ORIGINAL ARTICLE

Influence of Different Extraction Methods on Antioxidant and Antibacterial Activities of Nonnea lutea

Babak Babakhani[1],
Fatemeh Janbaz[1],
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[2]

[1]Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
[2]MSc in Plant Physiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
[3]Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 29, 2017 Accepted November 26, 2017)

Abstract

Background and purpose: No reports are found on biological activities of *Nonea lutea* (boraginaceae). The aim of this study was to investigate the antioxidant and antibacterial activities of this plant.

Materials and methods: The aerial parts were extracted by three different methods, i.e. meceration (MA), ultrasonic assisted (US), and soxhlet assisted (SO) extractions with methanol. Antioxidative capacity was assessed by utilizing four methods: DPPH and nitric oxide (NO) free radicals scavenging, reducing power and iron chelating activity. The total phenolic and flavonoid contents were also determined. Antibacterial activities were evaluated by disc diffusion method against four bacteria.

Results: The highest amount of total phenolic and flavonoid contents were found in SO and US extracts, respectively. In DPPH radical scavenging activity, SO extract ($IC_{50} = 99.14 \pm 0.3$ µg ml^{-1}) had a higher activity which was significantly different from that of other extracts ($P< 0.01$). In reducing power, the extracts showed similar activities ($P>0.05$). The extracts showed weak iron chelating and nitric oxide radical scavenging activities indicating no significant differences ($P> 0.05$). Findings showed that all extracts had the highest activity against *B. subtilis* and the least activity against *S. aureus*. SO extract showed the highest activity against *B. subtilis*, US extract showed the highest activity against *E coli* and *P. aeruginosa*, and MA extract showed the highest activity against *S. aureus*.

Conclusion: The results indicated that extraction methods significantly affect antioxidant and antibacterial capacities and total phenolic and flavonoid contents. For this plant, SO extraction method was found to be more efficient.

Keywords: *Nonnea lutea*, Boraginaceae, antibacterial, disc diffusion method, extraction method, phenol, flavonoid

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (156): 129- 145 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۶ دی سال ۱۳۹۶ (۱۴۵-۱۲۹)

تاثیر روش های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت آنتی باکتریال گیاه *Nonnea lutea*

بابک باباخانی[۱]
فاطمه جانباز[۲]
محمدعلی ابراهیم زاده[۳]

چکیده

سابقه و هدف: از گیاه چشم گربه‌ای تاکنون هیچ اثر بیولوژیکی گزارش نشده است. این مطالعه به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن انجام شده است.

مواد و روش‌ها: اندام‌های هوایی به سه روش خیساندن، سوکسله و التراسونیک با متانول عصاره‌گیری شد. فعالیت آنتی اکسیدانی با چهار روش مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی آن نیز اندازه‌گیری شد. فعالیت ضد میکروبی بر روی چهار باکتری به روش دیسک دیفیوژن انجام شد.

یافته‌ها: بیش‌ترین میزان فنل و فلاونوئید تام مربوط به عصاره سوکسله و عصاره اولتراسونیک بود. IC_{50} بدام اندازی رادیکال DPPH در استخراج به روش سوکسله ۰/۳ ± ۹۹/۱۴ µg/ml بود که اختلاف معنی‌داری با دو عصاره دیگر داشت ($p<۰/۰۱$). در تست احیا کنندگی، عصاره‌ها فعالیت مشابه‌ای از خود نشان دادند ($p>۰/۰۵$). عصاره‌ها توانایی کمی در شلاته کردن آهن و به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید از خود نشان دادند و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). عصاره‌ها بیش‌ترین تاثیر را بر باسیلوس سابتیلیس و کم‌ترین اثر را بر استافیلوکوک اورئوس داشتند. موثرترین عصاره بر باسیلوس سابتیلیس سوکسله، موثرترین عصاره بر سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی التراسونیک و موثرترین عصاره بر استافیلوکوکوس اورئوس خیساندن بود.

استنتاج: روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت ضد میکروبی دارد. بیش‌ترین میزان فنل تام ،مربوط به عصاره سوکسله و بیش‌ترین میزان فلاونوئید تام مربوط به عصاره اولتراسونیک بود. عصاره‌گیری با سوکسله مناسب‌تر از سایر روش‌ها تعیین شد.

واژه های کلیدی: چشم گربه‌ای، گل گاوزبان، ضد میکروب، دیسک دیفیوژن، روش استخراج، فنل، فلاونوئید

مقدمه

تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن بخش لازمی از زندگی بوده که در واکنش‌های بیولوژیک مهمی مانند فاگوسیتوز و تنظیم رشد سلولی و پیام‌های بین سلولی نقش دارند. رادیکال‌های آزاد تنها زمانی مفید هستند که در زمان و مکان درستی تولید شوند. در غیر این صورت می‌توانند مضر باشند چرا که

مولف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده– ساری، کیلومتر ۱۸ جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران Email: zadeh20@gmail.com
۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران
۲. کارشناسی ارشد، رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران
۳. استاد، شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۴/۱۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۹/۵

بسیار فعال بوده و به مولکول‌های نزدیک به خود حمله می‌کنند. استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد یا ضعیف شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی یا تولید کم آنتی‌اکسیدان‌های آندروژن می‌باشد. بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله بیماری‌های التهابی، بیماری‌های عصبی، تصلب شرائین و سرطان در ارتباط با استرس اکسیداتیو است. به منظور جلوگیری از آسیب رادیکال آزاد، در بدن موجودات زنده، سیستم‌های آنتی اکسیدان قوی و پیچیده‌ای وجود دارد. عملکرد آن‌ها معمولا با حذف یا غیر فعال کردن میانجی‌هایی که رادیکال آزاد تولید می‌کنند می‌باشد. علی رغم وجود آنتی اکسیدان‌های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تأمین آنتی اکسیدان از منابع خارجی دارد(۱). شواهد متعددی وجود دارد که سمی بودن و اثرات سوء آنتی‌اکسیدان‌های صناعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) را تأیید می‌کند. علاوه بر این خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از آنتی اکسیدان‌های صناعی می‌باشد(۲). گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند می‌توانند باعث حفاظت سلول‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو شوند. آنتی اکسیدان‌های طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماری‌ها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می‌شوند(۱). نظر به این‌که گیاهان منبع آنتی اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است(۳).

امروزه تحقیقات وسیعی بر روی عصاره‌های گیاهی صورت می‌گیرد تا بتوانند به نمونه‌هایی با فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی دست یابند. از آن‌جایی که چندین روش برای تهیه عصاره گیاهی وجود دارد و اینکه هر روش در مقایسه با دیگر روش‌ها از محدودیت‌ها و مزایای منحصر به فرد برخوردار می‌باشد، 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 بدست آید(۴).

گیاه چشم گربه‌ای با نام علمی *Nonnea lutea* از تیره *Boraginaceae* (گل گاوزبان) و جنس *Nonnea* می‌باشد. گیاهان این خانواده به دلیل دارا بودن موسیلاژ فراوان از نظر دارویی دارای اهمیت هستند(۵). این جنس شامل ۳۵ گونه بوده که از شرق آسیا تا جنوب اروپا و شمال آفریقا گسترده شده است. در ساقه، ریشه، برگ و گل اکثر گیاهان موجود در این خانواده لعاب و نیترات پتاسیم قابل توجهی وجود دارد و به همین جهت در طب گیاهی به عنوان معرق از جوشانده گل و سایر اعضای گیاه استفاده می‌شود. گیاه چشم گربه‌ای (شکل ۱) گیاهی از این جنس بوده که تاکنون هیچ اثر بیولوژیکی از آن گزارش نشده است. بر این اساس، این اولین تحقیق و گزارش از این گیاه می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیر روش‌های استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی گیاه چشم گربه‌ای انجام شده است. بدین منظور عصاره‌ها با کمک سه روش تهیه شده و سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با چهار روش سنجیده شد. محتوای تام فنل و فلاونوئید تمامی عصاره‌ها نیز تعیین گردید. علاوه بر آن، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها نیز در مقابل دو سوش گرم منفی و دو سوش گرم مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت.

شکل ۱: گیاه چشم گربه ای

مواد و روش ها

نمونه‌ی گیاهی:

اندام‌های هوایی گلدار گیاه *Nonnea lutea* با تائید دکترای سیستماتیک گیاهی از ساری جمع آوری و استفاده شد. نمونه‌ی هرباریومی در هرباریوم دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر (به شماره ۷۲۸) نگهداری می‌شود. اندام‌های گیاه در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس پودر شدند. به منظور تهیه عصاره از سه روش استفاده شد. ماسیراسیون (خیساندن)، سوکسله و التراسونیک. به منظور یکسان سازی اثر حلال در هر روش، از متانول خالص استفاده شد.

تهیه عصاره به روش خیساندن:

در این روش ۳۰ گرم از اندام گیاه با ۶۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد متانول جدا و مجددا متانول جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز چهارم، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید(۶).

تهیه عصاره به روش اولتراسونیک:

در این روش, از امواج غیر مستقیم اولترا سونیک با فرکانس ۶۰ کیلو هرتز در دمای ۲۵ درجه به مدت یک ساعت استفاده شد. ۳۵ گرم اندام هوایی گیاه به همراه ۷۰ میلی لیتر 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 تبخیر کننده چرخان حذف گردید(۷).

تهیه عصاره به روش سوکسله:

در این روش ۲۰ گرم اندام هوایی گیاه در کاغذ صافی قرار داده شد و سپس در دستگاه سوکسله قرار گرفت. عمل استخراج با حلال متانول به مدت ۸ ساعت ادامه پیدا کرد سپس متانول حاوی مواد استخراج شده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید(۸).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید:

محتوای ترکیبات فنولی با کمک معرف فولین سیو کالتیو انجام شد (۹و۱۰). غلظت mg/ml ۱ از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵ درصد) اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک (GAE) بیان شد. بدین منظور 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 بصورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد.

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره با روش رنگ سنجی با کلرید آلومینیوم ارزیابی شد(۹،۱۰). غلظت mg/ml ۱ از هر عصاره تهیه شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد) و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات (۱ مولار) و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به مجموعه اضافه شد. مخلوط 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 در گرم عصاره

(QE) گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش شد.

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH:

به منظور انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با غلظت‌های مختلف، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار محلول DPPH در متانول اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک قرار داده شد. جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول اندازه‌گیری شد. BHA به عنوان استاندارد استفاده شد و میزان IC_{50} به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاک سازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام‌اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

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

که در آن A_B=جذب بلانک، A_S=جذب نمونه یا استاندارد میباشد(۹و۱۰).

تعیین قدرت احیاء کنندگی:

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها با کمک روش گزارش شده‌ی قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با pH ۶/۶ و ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید (به عنوان متوقف کننده واکنش) به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۱ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. دراین آزمایش آسکوربیک اسید (ویتامین C) با غلظتهای ۲۵, ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد(۹،۱۰).

ارزیابی میزان به دام‌اندازی نیتریک اکساید

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 میلی مولار) 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 (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک بکار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱ درصد 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.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100$$ که در آن A_B=جذب بلانک, A_S =جذب نمونه یا استاندارد میباشد(۹و۱۰).

ارزیابی میزان شلات‌کنندگی آهن

اندازه‌گیری قدرت شلاته‌کنندگی آهن با روش گزارش شده ی قبلی انجام شد. به ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف هر عصاره ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن II اضافه شد و پس از ۵ دقیقه ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه شد 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:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100$$ که در آن A_B= جذب بلانک و A_s= جذب نمونه یا استاندارد EDTA میباشد (۱۱).

به عنوان کنترل مثبت به‌کار گرفته شد. فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بصورت IC_{50} بیان شد. در این آزمایش نیز محلول بلانک شامل تمامی اجزای شرکت کننده در واکنش به جز عصاره بود(۱۱).

بررسی فعالیت ضد میکروبی

به منظور تهیه‌ی محلول عصاره، از مخلوط ۲۰ درصد DMSO و نرمال سالین استفاده شد. مجموعه با هم مخلوط و روی شیکر هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از : *Pseudomonas aerojinosa* (PTCC= 1599), *Bacillus subtililis* (PTCC= 1156), *Ecoli* (PTCC=1399) و *Staphylococcus aureus* (PTCC=1113) که از موسسه رازی تهیه شدند. برای تهیه دیسک‌های آنتی بیوگرام، ابتدا دیسک‌های گرد به قطر ۶ میلی‌متر از کاغذ صافی تهیه گردید و در یک بطری استریل قرار داده شد. سپس با حرارت خشک و با دمای ۱۴۰ درجه به مدت ۱ ساعت استریل شد. عصاره‌های گیاه روی دیسک ریخته شد و پس از قرار گرفتن در پلیت استریل و خشک شدن، در یخچال نگهداری گردید.

تهیه محلول میکروبی

ابتدا سوش‌های میکروبی را ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، بر روی محیط کشت آگار کشت داده تا به حالت فعال در آیند. سپس کلنی‌های مشخص حاصل از کشت خالص باکتری در ۲-۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل و محلول یکنواختی تهیه شد. برای تعیین غلظت میکروبی و استاندارد کردن آن، می‌بایست با سوسپانسیون مک فارلند مقایسه شود(۱۳، ۱۲).

روش دیسک دیفیوژن

در روش دیسک دیفیوژن، دیسک‌های بلانک استریل در عصاره‌های مورد نظر قرار داده شد تا عصاره‌ها کاملا جذب دیسک‌ها شوند. سپس این دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شوند. از کشت ۲۴ ساعته هر یک از ۴ باکتری آماده شده سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه و به وسیله سوآپ بر سطح محیط کشت مولر

هینتون آگار کشت یکنواختی تهیه شد. دیسک‌های حاوی عصاره را بر سطح آگار قرار داده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با خط کش در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شدند(۱۳،۱۲).

آنالیز آماری

تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شد و کلیه اطلاعات بصورت 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 بدست آمد.

یافته ها

بازده عصاره‌ها

پس از اتمام عصاره‌گیری وزن عصاره‌ها محاسبه شد و بازده هر یک از آن‌ها محاسبه شد. این مقادیر در جدول ۱ آمده است. بیش‌ترین راندمان با ۲۱ درصد مربوط به عصاره‌ی حاصل از روش سوکسله بود.

جدول ۱: راندمان استخراج عصاره به روش‌های مختلف در گیاه چشم گربه‌ای

عصاره حاصل از روش های مختلف استخراج	راندمان (٪)
روش اولتراسونیک	۹/۵
روش خیساندن	۱۳
روش سوکسله	۲۱

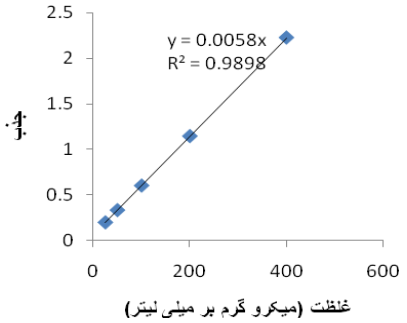
محتوای تام فنلی عصاره‌ها به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد ۱ بدست آمده و در جدول ۲ آورده شده است. بیش‌ترین میزان فنل کل، مربوط به عصاره سوکسله با میانگین ۱۴۸/۰۶ و کم‌ترین میزان فنل کل مربوط به عصاره اولتراسونیک با میانگین ۹۷/۶۳ GAE بود. محتوای تام فلاونوئیدی به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین QE در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین نمودار۲ تعیین شد. بیشترین میزان فلاونوئید کل مربوط به عصاره اولتراسونیک با میانگین ۹۱/۹۵ و کم‌ترین آن مربوط به عصاره ماسیراسیون با میانگین ۸۰/۹۷ QE بود (جدول ۲).

جدول۲: تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره های متانولی چشم گربه ای

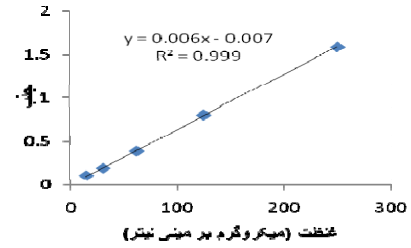
نوع عصاره	محتوای تام فنولی (میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره)	محتوای تام فلاونوئیدی (میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره)
سوکسله	۱۴۸/۰۶± ۵/۳	۸۸/۹۸± ۷/۶
اولتراسونیک	۹۷/۶۳± ۴/۷	۹۱/۹۵± ۶/۸
ماسیراسیون	۱۰۱/۷۲± ۸/۱	۸۰/۹۷±۳/۱

اختلاف معنا داری بین میزان مقادیر تام فنلی در روش سوکسله با سایر روش هم وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$).

اختلاف معنا داری بین میزان مقادیر تام فلاونوئید در روش اولتراسونیک با سوکسله وجود نداشت ($p>0.05$).



نمودار ۱: منحنی استاندارد گالیک اسید جهت تعیین محتوای تام فنولی موجود در عصاره متانولی چشم گربه‌ای



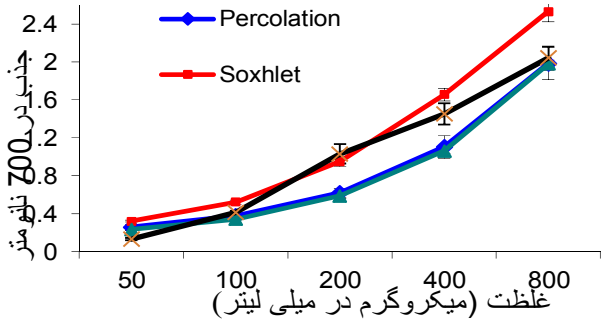
نمودار ۲: منحنی استاندارد کوئرستین جهت تعیین محتوای تام فلاونوئید در عصاره های متانولی چشم گربه ای

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر قدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH در جدول ۳ آمده است. مقدار IC_{50} در استخراج به روش سوکسله ۰/۳ ± ۹۹/۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که اختلاف معنی داری با عصاره های حاصل از دو روش دیگر داشت($p<۰/۰۱$). در این تست BHA به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. BHA از هر سه عصاره قوی‌تر بود ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۳: تاثیر روش استخراج بر میزان به دام‌اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های متانولی چشم گربه‌ای

نوع عصاره	IC_{50} (میکروگرم در میلی‌لیتر)
اولتراسونیک	۱۴۳/۶۶ ± ۰/۷
ماسیراسیون	۱۲۳/۳۸ ± ۰/۵
سوکسله	۹۹/۱۴ ± ۰/۳
BHA	۵۳/۸۲ ± ۳/۲

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیا کنندگی در نمودار ۳ نشان داده شده است. در این تست، عصاره‌ی حاصل از سوکسله فعالیت بالاتری از خود نشان داد اما از نظر آماری با بقیه اختلاف نداشت. عصاره‌ها و ویتامین ث که به عنوان کنترل به کار رفت، همگی از نظر آماری قدرت یکسانی از خود نشان دادند ($p>0.05$).



نمودار ۳: ارزیابی قدرت احیاکنندگی گیاه توسط عصاره‌های گیاه چشم گربه‌ای

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت شلاته‌کنندگی آهن در جدول ۴ آمده است. عصاره‌ها توانایی کمی در شلاته‌کردن آهن از خود نشان دادند. با این حال عصاره حاصل از روش سوکسله با ۳۱/۵ درصد مهار در غلظت ۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر، قوی‌تر از عصاره‌های دیگر بود. اگرچه اختلاف معنی‌داری با سایر عصاره‌ها از خود نشان نداد($p>۰/۰۵$). در این تست EDTA به عنوان استاندارد به‌کار رفت. این ترکیب فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داد. میزان IC_{50} این ترکیب ۰/۰۲ ± ۱۸/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. فعالیت تمامی عصاره‌ها از EDTA ضعیف‌تر بود ($p<۰/۰۰۱$).

جدول۴: تاثیر روش استخراج بر میزان شلات کنندگی آهن توسط عصاره های گیاه چشم گربه ای

غلظت	ماسیراسیون		التراسونیک		سوکسله	
(میکروگرم/میلی لیتر)	میانگین جذب	درصد به دام اندازی	میانگین جذب	درصد به دام اندازی	میانگین جذب	درصد به دام اندازی
۱۶۰۰	۰/۴۳۰±۰/۰۳	۱۶/۳۴	۰/۳۶۹±۰/۰۲	۲۸/۲۱	۰/۳۵۲±۰/۰۱	۳۱/۵۱
۸۰۰	۰/۴۷۳±۰/۰۴	۷/۹۷	۰/۳۹۶±۰/۰۵	۲۲/۹۵	۰/۳۵۷±۰/۰۳	۳۰/۵۴
۴۰۰	۰/۴۹۵±۰/۰۵	۳/۶۹	۰/۴۰۲±۰/۰۶	۲۱/۷۸	۰/۳۸۵±۰/۰۵	۲۵/۰۹
۲۰۰	۰/۵۰۴±۰/۰۳	۱/۹۴	۰/۴۲۸±۰/۰۴	۱۶/۷۳	۰/۳۹۷±۰/۰۴	۲۲/۷۶
۱۰۰	۰/۵۱۵±۰/۰۷	۰	۰/۴۶۰±۰/۰۸	۱۰/۵۰	۰/۴۱۹±۰/۰۲	۱۴/۴۸

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در جدول ۵ نشان داده شده است. به علت توانایی کم عصاره‌ها در این تست، صرفا نتایج حاصل از یک غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. در این تست اختلاف معنی‌داری بین مقادیر وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). میزان IC_{50} کوئرستین که به عنوان کنترل مثبت بکار رفت، برابر ۱۷/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. بین فعالیت کوئرستین و تمامی عصاره اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$).

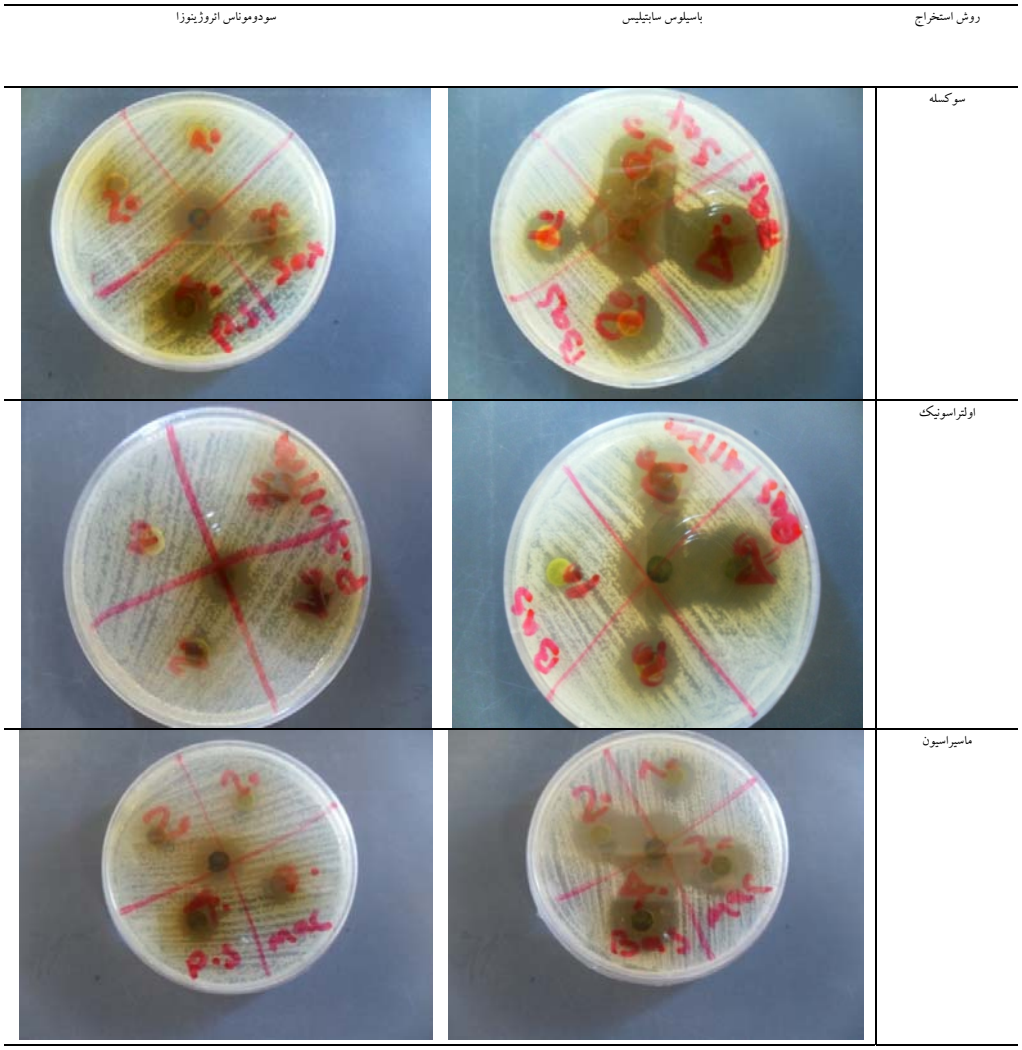
جدول۵: میزان به دام اندازی نیتریک اکساید عصاره‌های گیاه چشم گربه‌ای در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

عصاره	در صد به دام اندازی (٪)
اولتراسونیک	۶/۰۲
سوکسله	۴/۶۸
ماسیراسیون	۳/۶۷

نتایج حاصل از تست ضد میکروبی در جدول ۶ و شکل ۲ آمده است. براساس نتایج این جدول، تمامی عصاره ها بیشترین تاثیر را بر باسیلوس سابتیلیس و کم‌ترین اثر را بر استافیلوکوک اورئوس داشتند. عصاره‌ی حاصل از سوکسله موثرترین عصاره بر باسیلوس سابتیلیس، عصاره‌ی حاصل از التراسونیک موثر ترین عصاره بر سودوموناس ائروژینورا و اشرشیاکلی و عصاره‌ی حاصل از ماسیراسیون موثرترین عصاره بر استافیلوکوکوس اورئوس بود.

جدول۶: میانگین قطر هاله ی عدم رشد ناشی از تاثیر عصاره‌های مختلف بر باکتری‌ها

عصاره	سودوموناس آئروژینورا	اشرشیاکلی	باسیلوس سابتیلیس	استافیلوکوک اورئوس
سوکسله	۹/۹ ± ۲/۵	۶/۱ ±۰/۶	۱۹/۹ ±۴/۸	۱/۹ ±۰/۳
اولتراسونیک	۱۶/۲±۳/۷	۹/۴ ± ۱/۱	۱۶/۸ ±۲/۹	۱/۷ ±۰/۴
ماسیراسیون	۹/۸ ±۱/۹	۸/۳ ±۲/۰	۱۸/۳ ±۳/۵	۶/۷ ±۱/۳



شکل ۲: هاله‌ی عدم رشد در پلیت‌های باسیلوس سابتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا در مجاورت عصاره‌های ناشی از روش‌های مختلف استخراج اندام هوایی گیاه چشم گربه‌ای در غلظت‌های ۵۰-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

بحث

این مطالعه به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و تاثیر استفاده از روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی و هم‌چنین بررسی فعالیت ضد میکروبی اندام هوایی گیاه چشم گربه‌ای انجام شد. استخراج با روش‌های مختلف راندمان‌های متفاوتی به دست داد. سوکسله با ۲۱درصد و التراسونیک با ۹/۵درصد به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین راندمان استخراج را به خود اختصاص دادند. نظر به استفاده از حرارت و تکرار مجدد عمل استخراج (هر بار با حلال تازه) در روش سوکسله، به دست آمدن راندمان بالاتر استخراج کاملا منطقی به نظر می‌رسد. بالاتر بودن راندمان استخراج در روش سوکسله، به دفعات توسط مطالعات متعددی گزارش شده است. به عنوان نمونه راندمان حاصل از عصاره‌ی روش سوکسله در میوه *Sambucus ebulus* (۱۴) و میوه *S. nigra* (۱۵) به مراتب بالاتر از دو روش دیگر بوده است. اما استخراج با روش التراسونیک در زمان ۱ ساعت راندمانی مناسب و بسیار نزدیک به روش ماسیراسیون با صرف ۷۲ ساعت از خود نشان داد. به

جهت امکان پذیر بودن این مقایسه از حلال یکسان (متانول خالص) استفاده شد.

از دیر باز عصاره‌گیری از گیاهان به روش کلاسیک عصاره‌گیری به شکل خیساندن انجام می‌شده است. مقالات زیادی در خصوص استفاده از این روش در استخراج ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاهان به چاپ رسیده است از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی از عصاره *Hypericum perforatum* L. با روش خیساندن بدست آمده است. به خصوص فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید بسیار قابل ملاحظه بوده که حتی می‌تواند توجیهی برای بروز اثرضد التهابی و اثرات CNS گزارش شده از این گیاه باشد(۱۶). به طور مشابه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در مهار پراکسیداسیون چربی، به دام‌اندازی پراکسید هیدروژن و فعالیت آنتی همولیز گلبول قرمز از عصاره اندام هوایی گیاه کما (*Dorema aitchisonii*) گزارش شده است(۱۷). بررسی فعالیت آنتی اکسیدانتی ابریشم ذرت (Corn silk) (۱۸)، خرمندی (*Diospyros lotus*) ، تلکا (*Pyrus boissieriana*) و شیر دندان (*Leontodon hispidus*) (۱۹). همگی با روش خیساندن گزارش شده‌اند. اثرات فارماکولوژیک متعددی از عصاره متانلی گل گردو *Juglans regial* L. با روش خیساندن گزارش شده است(۲۰). این عصاره اثر ضد افسردگی، ضد التهابی، آنتی هیپوکسی و آنتی اکسیدانی خوبی از خود نشان داده است. گزارشات متعدد دیگری از فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی اندام هوایی گونه‌ای از سیر *Allium paradoxum* و باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) با روش خیساندن به چاپ رسیده (۲۱،۲۲) که همگی حاکی از کارآرایی خوب این روش کلاسیک استخراج می‌باشد.

از روش‌های معمول دیگر استفاده از روش عصاره‌گیری با کمک سوکسله است. مقالات زیادی نیز در خصوص کاربرد این روش استخراج، در جداسازی ترکیبات آنتی اکسیدان به چاپ رسیده است از جمله: فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی از عصاره پوست درختان راش و بلوط با روش سوکسله بدست آمده است(۲۳). فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی نیز از عصاره اتانلی اندام‌های مختلف گیاه زوفا (*Hyssopus oficinalis* L.) (۲۴) و گیاه مورد (*Myrtus communis* L.) (۲۵) با روش سوکسله گزارش شده است. در مطالعه دیگر از سه روش سوکسله، ماسیراسیون و اولتراسونیک برای عصاره‌گیری از گیاه برگ بو (*Laurus nobilis*) استفاده شد. عصاره تهیه شده به روش سوکسله با بیش‌ترین محتوای فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت به دام اندازی DPPH و نیتریک اکساید بهتری نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد. نتایج اندازه‌گیری محتوای تام فنولی نشان داد که عصاره ناشی از سوکسله بالاتر از اولتراسونیک و ماسیراسیون می‌باشد(۲۶).

در مطالعه‌ای جهت عصاره‌گیری از برگ گیاه *Cucumis melo* از روش‌های سوکسله، اولتراسونیک و ماسیراسیون استفاده شد. عصاره سوکسله، ترکیبات فنولی بیش‌تری نسبت به عصاره‌های دیگر داشت. در شلاته‌کنندگی آهن عصاره‌ی ناشی از سوکسله بهترین فعالیت را دارا بودند. این مقاله نشان داد که هر سه روش در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان موثر بودند اما تفاوتی بین آنها وجود نداشت(۲۷). مقاله‌ای نیز در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی *Vicia faba* نتایج مشابهی را نشان داده است، بدین صورت که هر سه روش استخراج موثر بوده اما تفاوتی بین آنها وجود ندارد(۲۸).

در یک مطالعه گل آذین گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum*) با سه روش عصاره شده و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل با یکدیگر مقایسه شده است. در عمده‌ی 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 مطالعه هم‌چنین نشان داد که روش‌های سوکسله و اولتراسوند در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئید موثرتر از روش کلاسیک خیساندن عمل می‌کنند(۲۹).

روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، 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 مخصوصا 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(۲۵). امواج صوتی که فرکانس‌های بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز داشته باشند می‌توانند موجب ایجاد نوسانات مکانیکی در محیط شوند. این عمل حباب‌هایی در مایع ایجاد کرده و فشار منفی تولید می‌کند. حباب‌های تشکیل شده، رشد و در نهایت متلاشی می‌شوند. تأثیرات مکانیکی اولتراسوند، باعث نفوذ بیش‌تری از حلال به درون مواد سلولی شده و در طی استخراج می‌تواند دیواره‌های سلولی را نیز تخریب کرده و باعث تسهیل آزاد سازی محتوای آن شود(۳۰). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تاثیر عوامل مختلف در روش اولتراسونیک بر روی کیفیت عصاره حاصل از روش استخراج اولتراسونیک انجام شد مشخص شد که نوع حلال نسبت به زمان عصاره‌گیری تاثیر بارزتری روی محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی دارد(۳۱). در این گزارش‌ها بسیاری از محققین توانستند نشان دهند که روش التراسونیک بطور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش کارایی استخراج، کاهش حجم حلال مصرفی و هم‌چنین کاهش زمان می‌شود(۸). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات دو روش عصاره‌گیری بر روی محتوای تام فنولی و فلاونوییدی سیاه ولیک (*Crataegus pentagyna*) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون پلی فنولی و اولتراسونیک با چهار تست آنتی اکسیدانی مختلف به صورت برون تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره‌ی حاصل از روش اولتراسونیک در تست‌های مختلف آنتی اکسیدانی بهتر از سایر عصاره‌ها بوده است(۷). مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، برروی اندام‌های هوایی گیاه زعفران خزری (*Crocus caspius*) انجام شد نیز نشان داد که عصاره اولتراسونیک دارای بیش‌ترین میزان فنول و فلاونویید بود، در تست DPPH و به دام اندازی H2O2 هم قوی‌ترین عصاره گزارش شده است(۳۲).

گیاهان داروئی به طور سنتی در پیشگیری و درمان و مشکلات گوناگون به کار می‌روند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتا به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد(۱). ترکیبات فنولی تقریبا در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک از رشد سلولی تا 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(۱). علاوه بر این از پلی فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله: فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق گزارش شده است(۱). شواهد اپیدمیولوژی حاکی از آن است که بین مصرف غذایی فلاونوئیدها و ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی ارتباط معکوس وجود دارد(۳۳). در مطالعه حاضر، میزان محتوای تام

فلاونوئیدی در عصاره بدست آمده با روش سوکسله بسیار بالا بود.

مدل به دام 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 بوده که پس از احیاء شدن، پایداری شده و رنگ آن از ارغوانی به زرد تغییر می کند. این رادیکال در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد (۱). در مطالعه حاضر، تغییر روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر قدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH داشت. عصاره‌ی حاصل از سوکسله فعالیت بالاتری از سایر عصاره‌ها نشان داد. در برخی مطالعات قبلی ارتباط خطی خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش شده است(۳۴). در این مطالعه نیز عصاره با میزان بیشتر فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان داد.

قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان داروئی به کار می‌رود(۱). در حالت کلی، عوامل احیا کننده فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند. چنانچه ترکیبی دارای این ویژگی‌ها باشد می‌تواند به عنوان آنتی اکسیدان 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 چندانی بر فعالیت احیا کنندگی عصاره‌های حاصل از این مطالعه نداشت. تقریبا تمامی عصاره و هم‌چنین ویتامین ث که به عنوان کنترل مثبت بکار رفت اثر یکسانی داشتند و اختلاف آنها از نظر آماری معنی دار نبود($p>۰/۰۵$).

نیتریک اکساید، رادیکالی آزاد با یک تک الکترون بوده 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(۱). در مطالعه حاضر، در محیط آزمایشگاهی برای تولید NO•، از سدیم نیترو پروساید استفاده شد. قدرت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌ها ضعیف اما وابسته به دوز بود.

یون‌های فلزی دو ظرفیتی نقش مهمی در کاتالیست کردن فرایندهای اکسیداسیون ایفا می‌کنند. شلاته کننده‌های آهن در بیماری‌های چون تالاسمی کاربرد درمانی دارند(۳۵). نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت شلاته کنندگی آهن نشان داد که مجموعا عصاره‌ها توانایی کمی در شلاته کردن آهن از خود نشان دادند. با این حال عصاره‌ی حاصل از روش سوکسله با ۳۱/۵ درصد مهار در غلظت ۱/۶ میلی گرم بر میلی لیتر قویتر از عصاره‌های دیگر بود. گرچه اختلاف معنی‌داری با عصاره‌ی التراسونیک از خود نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

علی رغم اینکه *N. lutea* در شمال ایران رشد فراوانی دارد هیچ گزارشی درباره فعالیت بیولوژیک آن یافت نشد. بجز فعالیت آنتی اکسیدانی، از فعالیت ضدمیکروبی این گیاه نیز تاکنون گزارشی صورت نپذیرفته است. به طور کلی از خانواده گل گاو زبان در درمان بریدگی‌های سطحی پوست، سوختگی، التیام زخم، تصفیه خون، تقویت قلب درمان التهاب و به عنوان ملین، نرم کننده و خلط آور استفاده می‌شود(۳۶). چندین گزارش در خصوص فعالیت ضد میکروبی گیاهان دیگر از تیره ی گل گاو زبان وجود دارد. از جمله گزارش شده که گیاه گل گاو زبان چسبندگی باکتری به ترشحات معده را کاهش می‌دهد(۳۷). عصاره آبی و الکلی برگ‌های گیاه *Coldennia procumbens* (از تیره گاوزبان) فعالیت ضد باکتری مهم در مقابل

باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پروجنوس)، فعالیت متوسطی در مقابل سالمونلا تیفی و اثر بسیار کم‌تری در برابر اشرشیاکلی داشتند(۳۸،۴۰).

در مجموع، راندمان استخراج در عصاره حاصل از سوکسله بالاتر از سایر روش‌ها بود. علاوه بر آن، این عصاره بالاترین محتوای فنل را دارا بود. بجز در تست به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید که هیچ یک از عصاره‌ها فعالیت بالایی نداشتند، عصاره بدست آمده از روش سوکسله، بهترین فعالیت را در سایر تست‌های آنتی اکسیدانی از خود نشان داد. بیش‌ترین فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها هم در عصاره حاصل از روش سوکسله مشاهده شد. این عصاره بخصوص بر علیه باسیلوس سابتیلیس موثرتر از سایر عصاره‌ها بود. این مطالعه نشان داد استخراج با سوکسله، به‌طور موثرتری نسبت به سایر روش‌ها می‌تواند در استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان از این گیاه به کار رود.

سپاسگزاری

بخشی از این مطالعه توسط گرانت پژوهشی از سوی معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره ۱۰۱-۹۲ تامین شده است که بدین وسیله از حمایت مالی این حوزه تشکر می‌گردد.

References

1. Khalili M, Ebrahimzadeh M A. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
2. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of Hibiscus esculenus leaves. Pharmacologyonline 2009; 2: 1097-1105.
3. Nabavi SF, Nabavi SM , Ebrahimzadeh MA, Jafari N, Yazdanpanah S. Biological activities of freshwater algae, Spirogyra singularis Nordstedt. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2013; 22(1): 58-65.
4. 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.
5. Pakravan M, Nejhad Falatoury A, Tavassoli A. Morphological and micromorphological studies of Nonea (Boraginaceae: tribe Boragineae) in Iran. Iran J Bot. 2009; 15(1): 129-139. (persian)
6. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of the bulb and aerial parts of Ornithogalum sintenisii L (Liliaceae) at flowering stage. Trop J Pharm Res. 2010; 9(2): 141-148.
7. Rabiei Kh, Bekhradnia S, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of Crataegus pentagyna subsp. elburensis. Nat Pro Res. 2012; 26(24): 2353-2357.
8. 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. Int Food Res J. 2014; 21(2):783-788.

9. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of Hyoscyamus squarrosus fruits. Pharmacologyonline. 2009; 2: 644-650.
10. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami Sh. Antioxidant and free radical scavenging activities of culinary-medicinal mushrooms, golden chanterelle Cantharellus cibarius and angel's wings Pleurotus porrigens . Int J Med Mushrooms. 2010; 12(3): 265-272.
11. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr J Biotechnol. 2008; 7(18): 3188-3192.
12. Mohammadi Amlashi S, Babakhani B. Examining the antibacterial activity of Artemisia dracunculus L. extracts using different methods of extraction. Int J Mol Clin Microb. 2016; 6(1): 629-634.
13. Davoodi A, Ebrahimzadeh MA, Fathalinezhad F, Khoshvishkaie E. Antibacterial activity of Mespilus germanica leaf extract. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017; 26(146): 173-178. (Persian)
14. Ebrahimzadeh MA, Enayatifard R, Saeedi M, Khalili M, Ghaffarloo M, Yazdani Charati J. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. Iran J Pharm Res. 2014; 13(3): 1041-1047. (persian)
15. Azari B, Siami A, Ebrahimzadeh MA, Khan BA. Antioxidants activity of extracts from Sambucus nigra, efficiency of different extraction methods. Lat Am Appl Res. 2015; 45:139-144.
16. Fathi H Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and free radical scavenging activities of Hypericum perforatum L. International Journal of Forest, Soil and Erosion. 2013; 3(2): 68-72.
17. Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Free radical scavenging and antioxidant activities of Dorema aitchisonii. J Food Drug Anal. 2012; 20 (1): 34-40.
18. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. Turk J Biol. 2008; 32(1): 43-49.
19. Ebrahimzadeh MA, Eslami S, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant and antihemolytic activities of leontodon hispidus. Biotechnol & Biotechnol Eq. 2010; 24(4): 2127-2131.
20. Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Mahmoudi M, Keyvani Rad Sh. Biological activities of Juglans regia flowers. Braz J Pharmacog. 2011; 21(3): 465-470.
21. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA. Antioxidant activity of hydroalcholic extract of Ferula gummosa Boiss roots. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15(6):658-664.
22. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Eslami B, Dehpour AA. Antioxidant and antihaemolytic activities of Ferula foetida regel

(Umbelliferae). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15(2): 157-164.

23. Fazli R, Nazarnezhad N, Ebrahimzadeh MA, Zabihzadeh M. Evaluation of the Antioxidant capacities and total Phenolic Contents of beech and oak barks. Armaghane Danesh. 2013; 18(2): 137-145 (Persian).
24. Alinezhad H, Azimi R, Zare M, Ebrahimzadeh MA, Eslami Sh, Nabavi SF, et al. Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of Hyssopus officinalis L. var. angustifolius. Int J Food Prop. 2013; 16(5): 1169-1178.
25. Mozdastan Sh, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (Myrtus communis L). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
26. Ebrahimzadeh MA, Hashemi Z, Jamshidi M. Evaluation of antioxidant activities of Laurus nobilis L. (Lauraceae) fruits, Impact of extraction methods. World Sci J. 2013; 1:79-87.
27. 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 Erosion. 2013; 3(3): 95-99.
28. Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of methods for the extraction of antioxidants from Vicia faba L. bean and hulls. Latin Am App Res. 2014; 44: 203-208.
29. 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. 2016; 20:946-949.
30. Wang L., Weller C.L. Recent advance in extraction of nutaceuticals from Plants. Trends Food Sci Technol 2006, 17, 300-312.
31. Falleh H. 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 Pharm Res. 2012; 11(2): 243-249.
32. Ebrahimzadeh M, Fathi H, Khalil M. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of Crocus caspius, Impact of extraction methods. Pak J Pharm Sci. 2016; 29(3): 773-777.
33. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk: ten year follow-up of the Zutphen Elderly Study. Lancet. 1997; 349(8878):1007-1011.
34. 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.
35. 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.
36. Bekhradnia S, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of Echium amoenum. Rev Chim J (Bucharest). 2016; 67(2): 223-226.

37. Omahony R, Al-Khateeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, et al. Bactercidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against Helicobacter pylori. World J Gastroenterol. 2005;11 (47): 7499-7507.
38. Ramakrishnan G, Kothai R, Jaykar B. In vitro Antibacterial activity of different extracts of leaves of Coldenia procumbens.Int J Pharm Tech Res. 2011; 3(2): 1000-1004.
39. Dash GK, Abdullah MS. A review on Heliotropium indicum L. (Boraginaceae). Int J Pharm Sci Res. 2013; 4(4): 1253-1258.
40. Lee Hoi-Soon. Growth inhibitory effects of various medicinal plants against lactic bacteria and harmful lntestinal bacteria. Food Sci Biotech. 2000; 9(1): 52-56.