

Evaluation of Antioxidant Activity of Vicia hirsuta and the Effect of Extraction Method

Samira Montahaedargah¹,
Pezhman Moradi²,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh³

¹ MSc in Breeding and Physiology of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

² Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

³ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 3, 2017, Accepted August 14, 2017)

Abstract

Background and purpose: The genus *Vicia* (Papilionaceae) contains 45 species in Iran. This investigation was designed to study the impact of extraction methods on total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of *V. hirsuta* aerial parts.

Materials and methods: In this experimental study the efficiencies of three extraction methods i.e. Maceration, Soxhlet, and ultrasonically assisted extraction were evaluated for the extraction of antioxidants. Antioxidant activities were investigated by four different methods. The total phenolic and flavonoid contents were also determined. Data analysis was done in GraphPad Prism 5.

Results: Soxhlet extract showed highest amount of phenolic and flavonoids contents. In DPPH radical scavenging activity, soxhlet extract had a higher activity which was significantly different from other extracts ($P < 0.01$). This extract had higher nitric oxide radical scavenging activity ($377.4 \pm 9.1 \mu\text{g ml}^{-1}$), too. In reducing power assay, all extracts showed the same activity ($P > 0.05$). In iron chelating activity, maceration extract had the highest activity.

Conclusion: Extraction methods significantly affect antioxidant capacities and total phenolic and flavonoid contents. Soxhlet assisted extraction was chosen as the most efficient method.

Keywords: antioxidant, phenolics, flavonoids, *Vicia*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(153): 123 - 128 (Persian).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ماشک معمولی (*Vicia hirsuta*). اهمیت روش استخراج

سمیرا منتهای درگاه¹پژمان مرادی²محمدعلی ابراهیم زاده³

چکیده

سابقه و هدف: جنس *Vicia* (Papilionaceae) دارای 45 گونه در ایران است. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر روش استخراج بر محتوای تام فنلی، فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی اندام هوایی گیاه ماشک معمولی *V. hirsuta* طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کارایی سه روش استخراج خیساندن، سوکسله و اولتراسونیک، به منظور استخراج مواد آنتی اکسیدان مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی با چهار روش مورد ارزیابی قرار گرفت. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی نیز اندازه گیری شد. داده ها با نرم افزار گراف پد پریسم 5 آنالیز شد.

یافته‌ها: عصاره سوکسله بالاترین میزان تام فنلی و فلاونوئیدی را داشت. در به دام اندازی رادیکال DPPH همین عصاره بالاترین فعالیت را نشان داد که اختلاف معنی داری با سایر عصاره‌ها داشت ($p < 0/01$). این عصاره بهترین فعالیت را در به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید از خود نشان داد $IC_{50} = 377/4 \pm 9/1 \mu g/ml$. در تست احیا کنندگی، عصاره‌ها اثر مشابهی نشان دادند ($p > 0/05$). در تست شلاته کنندگی آهن، روش خیساندن بالاترین فعالیت را نشان داد.

استنتاج: روش استخراج تاثیر زیادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی دارد. روش سوکسله به عنوان مناسب ترین روش انتخاب شد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید، ماشک

مقدمه

می باشند. بر این اساس تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است (1). جنس *Vicia* از خانواده ی Papilionaceae دارای 45 گونه در ایران است. فعالیت آنتی اکسیدانی *V. faba*، *V. sativum*، *V. cracca* و *V. sojakii* گزارش شده است (2، 3).

رادیکال های آزاد نقش زیادی در پیدایش یا پیشرفت بیماری های مختلف از قبیل سرطان، بیماری های قلبی - عروقی و بیماری های دژنراتیو دارند. این اثرات زیان آور می تواند توسط آنتی اکسیدان ها متوقف گردد. گیاهان منبع خوبی برای آنتی اکسیدان های طبیعی

Email: zadeh20@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری، کیلومتر 18 جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

1. کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

2. دانشجوی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

3. استاد، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1396/1/14 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1396/2/10 تاریخ تصویب: 1396/5/23

اضافه شد. جذب پس از 30 دقیقه در 415 نانومتر اندازه گیری شد (6، 7).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

به 1 میلی لیتر از عصاره، 1 میلی لیتر محلول DPPH اضافه شد. جذب مخلوط پس از 15 دقیقه در تاریکی در 517 نانومتر قرائت شد. درصد به دام اندازی رادیکال آزاد محاسبه شد (6، 7).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

5/2 میلی لیتر از عصاره با 2/5 میلی لیتر بافر فسفات 0/2 مولار و 2/5 میلی لیتر محلول 1 درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط و مجموعه در 50 درجه سانتی گراد برای 20 دقیقه نگهداری شد. 2/5 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید اضافه گردید. به 2/5 میلی لیتر از این محلول، 2/5 میلی لیتر آب و 0/5 میلی لیتر محلول 0/1 درصد کلراید آهن III اضافه شد. جذب در 700 نانومتر قرائت شد (6، 7).

ارزیابی به دام اندازی نیتریک اکساید

سدیم نیترو پروساید با غلظت های مختلفی از عصاره مجاور شد. پس از 150 دقیقه انکوبه شدن، 0/5 میلی لیتر واکنشگر گریس اضافه شد و جذب مخلوط در 546 نانومتر در مقابل بلانک قرائت و درصد به دام اندازی محاسبه شد (6، 7).

ارزیابی شلات کنندگی آهن

به 1 میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره، 50 $\mu\text{g/ml}$ محلول 2 mM کلرید آهن II اضافه شد. پس از 5 دقیقه، 100 میکرو لیتر محلول 5 mM فروزین اضافه شده و با آب به حجم 3 میلی لیتر رسانده شد. پس از 10 دقیقه انکوبه شدن، جذب در 562 نانومتر اندازه گیری و درصد مهار تشکیل کمپلکس محاسبه شد (6، 7).

تأثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی V. faba گزارش شده است (4). در بررسی متون، گزارشی از فعالیت آنتی اکسیدانی ماشک معمولی به دست نیامد. این تحقیق به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و همچنین بررسی تأثیر روش های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی این گیاه انجام شده است. عصاره های گیاه با کمک سوکسله و امواج غیرمستقیم اولتراسونیک تهیه و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها با عصاره ماسیراسیون مقایسه شده است.

مواد و روش ها

نمونه گیاهی:

اندام هوایی V. hirsuta از ورسک جمع آوری شد. برای تهیه عصاره، خیساندن 15 گرم از گیاه خشک با 50 میلی لیتر متانول، و برای تهیه عصاره اولتراسونیک از امواج 60 کیلو هرتز در دمای اتاق به مدت یک ساعت استفاده شد. 15 گرم گیاه در 50 میلی لیتر متانول در حمام اولتراسونیک قرار گرفت (5). برای تهیه عصاره سوکسله، 10 گرم گیاه در سوکسله با متانول به مدت 8 ساعت استخراج شد.

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

نیم میلی لیتر از عصاره (با غلظت 400 میکرو گرم بر میلی لیتر) با 2/5 میلی لیتر فولین سیو کالتیو مخلوط و 2 میلی لیتر محلول کربنات سدیم (7/5 درصد) اضافه و جذب نمونه ها پس از 2 ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش در 760 نانومتر اندازه گیری شد. محتوای تام فلاونوئید عصاره با رنگ سنجی ارزیابی شد. غلظت 0/8 mg/ml از عصاره تهیه شد. به 0/5 میلی لیتر از نمونه در 1/5 میلی لیتر متانول، 100 میکرو لیتر محلول آلومینیوم کلراید 10 درصد، 100 میکرو لیتر پتاسیم استات 1 مولار و 2/8 میلی لیتر آب

آنالیز آماری

آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز برای مقایسه میانگین‌ها بکار رفت. نتایج با احتمال 0/05 $p <$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها با نرم افزار گراف پد پریسم 5 آنالیز شد.

یافته ها و بحث

محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌ها در جدول شماره 1 آمده است.

عصاره سوکسله، بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی را دارا بود.

جدول شماره 1: راندمان استخراج، محتوای تام فنولی و

فلاونوئیدی عصاره‌های ماشک معمولی

عصاره	راندمان	محتوای تام فنولی، میلی گرم	محتوای تام فلاونوئیدی، میلی گرم
(%)	معادل گالیک اسید در گرم عصاره	معادل کوئرستین در گرم عصاره	
روش سوکسله	21/7	137/9 ± 6/1	53/3 ± 3/8
روش اولتراسونیک	13/4	118/1 ± 3/5	46/7 ± 2/1
روش ماسیراسیون	17/6	128/8 ± 4/8	47/5 ± 2/7

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر قدرت به دام‌اندازی رادیکال DPPH در جدول شماره 2 آمده است. IC_{50} در استخراج به روش سوکسله $8/6 \pm 127/6$ میکرو گرم بر میلی لیتر به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با عصاره‌های دیگر داشت ($p < 0/01$).

جدول شماره 2: تاثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی

اکسیدانی عصاره‌های ماشک معمولی

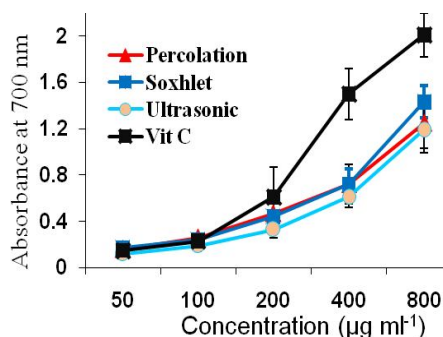
عصاره	به دام‌اندازی رادیکال DPPH	به دام‌اندازی رادیکال NO	شلاته‌کنندگی آهن
	IC_{50} ($\mu g\ ml^{-1}$) ^a	IC_{50} ($\mu g\ ml^{-1}$) ^b	IC_{50} ($mg\ ml^{-1}$) ^c
روش سوکسله	127/6 ± 8/6	377/4 ± 9/1	1/44 ± 0/1
روش اولتراسونیک	227/2 ± 10/5	460/8 ± 11/3	1/68 ± 0/1
روش ماسیراسیون	195/3 ± 13/6	668/4 ± 14/7	1/32 ± 0/1

BHA a IC_{50} $53/82 \pm 3/2 \mu g/ml$ بود.b IC_{50} کوئرستین، $195/0 \pm 6/4 \mu g/ml$ بود.c IC_{50} EDTA، $18/1 \pm 0/1 \mu g/ml$ بود.

نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر قدرت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید در جدول شماره 2

آمده است IC_{50} . برای عصاره سوکسله از سایر عصاره ها پایین تر بود. اختلاف بین تمامی مقادیر معنی دار بود ($p < 0.001$).

عصاره ها در تست شلاته‌کنندگی آهن فعالیت ضعیفی نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. نتایج حاصل از تاثیر روش استخراج بر میزان قدرت احیاکنندگی در نمودار شماره 1 نشان داده شده است. عصاره‌ها فعالیت خوبی از خود نشان دادند. فعالیت آن‌ها یکسان بوده و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$).



نمودار شماره 1: تاثیر روش استخراج بر قدرت فعالیت احیا کنندگی عصاره‌های ماشک معمولی

گیاهان به‌طور سنتی در درمان و پیشگیری اختلالات گوناگون به کار می‌روند (8). فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن‌ها نسبت داد (9).

در مقایسه روش‌های مختلف استخراج، سوکسله بالاترین مقدار ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئید تام را دارا بود. نتایج حاصل از مطالعه‌ای نیز نشان داد که محتوای فنلی زولنگ در عصاره سوکسله نسبت به دو روش دیگر بیش تر است (10). مدل به دام‌اندازی رادیکال DPPH در ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌ها استفاده می‌شود. فعالیت عصاره سوکسله بالاتر از بقیه بود. این عصاره بالاترین مقدار فنل و فلاونوئید را نیز دارا بود. ارتباط خوبی بین فعالیت

آنتی اکسیدانی و فنول در برخی گیاهان گزارش شده است (11). در خصوص زولنگ در تست به دام اندازی رادیکال DPPH عصاره سوکسله قوی تری از دو روش دیگر بود (10). عصاره سوکسله از گیاه مورد نیز بالاترین فعالیت را داشته است (12).

نیتریک اکساید در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک نقش دارد. تولید بیش از حد آن می تواند با ایجاد استرس به تخریب DNA منجر شود. قدرت به دام اندازی نیتریک اکساید عصاره ها خوب و وابسته به دوز بود. روش استخراج تاثیر قابل ملاحظه ای این فعالیت داشت. در این تست نیز، عصاره ی سوکسله بالاترین فعالیت را نشان داد. در خصوص زولنگ (10) و عصاره های مورد (13)، عصاره ماسیراسیون بالاترین فعالیت را از خود نشان داده است. قدرت احیا کنندگی به عنوان معیاری برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی به کار می رود. روش استخراج تاثیر بر فعالیت احیا کنندگی عصاره ها نداشت. عصاره ها فعالیت بالایی از خود نشان دادند که اختلاف معنی داری بین آن ها وجود نداشت. در تحقیقی مشابه بر گیاه مورد، عصاره ماسیراسیون اثر بهتری نسبت به ویتامین ث نشان داد (9).

ارائه متدهای نوین استخراج ترکیبات با فعالیت بیولوژیکی از گیاهان افزایش یافته است. استخراج به کمک اولتراسوند یک روش ساده بوده و می تواند جایگزین مناسبی برای روش های سنتی باشد. این روش ارزان بوده و اجرای آن راحت می باشد. در مطالعه ای که روی گیاه *Crocus caspius* انجام شد، عصاره اولتراسونیک دارای بیشترین میزان فنول و فلاونوئید بود، در تست DPPH، هم قوی ترین عصاره گزارش شده است (13). این مساله در تحقیق حاضر تایید نشد. در پایان می توان نتیجه گرفت که استخراج با کمک سوکسله در استخراج ترکیبات فعال آنتی اکسیدان، فنل و فلاونوئید تام در ماشک معمولی بسیار موثر از سایر روش ها عمل می کند.

سپاسگزاری

این مقاله با حمایت حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده که بدینوسیله از ایشان تشکر می گردد.

References

1. 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.
2. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of *vicia canescence*. *Pharmacologyonline* 2009; 3:688-694.
3. Eslami B, Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA. Free radicals scavenging and antioxidant activity of *Vicia sojakii*. *Rev Chim* 2011; 62(12): 1216-1218.
4. Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from *vicia faba* L. bean and hulls. *Latin Am Appl Res* 2014; 44: 203-208.
5. 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.

6. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15(6): 658-664.
7. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. *Pharmacologyonline*. 2009; 2: 644-650.
8. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activity of *Hibiscus esculenus* leaves. *Pharmacologyonline*. 2009;2: 1097-1105.
9. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi F, 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 Mushr*. 2010, 12(3): 265-272.
10. Motallebi Riekandeh S, Mazandarani M, Ebrahimzadeh MA, Zargari M. Antioxidant activities of *Eryngium caucasicum* Inflorescence. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(5): 946-949.
11. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009;22(3): 277-281.
12. 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).
13. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods. *Pak J Pharm Sci* 2016; 29(3):773-777.