ORIGINAL ARTICLE

Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.)

Shokufeh Mozdastan[1],
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[2],
Shahram Eslami[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, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 14, 2015 ; Accepted July 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: Medicinal plants are the main source of very potent antioxidants. *Myrtus communis L. (*Myrtle, Myrtaceae) is a medicinal plant used worldwide in traditional medicine. It is a well-known plant with distinctive antioxidant activity. This study aimed at investigating the effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from Myrtle *(Myrtus communis L.)* leaf.

Materials and methods: The shade-dried leaf was extracted separately or successively with 6 solvets with different polarity: n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, methanol, and water. Twelve extracts were prepared. Antioxidant capacity was assessed using DPPH and nitric oxide (NO), free radicals scavenging, reducing power and iron chelating activity. The total phenolic and flavonoid contents were also determined.

Results: The highest yield of extraction was achieved by the most polar solvent, water. It also showed highest amount of phenolics but the extract did not contain the highest amount of flavonoids. Polar solvent extracts showed the best antioxidant capacities in DPPH and NO free radicals scavenging and reducing power. Nonpolar solvents, such as Chloroform, n-butanol and ethyl acetate had the highest amount of flavonoids and were also detected with the best iron chelating activity.

Conclusion: The results clearly showed that utilization of polar solvent results in extraction of significant amounts of phenolics. Those components were the most potent antioxidants present in these extracts. Nonpolar solvents are more suitable for extraction of favonoids.

Keywords: Myrtle, *Myrtus communis*, solvent extraction, antioxidant, total phenolics, total flavonoids, iron chelating

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(126): 68-81 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۶ تیر سال ۱۳۹۴ (۸۱-۶۸)

نقش افزایش قطبیت حلال در محتوای تام فنل و فلاونوئیدی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مورد *Myrtus communis* L.

شکوفه مزدستان[۱]
محمد علی ابراهیم زاده[۲]
شهرام اسلامی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان داروئی از منابع اصلی آنتی‌اکسیدان‌های قوی به شمار می‌روند. گیاه مورد از خانواده میرتاسه یک گیاه داروئی بوده که در سراسر دنیا در طب سنتی به کار می‌رود. این گیاه بسیار شناخته شده بوه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثبات شده‌ای دارد. این مطالعه به منظور بررسی نقش حلال در محتوای فنلی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه مورد طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: برگ‌ها در سایه خشک و به قطعات ریز خرد شدند. پودر گیاه به طور جداگانه و هم‌چنین به طور متوالی با ۶ حلال با قطبیت‌های متفاوت شامل: n- هگزان، کلروفرم، اتیل استات، n- بوتانول، متانول و آب استخراج شدند. بدین‌ترتیب ۱۲ عصاره تهیه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با چهار روش مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت: به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH و نیتریک اکساید، تست احیا کنندگی و بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی آهن. علاوه بر آن محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی نیز اندازه گیری شد.

یافته‌ها: بالاترین راندمان عصاره گیری در هر دو روش به قطبی ترین حلال تعلق داشت: آب. این عصاره بالاترین میزان فنلی تام را نیز دارا بود، اما میزان فلاونوئید آن بالاترین نبود. حلال‌های قطبی بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH و نیتریک اکساید و هم‌چنین تست احیا کنندگی نشان دادند. حلال‌های غیر قطبی مانند کلروفرم، n- بوتانول و اتیل استات برای استخراج فلاونوئید ها بسیار مناسب‌تر بودند و فعالیت شلاته کنندگی آهن بالاتری از خود نشان دادند.

استنتاج: استفاده از حلال قطبی، استخراج مقادیر بیش‌تر ترکیبات فنولی را امکان‌پذیر می‌نماید. این ترکیبات بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در عصاره دارا می‌باشند. حلال‌های غیر قطبی برای استخراج فلاونوئید ها مناسب‌تر هستند.

واژه های کلیدی: میرتل، میرتوس، استخراج، آنتی اکسیدان، فنول تام، توتال فلاونوئید، شلاته کنندگی آهن

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی و فراورده‌های حاصل از آن‌ها نقش گیاهان را در چرخه اقتصادی پر اهمیت کرده است. به‌طوری‌که مصرف رو به ازدیاد آن‌ها تنها به کشورهای در حال توسعه محدود نشده است، بلکه اخیرا در کشورهای توسعه یافته نیز جایگاه ویژه‌ای به خود اختصاص داده است. درکشور ما به لحاظ تنوع جغرافیایی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۲۴۵- ۹۱ 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 دانشگاهی 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، گروه علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری علوم دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۱/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۱/۲۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۱۵

و اقلیمی، گونه‌های گیاهی متنوع در آن انتشار دارند. در این میان فلور غنی ایران بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در بر می‌گیرد که تعداد بسیار زیادی از آن ها را گیاهانی تشکیل می‌دهند که گیاهان دارویی نامیده می‌شوند. از نیمه دوم قرن گذشته، تحقیقات وسیعی روی گیاهان دارویی در بیش‌تر کشورهای جهان انجام گرفته و در پی آن داروهای گیاهی فراوانی تهیه و به بازار عرضه گردیده است. بنابراین ضرورت مطالعه بر روی مواد مؤثر دارویی فلور طبیعی ایران حائز اهمیت است(۱). بسیاری از بیماری‌های مزمن در افراد بالغ که با افزایش سن ارتباط داده می‌شوند، به صورت مستقیم با استرس اکسیداتیو در ارتباط بوده که این فرآیند ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد یا ضعف سیستم دفاعی ارگانیسم مورد نظر است. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به تصلب شرائین، سکته مغزی، بیماری‌های عصبی و بیماری التهابی مزمن اشاره نمود(۲). فرآیند اکسیداسیون و تولید رادیکال‌های آزاد و ذرات فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygens Species) بخش لازمی از حیات بوده که در واکنش‌های بیولوژیک مهمی شرکت دارند. به طور مثال فاگوسیتوز کننده‌های فعال شده برای از بین بردن باکتری و قارچ‌های مهاجم نیازمند مصرف ROS هستند. هم‌چنین سوپراکساید نقش مفیدی در تنظیم رشد سلولی و پیام‌های بین سلولی دارد. رادیکال‌های آزاد و ROS تنها زمانی مفید هستند که در زمان و مکان درستی تولید شوند، در غیر این صورت می‌توانند مضر باشند. استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد و ذرات فعال اکسیژن و ضعیف شدن سیستم‌های آنتی اکسیدانی به علت برداشت کم آن‌ها یا تولید کم آنتی اکسیدان‌های اندوژن و یا افزایش استفاده از آن‌ها می‌باشد. بسیاری از بیماری‌های مزمن در ارتباط با استرس اکسیداتیو است. به منظور جلوگیری از آسیب ROS، در بدن موجودات زنده، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان قوی و پیچیده‌ای وجود دارد(۳). گیاه مورد با نام علمی *Myrtus communis* Linn از خانواده Myrtaceae می‌باشد. میرتاسه تیره‌ای نسبتا بزرگ حدود ۱۰۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه است که بومی جنوب اروپا، شمال آفریقا و غرب آسیاست. هم چنین در امریکای جنوبی، هیمالیا و استرالیا هم فراوانی خوبی دارد(۵،۴). مورد گیاهی معطر و خوشبو است که دلیل آن وجود غده های حاوی اسانس در برگ، میوه و گل‌های آن می‌باشد. این گیاه از گذشته به دلیل خواص ضدالتهابی، ضدویروسی، ضدعفونی کنندگی و گندزدایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات شیمیایی اسانس مورد در مناطق مدیترانه‌ای به طور گسترده مورد مطالعه قرارگرفته است. بخش دارویی این گیاه را برگ‌ها تشکیل می‌دهند. برگ‌های گیاه ۱/۵ تا ۲ درصد حجمی اسانس دارند. اسانس ها معمولاً متعلق به ترپن‌ها، سزکویی ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها، فنول‌ها، اترها و یا پراکسیدها می‌باشند(۵). میوه مورد دارای سیتریک اسید، مالیک اسید، رزین، تانن، روغن‌های اشباع، فلاونوئید، گلیکوزیدهای آنتوسیانینی، کوئرستین، میریستین، کافئیک اسید و هسپریدین می‌باشد. برگ مورد حاوی تانن، فلاونوییدها، کومارین، کافییک اسید، گالیک اسید و الاژیک اسید می‌باشد. ریشه مورد حاوی تانن، آلکالوییید، گلیکوزید، گالیک اسید، فنولیک اسید و کوئرستین است. از این گیاه اثرات فراوانی از جمله ضد میکروبی(۷،۶)، ضد قارچی(۸)، حشره‌کشی و ضد مالاریایی(۹)، فعالیت ضد التهابی(۱۰)، فعالیت آنتی اکسیدانی(۱۲،۱۱)، اثرات ضد دیابتی(۱۳)، فعالیت قلبی- عروقی(۱۴) و فعالیت ضد دردی(۱۵) گزارش شده است. این تحقیق به منظور بررسی نقش حلال در محتوای فنولی و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برگ گیاه مورد انجام شده است. بدین منظور ۶ حلال به دو صورت متفاوت (جداگانه و متوالی) در استخراج عصاره از برگ‌های این گیاه به کار رفته و عصاره‌ها ضمن اندازه‌گیری میزان تام فنلی و فلاونوئیدی، با ۴ روش متفاوت آنتی‌اکسیدانی، با یکدیگر مقایسه شدند.

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 خیساندن یک بار به طور جداگانه (هر بار با پودر جدید گیاه) و یک بار دیگر به طور متوالی (هر بار بر روی باقی‌مانده جامد حاصل از استخراج قبلی) هر بار با ۶ حلال مختلف صورت پذیرفت. حلال‌ها به ترتیب کاهش قطبیت عبارتند بودند از: آب، متانول، n-بوتانول، اتیل استات، کلروفرم و n- هگزان.

در این روش ۱۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۵۰ میلی‌لیتر n- هگزان مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجددا n- هگزان جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه روتاری (تبخیرکننده چرخان) حذف گردید. همین روش با حلال‌های دیگر نیز به طور جداگانه با پودر جدید گیاه انجام شد. بدین صورت که ۱۰ گرم از پودر برگ خشک گیاه با حلال‌های کلروفرم، اتیل استات، n-بوتانول، متانول و یا آب مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. ادامه کار به همان صورت تهیه عصاره هگزانی انجام پذیرفت(۱۶). در این روش ۵۰ گرم از پودر برگ خشک گیاه با ۲۰۰ میلی لیتر n-هگزان مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً n-هگزان جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. سپس n-هگزان خارج شده و به همراه حلال‌های قبلی توسط دستگاه روتاری حذف شد. به پودر باقیمانده استخراج از این مرحله، کلروفرم اضافه شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. پس از خارج کردن کلروفرم به باقیمانده، اتیل استات افزوده شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. سپس n-بوتانول اضافه شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد. پس از خارج کردن n-بوتانول، متانول افزوده شد. مراحل کار با این حلال نیز تکرار شد و در نهایت بعد از خارج کردن متانول، به باقیمانده استخراج آب اضافه شد. مراحل کار با آب نیز تکرار شد(۱۷).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد(۱۶). غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی لیتر 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 میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۲ بار تکرار شد(۱۶). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد(۱۶). 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 میلی لیتر 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- ماوراء بنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی

کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۲ بار تکرار شد ومیانگین آن‌ها گزارش شد(۱۶).

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(۱۸،۱۹).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره‌ها از طریق متدین و چن ارزیابی شد. غلظت‌های 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 غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد(۱۸، ۱۹).

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیتروپروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتریت تولید می نماید. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنش‌گر گریس مورد سنجش قرار می گیرد. به دام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظور سدیم نیتروپروساید (۱۰ میلی‌مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت های 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 میلی لیتر 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 (آب) قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن ها گزارش شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام اندازی 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 (۱۸، ۱۹).

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 میلی لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II اضافه شد و پس از ۵ دقیقه ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی مولار 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 شلاته‌کنندگی آهن به صورت IC_{50} بیان شد. در این آزمایش نیز محلول بلانک شامل تمامی اجزای شرکت کننده در واکنش به جز عصاره بود(۱۸، ۱۹).

آنالیز آماری

تمامی اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت Mean ± SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

یافته ها

پس از انجام فرآیند عصاره‌گیری، وزن عصاره‌ها محاسبه شد. بازده هر یک از آن‌ها در جدول شماره ۱ آمده است. بالاترین راندمان عصاره‌گیری با حلال‌ها به شکل جداگانه به حلال آب تعلق داشت (۳۰/۹ درصد). در روش متوالی نیز آب بالاترین راندمان استخراج را داشت (۱۷/۸ درصد).

جدول شماره ۱: راندمان در روش استخراج ماسیراسیون با حلال های مختلف به شکل جداگانه و متوالی

نوع عصاره	راندمان به روش جداگانه (درصد)	راندمان به روش متوالی (درصد)
n-هگزان	۰/۹	۰/۹
کلروفرم	۳/۲	۲/۰
اتیل ستات	۲/۵	۱/۶
n-بوتانول	۳/۵	۲/۹
متانول	۱۸/۸	۱۰/۴
آب	۳۰/۹	۱۷/۸

محتوای تام فنلی با کمک معرف فولین سیو کالتیو بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید سنجیده شد. این مقادیر به صورت میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره در جدول شماره ۲ آمده است. محتوای تام فلاونوئیدی که بر اساس روش رنگ سنجی به کمک آلومینیوم کلراید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی مقادیر در جدول شماره ۲ آمده است. در استخراج با حلال ها به شکل جداگانه آب و متانول بالاترین میزان ترکیبات پلی فنولی و در روش متوالی آب و n- بوتانول بالاترین محتوای پلی فنولی را داشتند. در مجموع در روش متوالی ۱۶۶۴ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. در استخراج به شکل جداگانه عصاره کلروفرمی و اتیل استاتی بالاترین میزان فلاونوئید تام و در روش متوالی n- بوتانول و اتیل استات بالاترین محتوای فلاونوئید تام را داشتند. اتیل استات حلال مناسبی برای جداسازی ترکیبات پلی فنولی می‌باشد(۲۰). در تست به دام اندازی رادیکال DPPH، در استخراج با حلال‌ها به شکل جداگانه حلال های قطبی شامل آب با IC_{50} ۸/۱۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و متانول با IC_{50} ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت را در این روش از خود نشان دادند. فاز کلروفرمی ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان داد (IC_{50} = ۴۴۹/۲ µg/ml). دراستخراج با حلال‌ها به شکل متوالی، مجدداً آب (IC_{50} = ۱۱/۲۶ µg/ml) و متانول (IC_{50} = ۱۲/۶ µg/ml) بالاترین فعالیت را از خود نشان

جدول شماره ۲: محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های برگ گیاه مورد در روش ماسیراسیون با حلال های مختلف به شکل جداگانه و متوالی

نوع عصاره	میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به روش جداگانه	میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به روش جداگانه	میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره به روش متوالی	میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره به روش متوالی
n-هگزان	۱۱۵/۵	۱۶۴/۲	۱۱۵	۱۶۱/۶
کلروفرم	۱۴۷	۲۷۱/۶	۱۱۹	۱۶۵
اتیل استات	۱۴۵	۲۲۰/۸	۲۶۰/۵	۳۱۲/۵
n-بوتانول	۱۹۵	۱۶۶/۶	۳۹۲	۳۱۶/۶
متانول	۳۴۶	۱۰۰/۸	۳۵۵	۱۵۸/۳
آب	۴۷۶/۵	۴۹/۲	۴۲۲/۵	۸۳/۳

دادند. فازهای غیر قطبی شامل n- هگزانی (IC_{50} = ۴۹۷/۵ µg/ml) و کلروفرمی (IC_{50} = ۳۵۹ µg/ml) ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان دادند. نتایج در جدول شماره ۳ آمده است. میزان IC_{50} ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت، معادل ۰/۰۲ ± ۵/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. میزان IC_{50} برای BHA نیز به عنوان کنترل مثبت، معادل ۳/۲ ± ۵۳/۸۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول شماره۳: میزان IC_{50}درتست به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره مورد در روش استخراج با حلال ها به شکل جداگانه و متوالی

نوع عصاره	میزان IC_{50} در روش جداگانه (میکروگرم در میلی لیتر)	میزان IC_{50} در روش متوالی (میکروگرم در میلی لیتر)
n-هگزان	۲۱۶/۳ ±۱۷/۲	۴۹۷/۵ ±۲۱/۲
کلروفرم	۴۴۹/۲ ±۲۱/۳	۳۵۹ ±۱۵/۹
اتیل ستات	۴۳/۳ ±۳/۷	۲۶/۰۶ ±۲/۳
n-بوتانول	۲۳/۸ ±۱/۹	۱۲/۸ ±۱/۷
متانول	۱۲/۵ ±۰/۶	۱۲/۶ ±۰/۸
آب	۸/۱۳ ± ۰/۲	۱۱/۲۶ ±۰/۵

در بررسی قدرت احیا کنندگی، در استخراج با حلال‌ها به شکل جداگانه آب و متانول بالاترین فعالیت را در این روش از خود نشان دادند. آب در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۲/۹۱۲ و متانول در همان غلظت دارای جذب ۲/۸۱۰ بود. فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان دادند. کلروفرم در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۰/۴۱۷ و n- هگزان در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۰/۵۲۶ بود. در استخراج با حلال‌ها به شکل متوالی، مجددا بخش های قطبی شامل آب در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۲/۷۵۸ و متانول در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۲/۶۹۴ بالاترین فعالیت را از خود نشان دادند. فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان داند. کلروفرم در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۰/۶۵۵ و n- هگزان در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای جذب ۰/۴۵۸ بود. نتایج در جداول شماره ۴ و ۵ آمده است. جداول شماره ۶ و ۷ درصد به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره مورد در روش استخراج با حلال‌ها به شکل جداگانه و متوالی را نشان می‌دهند. مقادیر IC_{50} نیز در جدول ۸ گزارش شده است. در روش ماسیراسیون با حلال‌ها به شکل جداگانه، عصاره‌های حاصل از حلال‌های قطبی، شامل آب و متانول بالاترین فعالیت را در این روش از خود نشان دادند (آب با IC_{50}برابر ۱۶۵/۱ µg/ml و متانول با IC_{50} برابر ۱۷۹/۳µg/ml). فازهای غیرقطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان دادند (عصاره کلروفرم با IC_{50}برابر ۱۳۳۲/۶ µg/ml و عصاره n- هگزانی با IC_{50}برابر ۱۲۱۹/۵ µg/ml). در شکل متوالی نیز عصاره‌های حاصل از حلال‌ها با قطبیت نسبتا بالا، شامل متانول و n- بوتانول بالاترین فعالیت را در این تست از خود نشان دادند (عصاره‌ی متانلی با IC_{50} برابر ۹۳/۱ µg/ml و عصاره ی n- بوتانلی با IC_{50}برابر ۲۸۴/۱ µg/ml). فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف ترین فعالیت را از خود نشان دادند (عصاره ی کلروفرمی با IC_{50}برابر ۶۰۳/۵ µg/ml و عصاره n- هگزانی با IC_{50}برابر ۶۶۳/۶ µg/ml) (جدول شماره ۸).

جدول شماره ۴: میزان قدرت احیا کنندگی عصاره مورد در روش ماسیراسیون با حلال های مختلف به شکل جداگانه. ویتامین ث که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت

غلظت	میانگین جذب (Mean ± SD)						
µg/ml	هگزانی	کلروفرم	اتیل استات	n-بوتانول	متانول	آب	ویتامین ث
۸۰۰	۰/۸۶۳	۰/۶۶۶	۱/۵۰۲	------	------	------	۱/۷۱۵±۰/۴
۴۰۰	۰/۵۲۶	۰/۴۱۷	۰/۸۳۴	۱/۶۵۲	۲/۸۱۰	۲/۹۱۲	۱/۶۹۹±۰/۷
۲۰۰	۰/۳۵۳	۰/۲۶۰	۰/۴۹۰	۰/۹۳۹	۱/۵۴۴	۲/۵۸۴	۱/۶۷۲±۰/۹
۱۰۰	۰/۲۷۹	۰/۱۶۵	۰/۲۹۴	۰/۵۶۴	۰/۹۷۶	۱/۱۷۷	۱/۴۴۳±۰/۵
۵۰	۰/۲۳۸	۰/۱۱۹	۰/۱۷۳	۰/۳۷۵	۰/۵۸۰	۰/۶۹۰	۱/۱۵۲±۰/۷
۲۵	۰/۱۹۸	۰/۱۱۵	۰/۱۲۲	۰/۲۸۹	۰/۳۸۵	۰/۴۴۰	۰/۹۶۹±۰/۲

جدول شماره ۵: میزان قدرت احیا کنندگی عصاره مورد در روش ماسیراسیون با حلال های مختلف به شکل متوالی. ویتامین ث به عنوان کنترل مثبت به کار رفت

غلظت	میانگین جذب (Mean ± SD)						
µg/ml	هگزانی	کلروفرم	اتیل استات	n-بوتانول	متانول	آب	ویتامین ث
۸۰۰	۰/۷۱۳	۱/۰۵۳	۱/۲۶۲	۲/۹۴۴	------	------	۱/۷۱۵±۰/۴
۴۰۰	۰/۴۵۸	۰/۶۵۵	۱/۱۸۵	۲/۸۱۳	۲/۶۹۴	۲/۷۵۸	۱/۶۹۹±۰/۷
۲۰۰	۰/۲۹۱	۰/۳۹۵	۰/۸۷۵	۱/۸۷۲	۱/۷۲۷	۲/۰۲۴	۱/۶۷۲±۰/۹
۱۰۰	۰/۱۸۰	۰/۳۶۵	۰/۵۷۴	۱/۰۰۰	۰/۹۲۲	۰/۹۹۳	۱/۴۴۳±۰/۵
۵۰	۰/۱۰۲	۰/۳۱۰	۰/۴۰۷	۰/۶۳۲	۰/۵۵۸	۰/۶۰۴	۱/۱۵۲±۰/۷
۲۵	۰/۰۷۵	۰/۲۵۱	۰/۳۴۴	۰/۴۲۱	۰/۳۸۰	۰/۴۰۶	۰/۹۶۹±۰/۲

جدول شماره ۶: میزان به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید (درصد) توسط عصاره مورد در روش استخراج با حلال ها به شکل جداگانه

غلظت	درصد به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید					
µg/ml	n-هگزان	کلروفرم	اتیل استات	n-بوتانول	متانول	آب
۸۰۰	۳۰/۵	۲۷/۶	۶۴/۷	------	------	------
۴۰۰	۲۱/۳	۲۳	۴۷/۷	۵۴/۵	۶۶/۸	۶۹/۴
۲۰۰	۳/۵	۵	۳۲	۵۳/۵	۵۷/۸	۶۵/۱
۱۰۰	۲/۹	۴	۳۱	۳۲/۵	۵۵	۵۸
۵۰	۱	۲/۸	۲۶	۱۱/۸	۴۳/۶	۴۱/۶
۲۵	------	۱	۱۳/۵	۱۰/۱	۱۴/۴	۹/۹

جدول شماره ۷: میزان به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید (درصد) توسط عصاره مورد در روش استخراج با حلال ها به شکل متوالی

غلظت	درصد به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید					
µg/ml	n-هگزان	کلروفرم	اتیل استات	n-بوتانول	متانول	آب
۸۰۰	۵۱/۶	۶۷/۷	۷۰/۷	۶۰	۶۵/۶	۶۲
۴۰۰	۴۴	۳۱/۷	۴۷/۷	۵۸	۶۲/۲	۶۱/۶
۲۰۰	۳۴	۱۳/۷	۳۸	۵۴	۶۱	۵۶/۶
۱۰۰	۱۹/۸	۴/۵	۳۲/۶	۵۱/۵	۵۷	۴۸/۵
۵۰	۳/۶	۱	۱۶/۲	۳۰	۳۴	۱۶

جدول شماره ۹ نیز توانایی شلاته کردن آهن را در عصاره‌ها نشان می‌دهد. عصاره‌ها قدرت ضعیفی در شلاته کردن آهن از خود نشان دادند. برای بررسی اثر از غلظت بالای ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (یک تک غلظت) استفاده شد. در استخراج به طور جداگانه، عصاره هگزانی با ۹۸/۵ درصد و عصاره‌ی کلروفرمی با ۹۳/۴ درصد قوی‌ترین عصاره‌ها بودند. در استخراج به طور متوالی نیز عصاره‌ی آبی با ۹۳/۶ درصد و عصاره‌ی کلروفرمی و n- بوتانلی به ترتیب با ۸۸ و ۸۱ درصد قوی‌ترین عصاره‌ها بودند. EDTA که به عنوان استاندارد به کار رفت، فعالیت بسیار بالایی از خود نشان داد.

جدول شماره ۸: میزان IC_{50} در تست به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره مورد در روش استخراج با حلال ها به شکل جداگانه و متوالی

نوع عصاره	IC_{50} در روش جداگانه (µg/ml)	IC_{50} در روش متوالی (µg/ml)
n-هگزان	۱۲۱۹/۵	۶۶۳/۶
کلروفرم	۱۳۳۲/۶	۶۰۳/۵
اتیل ستات	۵۰۶/۴	۴۵۰/۶
n-بوتانول	۲۹۷/۷	۲۸۴/۱
متانول	۱۷۹/۳	۹۳/۱
آب	۱۶۵/۱	۳۳۵/۷
کوئرستین	۱۷/۰۱ ± ۰/۰۳	۱۷/۰۱ ± ۰/۰۳

جدول شماره ۹: میزان شلات کنندگی آهن توسط عصاره مورد در غلظت ۳۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در روش ماسراسیون با حلال ها به شکل جداگانه و متوالی

	استخراج جداگانه	استخراج متوالی
حلال عصاره گیری	درصد به دام اندازی	درصد به دام اندازی
n- هگزان	۹۸/۵	۷۹ ±۱/۸
کلروفرم	۹۳/۴	۸۸ ± ۳/۹
اتیل استات	۸۵	۷۶/۶ ± ۵/۷
n- بوتانول	۳۱/۵	۸۱ ± ۳/۰
متانول	۵۱/۷	۵۳ ± ۴/۵
آب	۹۳	۹۳/۶ ± ۲/۶

بحث

بالاترین راندمان عصاره گیری در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل جداگانه یا متوالی به آب تعلق داشت. این نشان می‌دهد که بخش عمده‌ای از ترکیبات موجود در این گیاه بسیار قطبی می باشند یا این که به قند یا گروه‌های قطبی دیگر متصل شده اند. در عصاره‌گیری در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی در مجموع راندمان عصاره‌گیری ۳۴/۹ درصد بود. گیاهان به طور سنتی در درمان و پیشگیری

اختلالات گوناگون به‌کار می‌روند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد(۲۱). ترکیبات فنولی را می‌توان به فنول‌های ساده، با یک حلقه آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است و ترکیبات پلی فنولی تقسیم نمود. ترکیبات پلی‌فنولی حداقل دارای دو بخش فنولی (از قبیل فلاونوئیدها) یا سه و یا بیش‌تر از سه بخش فنولی بوده که تانن نامیده می‌شوند. ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستندکه به وسیله حضور یک حلقه آروماتیک حاوی گروه هیدروکسیل آزاد شناخته می‌شوند. این مولکول‌ها تقریبا در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از پروسه‌های فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، تشکیل ریشه، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. هم‌چنین یکی از مهم ترین خصوصیاتی که به این گروه از ترکیبات نسبت داده می شود، خاصیت آنتی اکسیدانی بوده که به آن ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد(۲۲). علاوه بر این پلی‌فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله: فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشادکننده عروق از خود نشان می‌دهند(۲۲). معرف فولین‌سیوکالتیو واکنشگری است که به‌طور گسترده در سنجش ترکیبات فنولی که در عصاره‌ها وجود دارد، به کار می‌رود. این روش بر مبنای قدرت احیا کنندگی گروه هیدروکسی فنولی بوده که با واکنشگر ترکیب شده و بخش رنگ سازی را تولید می‌کند که در ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین مقدار می‌گردد(۳). فلاونوئیدها با ساختار اصلی دی فنیل پروپان ($C_6 + C_3 + C_6$) با تفاوت‌هایی در حلقه پیران مرکزی، به طور گسترده در سلسله گیاهان توزیع داشته و تقریباً نیمی از حدود ۸۰۰۰ فنول‌های شناسایی شده را تشکیل می‌دهند(۲۳). این ترکیبات عمدتا شامل آنتوسیانین‌ها و آنتوسیانیدین‌ها، فلاوانول ها، فلاون‌ها، کاتشین‌ها و فلاوانون‌ها می‌باشند. فلاونوئیدها ترکیباتی هستند که مسئول ایجاد رنگ در گل‌ها و میوه ها هستند. به عنوان محصولات متابولیسم ثانویه در گیاهان، این ترکیبات به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع داروئی و غذایی مورد توجه هستند(۲۴). مکانسیم عمل فلاونوئیدها به دام‌اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون‌ها می‌باشد(۳). شواهد اپیدمیولوژی حاکی از آن است که بین مصرف غذایی فلاونوئیدها و ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی ارتباط معکوس وجود دارد(۲۵). 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. علاوه بر این، این ترکیبات پتانسیل شلات کردن فلزات را نیز دارند. فلاونوییدها و دیگر ترکیبات فنولی گیاه مانند اسید های فنولی، استیلبن، تانن‌ها، لیگنان‌ها و لیگنین‌ها معمولاً در برگ‌ها و بخش های چوبی مانند ساقه و شاخه وجود دارند. این ترکیبات نقش مهمی در رشد طبیعی گیاه و مقاومت در برابر عفونت و ضربه دارند. مدل به‌دام اندازی رادیکال DPPH به طورگسترده برای ارزیابی توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. DPPH یک رادیکال آزاد با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء شدن و تولید مولکول پایدار DDPH-H از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال DPPH در ۵۱۵ تا ۵۲۸ نانومتر جذب دارد، اما به محض احیاء توسط یک آنتی اکسیدان، جذب کاهش می‌یابد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به صورت ناپدید شدن رنگ ارغوانی و در نهایت به سمت رنگ زرد بیان می‌شود. این واکنش به سرعت انجام می‌شود(۳). در روش ماسیراسیون با حلال‌ها به شکل جداگانه، حلال‌های قطبی شامل آب و متانول بالاترین فعالیت را

در این روش از خود نشان دادند. فاز کلروفرمی ضعیف ترین فعالیت را از خود نشان داد (میکروگرم در میلی‌لیتر IC_{50} = ۴۴۹/۲). در برخی مطالعات قبلی، ارتباط خطی خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول تام در بسیاری از گیاهان گزارش شده است(۲۷،۲۶). در مطالعه ما نیز عصاره‌ها با میزان بیش تر فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند. در استخراج به روش متوالی، مجددا آب و متانول بالاترین فعالیت را از خود نشان دادند. فازهای غیر قطبی شامل n- هگزانی و کلروفرمی ضعیف ترین فعالیت را از خود نشان دادند. قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان داروئی به کار می‌رود(۳). در حالت کلی، حضور عوامل احیا کننده نقش اساسی در خاصیت احیا کنندگی ایفا می کند. این ترکیبات فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می کنند. چنانچه ترکیبی دارای این ویژگی‌ها باشد، می‌تواند باعث کاهش میزان ترکیبات حد واسط اکسیده ساخته شده طی مراحل لیپید پراکسیداسیون شود. به این ترتیب باعث شکستن زنجیره واکنش می‌شود و می‌تواند به عنوان آنتی اکسیدان اولیه و ثانویه عمل کند. سنجش احیاکنندگی 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. در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل جداگانه بخش‌های قطبی، آب و متانول بالاترین فعالیت را در این روش از خود نشان دادند. بخش‌های غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی فعالیت ضعیفی از خود نشان دادند. در روش ماسیراسیون با حلال ها به شکل متوالی، مجددا بخش های قطبی شامل آب و متانول در غلظت های برابر، بالاترین فعالیت را از خود نشان دادند. فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف ترین فعالیت را از خود نشان دادند.

نیتریک اکساید، رادیکالی آزاد با یک تک الکترون است که به صورت فیزیولوژیک از ال-آرژنین، تحت تاثیر آنزیم NOS تهیه می‌شود. •NO در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک از جمله تنظیم فشار خون، گشاد شدن عضلات صاف عروق و سیستم ایمنی نقش دارد. تولید بیش از حد •NO وتمامی ذرات تولید شده از•NO، می‌تواند ایجاد استرس اکسیداتیو و استرس نیتروزاتیو کند که منجر به تخریب DNA، تغییر عملکرد پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود(۳). •NO به سرعت با رادیکال سوپراکساید (O_2^-) وارد واکنش شده و پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) تولید می کند که یکی از فعال ترین ذرات اکسیژن است. نیمه عمر پراکسی نیتریت بسیار کم و در حد یک ثانیه است، اما همین زمان کوتاه برای واکنش با مولکول‌های زیستی کافی است(۳). حتی در غلظت‌های کم می‌تواند باعث شروع آپوپتوز و در غلظت‌های بالاتر سبب نکروز شود. بنابراین حضور مواد آنتی اکسیدان که مانع از تشکیل ذرات فعال اکسیژن و نیتروژن شوند مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و همین‌طور عوامل به‌دام اندازنده رادیکال نیتریک اکساید، مانع از بروز استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو می‌شود(۳). از مهم‌ترین عوامل آنتی‌اکسیدان و به‌دام اندازنده، که آثار تخریبی پراکسی نیتریت را کاهش می‌دهد، پلی‌فنول‌ها به خصوص فلاونوئیدها هستند(۲۷). در محیط آزمایشگاهی برای تولید •NO، از سدیم نیتروپروساید استفاده شد. سدیم نیتروپروساید در محلول‌های آبی و pH فیزیولوژیک، تولید نیتریک اکساید می کند که•NO نیز با اکسیژن واکنش داده و یون نیتریت تولید می کند. یون نیتریت در حضور واکنشگر گریس و از طریق فتومتری مورد سنجش قرار می گیرد. به‌دام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن باعث کاهش یون نیتریت می‌شود. بنابراین هرچه به دام اندازی بیش‌تر باشد، نیتریت کم‌تری تولید شده و جذب کم‌تر خواهد شد. بر این اساس رنگ کم تری نیز دیده خواهد شد(۳). نیتریک اکساید نقش مهمی

در عملکرد طبیعی فیزیولوژیک در بسیاری از سیستم ها دارد. بسیاری از اختلالات مانند سکته، سردرد، التهاب و اختلالاتی چون آلزایمر به واسطه عملکرد این ترکیب رخ می‌دهد(۳). در سیستم عصبی، نیتریک اکساید به عنوان میانجی در یادگیری و حافظه نقش دارد(۲۸). قدرت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌ها ضعیف اما وابسته به دوز بود. در روش ماسیراسیون با حلال‌ها به شکل جداگانه، عصاره‌های حاصل از حلال‌های قطبی، شامل آب و متانول به ترتیب بالاترین فعالیت را از خود نشان دادند. فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف‌ترین فعالیت را از خود نشان دادند. در شکل متوالی نیز عصاره‌های حاصل از حلال ها با قطبیت نسبتا بالا، شامل متانول و n - بوتانول بالاترین فعالیت را در این تست از خود نشان دادند. فازهای غیر قطبی شامل کلروفرمی و n- هگزانی نیز ضعیف ترین فعالیت را از خود نشان دادند.

یون‌های فلزی دو ظرفیتی نقش مهمی در کاتالیست کردن فرایندهای اکسیداسیون ایفا کرده و موجب تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و تجزیه هیدروپراکساید از طریق واکنش فنتون می‌شوند. لذا کاهش غلظت یون آهن دو ظرفیتی در مقابل تخریب ناشی از اکسیداسیون محافظت ایجاد خواهد کرد. شلاته‌کننده‌های آهن در بیماری‌های چون تالاسمی کاربرد درمانی دارند(۳). عصاره‌ها قدرت ضعیفی در شلاته کردن آهن از خود نشان دادند. برای بررسی اثر، از غلظت بالای ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (یک تک غلظت) استفاده شد. در استخراج به طور جداگانه، عصاره هگزانی و عصاره کلروفرمی قوی‌ترین عصاره ها بودند. در استخراج به طور متوالی نیز عصاره ی آبی، عصاره‌ی کلروفرمی و عصاره n- بوتانلی قوی‌ترین عصاره‌ها بودند.

در مطالعه‌ای که توسط Wannes و همکاران انجام شد، ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی برگ، ساقه و گل گیاه مورد (از تونس) بررسی گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله تست DPPH، قدرت احیاکنندگی و شلات‌کنندگی ارزیابی شد. در همه تست‌ها عصاره متانولی برگ گیاه مورد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به اسانس نشان داد. برگ بیش‌ترین مقدار فنول تام را داشت (۲۶/۵۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم). میزان فلاونوئید در برگ این گیاه ۳ میلی‌گرم معادل کاتشین در گرم گزارش شده است. میزان IC_{50} برای عصاره متانولی برگ گیاه مورد در تست به دام‌اندازی رادیکال DPPH، ۰/۷۳ ± ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و در تست قدرت احیاکنندگی ۱/۹۱ ± ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است. این میزان حدوداً برابر قدرت فاز متانلی در نمونه ما بود (جدول شماره ۳). عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه مورد توانایی بسیار کمی برای شلات کردن آهن نشان داد که همانند گزارش ما بود. در این تست میزان IC_{50} برابر با ۰/۳۳ ± ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است(۲۹).

در مطالعه‌ای که توسط Goncalves و همکاران انجام شد، محتوای تام فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جوشانده گرم و سرد گیاهان دارویی مدیترانه‌ای بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، محتوای تام فنلی در جوشانده گرم بسیار بیش‌تر از حلال سرد بود. از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی جوشانده برگ گیاه دو گیاه *Pistacia lentiscus* و *Myrtus communis* بیش‌ترین توانایی شلات‌کنندگی آهن را نشان دادند، اما بین جوشانده‌ی گرم و سرد آن‌ها تفاوت قابل توجهی وجود نداشت(۳۰). برگ گیاه مورد در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب شلاته شدن ۹۳/۱۳ و در حالت گرم موجب شلاته شدن آهن به میزان ۹۶/۱۴ درصد شد. محتوای تام فنلی در برگ مورد ۱۰۰۶/۰۵ میکرومول معادل گالیک اسید (معادل ۱۷۱ میلی‌گرم) و در فرم انفوزیون داغ ۱۲۴۴/۶۴ (معادل ۲۱۱/۵ میلی‌گرم) گزارش شده است. نمونه ما از ایران حدود دو برابر این مقدار حاوی ترکیبات فنلی بود (جدول شماره ۲).

در مطالعه‌ای که توسط Kanoun و همکاران انجام شد، عصاره برگ، ساقه و میوه گیاه مورد تهیه و برای ارزیابی محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی و تانن مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تهیه عصاره متانلی، از روش خیساندن به مدت ۲۴ ساعت در متانل ۹۶/۶ درجه استفاده شد. برای تهیه عصاره‌های دیگر، اندام‌های مختلف گیاه با آب جوش استخراج شده و سپس فاز آبی به ترتیب با اتیل استات و سپس با n–بوتانول استخراج شد. طبق نتایج به دست آمده، محتوای تام فنلی و فلاونوییدی در برگ گیاه مورد بیش تر از ساقه و میوه بود (۱۱۹/۲۳ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم)(۳۱). این مقادیر بالاتر از مطالعه ی Wannes بود که میزان فنل تام را در برگ گیاه ۲۶/۵۵ گزارش کرده بود. برگ گیاه مورد که از پرتغال گزارش شده، دارای ۳۱/۲ میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم بود(۳۲). این میزان در برگ مورد از یونان ۳۷۳ گزارش شده است(۳۳). محتوای تام فلاونوییدی در برگ گیاه مورد معادل ساقه وکم‌تر از میوه گزارش شده است (۶/۵۶ میلی گرم معادل کاتشین در گرم ماده خشک) که از گزارش Wannes بیش‌تر بود. نتایج تست احیاکنندگی نشان داد که فراکسیون بوتانولی، قوی‌تر از فراکسیون های اتیل استاتی و متانلی بود. در به دام‌اندازی رادیکال DPPH، فراکسیون اتیل استاتی با IC50، معادل ۰/۰۹ قوی‌ترین بخش و متعاقب آن فراکسیون بوتانول ۰/۲۱ و در نهایت عصاره متانلی برگ ۰/۴۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود. نشان داده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این گیاه، در ارتباط با ترکیب پلی فنول آن می باشد(۱۲).

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکترای حرفه‌ای خانم شکوفه مزدستان در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می گردد.

References

1. Zakizadeh M, Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA. In vitro antioxidant activity of flower, seed and leaves of Alcea hyrcana Grossh. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(4): 406-412.
2. Bovicelli P. Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. J Pharm Pharmacol 2007; 59(12): 1703-1710.
3. Khalili Ma, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
4. 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.
5. Sumbul S, Aftab ḥmad M, Asif M, Akhtar M. *Myrtus communis* Linn. Indian J Nat Prod Resour 2011; 2(4): 395-402.
6. Alem G, Mekonnen Y, Tiruneh M, Mulu A. Invitro antibacterial activity of crude preparation of myrtle (Myrtus communis) on common human pathogens. Ethiop Med J 2008; 46(1): 63-69.
7. Akin M, Aktumsek A, Nostro A. antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in northern Cyprus. Afr J Biotechnol 2010; 9(4): 531-535.
8. Mohammadi R, Esfahani SHM, Shadzi S and Moattar F. Antifungal activity of *Myrtus communis* L. essential oil against clinical isolates of *Aspergillus*. J Isfahan Medical School 2008; 26(89): 105-110.

9. Milhau G, Valentin A, Benoit F, Mallie M, Bastide JM, Pellisier Y, et al. *In Vitro Antimalarial Activity of Eight Essential Oils*. J essent oil Res 1997; 9(3): 329-333.
10. Feisst C, Franke L, Appendino G, Werz O. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from Myrtus communis and their implication as anti-inflammatory compounds. J Pharmacol Exp Ther 2005; 315(1): 389-396.
11. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Perez-Alvarez J, Fernandez-Lopez J. Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts. CYTA-Journal of Food 2010; 8(2): 95-101.
12. Montoro P, Tuberoso CI, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, et al. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. J Pharm Bio Med Anal 2006; 41(5): 1614-1619.
13. Sepici A, Gürbüz I, Cevik C, Yesilada E. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. J Ethnopharmacol 2004; 93(2-3): 311-318.
14. Al-zohyri AM, Al-Jeboory AA, Jawad ALM. Cardiovascular and antimicrobial effect of *Myrtus communis*. Indian J Pharmacol 1985; 17(4): 233-235.
15. Twaij H, El-jalil HA. Evaluation of narcotic (opioid like) analgesic activities of medicinal plants. Eur J Sci Res 2009; 33(1): 179-182.
16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Free radical scavenging ability of methanolic extract of *Hyoscyamus squarrosus* leaves. Pharmacologyonline 2009; 2: 796-802.
17. Abbasi M. Antioxidant activity and radical scavenging effects of various fractions from *Curcuma zedoaria*. Asian J Pharm Biol Res 2011; 1(4): 525-533.
18. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami Sh. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010; 14(9): 765-769.
19. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. Pharmacologyonline 2009; 2: 644-650.
20. Yen GC, Lee CA. Antioxidant activity of extracts from molds. J Food Prot 1996; 12: 1327-1330.
21. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J Agric Food Chem 2003; 51(10): 2866-2887.
22. Falleh H, Ksouri R, Lucchessi ME, 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. Trop J Pharm Res 2012; 11(2): 243-249.
23. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 2002; 13(10): 572-584.
24. Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer JP, Mason TJ. The extraction of rutin from flower buds of Sophora japonica. Ultrason Sonochem 2001; 8(3): 299-301.
25. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. Lancet 1997; 349(9053): 699.
26. 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.
27. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem 2005; 53(20): 7749-7759.

28. Aliev G, Palacios HH, Lipsitt AE, Fischbach K, Lamb BT, Obrenovich ME, Morales L, et al. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. Neurotox Res 2009; 16(3): 293-305.
29. Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, 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.
30. Goncalves S, Gomes D, Costa P, Romano A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. Ind Crops Prod 2013; 43(1): 465-471.
31. Kanoun K, Belyagoubi-Benhammou N, Ghembaza N, Atik Bekkara F. Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtuscommunis* L. Int Food Res J 2014; 21(5): 1957-1962.
32. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (Myrtus communis) extracts. Nat Prod Commun 2009; 4(6): 819-824.
33. Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food Chemistry 2008; 107(3): 1120-1130.