ORIGINAL ARTICLE

Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus communis L.)

Shokofeh Mozdastan[1],
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[2],
Masoumeh Khalili[3]

[1] Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Student in Pharmaceutical Sciences, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 2, 2015 ; Accepted July 14, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Myrtus communis L. (Myrtle, Myrtaceae)* is a known medicinal plant used in traditional medicine worldwide. It is a well-known plant with distinctive antioxidant activity. In this study we investigated the impact of extraction methods on total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of Myrtle (*Myrtus communis L.*) leaf.

Materials and methods: The shade-dried leaf was extracted by three different methods including meceration, ultrasonic assisted, and soxhlet assisted extraction. Antioxidant capacity was assessed using four different methods: DPPH and nitric oxide (NO) free radicals scavenging, reducing power and iron chelating activity. The total phenolic and flavonoid contents were also identified. The data were analyzed by analysis of variance and the means separated by Newman-Keuls Multiple Comparison test (GraphPad Prism 5).

Results: The highest yield of extraction was achieved with soxhlet assisted extraction. It also showed highest amount of total phenolics and flavonoids contents. In DPPH radical scavenging activity, the soxhlet extract (IC_{50} = 11.3 ± 0.3 µg ml) had a higher activity which was significantly different from other extracts ($P< 0.05$). All extracts were stronger than BHA ($P<0.001$). This extract had higher iron chelating activity, too. It was significantly more potent than ultrasonic ($P<0.01$) and maceration extracts ($P<0.001$). But EDTA was so stronger than other extracts ($P<0.001$). In reducing power assay, maceration extract showed the highest activity ($P<0.001$). In nitric oxide radical scavenging activity, IC_{50} for ultrasonic extract, soxhlet assisted extraction and maceration extract were 355.1, 402.9, and 173.3 µg/ml, respectively. Here, the maceration extract showed the highest activity, too ($P<0.001$).

Conclusion: The results clearly indicate that extraction methods used in this study significantly affected antioxidant capacities and total phenolic and flavonoids contents. Soxhlet assisted extraction and maceration methods were found to be more efficient in extraction of antioxidant components of Myrtle.

Keywords: Myrtle, *Myrtus communis*, extraction methods, antioxidant, total phenolics, total flavonoids

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 10-24 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۷ مرداد سال ۱۳۹۴ (۲۴-۱۰)

مقایسه اهمیت روش های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی برگ گیاه مورد *Myrtus communis*

شکوفه مزدستان[۱]
محمد علی ابراهیم زاده[۲]
معصومه خلیلی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: گیاه مورد از خانواده میرتاسه یکی از گیاهان داروئی مهم بوده که در سراسر دنیا در طب سنتی به کار می‌رود. این گیاه بسیار شناخته شده بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثبات شده‌ای دارد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه این گیاه طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: برگ‌های گیاه مورد، در سایه خشک شده و به قطعات ریز خرد شدند. عصاره‌گیری به سه روش ماسیراسیون، با کمک سوکسله و با کمک امواج التراسونیک با حلال متانول انجام شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با چهار روش مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت: به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH و نیتریک اکساید، تست احیاکنندگی و بررسی فعالیت شلاته کنندگی آهن. علاوه بر آن محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی نیز اندازه گیری شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز توسط نرم‌افزار گراف پد پریسم ۵ به منظور مقایسه میانگین‌ها به‌کار رفت.

یافته‌ها: بالاترین راندمان عصاره گیری مربوط به سوکسله بود. این عصاره بالاترین میزان فنلی تام و فلاونوئید تام را نیز دارا بود ($p<۰/۰۰۱$). در به دام اندازی رادیکال DPPH عصاره حاصل از روش سوکسله (IC_{50}=۱۱/۳ ± ۰/۳ µg/ml) اختلاف معنی‌داری با عصاره‌های حاصل از دو روش دیگر داشت ($p<۰/۰۵$). هر سه عصاره قوی‌تر از BHA بودند ($p<۰/۰۰۱$). در تست شلاته‌کنندگی آهن، عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌تر از عصاره‌های دیگر بود. توانایی عصاره سوکسله در شلاته کردن آهن از نظر آماری به طور معنی‌داری از عصاره التراسونیک ($p<۰/۰۱$) و ماسیراسیون ($p<۰/۰۰۱$) بالاتر بود. فعالیت تمامی عصاره از EDTA که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، ضعیف تر بود ($p<۰/۰۰۱$). در تست قدرت احیاکنندگی، عصاره حاصل از ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). در تست قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید، میزان IC_{50} برای عصاره‌های به دست آمده از روش اولتراسونیک، ۳۵۵/۱ برای روش سوکسله ۴۰۲/۹ و برای روش ماسیراسیون ۱۷۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. در این تست نیز، عصاره‌ی حاصل از ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. اختلاف بین تمامی مقادیر از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۱$).

استنتاج: نتایج به وضوح نشان داد که استفاده از روش استخراج، تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. در مورد این گیاه، روش عصاره‌گیری با سوکسله و ماسیراسیون مناسب تر از التراسونیک تعیین شد.

واژه های کلیدی: میرتل، میرتوس، روش استخراج، آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید

مقدمه

نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به خوبی به اثبات رسیده است(۱). واکنش‌های بیوشیمیائی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید نموده که توانائی تخریب بیومولکول‌ها را دارا می‌باشند. این

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۰۶- ۹۲ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: محمدعلی ابراهیم زاده- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاه پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: zadeh20@yahoo.com
۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکترای شیمی دارویی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۲/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۲۳

اثر زیان بخش رادیکال‌های آزاد، می‌تواند توسط مواد آنتی‌اکسیدان بلوکه گردد. این ترکیبات موجب به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد شده و موجب سمیت‌زدائی می‌گردند. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان(۲) و بیماری‌های دژنراتیو (پارکینسون و آلزایمر)(۳) بازی می‌کنند. نظر به این که گیاهان، منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است(۴).

گیاه مورد Myrtle(*Myrtus communis* L.,Mirtaceae) گیاهی است که به طور گسترده در طب سنتی به کار می‌رود. این گیاه همیشه سبز بوده و بومی آسیاست. علاوه بر آن در نواحی مدیترانه نیز وجود دارد(۵). امروزه محققان علاقه زیادی به این گیاه نشان می‌دهند(۶). گزارشات اخیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف مورد را نشان می‌دهد(۹-۷). این جنس دارای ۵۶۵۰گونه بوده که به مقدار زیادی اسانس در برگ، گل و میوه آن دارند(۱۰). گیاه مورد مصارف فراوانی دارد. برگ‌ها به عنوان چاشنی، به خصوص برای گوشت به‌کار می‌روند. از برگ و میوه‌های آن نوشیدنی تهیه می‌شود. این گیاه کاهنده چربی خون(۱۱)، ضد درد(۱۲) و ضد میکروب(۱۰) می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده مانند فلاونوئیدها (کوئرستین)، اسیدهای فنولیک (کافئیک اسید)، تانن‌ها و آلفا توکوفرول از مورد جدا شده‌اند(۱۳،۸). ترکیبات منحصر به فردی از برگ‌ها جدا شده‌اند که اثر قوی ضد میکروبی و ضد التهابی دارند(۱۴). این گیاه به عنوان ضد درد و ضد التهاب، در درد معده، کاهنده قند خون، در درمان سرماخوردگی و بیماری‌های دهان، ضد میکروب، در درمان یبوست، اشتها آور، ضد خون‌ریزی و به صورت خارجی در درمان زخم‌ها به کار می‌رود(۱۵،۵). از میان عصاره دم کرده گیاهان مختلف، عصاره برگ مورد یکی از قوی‌ترین عصاره‌های دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی می‌باشد(۱۰). برگ‌ها در درمان زخم معده، عفونت‌های دستگاه گوارش و اسهال خونی به کار می‌روند(۶). دانه‌های این گیاه حاوی ۶۴ درصد اسید چرب اولئیک اسید است. علاوه بر آن پالمتیک اسید و استئاریک اسید نیز به میزان زیاد وجود دارد(۱۶). برگ‌ها حاوی تانن، فلاونوئیدها مانند کاتشین و اسانس هستند(۱۳). میوه‌ها عمدتاً حاوی روغن‌های فرار، تانن‌ها، قند، فلاونوئید و اسیدهای آلی مانند سیتریک اسید و کالیک اسید می‌باشند(۱۷). در طب سنتی ترکیه، برگ‌ها و میوه‌ها به عنوان آنتی‌سپتیک، در درمان زخم‌ها و در درمان بیماری‌های ادراری به کار می‌روند(۵). بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی مربوط به زمان گل‌دهی (اگوست) گزارش شده است(۱۸). فعالیت آنتی‌موتاژنیک عصاره‌های مختلف گیاه مورد، مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره‌های اتیل استاتی و متانلی بهترین فعالیت را از خود نشان دادند(۱۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شناسایی اجزای اسانس برگ، ساقه و گل این گیاه از کشور تونس اخیرا بچاپ رسیده است(۲۰). در این گیاه، بالاترین محتوای تام فنلی در برگ و بالاترین مقدار تام فلاونوئید از ساقه گزارش شده است(۲۰).

امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره‌های گیاهی صورت می‌گیرد تا این که به نمونه‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا دست یابند. چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می‌باشند. در سال‌های اخیر توجه فراوانی به ارائه متدهای جدید استخراج شده است، به گونه‌ای که بیش‌ترین اجزای اصلی، در کوتاه‌ترین زمان ممکن با کم‌ترین قیمت به دست آید(۲۱). این تحقیق به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر قدرت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه مورد انجام شده است. بدین منظور عصاره‌ها با کمک سوکسله و امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز تهیه شده و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با فعالیت عصاره تهیه شده از روش

کلاسیک ماسیراسیون مقایسه شده‌اند. خاصیت شلاته‌کنندگی آهن، به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد نیتریک اکساید و DPPH و هم‌چنین تست احیاکنندگی به منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به کار رفت. علاوه بر این، محتوای تام فنل و فلاونوئید تمامی عصاره‌ها نیز تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید.

مواد و روش ها

نمونه گیاهی

برگ گیاه مورد توسط دکترای سیستماتیک گیاهی از استان لرستان جمع‌آوری و تایید شد. نمونه هرباریومی در هرباریوم دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر به شماره ۱۳۸۵ نگهداری می‌شود. برگ‌ها در سایه خشک شده، به قطعات ریز تبدیل شده و سپس عصاره‌گیری با روش های زیر با استفاده از متانول خالص انجام شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن

در این روش ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۵۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا و مجددا حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید.

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک

در این روش، از امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه به مدت یک ساعت استفاده شد. ۱۰ گرم برگ ریز شده 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 به دست آمده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید(۲۲).

تهیه عصاره به روش سوکسله

در این روش ۱۰ گرم برگ ریز شده 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 تبخیرکننده چرخان حذف گردید(۲۳).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد(۲۴). غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت 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 به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۲ بار تکرار شد(۲۴). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد(۲۵). غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراءبنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین درگرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات۲ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش شد(۲۴).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. ویتامین ث و BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC_{50} به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاک‌سازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right) \times 100$$

A_B=جذب بلانک،

A_S= جذب نمونه یا استاندارد(۲۵، ۲۶).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق متد ین و چن ارزیابی شد. غلظت های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با pH= ۶/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید $[K_3Fe(CN_6)]$ مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید ($FeCl_3$) به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۲۵, ۴۰, ۸۰۰, ۵۰, ۱۰۰, ۲۰۰, ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد(۲۶،۲۵).

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتریت تولید می‌نماید. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می‌گیرد. به دام‌اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی‌مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند، مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره مورد (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک به کار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱درصد در اسید فسفریک ۲ درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن‌ها گزارش شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام‌اندازی هم طبق فرمول زیر محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right) \times 100$$

A_B=جذب بلانک،

A_S=جذب نمونه یا استاندارد(۲۵، ۲۶).

ارزیابی میزان شلات کنندگی آهن

اندازه‌گیری قدرت شلاته کنندگی آهن با روش دنیز انجام شد. به ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف هر عصاره ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۱ میلی لیتر محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شده و با آب به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در

دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین، با کمک فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right) \times 100$$

A_B= جذب بلانک و

A_S= جذب نمونه یا استاندارد EDTA به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. فعالیت شلاته کنندگی آهن به صورت IC_{50} بیان شد. در این آزمایش نیز محلول بلانک شامل تمامی اجزای شرکت‌کننده در واکنش به جز عصاره بود(۲۶،۲۵).

آنالیز آماری

تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت Mean ± SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) و متعاقب آن Newman-Keuls Multiple Comparison Test برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال p <۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد. نرم افزار گراف پد پریسم ۵ بدین منظور بکار رفت.

یافته ها

۳-۱-۱- بازده عصاره ها

پس از انجام عملیات عصاره‌گیری، وزن عصاره‌ها محاسبه شد و بازده هر یک از آن‌ها محاسبه شد. این مقادیر در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: استخراج عصاره به روش های مختلف

عصاره حاصل از روش های مختلف استخراج	راندمان (درصد)
روش سوکسله	۳۶/۶
روش اولتراسونیک	۱۷/۰
روش ماسیراسیون	۱۸/۸

بین راندمان سوکسله و بقیه اختلاف آماری وجود داشت (p <۰/۰۰۱). بین راندمان ماسیراسیون و التراسونیک نیز اختلاف آماری وجود داشت (p <۰/۰۱).

محتوای تام فنلی عصاره‌ها به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره در جدول شماره ۲ آمده است. عصاره حاصل از روش سوکسله با ۱/۵± ۳۹۰ و التراسونیک با ۲/۳ ± ۳۰۲ GAE در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بودند. محتوای تام فلاونوئیدی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین QE در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین تعیین شد. این مقادیر نیز در جدول شماره ۲ آمده است. عصاره‌ی حاصل از روش استخراج سوکسله با ۲/۵± ۱۱۵/۸ و التراسونیک با ۱/۷± ۷۶/۶ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بودند.

جدول شماره ۲: تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره های برگ گیاه مورد

نوع عصاره	معادل گالیک اسید در گرم عصاره (میلی گرم) انحراف معیار ± میانگین	معادل کوئرستین در گرم عصاره (میلی گرم) انحراف معیار ± میانگین
سوکسله	۳۹۰ ±۱/۵	۱۱۵/۸ ±۲/۵
اولتراسونیک	۳۰۲ ± ۲/۳	۷۶/۶ ±۱/۷
ماسیراسیون	۳۴۶ ±۲/۷	۱۰۰/۸ ±۴/۲

از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین تمامی مقادیر تام فنلی و فلاونوئید با هم وجود داشت (p <۰/۰۰۱). نتایج حاصل ازتاثیر روش استخراج برقدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH در جدول شماره ۳ آمده است. مقدار IC_{50} در استخراج به روش سوکسله ۰/۳ ± ۱۱/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با عصاره‌های حاصل از دو روش دیگر داشت (p <۰/۰۵).

جدول شماره ۳: تاثیر روش استخراج بر میزان به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره مورد

نوع عصاره	IC_{50}(میکروگرم در میلی لیتر) انحراف معیار ± میانگین
سوکسله	۱۱/۳ ±۰/۳ *
اولتراسونیک	۱۳/۱ ±۰/۷
ماسیراسیون	۱۲/۵ ±۰/۵
ویتامین ث	۵/۰۴ ± ۰/۰۲
BHA	۵۳/۸۲ ± ۳/۲

*: p <۰/۰۵ نسبت به عصاره‌های دیگر. در این تست ویتامین ث و BHA به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. هر سه عصاره قوی‌تر از BHA بودند (p <۰/۰۰۱). ویتامین ث از هر سه عصاره قوی‌تر بود (p <۰/۰۰۱).

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیاکنندگی در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. در این تست، عصاره حاصل از ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داد.

جدول شماره ۴: تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی عصاره برگ گیاه مورد

	اولتراسونیک	سوکسله	ماسراسیون	ویتامین ث[1]
غلظت µg/ml	میزان جذب	میزان جذب	میزان جذب	میزان جذب
۸۰۰	۱/۱۴ ±۰/۱۶	۱/۱۷ ±۰/۱۲	----	۱/۷۲ ±۰/۰۸
۴۰۰	۱/۱۳ ±۰/۱۱	۱/۱۷ ± ۰/۱۴	۲/۸۱± ۰/۲۳	۱/۶۷ ±۰/۰۹
۲۰۰	۱/۱۲ ±۰/۰۸	۱/۰۹ ±۰/۰۹	۱/۵۴ ± ۰/۱۱	۱/۴۴ ±۰/۰۵
۱۰۰	۰/۷۷ ±۰/۰۲	۰/۹۴ ±۰/۰۴	۰/۹۷ ± ۰/۰۵	۱/۱۵ ±۰/۰۷
۵۰	۰/۴۹ ±۰/۰۳	۰/۵۸ ±۰/۰۵	۰/۵۸± ۰/۰۷	۰/۹۷ ±۰/۰۲
۲۵	۰/۳۹ ±۰/۰۳	۰/۳۶ ±۰/۰۴	۰/۳۸ ± ۰/۰۴	۰/۷۲ ±۰/۰۴

ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. تنها اختلاف بین میزان جذب در عصاره‌های التراسونیک و سوکسله از نظر آماری معنی‌دار نبود (ns). در تمامی موارد اختلاف معنی‌داری بین بقیه موارد وجود داشت ($p <$ ۰/۰۰۱). بررسی آماری فقط در غلظت ۴۰۰ µg/ml بررسی شده است. نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. میزان IC_{50} در این تست برای عصاره به دست آمده از روش اولتراسونیک، ۳۵۵/۱ برای روش سوکسله ۴۰۲/۹ و برای روش ماسیراسیون ۱۷۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در این تست نیز، عصاره‌ی حاصل از ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. اختلاف بین تمامی مقادیر از نظر آماری معنی‌دار بود ($p <$ ۰/۰۰۱). میزان IC_{50} کوئرستین که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، برابر ۰/۰۳ ± ۱۷/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. بین فعالیت کوئرستین و تمامی عصاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p <$ ۰/۰۰۱).

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت شلاته‌کنندگی آهن در جدول شماره ۶ آمده است. به علت ضعیف بودن توانایی عصاره‌ها در شلاته کردن آهن، تست صرفاً در یک غلظت بالا (۳۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) گزارش گردید. عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌تر از عصاره‌های دیگر بود. EDTA به عنوان استاندارد به کار رفت. این ترکیب فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داد. میزان IC_{50} این ترکیب ۰/۰۲ ± ۱۸/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول شماره ۵: تاثیر روش استخراج بر میزان به دام اندازی نیتریک اکساید (درصد) توسط عصاره مورد

	درصد به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید		
غلظت µg/ml	اولتراسونیک	سوکسله	ماسراسیون
۸۰۰	۶۵ ± ۱/۶	۶۲/۵ ± ۳/۷	-----
۴۰۰	۶۱ ± ۲/۱	۶۱ ± ۲/۴	۶۶/۸ ± ۳/۳
۲۰۰	۶۰ ± ۱/۸	۵۸ ± ۲/۱	۵۷/۸ ± ۱/۶
۱۰۰	۵۵/۵ ± ۱/۴	۴۹ ± ۱/۳	۵۵ ± ۱/۱
۵۰	۲۴/۶ ± ۰/۹	۱۵ ± ۱/۱	۴۳/۶ ± ۱/۲
۲۵	۲/۷ ±۰/۴	¾ ± ۰/۵	۱۴/۴ ± ۱/۰

جدول شماره ۶: تاثیر روش استخراج بر میزان شلات کنندگی آهن توسط عصاره برگ مورد

روش استخراج	غلظت µg/ml	درصد به دام اندازی
اولتراسونیک	۳۲۰۰	۶۱ ± ۳/۱
سوکسله	۳۲۰۰	۷۰ ± ۲/۹
ماسیراسیون	۳۲۰۰	۵۱/۷ ± ۴/۳

توانایی عصاره سوکسله در شلاته کردن آهن از نظر آماری به طور معنی داری از عصاره التراسونیک ($p <$ ۰/۰۱) و ماسیراسیون ($p <$ ۰/۰۰۱) بالاتر بود. فعالیت تمامی عصاره از EDTA ضعیف تر بود ($p <$ ۰/۰۰۱).

بحث

استخراج با روش‌های مختلف راندمان‌های متفاوتی به دست داد. سوکسله با ۳۶/۶ درصد و التراسونیک با ۱۷ درصد به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین راندمان استخراج را به خود اختصاص دادند. نظر به تکرار مجدد عمل استخراج (هر بار با حلال تازه) در روش سوکسله، به دست آمدن راندمان بالاتر استخراج کاملا منطقی به نظر می‌رسد ($p <$ ۰/۰۰۱). اما استخراج با روش التراسونیک در زمان ۱ ساعت، راندمانی بسیار نزدیک به روش ماسیراسیون از خود نشان داد. گرچه اختلاف بین این دو نیز از نظر آماری معنی‌دار بود (۱۷در مقابل ۱۸/۸ درصد، ($p <$ ۰/۰۱). به جهت امکان پذیر بوده این مقایسه، از حلال یکسان (متانول) استفاده شد. در مقایسه

روش های مختلف استخراج، سوکسله با ۱/۵± ۳۹۰ و التراسونیک با ۲/۳ ± ۳۰۲ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین مقدار ترکیبات پلی فنولی را دارا بودند. در مقایسه میزان تام فلاونوئیدی، مجددا سوکسله با ۲/۵± ۱۱۵/۸ و التراسونیک با ۱/۷± ۷۶/۶ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین مقدار فلاونوئید تام را دارا بودند. تمامی این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار بود (p <۰/۰۰۱). گیاهان به طور سنتی در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون به کار می روند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتا به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد(۲۷). ترکیبات فنولی شامل فنول‌های ساده، با یک حلقه آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است و ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشند. ترکیبات پلی‌فنولی که دارای دو بخش فنولی باشند، فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند(۲۷). ترکیبات فنولی تقریباً در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. از مهم‌ترین خصوصیاتی که به این گروه نسبت داده می‌شود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده که به آن‌ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد(۲۸). علاوه بر این پلی فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله: فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشادکننده عروق گزارش شده است(۲۷). معرف فولین سیو کالتیو واکنشگری است که به طور گسترده در سنجش ترکیبات فنولی به کار می‌رود. گروه هیدروکسی فنولی با واکنشگر ترکیب شده و بخش رنگ‌سازی را تولید می‌کند که در ۷۶۰ نانومتر تعیین مقدار می‌گردد(۲۷).

روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت‌ها وابسته به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره‌گیری و مخصوصاً قطبیت آن است. علاوه بر این‌ها استخراج ترکیبات فنولی از سایر ترکیبات بیولوژیک گیاه، به وسیله روش‌های استخراج قدیمی مانند ماسیراسیون در واقع هدر دادن حلال و زمان است. تکنیک‌های پیشرفته استخراج مانند عصاره‌گیری به کمک امواج مایکروویو و یا اولتراسوند از طریق افزایش کارایی و انتخابیت، موجب غلبه بر دشواری‌های روش قدیمی شده است. در این زمینه استفاده از امواج اولتراسوند جهت شکستن غشا سلولی باعث کاهش زمان عصاره‌گیری و افزایش بازده شده است. امواج صوتی که فرکانس‌های بالاتر از ۲۰ کیلوهرتز دارند، نوسان‌های مکانیکی در یک ماده ایجاد می‌کنند. برخلاف امواج الکترومغناطیسی، امواج صوتی باید در یک ماده پخش شوند و دارای چرخه‌های انبساط و انقباض در طی پخش در محیط می‌باشند. در حالت انبساط، حباب‌هایی دریک مایع ایجاد می‌شود و فشار منفی تولید می‌کند. حباب‌های تشکیل شده، رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. دو حالت کلی استخراج، حمام‌های اولتراسوند و سیستم پروب اولتراسوند می‌باشند. تأثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ بیش تری از حلال به درون مواد سلولی شده و انتقال جرم را بهبود می‌دهند. اولتراسوند در طی استخراج می‌تواند دیواره‌های سلولی را نیز تخریب کند و باعث تسهیل آزادسازی محتوای آن شود. بنابراین، تخریب سلولی کارآمد و انتقال جرم مؤثر، دو فاکتور اصلی هستند که باعث افزایش استخراج با اولتراسوند می‌شود(۲۹). فرکانس اولتراسوند تأثیرات زیادی روی بازده و سرعت استخراج دارد. هم‌چنین اثرات اولتراسوند روی بازده و سرعت استخراج اولتراسوند بسته به ماهیت مواد گیاهی استخراجی متفاوت می‌باشد. استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی استخراج است. فواید اصلی استفاده از اولتراسوند در استخراج شامل افزایش بازده استخراج و سرعت

استخراج است. اولتراسوند امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد. در مقایسه با تکنیک‌های استخراج جدید دیگر هم چون استخراج با مایکروویو، دستگاه اولتراسوند ارزان‌تر است و اجرای آن راحت‌تر می‌باشد. استخراج به کمک اولتراسوند مشابه استخراج با سوکسله می‌تواند با هر حلالی برای استخراج دامنه وسیعی از ترکیبات طبیعی استفاده شود(۳۰).

در مطالعه‌ای که توسط Falleh و همکارانش انجام شد، به منظور عصاره‌گیری از گیاه *Mesembryanthemum edule*، از روش استخراج اولتراسونیک استفاده شد. از اهداف این مطالعه بررسی تاثیر عوامل مختلف در روش اولتراسونیک بر روی کیفیت عصاره‌های حاصل از این روش بود. متغیرها شامل حلال (متانول و اتانول) و زمان عصاره‌گیری (۵ و ۱۰ دقیقه) بودند. نتایج نشان داد که نوع حلال نسبت به زمان عصاره‌گیری تاثیر بارزتری روی محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. عصاره متانولی حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنولی نسبت به عصاره اتانولی بود. برای هر دو حلال زمان عصاره‌گیری بیش‌تر، برای داشتن ترکیبات پلی فنولی بهتر بود. اما عصاره اتانولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد(۲۸).

نتایج یک مقاله پژوهشی نشان داد که عصاره گل آذین گیاه زولنگ دارای محتوی تام فنولی ۵۸/۸، ۶۰/۱ و ۱۰۵/۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به ترتیب برای سه روش استخراجی التراسونیک، خیساندن و سوکسله بود. نتایج حاکی از وجود مواد فنولی بیش‌تر در عصاره حاصل از روش سوکسله نسبت به دو روش دیگر بود(۳۱). فلاونوئیدها با ساختار اصلی دی فنیل پروپان با تفاوت هایی در حلقه پیران مرکزی، به طور گسترده در سلسله گیاهان توزیع داشته و تقریباً نیمی از حدود ۸۰۰۰ فنول‌های شناسایی شده را تشکیل می‌دهند(۲۷). فلاونوئیدها ترکیباتی هستند که مسئول ایجاد رنگ در گل‌ها و میوه‌ها هستند. به عنوان محصولات متابولیسم ثانویه در گیاهان، این ترکیبات به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع داروئی و غذایی مورد توجه هستند(۲۷). مکانسیم عمل فلاونوئید ها به دام‌اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون‌ها می‌باشد(۲۷). با استفاده از روش آلومینیوم کلراید، فلاونوئیدها با برخی ویژگی‌های ساختاری می‌توانند با یون آلومینیوم واکنش داده و کمپلکس قرمزی را تشکیل دهند. این کمپلکس جذب بیشینه‌ای در ۵۱۰ نانومتر دارد. فلاونوییدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری‌کننده در پیشرفت سرطان و بیماری‌های قلبی شناخته شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی وابسته به خصوصیات احیاکنندگی آن‌ها است. این ترکیبات نقش مهمی در رشد طبیعی گیاه و مقاومت در برابر عفونت و ضربه دارند.

عرضه روش‌های جدید استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاهان، به خصوص در صنایع دارویی افزایش یافته است. دلیل این موضوع نیاز به روش ایده ال استخراج بوده که بتواند بیش‌ترین مقدار ترکیبات فعال بیولوژیک را در کوتاه‌ترین زمان ممکن با پایین‌ترین قیمت به دست آورد(۳۲). گزارشات متعددی از به‌کارگیری روش استخراج با کمک التراسونیک در استخراج مواد مختلف از قبیل ایزوفلاون‌ها از ریشه *Radix puerariae*، هسپریدین از پوست *Citrus reticulata*، پلی‌ساکاریدها از پوست میوه‌ی longan و ترکیبات فنولی از غلات در دست است(۲۲). در این گزارشات بسیاری از محققین توانستند نشان دهند که روش التراسونیک به طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش زمان و کاهش حجم حلال مصرفی می‌شود. در یک مقاله، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه *Agrimonia pilosa* به روش استخراج التراسونیک و روش سوکسله با یکدیگر مقایسه شده است(۳۲). در این مقاله نشان داده شده که هر دو روش در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه، موثر و کارآمد بوده و به خوبی قابل استفاده در صنایع غذایی هستند. در این مطالعه عصاره به دست آمده از هر دو روش استخراج،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به BHT نشان داد. این توانایی بالا به حضور ترکیبات فنولی و فلاونوییدی موجود در گیاه نسبت داده شد. برخی از مطالعاتی که در آن‌ها از روش اولتراسونیک جهت عصاره‌گیری استفاده شده شامل: استخراج ایزوفلاوون‌ها از ریشه گیاه *Radix puerariae*، استخراج هسپریدین از پوست میوه *Citrus reticulate* و استخراج ترکیبات فنولی از سبوس گندم می باشد. این مطالعات نشان دادند که روش استخراج اولتراسونیک باعث استخراج با کیفیت بهتر و زمان کوتاه‌تر می‌شود(۳۲).

در مطالعه‌ای که توسط ابراهیم‌زاده و همکاران انجام شد، اثرات روش‌های مختلف عصاره‌گیری روی محتوای تام فنولی و فلاونوییدی گیاه *Lythrum salicaria* مورد بررسی قرار گرفت. برگ خشک و گل *L. salicaria* با روش‌های مختلف عصاره‌گیری شد (از جمله ماسیراسیون و اولتراسونیک). عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی در همه تست‌ها نشان دادند. این تحقیق نشان داد که در این گیاه، محتوای تام فنولی در عصاره اولتراسونیک بیش‌تر از عصاره ماسیراسیون بوده اما محتوای تام فلاونوئیدی در عصاره ماسیراسیون بیش‌تر از عصاره اولتراسونیک بوده است. عصاره اولتراسونیک در تست‌های به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، نیتریک اکساید و H_2O_2 بهتر از عصاره ماسیراسیون گزارش شده است(۲۴). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات دو روش عصاره‌گیری بر روی محتوای تام فنولی و فلاونوییدی گیاه *Crataegus pentagyna* مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون پلی‌فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی‌اکسیدانی مختلف به صورت *in vitro* ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که عصاره حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های DPPH، به دام‌اندازی هیدروژن پراکسید و شلات کردن Fe^{2+} بهتر از عصاره پلی‌فنل بود(۲۲). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی اکسیدانی، بر روی اندام‌های هوایی گیاه *Crocus caspius* انجام شد. روش‌های استخراج شامل اولتراسونیک، پرکولاسیون و فراکسیون پلی‌فنولی بود. عصاره اولتراسونیک دارای بیش‌ترین میزان فنول و فلاونویید بود. در تست DPPH و به دام‌اندازی H_2O_2 هم قوی‌ترین عصاره گزارش شده است. عصاره تهیه شده به روش خیساندن در تست قدرت احیاکنندگی قوی‌ترین عصاره بود(۳۳).

در مطالعه دیگر از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسونیک برای عصاره گیری از گیاه *Laurus nobilis* استفاده شد. عصاره تهیه شده به روش سوکسله با بیش‌ترین محتوای فنولی و فلاونوییدی، فعالیت به دام‌اندازی DPPH و نیتریک اکساید بهتری نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد. عصاره تهیه شده به روش ماسراسیون فعالیت به دام‌اندازی H_2O_2 بهتری نشان داد. تفاوت قابل توجهی بین روش‌های مختلف استخراج در تست قدرت احیاکنندگی این گیاه وجود نداشت. نتایج اندازه‌گیری محتوای تام فنولی نشان داد که عصاره ناشی از سوکسله بالاتر از اولتراسونیک و ماسراسیون می‌باشد(۳۴).

در مطالعه‌ای جهت عصاره‌گیری از برگ گیاه *Cucumis melo* از روش‌های سوکسله، اولتراسونیک و ماسراسیون استفاده شد. عصاره سوکسله، ترکیبات فنولی بیش‌تری نسبت به عصاره‌های دیگر (به ترتیب التراسونیک و ماسیراسیون) داشت(۳۵). ترکیبات فلاونوئیدی نیز به همان ترتیب گزارش شد. در به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH، عصاره ماسیراسیون، در به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید عصاره التراسونیک و در شلاته‌کنندگی آهن عصاره ناشی از سوکسله بهترین فعالیت را دارا بودند. این مقاله نشان داد که هر سه روش در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان موثر بودند اما تفاوتی بین آن‌ها وجود نداشت(۳۵). در یک مطالعه گل آذین گیاه زولنگ *Eryngium caucasicum* با سه روش عصاره شده و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل را با چهار روش با یکدیگر مقایسه شده است(۳۱). در عمده تست‌ها عصاره حاصل از روش سوکسله قوی‌ترین فعالیت را از خود نشان داد، گرچه

اختلاف زیادی بین این عصاره و عصاره حاصل از روش التراسونیک وجود نداشت. این تحقیق هم چنین نشان داد که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند. بنابراین روش ارجح در استخراج این ترکیبات فعال بیولوژیک در این گیاه می‌باشند. میزان فلاونوئید تام در این مقاله، ۱۱/۹ تا ۱۸/۶۵ میلی‌گرم فلاونوئید معادل کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد.کم‌ترین مقدار مربوط به‌روش خیساندن بود که میزان آن کم‌تر از دو روش دیگر (سوکسله و اولتراسوند) بود. در واقع این تحقیق نشان داد که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در این گیاه در استخراج ترکیبات فلاونوئید موثر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند(۳۱).

مدل به‌دام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده برای ارزیابی توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایداری می‌کند که از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. این رادیکال در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد(۲۷). در تحقیق حاضر، تغییر روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر قدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH داشت. مقدار IC_{50} در روش سوکسله ۰/۳± ۱۱/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که از نظر آماری با مقادیر دو روش دیگر متفاوت بود ($p < ۰/۰۵$). در برخی مطالعات قبلی ارتباط خطی خوبی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش شده است(۳۷،۳۶). در مطالعه ما نیز عصاره با میزان بیش‌تر فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند. در این تست ویتامین ث و BHA به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. هر سه عصاره قوی تر از BHA بودند ($p < ۰/۰۰۱$) اما ویتامین ث از هر سه عصاره قوی‌تر بود ($p < ۰/۰۰۱$). در خصوص گیاه زولنگ، میزان IC_{50} حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای به دام‌اندازی رادیکال DPPH به ترتیب برابر ۸۳/۱، ۱۷۷/۳ و ۱۸۸/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود بر این اساس استخراج با روش سوکسله مهارکننده قوی‌تری از دو روش دیگر بود. در این مطالعه نیز ارتباط خطی خوبی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول تام به دست آمد. عصاره‌ها با میزان بیش‌تر فنولی (به ترتیب سوکسله، خیساندن و التراسونیک)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند (به ترتیب سوکسله، خیساندن و التراسونیک)(۳۱).

قدرت احیاکنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می‌رود(۲۷). در حالت کلی، حضور عوامل احیا کننده فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند. چنان‌چه ترکیبی دارای این ویژگی‌ها باشد، می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کند. سنجش احیا کنندگی نمونه، ناشی از احیا آهن III به آهن II با اهداء الکترون می‌باشد. میزان کمپکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاکنندگی می‌باشد. روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت احیاکنندگی عصاره‌های حاصل داشت. عصاره حاصل از خیساندن بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. تنها اختلاف بین میزان جذب در عصاره‌های التراسونیک و سوکسله از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$). در تمامی موارد اختلاف معنی‌داری بین بقیه موارد وجود داشت ($p < ۰/۰۰۱$). در این تحقیق عصاره ماسیراسیون در غلظت ۴۰۰ µg/ml حتی از ویتامین ث هم اثر بهتری نشان داد ($p < ۰/۰۰۱$). نیتریک اکساید، رادیکالی آزاد با یک تک الکترون است که در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک از جمله تنظیم فشار خون، گشاد شدن عضلات صاف عروق و سیستم ایمنی نقش دارد. تولید بیش از حد این ذره می‌تواند ایجاد استرس اکسیداتیو و استرس نیتروزاتیو

کند که منجر به تخریب DNA، تغییر عملکرد پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در این تحقیق در محیط آزمایشگاهی برای تولید •NO، از سدیم نیتروپروساید استفاده شد. قدرت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌ها ضعیف اما وابسته به دوز بود. روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید حاصل از عصاره‌ها داشت. نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. میزان IC_{50} در این تست برای عصاره به دست آمده از روش اولتراسونیک، ۳۵۵/۱ برای روش سوکسله ۴۰۲/۹ و برای روش ماسیراسیون ۱۷۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در این تست نیز، عصاره‌ی حاصل از ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داد. اختلاف بین تمامی مقادیر از نظر آماری معنی‌دار بود ($p <$ ۰/۰۰۱). میزان IC_{50} کوئرستین که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت، برابر ۰/۰۳ ± ۱۷/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. بین فعالیت کوئرستین و تمامی عصاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p <$ ۰/۰۰۱). میزان IC_{50} حاصل از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسوند برای به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید در گل آذین گیاه زولنگ به ترتیب برابر برابر ۵۸۳، ۳۹۰، ۲۴۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. عصاره حاصل از روش ماسیراسیون دارای قدرت مهارکنندگی بیش‌تری نسبت به دو روش دیگر بود(۳۱). یون‌های فلزی دو ظرفیتی نقش مهمی در کاتالیست کردن فرایندهای اکسیداسیون ایفا می‌کنند. شلاته کننده‌های آهن در بیماری‌های چون تالاسمی کاربرد درمانی دارند(۳۸). عصاره‌ها قدرت ضعیفی در شلاته کردن آهن از خود نشان دادند. نتایج حاصل در جدول شماره ۶ آمده است. برای بررسی اثر از غلظت بالای ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (یک تک غلظت) استفاده شد. روش سوکسله در استخراج ترکیبات شلاته کننده آهن قوی‌تر از روش‌های استخراجی دیگر بود. در این غلظت، عصاره حاصل از سوکسله توانست ۷۰ درصد یون‌های آهن را شلاته کند. توانایی عصاره سوکسله در شلاته کردن آهن از نظر آماری به طور معنی‌داری از عصاره التراسونیک ($p <$ ۰/۰۱) و ماسیراسیون ($p <$ ۰/۰۰۱) بالاتر بود. در این تست، EDTA به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. این ترکیب فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داد. میزان IC_{50} این ترکیب ۰/۰۲ ± ۱۸/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. فعالیت تمامی عصاره از EDTA ضعیف‌تر بود ($p <$ ۰/۰۰۱).

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکترای حرفه‌ای خانم شکوفه مزدستان در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. جمع‌آوری برگ گیاه مورد توسط آقای دکتر بهمن اسلامی، دکترای سیستماتیک گیاهی از لرستان، انجام پذیرفت که از ایشان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌گردد.

References

1. Kumaran A, Joel Karunakaran R. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chem 2006; 97(1): 109-114.
2. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Ame J Med 2002; 113.
3. Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effect of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's

disease and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Drug Targets CNS Neurological Disorders 2003; 2(2): 95-107.

4. Yen GC, Duh PD. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut huls from various cultivars. Journal of the American Oil Chemists' Society 1995; 72(9): 1065-1067.
5. Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Myrtus communis L. and its active constituents. Phytother Res 2014; 28(8): 1125-1136.
6. Berka-Zougali B, Hassani A, Besombes C, Allaf K. Extraction of essential oils from Algerian myrtle leaves using instant controlled pressure drop technology. J Chromgraph A 2010; 1217(40): 6134-6142.
7. Hayder N, Abdelwahed A, Kilani S, Ammar RB, Mahmoud A, Ghedira K, et al. Anti-genotoxic and free radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) Myrtus communis. Mutat Res 2004; 564(1): 89-95.
8. Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri FF, et al. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of Myrtus communis L. Free Radic Res 2004; 38(1): 97-103.
9. Rosa A, Deiana M, Casu V, Corona G, Appendino G, Bianchi F, et al. Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from Myrtus communis L. Free Radic Res 2003; 37(9): 1013-1019.
10. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. Phytochemistry 2006; 67(12): 1249-1255.
11. Sepici A, Gurbuz I, Cevik C, Yesilada E. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal an alloxan-diabetic rabbits. J Ethnopharmacol 2004; 93(2-3): 311-318.
12. Twaij HAA, Elisha EE, Khalid RM. Analgesic studies on some Iraqui medicinal plants. Part II. Int J Crude Drug Res 1989; 27(2): 109-112.
13. Romani A, Pinelli P, Mulinacci N, Vincieri FF, Tattini M. Identification and quantification of polyphenols in leaves of Myrtus communis. Chromatographia 1999; 49(1-2): 17-20
14. Feißt C, Franke L, Appendino G, Werz O. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from Myrtus communis and their implication as antiinflammatory compounds. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2005; 315(1): 389-396.
15. Sumbul S, Aftab ahmad M, Asif M, Akhtar M. Myrtus communis Linn- A review. Indian J Nat Prod Resour 2011; 2(4): 395-402.
16. Cakir A, Essential oil and fatty acid composition of the fruits of Hippophae rhamnoides L. (Sea Buckthorn) and Myrtus communis L. from Turkey. Biochem Systematics and Ecology 2004; 32(9): 809-816.
17. Martin T, Rubio B, Villaescua L, Fernandez L, Diaz AM. Polyphenolic compounds from pericarps of Myrtus communis. Pharm Biol 1999; 37(1): 28-31.
18. Gardeli Ch, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K, Komaitis M. Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chem 2008; 107(3): 1120-1130.
19. Hayder N, Skandrani I, Kilani S, Bouhlel I, Abdelwahed A, Ben Ammar R, et al. Antimutagenic activity of Myrtus communis L. using the Salmonella microsome assay.

South African Journal of Botany 2008; 74(1): 121-125.

20. Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower. Food Chem Toxicol 2010; 48(5): 1362-1370.
21. Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Xu G, Liu D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (Citrus reticulata) peel. Ultrason Sonochem 2008; 15(3): 227-232.
22. Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh M.A. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Nat Prod Res 2012; 26(24): 2353-2357.
23. Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of Lythrum salicaria L.(Lythraceae) International Food Research Journal 2014; 21(2):783-788
24. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of Hyoscyamus squarrosus leaves. Pharmacologyonline 2009; 2: 796-802.
25. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami Sh. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2010; 14(9): 765-769.
26. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of Hyoscyamus squarrosus fruits. Pharmacologyonline 2009; 2: 644-650.
27. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120):188-208 (Persian .
28. Falleh H, Ksouri R, Lucchessi M-E, Abdelly Ch, Magné Ch. Ultrasound-assisted extraction: effect of exraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of Mesembryanthemum edule L. Aizoaceae shoots, Tro J of Pharm Res 2012; 11(2): 243-249.
29. Vilkha K, Mawson R, Simons L, Bates D. Application and opportunities for untrasound assisted extraction in food industry; A review. Innovative Food Sciences and Emerging Technologies 2008; 9(2): 161-169.
30. Wang L, Weller CL. Recent advance in extraction of nutaceuticals from Plants. Trends in Food Sci and Technol 2006; 17(6): 300-312.
31. Motallebi Riekandeh S, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from Eryngium caucasicum (Apiaceae) inflorescence. Eur Rev Med Pharmacol Sci. Accepted for publication.
32. He Ch, Ji X, Pan YM, Wang H, Wang K, Liang M, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of Agrimonia pilosa Ledeb. Med Chem Res 2009; 19(5): 448-461.
33. Ebrahimzadeh MA, Fathi H, Khalil M. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of Crocus caspius, Impact of extraction methods. Pak J Pharm Sci 2015. Accepted for publication.
34. Ebrahimzadeh MA, Hashemi Z, Jamshidi M. Evaluation of antioxidant activities of Laurus nobilis L. (Lauraceae) fruits, Impact of extraction methods. World of Sciences Journal 2013; 5(2): 79-87.

35. Ebrahimzadeh MA, Askari M, Forouzani M. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from Cucumis melo L. fruit and leaves. Int J Forest Soil and Erosion 2013; 3(3): 95-99.
36. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 2004; 74: 2157-2184.
37. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus specis peels and tissues. Pak J Pharm Sci 2009; 22(3): 277-281.
38. Khalili M, Ebrahimzadeh MA, Kosaryan M, Abbasi A, Azadbakht M. Iron chelation and liver disease healing activity of edible mushroom (Cantharellus cibarius), in vitro and in vivo assays. RSC Adv 2015; 5(7): 4804-4811.