵ دقیقه از شروع واکنش صورت می‌گیرد. مزیت مصرف DPPH، این است که در زمان کوتاهی می‌توان تعداد زیادی نمونه را اندازه‌گیری نمود و نیز از حساسیت

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

کافی برخوردار است. پس در مراحل اولیه غربالگری نمونه‌ها، می‌توان از آن استفاده کرد (۱۲، ۱۵).

غلظت‌های انتخابی از عصاره‌ها (۱۰-۳۰-۵۰-۷۰-۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر به محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد، به‌طوری‌که حجم نهایی برابر ۲ میلی‌لیتر شد. جذب محلول بعد از ۵ دقیقه در طول‌موج 517nm خوانده شد. این کار تا ۳۰ دقیقه تکرار شد. برای مقایسه جذب نمونه‌ها از محلول DPPH به‌عنوان بلانک استفاده شد.

فعالیت جمع‌آوری رادیکال بر اساس درصد رادیکال جمع‌آوری‌شده DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (۲۲):

میزان جمع‌آوری (٪) = [جذب کنترل – جذب نمونه] / جذب کنترل × ۱۰۰

سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به روش FRAP:

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها از سال ۱۹۹۶ روشی به نام FRAP (Ferric Reduciting Ability of Plasma) معمول شد. اساس این روش، توانایی ماده موردنظر در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) با استفاده از معرفی به نام TPTZ (Trypyridyl-S-Triazine) می‌باشد. در حضور آنتی‌اکسیدان یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) احیا می‌شود و در حضور معرف TPTZ، محلول به رنگ بنفش در می‌آید. نسبت به میزان قدرت احیاکنندگی، جذب به‌صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. با استفاده از این تغییر جذب می‌توان خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف را سنجید. افزایش جذب در طول‌موج ۵۹۳nm پس از گذشت ۱۰ دقیقه از شروع واکنش صورت می‌گیرد (۱۲،۱۴).

محلول FRAP حاوی ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات (PH = ۳/۶)، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن III و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰TPTZ میلی‌مولار در اسیدکلریدریک ۴۰ میلی مولار به‌صورت تازه تهیه شد. غلظت انتخابی از عصاره‌ها ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محلول FRAP اضافه شد، به‌طوری‌که حجم نهایی برابر ۲ میلی‌لیتر شد. جذب محلول بعد از ۲۰ دقیقه در طول‌موج ۵۹۳nm خوانده‌شد.

منحنی استاندارد نیز بر اساس غلظت‌های مختلف سولفات آهن (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی مولار) در مقابل بلانک (آب) رسم گردید.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش پاک‌سازی رادیکال ABTS:

ABTS [2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium] ماده شیمیایی است که در حضور MnO_2 فعال شده و تبدیل به نوعی رادیکال آزاد مثبت می‌شود. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش پاک‌سازی رادیکال ABTSیک روش اسپکتروفتومتری است که به‌طور گسترده برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد مختلف استفاده می‌شود.

۵۴/۲ میلی‌گرم از ABTS در بافر فسفات (pH= 5, 7mM) حل شد و با افزودن یک گرم از MnO_2 رادیکال‌های آزاد $ABTS^+$ فعال تولید شد. این محلول جهت تکمیل واکنش به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حضور سه غلظت مختلف (۱۰، ۱۵، ۲۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها بررسی‌شد. بعد از 20min جذب آن‌ها در همان طول‌موج خوانده شد. جهت مقایسه نتایج، کرستین در سه غلظت ذکر شده به‌عنوان شاهد و محلول ABTS بدون افزودن نمونه به‌عنوان بلانک استفاده شده است (۱۷).

سنجش میزان فنول کل نمونه‌های گیاهی:

محتوی فنول کل نمونه با استفاده از واکنش‌گر Folin–Ciocalteu’s اندازه‌گیری شد، به‌طوری‌که ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده همراه با دو میلی‌لیتر Na_2Co_3 (2%W/V) در لوله آزمایش ریخته و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر واکنش‌گر Folin–Ciocalteu’s phenol (۵۰ درصد) به آن اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و سپس میزان جذب آن در طول‌موج720 nm خوانده شد.

برای مقایسه و به‌دست آوردن منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کرستین در حلال متانول استفاده شد. ابتدا غلظت ۱mM از آن تهیه و سپس غلظت‌های (۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰) میلی مولار آماده شدند. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر غلظت به جای نمونه ریخته شده و میزان جذب آن در طول‌موج ۷۲۰ nm خوانده شد (۱۸).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید تام:

محتوای فلاونوئید تام با روش رنگ‌سنجی ارائه شده توسط Kaijv, Sheng and Chao انجام شد. به‌طوری‌که بر روی ۲۵ میلی‌لیتر نمونه، ۷۵ میکرولیتر $NaNo_2$ (5% w/v) و ۰/۱۵ میلی‌لیتر $AlCl_3$ (10% w/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر NaOH (1mol/L) اضافه شد. با افزودن آب مقطر حجم نهایی به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول پس از ۵ دقیقه در طول‌موج ۵۰۷nm خوانده شد. برای مقایسه و به‌دست آوردن منحنی استاندارد از غلظت‌های (۱، ۲/۵، ۵) میلی مولار کرستین در حلال متانول استفاده شد (۱۲).

یافته‌ها

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان ترکیبات بیولوژیکی مثل عصاره‌های گیاهی در in vitro روش‌های متعددی در منابع است. از این میان، در این طرح روش‌های DPPH، FRAP و ABTS برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها استفاده شده‌اند.

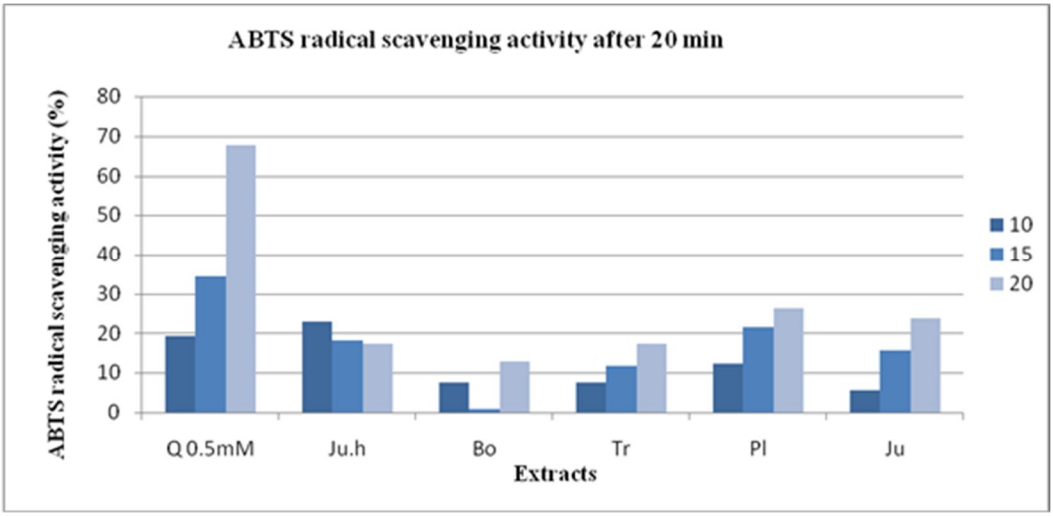
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

در روش DPPH بررسی نتایج به‌دست آمده نشان داد که ۵ غلظت مختلف از نمونه‌های(Ju) ، (Pl)، (Bo) در زمان ۱۰ دقیقه بعد از افزودن محلولDPPH بیشترین درصد مهاری را در مقایسه با سایر نمونه‌ها نشان دادند. مقایسه میزان فعالیت عصاره‌ها (IC_{50}) برای پاک‌سازی ۵۰ درصد از رادیکال‌های DPPH پس از ۱۰ دقیقه نیز بیانگر این بود که عصاره‌های (Ju)، (Pl) و (Bo) به‌ترتیب با میزان IC_{50} (۲/۹۳، ۱۳۲/۱۵ و ۱۳۱/۹۶) دارای بیشترین درصد مهاری نسبت به بقیه عصاره‌ها بودند.

با بررسی نمودار (۱) مشاهده می‌شود که عصاره Pl و عصاره Ju.h در غلظت کم یعنی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانایی بالاتری در جمع‌آوری رادیکال مثبت ABTS نسبت به نمونه‌های دیگر را دارا می‌باشد. همچنین جذب محلول‌ها به‌جز نمونه Ju.h با افزایش غلظت تغییر می‌نماید که نشانگر غیرفعال شدن رادیکال‌های آزاد بیشتری در غلظت‌های بالاتراست.

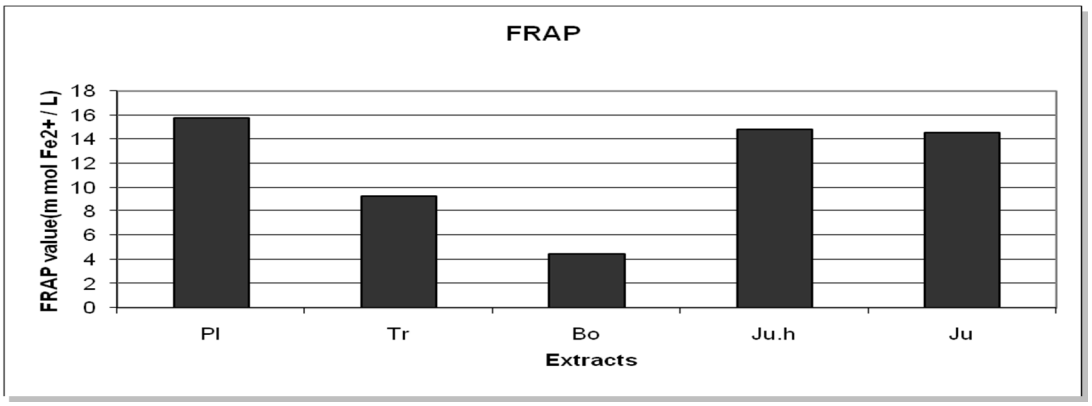
جدول (۱): میزان غلظت موردنیاز از عصاره‌ها (IC_{50}) برای پاک‌سازی ۵۰ درصد از رادیکال‌های DPPH (پس از ۱۰ دقیقه)

عصاره‌ها	IC_{50}
Tr	۱۵۶/۴۳
Pl	۱۳۲/۱۵
Ju.h	۲۵۸/۴۶
Ju	۲/۹۳
Bo	۱۳۱/۹۶



نمودار (۱): بررسی فعالیت جمع‌آوری رادیکال‌های ABTS در سه زمان مختلف توسط عصاره‌های گیاهی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با نمونه کرستین ۰/۵ میلی‌مولار

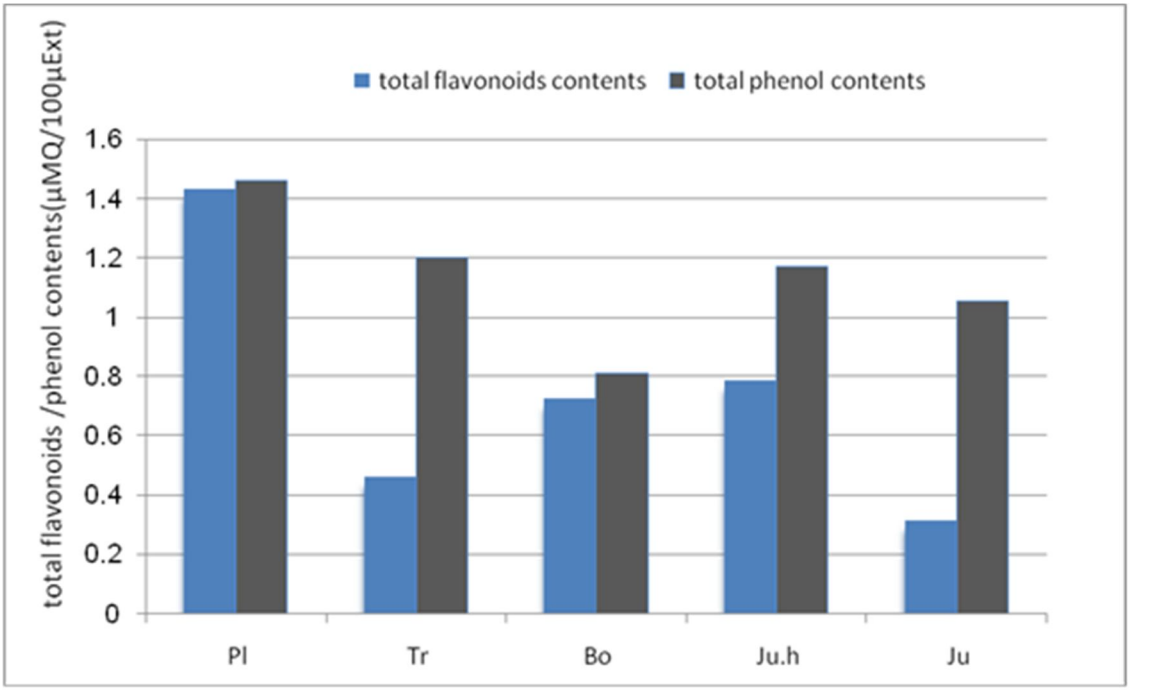
اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی (غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با روش FRAP نشان داد که نمونه‌های Pl، Ju.h، Ju نسبت به عصاره‌های دیگر فعال بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهد.



نمودار (۲): نتایج تست FRAP برای ارزیابی پتانسیل تام آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

با بررسی نمودار (۳) به این نتیجه می‌رسیم که میزان ترکیبات فلاونوئیدی و محتوای فنولی در نمونه‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی,Ju.h Pl وJu) بیش از بقیه نمونه‌ها می‌باشد؛ و می‌توان گفت رابطه مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان محتوای فنولی نمونه‌ها وجود دارد. عصاره‌های شبدر به خصوص کندر باوجود دارا بودن محتوای فنولی بالا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان ندادند.



نمودار (۳): تغییرات مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی تام عصاره‌ها به‌صورت هم‌ارز با µMQ

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنولی (اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها و تانن‌ها) هستند. که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌آیند. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی به لحاظ محافظت بدن در مقابل استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت حائزاهمیت هستند. مطالعات زیادی در زمینه خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی انجام گرفته است (۲۹، ۱۸). در این مطالعات گیاهانی که ترکیبات فنولی بالایی داشتند دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نیز بوده‌اند. نتایج سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند که گیاهانی با ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بالا، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند (۱۸، ۲۹). از طرف دیگر به نظر می‌رسد که ترکیبات فنولی که به‌صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند، به‌صورت مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، لذا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر عمل می‌کنند. در ضمن شاید پایین بودن میزان ترکیبات غیر قطبی در گیاهان دلیل پایین بودن میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های غیر قطبی ازجمله هگزان باشد (۲۱). در برخی موارد نیز علی‌رغم بالا یا پایین بودن ترکیبات فنولی خواص آنتی‌اکسیدانی متناسب با این ترکیبات نیست که بیانگر عوامل تأثیرگذار دیگر است که در این گیاهان وجود دارد و طی واکنش‌هایی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارند (۳۰). طی گزارشی که Sengulو همکاران ارائه دادند، هیچ ارتباطی بین محتوای فنولی کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد (۴). همچنین محتوای فنولی تعیین شده بر اساس متد Folin–Ciocalteu اندازه‌گیری خالص و قطعی از مقدار محتوای فنولی نیست. انواع مختلف ترکیبات فنولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوعی دارند که به ساختارشان وابسته است. عصاره‌های گیاهی مختلف ممکن است شامل انواع متفاوتی از ترکیبات فنولی باشند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مختلفی دارند (۳۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که IC_{50} در مهار رادیکال پایدار DPPH برای عصاره استخوان مغز گردو دارای کم‌ترین مقدار است؛ و از طرفی بررسی سنجش‌های ABTS وFRAP نیز نشان داد که عصاره‌های استخوان مغز گردو، پوسته سبز گردو و بارهنگ نسبت به عصاره‌های دیگر فعال‌تر بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

نشان می‌دهند. بررسی محتوای فلاونوئیدی و فنولی تام عصاره‌ها نیز بیانگر این است که به‌ترتیب عصاره بارهنگ دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی و فنولی و همچنین همه عصاره‌ها به‌جز کندر دارای بیشترین محتوای فنولی می‌باشند.

این تحقیق حاکی از این بود که بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد. شبدر باوجود بالا بودن میزان ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم‌تر از حد انتظاری نشان داد؛ و کندر نیز باوجود دارا بودن محتوای فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم و نامنظمی از خود نشان داد. نتیجه آن‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی فقط بر اساس محتوای فنولی آن‌ها توضیح داده نمی‌شوند. بلکه نیازمند موارد دیگر نیز هستند؛ و با توجه به این‌که ترکیبات فنولی با ساختار مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی متنوعی دارند. درنتیجه به‌طورقطع نمی‌توان گفت همیشه رابطه مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نمونه‌ها وجود دارد. به‌علاوه عصاره‌ها شامل ترکیبات خیلی پیچیده و متنوعی از ترکیبات مختلف با فعالیت مشخص و متفاوتی هستند. پس صرفاً با میزان محتوای فنولی عصاره‌ها، نمی‌توان در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نظر داد.

References:

1. Fallahian F. Medicinal plant of Iran. 1st ed. Tehran: vahede oloom tahghighat pub; 2006. (Persian)
2. Tabatabaiy A, Dehlavi D. Hycory and pecan walnut. 1st ed. Tehran: Jahad Daneshgahi pub; 1992. (Persian)
3. Mozafarian V. Iran plants names culture. Tehran: Farhange Moasere Iran pub; 1996. (Persian)
4. Sengul M, Yildiz H, Gungo N, Cetin B, Eser Z. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak J Pharm Sci 2009; 22(1): 102-6.
5. Maganha EG, Halmenschlager RC, Rosa RM, Henriques JAP, Ramos ALLP, Saffi J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. Food Chemistry 2010;118(1): 1-10.
6. Maghsoudlou Y, Rabiyi H, Sadeghi mahunak A. Determining the total content of phenolic and flavonoids compounds and antioxidant properties of mentha aquatique methanol extracts. Electronic J Processing Food Storage 2010; 43-56.
7. Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. J Sci Food Agric 2000;80(11):1686–90.
9. Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro E, Dominguez H. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. Food Chem 2009; 114: 806-12.
10. Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Stephen N, Gowda R.L, et al. Edible Japanese seaweed, wakame (Undaria pinnatifida) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. Food Chem 2009; 115: 501–8.
11. Horzic´D, Komes D, Belscak A, Kovacevic´ Ganic´ K, Ivekovic´ D, Karlovic´ D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. Food Chem 2009; 115: 441–8.
12. WHO Database World health organization. Fact sheet number; 2003,134. Available from: http: //www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html
13. Ackernecht EH. Therapeutics From the Pirimitives to the twentieth century. New York: Hanfer Press; 1973.
14. NCCAM Website National Center for Complementary and Alternative Medicine; 2005. Available from: http: //nccam.nih.gov/health/whatiscam/.
15. Issa AY, Volatea SR, Wargovichb MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation, New directions and perspectives. J Food Compos Anal 2006; 19: 405- 19.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

16. Lachman J, Hamouz K, Sulc M, Orsak M, Pivec V, Hejtmankova A, et al. Cultivar differences of total anthocyanins and anthocyanidins in red and purple-fleshed potatoes and their relation to antioxidant activity. Food Chem 2009; 114: 836-43.
17. Shukla Sh, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of etha nolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Food Chem Toxicol 2009; 47: 2338-43.
18. Jamshidi M, Ashtiani HR, Rezazade Sh, Fathiazad F, Mazandarani M, Khaki A. Evaluation and Comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some plant species in mazandaran. J Med Plants 2010; 34(2): 177-83.
19. Hussain H, Al-Harrasi A, Green IR. Frankincense (Boswellia) Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety Elsevier; 2016. p. 431–40.
20. Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. Food Chem 2007; 104: 997-1005.
21. Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Mohamadian M. Evaluate the performance of the antioxidant water, methanol and ethanol extract cumin and Blghst in vitro. J Gonabad Univ Med Sci Health Services 2010; 16(2): 37-45.
22. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J Agric Food Chem 1992; 40: 945-8.
23. Du H, li C, Wen Y, Tu Y, Zhong Y, Yuan Zh, Li Y, Liang B. Secondary metabolites from pericarp of Juglans regia. Biochem Syst Ecol 2014; 54: 88-91.
24. Mehrabian S, Majd A, Dana A. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of vegetative and generative parts of Plantago major l. In langrood (gilan) and hesarak (karaj) areas. Q J Biol Sci 2009; 1(2): 23-31.
25. Zhang D, Hamauzu Y. Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (Daucus carota L.). Food Agric Environ 2004; 2 (1): 95-100.
26. Nejati V, Khaneshi F. Effect of hydro-alcoholic extract of Plantago major leaf on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Qom Univ Med Sci J 2013; 7(5): 14-20.
27. Mollazadeh M. Forage plants. Comprehensive reference crops: Volume II. Tehran: Amouzesh va tarvije keshavarzi pub; 2012. (Persian)
28. Kolodziejczyk-Czepas J. Trifoliumspecies-derived substances and extracts —Biological activity and prospects for medicinal applications. J Ethnopharmacol 2012; 143: 14-23.
29. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr J Biotechnol 2006; 5(11): 1142-5.
30. Mortazaie S, Rafiyian M, Ansari-samani R, Shahinfard N. Compare the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity of eight clinical plants. Univ Rafsanjan Med Sci 2013; 519-30.
31. Kaur S, Mondal P. Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. J Microbiol Experiment. 2014; 1(1): 00005.

Original Article

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT ACTIVITY WITH DIFFERENT AMOUNTS OF PHENOLIC COMPOUNDS

Ziba Mirzaee[1], Gholamreza Dehghan[2]*

Received: 9 Feb, 2016; Accepted: 12 Apr, 2016

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:39 +0430 on Wednesday June 20th 2018

Abstract

Background & Aims: The aim of this study was to evaluate and compare the antioxidant activity and the collecting rate of free radicals in the environment of in vitro, by utilizing the methanol's extracts from different parts of the plants such as Plantago major, Trifolium subterraneum, Boswellia thurifera, Juglans regia (walnut).

Materials & Methods: Antioxidant and antiradical activities were determined using reducing power, ferric-reducing antioxidant potential (FRAP) ability to scavenge DPPH radical assays and ABTS methods. Moreover, the phenol and flavonoid contents were determined using UV/Vis spectrophotometric methods.

Results: The results showed that the rate of IC50 in the inhibition of (DPPH) stable radical for the extracts of walnuts inner shell was 2.93. The assessment of ABTS and FRAP also showed that the extracts of walnuts inner shells, green shells cover of walnut and plantago in compared with the other extracts were more active and showed the higher level of antioxidant activity. The results of total phenol and flavonoid contents also showed that the extract of plantago contains the highest level of flavonoid, and also all of extracts excluding Boswellia contain the highest level of phenolic compounds. On the other hand, Trifolium despite of the high levels of phenolic compounds showed the lower level of the antioxidant activity.

Conclusion: Results showed a significant relationship between the phenol content and the antioxidant activity of the extracts. Also the phenolic compounds with different structure have shown various antioxidant activities. Therefore the antioxidant activity of the plant's extracts could not be explained just on the basis of their phenolic content but also required other characterization. Consequently, there is not a conclusive and direct relationship between the antioxidant activity and the phenol and flavonoid contents.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP, Flavonoids

Address: M.Sc Student in Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran
Tel: +989143223832
Email: ziba.mirzaee@znu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(4): 329 ISSN: 1027-3727

[1] *M.Sc Student in Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran*