دوفصلنامه شیمی آلی
سال اول، شماره اول، بهار – تابستان ۱۴۰۱ (۹۷-۱۱۸)

Semiannual Organic Chemistry Journal
Vol. 1, No. 1, Spring - Summer 2022 (97-118)

بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنولی و ارزیابی اثر ضد اکسیدان عصاره برگ و گل گیاه *Echium italicum L.*

زهرا دشتی‌زاده[۱]، عبدالرسول حقیر ابراهیم‌آبادی[۲*]، اعظم منفرد[۳]، سید احمد میرشکرایی[۴]، ثمانه حیدری[۵]

۱. کارشناسی ارشد، شیمی آلی، دانشگاه پیام نور، ایران.
۲. دانشیار، شیمی دارویی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.
۳. دانشیار، شیمی آلی، دانشگاه پیام نور، ایران.
۴. استاد، شیمی آلی، دانشگاه پیام نور، ایران.
۵. دانشجوی دکتری، شیمی آلی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

(تاریخ وصول: ۹۸/۰۳/۲۷ ـ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۱۵)

Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and evaluation of antioxidant effect of Echium italicum L. leaf and flower extracts

Zahra Dashtizadeh[1], Abdolrasoul Haghir Ebrahimabadi[2*], Aazam Monfared[3], Seyed Ahmad Mirshokraie[4], Samaneh Heydari[5]

1. M.A in Organic Chemistry, Payame Noor University, Iran.
2. Associate Professor, Essential Oils Research Institute, University of Kashan, Kashan. Iran.
3. Associate Professor, Department of chemistry, Payame Noor University, Iran.
4. Professor, Department of chemistry, Payame Noor University, Iran.
5. PhD student of Organic Chemistry, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil. Iran.

(Received: Jun. 17, 2019 - Accepted: Sep. 06, 2019)

چکیده

مقدمه: گیاه .Echium italicum L از خانواده Boriginaceae یکی از چهار گونه موجود از جنس Echium (که در ایران آن را به نام گاوزبان می‌شناسند) محسوب می‌شود. مطالعات گیاه‌شناسی حاکی از فعالیت ضد اکسیدان قوی بعضی از گیاهان است و استفاده افراد از این گونه‌های گیاهی آن‌ها را در مقابل خطرات بیماری‌های ناشی از تشکیل اکسیدان‌ها در بدن مقاوم می‌نماید. در این پژوهش، ظرفیت ضد اکسیدان عصاره‌های برگ و گل گیاه Echium italicum L.حاصل از رویشگاهی طبیعی در ایران مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌های گیاه با استفاده از سوکسله و حلال متانول استحصال شد. خاصیت ضد اکسیدان عصاره‌ها با استفاده از آزمون‌های DPPH، بی‌رنگ شدن بتا کاروتن در حضور لینولئیک اسید و بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنولی با استفاده از آزمون فولین سیوکالتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌های برگ و گل به ترتیب با بازده وزنی–وزنی ۲۱٫۳٪ و ۱۳٫۶۰٪ به دست آمدند. در ارزیابی خاصیت ضد اکسیدان در آزمون DPPH مقادیر IC_{50} به ترتیب (۶۳٫۱۱±۱٫۴۵) و (۱۰۲٫۸۱±۱٫۰۸) میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره برگ و گل به دست آمد که در مقایسه با IC_{50} حاصل برای ضد اکسیدان استاندارد BHT (۰٫۸۰ ± ۱۹٫۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان‌دهنده فعالیت ضد اکسیدان بالاتر عصاره برگ است. درصد مهار لینولئیک اسید برای عصاره برگ و گل به ترتیب ۵۷٫۲۲٪ و ۴۸٫۷۴٪ به دست آمد که در مقایسه با درصد مهار لینولئیک اسید توسط BHT با مقدار ۸۹٫۴۳٪، نشان‌دهنده فعالیت ضد اکسیدان بالای عصاره‌ها است. مقدار تام ترکیبات فنولی برحسب معادل گالیک اسید در عصاره‌های برگ و گل به ترتیب ۶۸٫۸۲ و ۳۰٫۲۵ میکروگرم بر میلی‌گرم به دست آمد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که فعالیت ضد اکسیدان برگ و گل گیاه در مقایسه با اثرات مشابه از BHT، قابل‌توجه است. لذا برگ و گل گیاه منبع خوبی از ضد اکسیدان‌های طبیعی است.

واژگان کلیدی: گاوزبان، خاصیت ضد اکسیدان، آزمون DPPH، آزمون فولین سیوکالتیو، آزمون بتاکاروتن.

Abstract

Objective: The plant *Echium italicum* L. (Family: *Boriginaceae*, common name: Gaw_zaban) is one of four existing species of genus *Echium* in Iran. Scientific studies have indicated that some plants possess strong antioxidant activities and use of them makes the user resistant to the dangers of oxidative diseases. This study was conducted to investigate the antioxidant capacity of *Echium italicum* L. leaf and flower extracts from a natural habitat in Iran. The plant extracts were obtained by Soxhlet apparatus using methanol as solvent. Antioxidant activities of the extracts were evaluated using DPPH and beta-carotene tests and total phenolic compounds of the extracts were estimated both quantitatively and qualitatively using folin-ciocalteu test. The leaf and flower extraction yields were 21.3% w/w and 13.60% w/w respectively. In DPPH test, IC_{50} values 63.11±1.45 µg/ml and 102.81±1.08 µg/ml were obtained for leaf and flower extract respectively, showing potencies one-thred and one-fifth of that of BHT (IC_{50} = 19.72± 0.80 µg/ml). In beta-carotene-linolenic acid test, inhibition percentages of%57.22 and%48.74 were recorded for leaf and flower extracts, respectively, comparable to that of BHT (%89.43). Total phenolic compounds contents of the extracts equivalent to galic acid were evaluated 68.82 µg/mg and 30.25 µg/mg for leaf and flower extracts, respectively. Totally, the results of this investigation was confirmed good natural antioxidant potentials for the plant extracts.

Keywords: *Echium italicum* L, Antioxidant activity, DPPH assay, Folin-Ciocalteu test, Beta-carotene test.

نویسنده مسئول: عبدالرسول حقیر ابراهیم‌آبادی

[*]**Corresponding Author:** Abdolrasoul Haghir Ebrahimabadi
Email: aebrahimabadi@kashanu.ac.ir

مقدمه

گیاهان از منابع مهم در درمان بیماری‌ها شناخته می‌شوند. شناسایی ترکیبات آلی موجود در عصاره گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است و به همین منظور روش‌های متنوع عصاره‌گیری به‌منظور جداسازی ترکیبات مؤثر گیاهان ابداع شده است [۱].

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی[1] WHO داروهای گیاهی شامل گیاهان دارویی، مواد گیاهی، فرآورده‌های گیاهی و ترکیبات و محصولات نهایی گیاهان هستند. بر اساس برآورد WHO، هنوز هم حدود ۸۰٪ از جمعیت جهان از گیاهان و داروهای سنتی برای رفع نیازهای اولیه مراقبت از سلامت خود استفاده می‌کنند. همچنین حدود ۸۰٪ از تمام مواد دارویی مستقیم یا غیرمستقیم از منابع گیاهی و طبیعی مشتق شده‌اند [۲].

عصاره‌گیری فرآیندی است که در علم شیمی و داروسازی استفاده می‌شود و عبارت از جداسازی بخش‌های فعال و دارویی بافت گیاه از بخش‌های غیرفعال آن توسط حلالی انتخابی و مناسب با استفاده از روش‌های استاندارد است [۱]. طی فرآیند استخراج حلال به درون بافت گیاه انتشار یافته و ترکیبات با قطبیت مشابه را در خود حل می‌نماید. ترکیبات فعال دارویی (متابولیت‌های ثانویه) شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها (مانند آنتراکینون‌ها، ایزوتیوسیانات‌ها، فلاونوئیدها)، ترپنوئیدها (مثل اسانس‌ها، استروئیدها، ساپونین‌ها)، صمغ‌ها و موسیلاژها، لیگنان‌ها و رزین‌ها می‌باشند و حلالیت آن‌ها در حلال‌های مختلف متفاوت است. اثرات عصاره بستگی به نوع و میزان هر یک از ترکیبات استخراج شده و نسبت مواد استخراجی به یکدیگر دارد [۲].

سوکسله[2] از معروف‌ترین دستگاه‌های مورد استفاده برای عصاره‌گیری از گیاهان است. به‌منظور افزایش بازدهی در این روش باید عواملی مانند دما، خلوص حلال و نسبت مواد موردتوجه قرار گیرد [۱]. از سوکسله در موارد زیر استفاده می‌شود:

۱- حذف چربی، موم و مواد رنگی قبل از استخراج مواد مؤثر گیاه مورد آزمایش

۲- زمانی که حرارت طی زمان استخراج، مواد مؤثر گیاه مورد آزمایش را تجزیه نمی‌کند [۳].

استخراج موفقیت‌آمیز ترکیبات فعال بیولوژیکی از گیاه دارویی تا حد زیادی به نوع حلال استفاده‌شده بستگی دارد. ویژگی‌های یک حلال خوب برای تهیه عصاره گیاه عبارت‌اند از: سمیت کم، سهولت تبخیر در حرارت کم، جذب سریع عصاره، نقش محافظتی و عدم ایجاد مشکل هنگام جدا شدن از عصاره [۲]. عوامل مؤثر در انتخاب حلال عبارت‌اند از: میزان ترکیبات قابل استخراج، سرعت استخراج، تنوع ترکیبات مورد استخراج، تنوع ترکیبات بازدارنده استخراج، سهولت به‌کارگیری عصاره، سمیت حلال در فرآیند سنجش بیولوژیکی و خطرات بهداشتی

1. World Health Organization

2. Soxhlet extraction

بالقوه مواد موجود در عصاره [۲]. حلال‌های رایج برای استخراج ترکیبات فعال گیاهی (همراه با اندیس حلالیت و میزان حلالیت در آب) در جدول ۱ ارائه شده‌اند [۲].

جدول ۱. حلال‌های رایج برای استخراج ترکیبات فعال گیاهی

آب	متانول	اتانول	استون	کلروفرم	اتیل استات	دی اتیل اتر	هگزان
	Polarity Index=5.1 Solubility in water=100	Polarity Index=5.2 Solubility in water=100	Polarity Index=5.1 Solubility in water=100	Polarity Index=4.1 Solubility in water=0.815	Polarity Index=4.4 Solubility in water=8.7	Polarity Index=2.8 Solubility in water=6.89	Polarity Index=0.0 Solubility in water=0.001
آنتوسیانین	آنتوسیانین	تانن‌ها	فنول‌ها	ترپنوئیدها	فلاونوئیدها	آلکالوئید (باز)	لیپیدها
منوساکاریدها	ساپونین‌ها	پلی فنول‌ها	فلاونول‌ها	فلاونوئیدها (ژنین)	چالکون‌ها	ترپنوئیدها	کلروفیل‌ها
دی ساکاریدها	تانن‌ها	پلی استیلن‌ها	تانن‌ها	آلکالوئید (باز)	استیل بن‌ها	کومارین‌ها	کارتنوئیدها
تانن‌ها	کوآزینوئیدها	فلاونول‌ها	دی ترپن‌ها	اسانس‌ها	ویتانولیدها	اسیدهای چرب	پلی ان‌ها
ساپونین‌ها	فلاون‌ها	ترپنوئیدها	آنتراکینون‌ها	آنتراکینون‌ها (ژنین)		روغن‌ها	روغن‌ها
پپتیدها	فنون‌ها	استرول‌ها	بنزوکینون‌ها	گلوکزاینولات‌ها		کارتنوئیدها	موم‌ها
اسیدهای آمینه	پلی فنول‌ها	آلکالوئیدها	نفتوکینون‌ها	کانابینوئیدها			پروستاگلاندین‌ها
صمغ‌ها	لاکتون‌ها	رزین‌ها	لیگنین‌ها	ویتانولیدها			ویتامین‌های A,D,E,K
هیدروکلوئیدها	تری ترپنوئید	اسانس‌ها		استروئید-آلکالوئیدها			
آلکالوئیدها (نمک)	گلیکوزیدها	گلیکوزیدها		لیگنان‌ها			
اسیدهای آلی گیاهی	رزین‌ها	کرومون‌ها					
سیانوژنتیک‌ها	گلیکوزیدها	کوا-رین‌ها سیانوژنتیک-گلیکوزیدها					
ویتامین‌های B,C,H							

بهترین حلال برای استحصال عصارهٔ تام گیاه متانول خالص یا اتانول ۸۰ یا ۸۵ درصد است، این حلال‌ها اکثر مواد تشکیل‌دهنده گیاه را در خود حل می‌کنند. اتانول ۸۵ درصد مزیتی مضاعف دارد و نشاسته موجود در گیاه به‌وسیلهٔ آن استخراج نمی‌شود [۳].

ترکیبات فنولی گروه بزرگی از مواد طبیعی گیاهی شامل فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین و ... می‌باشند و معمولاً در میوه‌ها، سبزیجات، برگ-ها، آجیل‌ها، دانه‌ها، ریشه‌ها و سایر قسمت‌های گیاه دیده می‌شوند. این مواد کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به دارا بودن طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص ضد اکسیدان

دارند [۴].

فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنولی انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت‌های بیولوژیک متنوع این ترکیبات ازجمله ضد اکسیدان، ضد میکروبی، ضدالتهاب و وازودیلاتور آن‌ها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است [۴].

ترکیبات فنولی با داشتن خاصیت ضد اکسیدان و ضد رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامتی انسان ایفا نمایند [۴].

در سال‌های اخیر ثابت شده است که رادیکال-های آزاد از مهم‌ترین عوامل اکسیدکننده مواد غذایی می‌باشند. به‌طوری‌که علاوه بر ایجاد اثرات نامطلوب ارگانولپتیک در محصولات غذایی با از بین بردن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری و ایجاد ترکیبات سمی می‌توانند منجر به اثرات نامطلوب از قبیل بیماری‌های التهابی، دیابت ملیتوس، ایسکمی قلبی و مغزی، سرطان، نقص ایمنی و پیری شوند [۴].

رادیکال‌های آزاد اکسیژن‌دار به‌اختصار[1] OFRS نامیده می‌شوند و خود قسمتی از گروه بزرگ‌تری به نام[2] ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) هستند. دسته دیگری از رادیکال‌های آزاد نیز دارای نیتروژن بوده و به آن‌ها گونه‌های فعال نیتروژن یا[3] RNS گویند. گروه‌های ROS و RNS خود هرکدام به دودسته گونه‌های رادیکالی و غیر رادیکالی تقسیم می‌شوند. از گونه‌های رادیکالی اکسیژن‌دار می‌توان به مواردی چون رادیکال‌های هیدروکسیل (OH°)، پراکسی (ROO°)، آلکوکسی (RO°) و از گونه‌های غیر رادیکالی اکسیژن‌دار، ازن (O_3)، هیدروژن پراکساید (H_2O_2)، اکسیژن منفرد (O_2) اشاره کرد. نیتریت اکسید (NO°)، نیتروژن دی‌اکسید (NO_2°) از گونه‌های رادیکالی نیتروژن‌دار و نیتروزیل (NO^+)، نیتروکسید (NO^-) و نیتروس اسید (HNO_2) از گونه‌های غیر رادیکالی نیتروژن‌دار هستند [۵، ۶].

رادیکال‌های آزاد اکسیژن‌دار به علت طبیعت بسیار فعال به‌سرعت با مولکول‌های اطراف خود مانند آنزیم‌ها، رسپتورها و پمپ‌های یونی واکنش داده و با تخریب پروتئین‌ها و آسیب بر مراحل پروتئین‌سازی، تداخل در کانال‌های یونی، نقص رسپتورهای سلول و نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو شوند. همچنین با تداخل در اسیدهای نوکلئیک می‌توانند با ایجاد تغییر در ترتیب بازها، سبب جهش و درنتیجه بیماری‌های مهلکی مانند سرطان شوند. این ترکیبات می‌توانند باعث شروع پراکسیداسیون لیپیدها و درنتیجه ایجاد بیماری‌های التهابی، تخریب سلول‌های عصبی، آترواسکلروز، سرطان و ... شوند [۶].

ضد اکسیدان‌ها موادی هستند که در غلظت-های ناچیز و با مکانیسم ویژه‌ای از عمل اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند یا باعث کاهش و به تأخیر افتادن این‌گونه فرایندها می‌شوند. ضد اکسیدان‌ها با رادیکال‌های آزاد موجود در محیط واکنش می‌دهند و از تشکیل واکنش‌های زنجیره‌ای ممانعت به عمل می‌آورند [۷]. ترکیب‌های ضد اکسیدان طبیعی و سنتتیک مورد استفاده در مصارف درمانی در سه گروه ذیل تقسیم‌بندی می‌شوند [۷، ۸]:

1. Oxygen free radical species
2. Reactive oxygen species
3. Reactive nitrogen species

۱- (آنزیم‌های ضد اکسیدان)[1]: این خانواده به‌عنوان کاتالیزور در حذف رادیکال‌های توکسیک عمل می‌کنند.

۲- (ضد اکسیدان‌های پیشگیری‌کننده)[2]: این گروه از شرکت یون‌های فلزی واسطه در تولید رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کنند.

۳- (ضد اکسیدان‌های زنجیره شکن)[3]: این گروه به دو روش زیر عمل می‌کنند:

الف) (دادن هیدروژن یا الکترون)[4] به رادیکال آزاد:

$$LOO^{\circ} + AH \rightarrow LOOH + A$$

ب) (گرفتن هیدروژن یا الکترون)[5] از رادیکال آزاد:

$$L^{\circ} + A^{\circ} \rightarrow [LA] \rightarrow LH\,(C{=}C) + A$$

برای سنجش میزان اثر ضد اکسیدان عصاره‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد. این ارزیابی‌ها عمدتاً روی ضد اکسیدان‌های زنجیره‌شکن و بر اساس انتقال الکترون[6] (ET) و یا انتقال اتم هیدروژن[7] (HAT) صورت می‌پذیرد [۹].

الف) در روش‌های اندازه‌گیری ظرفیت کل ضد اکسیدان بر اساس انتقال الکترون که به‌اختصار ET نامیده می‌شود، توانایی ضد اکسیدان برای انتقال یک الکترون و کاهش ترکیباتی ازجمله فلزات، کربونیل‌ها و رادیکال‌ها آشکار می‌شود [۹، ۱۰].

$$\text{Probe (Oxidant)} + e^{-}\ \text{(from antioxidant)} \downarrow \text{Reduced probe} + \text{Oxidized}$$

واکنش فوق دربرگیرنده انتقال یک الکترون میان دو ترکیب ضد اکسیدان و اکسیدان همراه با تغییر رنگ نمونه Probe است که میزان این تغییر رنگ با غلظت ضد اکسیدان متناسب است و بدین‌صورت ظرفیت کاهندگی ضد اکسیدان را منعکس می‌کند.

مهم‌ترین روش‌های ارزیابی ضد اکسیدان بر اساس انتقال الکترون عبارت‌اند از [۹، ۱۰، ۱۱]:

۱- سنجش ظرفیت ضد اکسیدان معادل ترولوکس[8] (TEAC)

۲- سنجش قدرت ضد اکسیدان در احیای Fe^{+3} به Fe^{+2} (FRAP)[9]

۳- سنجش ظرفیت به دام انداختن رادیکال آزاد DPPH[10]

۴- سنجش پتانسیل ضد اکسیدان تام با معرف کمپلکس مس (II) به‌عنوان ضد اکسیدان (CUPRC)[11]

۵- اندازه‌گیری مقدار فنول تام با معرف فولین سیوکالتیو[12] (FC)

ب) در روش‌های اندازه‌گیری ظرفیت کل ضد اکسیدان بر اساس انتقال اتم هیدروژن که به‌اختصار HAT نامیده می‌شود، توانایی ماده ضد اکسیدان در رقابت با ماده شیمیایی مستعد اکسیداسیون برای انتقال اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد ارزیابی می‌شود [۹،۱۱].

$$ROO^{\circ} + AH \rightarrow ROOH + A^{\circ}$$
$$ROO^{\circ} + LH \rightarrow ROOH + L^{\circ}$$

در واکنش بالا AH ضد اکسیدان و LH نمونه

1. Enzyme Antioxidant
2. Preventive Antioxidants
3. Chain breaking Antioxidants
4. CB-Donor
5. CB-Acceptor
6. Electron Transfer
7. Hydrogen A Transfer
8. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
9. Ferric Reducing Antioxidant power
10. 2,2-Di Phenyl -2-Picryl Hydrazyl
11. Cupric reducing antioxidant capacity
12. Folin-Ciocalteus

قابل اکسایش (سوبسترا) است. ضد اکسیدان اضافه‌شده با سوبسترا به‌منظور گرفتن رادیکال آزاد رقابت می‌کند. با توجه به آن‌که در ارزیابی‌های ضد اکسیدان بر اساس سیستم HAT، سوبسترا و ضد اکسیدان هر دو با ROO° واکنش می‌دهند، فعالیت ضد اکسیدان با مقایسه سرعت واکنش آن‌ها، به‌وسیله منحنی جذب در حضور و عدم حضور ضد اکسیدان و درنهایت تعیین مساحت زیر این منحنی اندازه‌گیری می‌شود. روش‌های ارزیابی ضد اکسیدان بر اساس HAT عبارت‌اند از [۹، ۱۱]:

۱- ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (ORAC)[1]

۲- پارامتر ضد اکسیدان بر اساس به دام انداختن کل رادیکال‌ها (TRAP)[2]

۳- (سنجش سفید شدن کروسین)[3]

۴- جذب اکسیژن مهارشده (IOU)[4]

۵- (آزمون بیرنگ‌شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید)[5]

۶- (مهار خود اکسایش لیپو پروتئین‌ها با دانسیته کم)[6]

گیاه *Echium italicum* L. گیاهی دوساله از تیره گاوزبانیان، پوشیده از کرک‌های انبوه زبر با قاعده برجسته. ساقه محکم، قوی، افراشته، منشعب، به ارتفاع ۲۰ تا ۹۰ سانتی‌متر. برگ‌های قاعده‌ای طوقه‌ای، نواری و نیزه‌ی، به طول ۱۵ تا ۳۰ و عرض ۲ تا ۴,۵ سانتی‌متر، نوک‌تیز به همراه برگ‌های ساقه-ای کوچک‌تر و نیزه‌ای و فاقد دمبرگ است. این گیاه دارای گل‌های صورتی، سفید یا آبی است [۱۲، ۱۳]. زمان گلدهی گیاه از اردیبهشت تا اواخر تابستان است. گیاه بومی ایران است ولی در اروپا، ترکیه و قفقاز نیز می‌روید. این‌گونه بیشتر در مناطق شمال غرب، غرب، مرکز و شمال شرق ایران تا ارتفاعات ۲۵۰۰ متری دیده شده است [۱۲].

شکل ۱. تصاویر گیاه

1. Oxygen Radical Absorbance Capacity
2. Total Radical trapping Antioxidant Parameter
3. Crocin bleaching assay
4. Inhibited Oxygen Uptake
5. β-Carotene-Linoleic acid assay
6. Inhibition of induced low-density lipoprotein autoxidation

هدف این مطالعه بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنولی و خاصیت ضد اکسیدان عصاره برگ و گل گیاه *Echium italicum* L. بر اساس اندازه‌گیری توان به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH، آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید و اندازه‌گیری محتوای تام ترکیبات فنولی عصاره با معرف فولین سیوکالتیو است.

روش تحقیق

این مطالعه شامل مراحل جمع‌آوری، شناسایی و تائید گیاه توسط دکتر ولی‌الله مظفریان در هرباریوم باغ‌موزه ملی گیاه‌شناسی ایران، عصاره‌گیری از برگ و گل گیاه با دستگاه سوکسله، اندازه‌گیری محتوای تام ترکیبات فنولی عصاره‌های گیاه به روش فولین سیوکالتیو و بررسی قدرت ضد اکسیدان آن‌ها بر اساس روش-های توان به دام انداختن رادیکال‌های آزاد DPPH و آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید است.

جمع‌آوری گیاه

گیاه گاوزبان از گونه *Echium italicum* L. از منطقه ییلاقی شهرستانک واقع در ۶۵ کیلومتری شمال شرق کرج (جاده کرج – چالوس) در کنار رودخانه جمع‌آوری و پس از شناسایی و تائید توسط دکتر ولی‌الله مظفریان در مرکز هرباریوم باغ‌موزه ملی گیاه‌شناسی ایران، به علت گوشتی بودن گیاه به مدت ۱۴ روز در سایه و در مجاورت هوا خشک گردید.

عصاره‌گیری: داز مقدار ۲۸ گرم پودر برگ و ۱۵ گرم پودر گل خشک‌شده گیاه به‌صورت جداگانه با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۸ ساعت در دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. پس از اتمام این زمان عصاره‌های حاصل در خلأ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. عصاره‌های تغلیظ شده به ظروف پتری منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در آون خلأ و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. عصاره‌های خشک‌شده به‌منظور ایمن ماندن از اکسید شدن در مقابل نور در ویال کهربایی جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۱۶]. با داشتن وزن گیاه و وزن عصاره خشک، بازده عصاره به‌صورت نسبت وزن عصاره به وزن گیاه خشک (W/W) محاسبه شد.

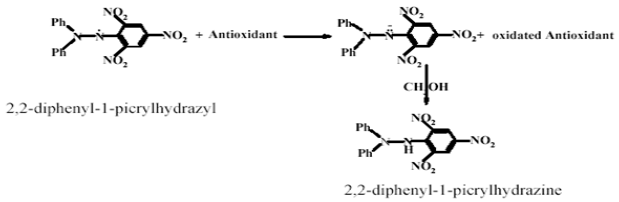
مواد شیمیایی و دستگاه‌ها: دستگاه‌ها و ابزار مورد استفاده عبارت‌اند از: ترازوی آنالیتیکال با دقت ۰,۰۰۰۱ گرم، مدل AX200 ساخت شرکت SIMADZU (ژاپن)، شوف بالن مدل ER ساخت شرکت BIBBY (انگلستان)، تبخیرکنندهٔ دوار[1] مدل Rota vapor R – 200 ساخت شرکت BUCHI (آلمان)، آون مدل UFE400 ساخت شرکت Mermert (آلمان)، دستگاه UV-Visible مدل Cintra6 ساخت شرکت GBC (استرالیا)، آسیاب برقی مدل SK_1 ساخت شرکت Retsch Gmbh (آلمان)، دستگاه سوکسله (اشک شیشه)، سمپلر با دقت ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، مدل Reference AG ساخت شرکت Ephendorf آلمان، لوله آزمایش، لوله آزمایش درب‌دار، ظروف پتری، اسپاتول، پیپت مدرج

1. Rotary Vaccum Evaporator

۱،۲،۵، ۱۰ میلی‌لیتری، بالن روداژدار (۲۹،۳۲) ۲۵۰ میلی‌لیتری، پیپت ۱ میلی‌لیتری، بالن ژوژه کهربایی ۵۰، ۲۵، ۱۰ میلی‌لیتری، بالن ژوژه ۵۰، ۲۵، ۱۰ میلی‌لیتری، ویال برای نگهداری عصاره، همزن ارتعاشی[1] مدل TTS 2 ساخت شرکت IKA (آمریکا)، همزن مغناطیسی[2] مدل VELP Scientifica ساخت اروپا، بن ماری مدل ۱۴ WNB ساخت شرکت Memmert (آلمان)، آون خلاء مدل VO 400، سمپلر مدل Refrence AG ساخت شرکت Eppendorf (آلمان).

مواد شیمیایی مورد استفاده عبارت‌اند از: متانول Merck، اتانول Merck، معرف DPPH ساخت شرکت Sigma، BHT[3] ساخت شرکت Sigma-Aldrich Chemie، معرف فولین سیوکالتیو Merck، بتا-کاروتن[4] Sigma، لینولئیک اسید[5] Merck، Tween40 ساخت شرکت Merck، گالیک اسید[6] از شرکت Acros، کلروفرم Merck، سدیم کربنات ۱۰ آبه Merck، DMSO[7] ساخت شرکت Merck، استون ساخت شرکت کیان کاوه، آب مقطر ۲ بار تقطیر.

آزمون DPPH: ارزیابی خاصیت ضد اکسیدان عصاره‌های تام متانولی گیاه با آزمون DPPH انجام شد. در این آزمون توانایی عصاره‌های گیاهی به‌عنوان ضد اکسیدان در دادن الکترون به عامل دارای رادیکال آزاد یعنی ۲، ۲ – دی فنیل – پیکریل هیدرازیل (DPPH) با تغییر رنگ محلول متانولی آن از بنفش به زرد مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون اثر ضد اکسیدان عصاره از طریق اندازه‌گیری ظرفیت کاهش رادیکال[8] (RSC)، DPPH، ارزیابی می‌شود.



شکل ۲. واکنش احیای DPPH به‌وسیله ضد اکسیدان

به علت وجود الکترون منفرد، DPPH دارای جذب قوی در طول موج ۵۱۷ نانومتر است و در این مرحله محلول متانولی آن به رنگ بنفش پررنگ است. اگر در حضور آنتی‌اکسیدان تک الکترون DPPH به‌صورت جفت الکترون درآید، نسبت به تعداد الکترون دریافتی جذب به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافته و محلول به رنگ زرد یا بی‌رنگ درمی‌آید. با استفاده از تغییر در جذب در این واکنش می‌توان توانایی مولکول‌های مختلف را به‌عنوان مهارکننده رادیکال سنجید. میزان تغییر جذب نمونه بستگی به قدرت و توانایی جذب رادیکال دارد [۱۴]. عمل احیاء شدن DPPH و کاهش جذب در طول موج ۵۱۷

1. Vortex
2. Stirrer
3. Butylated Hydroxy Toluene
4. β-Carotene
5. Linolenic acid
6. Gallic acid
7. Di Methyl Sulf Oxide
8. Radical Scavenging Capacity

نانومتر در دمای اتاق پس از گذشت ۳۰ دقیقه از شروع واکنش صورت می‌گیرد. درصد DPPH باقیمانده با غلظت ضد اکسیدان تناسب معکوس دارد. غلظتی از ضد اکسیدان که باعث کاهش ۵۰ درصد از غلظت DPPH ابتدایی ($DPPH_0$) شود را IC_{50} می‌نامند و از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شود [۱۵]:

$$DPPH = \left(\frac{DPPH_{rem}}{DPPH_{t=0}}\right) \times 100$$

میزان IC_{50} و خاصیت آنتی‌اکسیدان با یکدیگر نسبت عکس دارد به صورتی که هر چه میزان IC_{50} کمتر باشد، خاصیت آنتی‌اکسیدان نمونه بیشتر است [۱۴، ۱۵].

در این روش از متانول (حلال) به‌عنوان شاهد منفی و از بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌عنوان شاهد مثبت استاندارد استفاده شد و نتایج به‌دست‌آمده از عصاره برگ گیاه با BHT به‌عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید. برای به حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان از نتایج، آزمایش‌های مربوط به عصاره و نمونه استاندارد BHT سه بار تکرار و پس از خواندن جذب هر یک از محلول‌های با غلظت‌های معین در طول موج ۵۱۷ نانومتر، از داده‌ها میانگین گرفته و درصد مهار مطابق فرمول زیر محاسبه و با ترسیم نمودار (درصد مهار برحسب log C–)، IC_{50} برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. از محل تلاقی نمودار درصد مهار در ۵۰٪ با محور افقی منفی log C محاسبه و سپس از آن آنتی‌لگاریتم گرفته شد و پس از تبدیل واحد میلی‌گرم به میکروگرم (ضرب‌در ۱۰۰۰) نتایج در جدولی گردآوری شد که در بخش نتایج آمده است.

$$I\% = \left[\frac{A_{Blank} - A_{Sample}}{A_{Blank}}\right] \times 100$$

I: درصد مهار

A_{Sample}: جذب محلول نمونه

A_{Blank}: جذب محلول شاهد

در این آزمون محلول‌های زیر تهیه شدند [۱۶].

۱- محلول ضد اکسیدان ارغوانی رنگ DPPH

- ۵,۱ میلی‌گرم DPPH (با خلوص ۸۵٪) با ترازوی آنالیتیکی (دقت ۰,۰۰۰۱ گرم) توزین و به بالن ژوژه کهربایی ۵۰,۰ میلی‌لیتری منتقل شد.
- نمونه در مقداری متانول حل شد و سپس بالن با متانول به حجم رسانده شد.
- برای حصول اطمینان از انحلال کامل DPPH، محلول توسط شیکر کاملاً همگن شد.

۲- محلول شاهد منفی

- ۱,۰ میلی‌لیتر از محلول ضد اکسیدان حاوی DPPH تهیه‌شده در قسمت قبل، به یک بالن کهربایی مناسب منتقل شد.
- ۱,۰ میلی‌لیتر متانول به این محلول اضافه شد.
- بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از نگهداری این محلول در جای دور از نور و حرارت در فضای آزمایشگاه، جذب در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد.
- وجود جذب بین ۱,۱ تا ۱,۷ نشانه فعالیت بهینهٔ محلول DPPH است.

۳- محلول استاندارد BHT (شاهد مثبت)

- ۱۰,۰ میلی‌گرم BHT با ترازوی

آنالیتیکی (دقت ۰,۰۰۰۱ گرم) توزین و به بالن ژوژه ۱۰,۰ میلی‌لیتری منتقل شد (محلول استوک با غلظت 1mg/ml).

– نمونه در مقداری متانول حل شد و سپس بالن با متانول به حجم رسانده شد.

– محلول تهیه‌شده فوق پس از همگن شدن محلول استوک نمونه شاهد مثبت نامیده شد.

– از محلول استوک فوق، محلول‌هایی با غلظت ۰,۵، ۰,۲۵، ۰,۱، ۵×۱۰^{-۲}، ۵×۱۰^{-۳}، ۵×۱۰^{-۴}، ۵×۱۰^{-۵}، ۵×۱۰^{-۶} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بالن ژوژه‌های کهربایی تهیه شد.

– ۲,۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه‌شده فوق به‌صورت جداگانه به بالن‌های کهربایی منتقل شد.

– به هر بالن ۲,۰ میلی‌لیتر معرف ضد اکسیدان حاوی رادیکال آزاد DPPH (تهیه‌شده در قسمت ۱)، اضافه و محلول‌ها جداگانه کاملاً همگن شد.

– پس از مدت ۳۰ دقیقه نگهداری محلول‌ها در فضای آزمایشگاه و دور از نور، جذب در ۵۱۷ نانومتر ثبت شد.

۴– محلول عصاره

– محلول استوک از عصاره با غلظت 1mg/ml با حلال متانول ساخته شد.

– بسته به میزان فعالیت ضد اکسیدان نمونه، غلظت‌های رقیق‌تری از محلول استوک شامل محدوده‌ای از ۰,۵ تا ۰,۰۰۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش رقیق‌سازی متوالی ساخته شد.

– ۱,۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه‌شده فوق به‌صورت جداگانه به بالن‌های کهربایی منتقل شد.

– به هر بالن ۱,۰ میلی‌لیتر معرف ضد اکسیدان حاوی رادیکال آزاد DPPH (تهیه‌شده در قسمت ۱) اضافه و محلول‌ها جداگانه کاملاً همگن شد.

– پس از مدت ۳۰ دقیقه نگهداری محلول‌ها در فضای آزمایشگاه و دور از نور، جذب در ۵۱۷ نانومتر ثبت شد.

آزمون بی‌رنگ شدن بتا کاروتن در حضور لینولئیک اسید

همان‌طور که در بخش قبل اشاره شد، در یکی از روش‌های اندازه‌گیری ظرفیت کل ضد اکسیدان بر اساس انتقال اتم هیدروژن که به‌اختصار HAT نامیده می‌شود، توانایی ماده ضد اکسیدان در رقابت با ماده شیمیایی مستعد اکسیداسیون برای انتقال اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد ارزیابی می‌شود [۹].

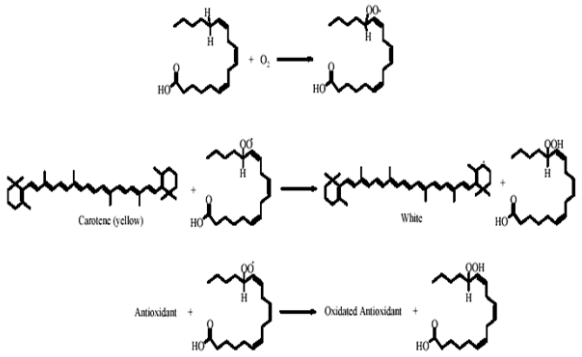
در آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید، لینولئیک اسید (L) در محیط آبی اشباع از اکسیژن (O_2) اکسیدشده و به رادیکال آزاد مربوطه (LOO°) تبدیل می‌شود. این رادیکال آزاد در مرحله بعد با جذب هیدروژن اتمی (H°) از بتاکاروتن موجب اکسید شدن آن و زایل شدن رنگ نارنجی ناشی از آن می‌گردد. وجود ماده ضد اکسیدان در محیط می‌تواند با بتاکاروتن در دادن هیدروژن اتمی رقابت نموده و از زایل شدن رنگ جلوگیری نماید. این آزمون نمونه‌ای از سنجش به روش انتقال هیدروژن است و در آن میزان زوال رنگ بتاکاروتن با سنجش میزان جذب نور آن در دو طول موج ۴۷۰ و ۴۹۰

نانومتر معین می‌شود [۹، ۱۷].

$$L + O2 \rightarrow LOO^{\circ}$$

$$\beta\text{-Carotene} + LOO^{\circ} \rightarrow \text{Oxidized } \beta\text{-Carotene} + LOOH$$

$$\text{Antioxidant} + LOO^{\circ} \rightarrow \text{Oxidized Antioxidant} + LOOH$$



شکل ۳. مهار اکسایش لینولئیک اسید

برای انجام آزمایش محلول‌های زیر تهیه شد [۱۶]:

۱- آب اشباع از اکسیژن: مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیرشده به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و جریان مداومی از گاز اکسیژن به مدت ۲ ساعت همراه با اختلاط و چرخش مگنت درون آن، وارد شد تا از اکسیژن اشباع شود.

۲- محلول عصاره‌ها: ۲۰,۰ میلی‌گرم عصاره برگ یا گل در بالن ژوژه ۱۰,۰ میلی‌لیتری توزین و پس از انحلال در مقداری حلال دی متیل و سولفوکساید (DMSO)، با این حلال به حجم رسانده شد. در این آزمون می‌توان برای حل کردن عصاره و محلول استاندارد (BHT)، از حلال‌های دیگری چون متانول، اتانول، آب مقطر نیز استفاده کرد.

۳- محلول شاهد مثبت: ۲۰,۰ میلی‌گرم شاهد مثبت (BHT) با ترازوی آنالیتیکی (دقت ۰,۰۰۰۱ گرم) توزین و به بالن ژوژه ۱۰,۰ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه پس از انحلال در مقداری حلال (DMSO)، با این حلال به حجم رسانده شد.

۴- محلول بتاکاروتن: ۱۰,۰ میلی‌گرم بتاکاروتن با ترازوی آنالیتیکی (دقت ۰,۰۰۰۱ گرم) توزین و به بالن ژوژه کهربایی ۱۰,۰ میلی‌لیتری منتقل شد. نمونه در مقداری حلال کلروفرم (به‌وسیله همزن) حل شد و سپس بالن با کلروفرم به حجم رسانده شد. (لازم به ذکر است این محلول پس از ساختن باید در فضای تاریک نگهداری شود).

۵- محلول لینولئیک اسید: ۰,۰۴۲۳ گرم لینولئیک اسید با ترازوی آنالیتیکی (دقت ۰,۰۰۰۱ گرم) در بالن ژوژه ۱۰,۰ میلی‌لیتری توزین شد. نمونه در مقداری حلال کلروفرم حل شد و سپس

بالن با کلروفرم به حجم رسانده شد.

محلول‌های نهایی:

- دو بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری روداژدار ۲۹,۳۲ شماره‌گذاری شده (شماره ۱ و ۲) آماده شد.
- ۲۲۵,۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ با دقت توسط ترازوی آنالیتیکی توزین و به بالن شماره ۱ اضافه شد.
- ۱۵۰,۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ با دقت توسط ترازوی آنالیتیکی توزین و به بالن شماره ۲ اضافه شد.
- ۶ میلی‌لیتر از محلول لینولئیک اسید تهیه‌شده در بند (۵)، به بالن شماره ۱ اضافه شد.
- ۴ میلی‌لیتر از محلول لینولئیک اسید تهیه‌شده در بند (۵)، به بالن شماره ۲ اضافه شد.
- ۵,۰ میلی‌لیتر از محلول بتاکاروتن تهیه‌شده در بند (۴)، به بالن شماره ۱ اضافه شد.
- حلال کلروفرم موجود در هر دو بالن با اتصال جداگانه آن‌ها به دستگاه روتاری، تبخیر شد.
- ۱۱۲,۵ میلی‌لیتر آب اشباع از اکسیژن تهیه‌شده در بند (۱)، به بالن شماره ۱ اضافه و محتویات کاملاً با یکدیگر مخلوط شد.
- ۷۵ میلی‌لیتر آب اشباع از اکسیژن تهیه‌شده در بند (۱)، به بالن شماره ۲ اضافه و محتویات کاملاً با یکدیگر مخلوط شد.
- برای هر یک از محلول‌های تهیه‌شده از نمونه عصاره‌ها، شاهد مثبت (BHT) و شاهد منفی (DMSO)، جداگانه ۳ لوله آزمایش درب دار برای تهیه محلول نهایی از هرکدام و ۱ لوله آزمایش درب دار به‌عنوان شاهد آماده شد.
- برای مثال به هر یک از لوله‌های آزمایش سری سه‌تایی در نظر گرفته‌شده برای شاهد مثبت (BHT)، ۳۵۰ ماکرولیتر از محلول شاهد مثبت تهیه‌شده در بند (۳) و ۲,۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده در بالن شماره ۱ اضافه شد.
- درب هر لوله گذاشته و محتویات کاملاً با یکدیگر مخلوط شد.
- برای محلول شاهد مثبت ۱ لوله آزمایش به‌عنوان شاهد گذاشته شد که به ترتیب ۷۰۰ میکرولیتر از محلول شاهد مثبت تهیه‌شده در بند (۳) و ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده در بالن شماره ۲ اضافه شد.
- درب لوله گذاشته و محتویات کاملاً با یکدیگر مخلوط شد.
- عملیات فوق برای لوله‌های آزمایش سری سه‌تایی نمونه عصاره‌ها و شاهد منفی به ترتیب با ۳۵۰ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده در بند (۲) و حلال DMSO، تکرار شد و سری‌های سه‌تایی و محلول شاهد هرکدام ساخته شد.
- پیش از قرار دادن تمامی لوله‌های آزمایش در حمام بن ماری، جذب سری سه‌تایی محلول شاهد منفی در ۴۷۰ و ۴۹۰ نانومتر ثبت شد.
- برای ثبت جذب ابتدا دستگاه UV-VIS، در طول موج مشخص‌شده توسط محلول بلانک تهیه‌شده برای سری سه‌تایی محلول شاهد منفی، صفر شد و سپس جذب سری سه‌تایی هرکدام ۳ بار قرائت و در ادامه میانگین‌گیری شد.
- جذب میانگین ثبت‌شده برای محلول شاهد منفی ازآنجا معادل جذب ماکزیمم (۱۰۰

درصد) در نظر گرفته شده است، باید بین ۰,۳ تا ۰,۴۵ باشد در غیر این صورت باید آزمایش مجدداً تکرار شود.

- تمامی ۱۶ لوله آزمایش پس از ثبت جذب محلول شاهد منفی، به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری قرار داده شد.

- جذب تمامی نمونه‌های سری‌های سه‌تایی جداگانه و پس از صفر شدن دستگاه UV-VIS در طول موج‌های ۴۷۰ و ۴۹۰ نانومتر در برابر محلول شاهد مربوطه ثبت و میانگین‌گیری شد.

- پس از ثبت و میانگین‌گیری هر سری، درصد جذب جداگانه در مقایسه با جذب ماکزیمم (۱۰۰ درصد) محاسبه شد.

سنجش فنول تام

یکی از روش‌های ارزیابی ضد اکسیدان بر اساس انتقال الکترون (ET)، اندازه‌گیری مقدار تام فنول با معرف فولین سیوکاتیو (FC) است [۱۱].

روش FC ظرفیت کاهش نمونه را اندازه‌گیری می‌کند. اغلب رابطه خطی میان مقدار تام فنول‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. وجود احیاء کننده در محیط باعث ایجاد رنگ سبز و اضافه کردن اکسیدکننده مثل برومین، رنگ زرد را تجدید می‌کند. طبیعت شیمیایی دقیق واکنشگر FC ناشناخته است. عقیده بر این است که حاوی هترو پلی فسفو تنگستات است. در اثر واکنش‌های برگشت‌پذیر کاهش، گونه‌های آبی‌رنگی به وجود می‌آید که احتمال می‌رود به دلیل تشکیل $(PMoW_{11}O_{40})^{-4}$ باشد. در این روش اعتقاد بر این است که مولیبدینیوم به‌آسانی در مخلوط احیاء می‌شود و واکنش انتقال الکترون بین احیاء کننده و مولیبدینیوم اتفاق می‌افتد [۱۱، ۱۸].

$$Mo\ (VI) + e^- \rightarrow Mo\ (V)$$

افزایش شدت جذب این واکنش بعد از ۲ ساعت و در ۷۶۰ نانومتر صورت می‌گیرد. معرف فولین سیوکالتیو، یک معرف غیراختصاصی است و خیلی از ترکیب‌های غیر فنولی (ویتامین ث، یون مس و ...) را هم احیاء می‌کند. ترکیب‌های فنولی در شرایط پایه‌ای که با محلول سدیم کربنات با pH حدود ۱۰ ایجاد می‌شود، واکنش می‌دهند. در حین واکنش، پروتون فنولی تبدیل به آنیون فنولات می‌شود که این آنیون قادر است معرف فولین سیوکالتیو را احیاء کند [۱۸]. پیش از انجام آزمایش روی عصاره‌ها، منحنی کالیبراسیون گالیک اسید ترسیم شد.

برای انجام آزمایش روی عصاره‌ها، محلول‌های زیر تهیه شد [۱۶]:

۱- محلول کربنات سدیم ۲٪: با توجه به در نظر گرفتن درصد خلوص کربنات سدیم، ۲/۶۹۹۴ گرم کربنات سدیم ۱۰ آبه با دقت توسط ترازوی آنالیتیکی در یک بالن ژوژه ۵۰,۰ میلی‌لیتری توزین شد. نمونه در مقداری آب مقطر حل و سپس با همان آب به حجم رسانده شد.

۲- محلول استوک نمونه: ۱۰,۰ میلی‌گرم عصاره برگ و یا گل، با دقت توسط ترازوی

آنالیتیکی در یک بالن ژوژه ۱۰,۰ میلی‌لیتری توزین و ۲,۰ میلی‌لیتر حلال DMSO به آن اضافه شد و درب بالن گذاشته و کاملاً با یکدیگر مخلوط شدند تا زمانی که نمونه کامل در حلال حل شد برای بهتر حل شدن می‌توان از حمام بن ماری و یا دستگاه سونیکاتور در ۵۰ درجه سانتی‌گراد نیز استفاده کرد. می‌توان از دیگر حلال‌ها مانند اتانول و یا آب مقطر نیز استفاده کرد.

۳- محلول نهایی نمونه از محلول استوک: ۳ عدد بالن ژوژه ۲۵,۰ میلی‌لیتری برای محلول استوک آماده شد که در هر بالن به ترتیب ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیرشده، ۰,۱ میلی‌لیتر از محلول استوک عصاره توسط سمپلر، ۰,۵۰ میلی‌لیتر محلول فولین سیوکالتیو توسط سمپلر و پس از ۳ دقیقه ۱,۵۰ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲٪ تهیه‌شده در بند (۱) اضافه شد و بالن با آب مقطر ۲ بار تقطیرشده به حجم رسانده و محتویات کاملاً با یکدیگر مخلوط شد.

- لازم به ذکر است فولین محلولی زردرنگ است و پس از گذشت زمان رنگ محلول سبز می‌شود و هرچه قدر رنگ سبز تندتر باشد نشان‌دهنده آن است که عصاره از ترکیبات فنولی بیشتری برخوردار است که می‌توانند در واکنش شرکت کنند.

۴- محلول شاهد: کاملاً مشابه محلول نمونه در یک بالن ژوژه ۲۵,۰ میلی‌لیتری تهیه شد و تنها تفاوت آن با محلول نهایی نمونه، استفاده از ۰,۱ میلی‌لیتر حلال DMSO به‌جای محلول استوک نمونه است.

- لازم به ذکر است رنگ محلول شاهد نباید با گذشت زمان تغییر کند و باید رنگ‌زردی که پس از اضافه کردن محلول معرف فولین ایجادشده، باقی بماند.

- جذب محلول‌های نمونه به کمک محلول شاهد تهیه‌شده پس از گذشت ۲ ساعت در ۷۶۰ نانومتر ثبت شد.

- لازم به ذکر است جذب هرکدام از محلول‌های نمونه ۳ بار قرائت و درنهایت میانگین‌گیری شد.

- جذب‌های میانگین‌گیری شده در فرمول به‌دست‌آمده از ترسیم منحنی کالیبراسیون برای غلظت‌های مختلف گالیک اسید، قرار داده شد و میزان غلظت فنول تام عصاره‌ها برحسب میکروگرم گالیک اسید محاسبه شد.

پیش از انجام آزمایش بر روی عصاره‌ها، ابتدا باید منحنی کالیبراسیون گالیک اسید رسم شود. برای رسم منحنی کالیبراسیون مراحل زیر انجام شد [۱۶]:

۱- وزن‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ میلی‌گرم گالیک اسید توسط ترازوی آنالیتیکی ۰,۱ میلی‌گرم جداگانه در بشرهای ۲۰ میلی‌لیتری توزین شد.

۲- هرکدام از این مقادیر در ۱,۰ اتانول ۹۶٪ حل شد.

۳- ۰,۱ میلی‌لیتر از هر یک از این محلول‌ها جداگانه توسط سمپلر به بالن ژوژه‌های ۵۰,۰ میلی‌لیتری که از قبل دوسوم حجم آن‌ها از آب مقطر پر شده بود، اضافه شدند.

۴- به هر بالن ۱,۰ میلی‌لیتر محلول فولین

سیوکالتیو اضافه شد.

۵- بعد از گذشت ۳ دقیقه ۳,۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲٪ (تهیه‌شده در بند (۱) تهیه محلول‌های مورد نیاز آزمون بر روی عصاره)، به هر بالن اضافه شد.

۶- تمامی بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده و کاملاً همگن شد.

۷- محلول شاهد کاملاً مشابه محلول‌های نمونه ساخته شد و تنها به‌جای محلول استوک گالیک اسید، ۰,۱ میلی‌لیتر حلال اتانول اضافه شد.

۸- بعد از گذشت ۲ ساعت، جذب محلول‌های نمونه در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

۹- منحنی جذب در برابر غلظت گالیک اسید ترسیم شد.

معادله خط مربوطه محاسبه شد:

$$Absorbance = 0.0012 \times Gallic\ acid\ (\mu g/ml) + 0.0033$$

نتایج

عصاره گیری: عصاره گیری از برگ و گل گیاه *Echium italicum* L. به روش سوکسله انجام شد. بازده‌های حاصل در جدول (۲) ارائه گردیده است [۱۶].

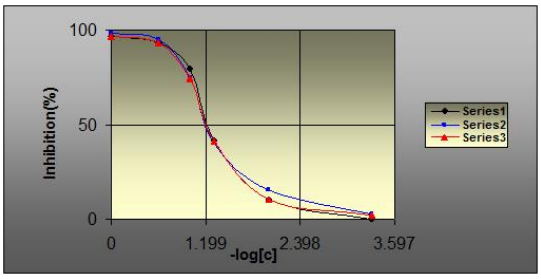
جدول ۲. بازده استخراج عصاره از گیاه

	برگ	گل
وزن گیاه خشک (g)	۲۸	۱۵
حجم حلال (ml)	۵۰۰	۵۰۰
وزن عصاره (g)	۵,۹۶	۲,۰۴
بازده (%W/W)	۲۱,۳	۱۳,۶

آزمون DPPH: در این آزمون، از محلول BHT به‌عنوان شاهد مثبت استفاده می‌شود. همان‌طور که قبلاً گفته شد، BHT به‌عنوان یک ضد اکسیدان قوی و استاندارد شناخته شده است. در بررسی نتایج حاصل از فعالیت ضد اکسیدان عصاره برگ و گل گیاه، ابتدا صحت نتایج ذکرشده در مورد فعالیت بالای ضد اکسیدان BHT و در ادامه نتایج مرتبط با عصاره برگ و گل بررسی می‌شود. این نتایج شامل جداول درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط هر یک از محلول‌های عصاره‌ها و شاهد مثبت (پس از یک‌بار قرائت جذب در ۵۱۷ نانومتر و میانگین‌گیری) و نمودار درصد مهار برحسب منفی لگاریتم غلظت و محاسبه IC_{50} (توانایی از بین بردن ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH) BHT و نمونه‌های عصاره برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است [۱۶،۲۲].

جدول ۳. میانگین درصد مهار عصاره متانولی برگ گیاه

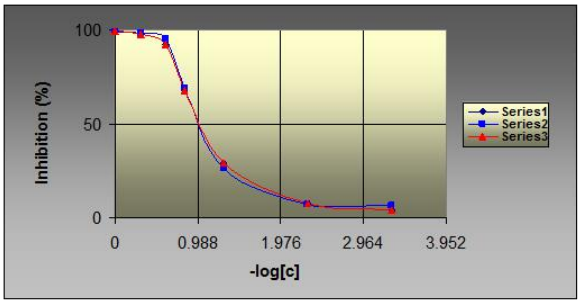
غلظت نمونه mg/ml	میانگین درصد مهار بار اول	میانگین درصد مهار بار دوم	میانگین درصد مهار بار سوم
۱	۹۶,۶۲	۹۸,۳۴	۹۶,۴۵
۰,۲۵	۹۳,۰۷	۹۵,۰۹	۹۳,۶
۰,۱	۷۹,۵	۷۵,۲	۷۴,۳۲
۰,۰۵	۴۱,۴۷	۴۰,۲۶	۴۱,۰۲
۰,۰۱	۱۰,۵۶	۱۵,۷۷	۱۰,۵۹
۰,۰۰۰۵	۰,۱۴۱	۳,۰۴	۲,۴۴



شکل ۴. درصد مهار نسبت به غلظت عصاره متانولی برگ گیاه.

جدول ۴. میانگین درصد مهار عصاره متانولی گل گیاه

غلظت نمونه mg/ml	میانگین درصد مهار بار اول	میانگین درصد مهار بار دوم	میانگین درصد مهار بار سوم
۱	۹۹,۶۵	۹۸,۹۵	۹۹,۹۱
۰,۵	۹۷,۴۸	۹۸,۰۸	۹۸,۵۵
۰,۲۵	۹۲,۳۴	۹۵,۰۹	۹۱,۳۶
۰,۱۵	۶۸,۱۵	۶۹,۱۴	۶۵,۱۱
۰,۰۵	۲۹,۴۱	۲۶,۲۱	۲۷,۶۴
۰,۰۰۵	۷,۵۶	۷,۰۷	۴,۱۲



شکل ۵. درصد مهار نسبت به غلظت عصاره متانولی گل گیاه

جدول ۵. میانگین درصد مهار BHT

غلظت نمونه mg/ml	میانگین درصد مهار بار اول	میانگین درصد مهار بار دوم	میانگین درصد مهار بار سوم
۰,۵	۹۶,۲۷	۹۶,۲۵	۹۷,۴۳
۰,۲۵	۹۵,۸۷	۹۵,۸۰	۹۶,۱۲
۰,۱	۸۸,۷۸	۹۰,۲۳	۹۰,۸۷
۰,۰۵	۷۶,۴۲	۷۸,۲۳	۷۸,۶۵
۰,۰۰۵	۱۶,۶۰	۱۷,۶۲	۱۷,۷۹
۰,۰۰۰۵	۳,۳۵	۴,۲۳	۳,۲۳
۰,۰۰۰۰۵	۲,۴۷	۳,۱۲	۲,۵۸
۰,۰۰۰۰۰۵	۰,۹۹	۱,۶۳	۱,۱۲

شکل ۶. درصد مهار نسبت به غلظت نمونه استاندارد BHT

جدول ۶. نتایج IC_{50} حاصل از آزمون DPPH عصاره و نمونه استاندارد BHT

نمونه	IC_{50} (µg/ml)
عصاره برگ	۶۳,۱۱ ±۱,۴۵
عصاره گل	۱۰۲,۸۱±۱,۰۸
BHT	۱۹,۷۲ ± ۰,۸۰

آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید

همان‌طور که در بخش قبل گفته شد، جذب شاهد منفی DMSO بلافاصله بعد از تهیه، در دو طول موج ۴۷۰ و ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه UV/Vis خوانده و برابر ۱۰۰ درصد جذب در نظر گرفته شد، پس از خواندن جذب هر یک از غلظت‌های معین استاندارد BHT و نمونه‌های عصاره برگ و گل و میانگین‌گیری، بعد از گذشت ۲ ساعت در دو طول موج ۴۷۰ و ۴۹۰ نانومتر، درصد جذب هر یک از نمونه‌ها نسبت به شاهد منفی سنجیده و میزان فعالیت ضد اکسیدان محاسبه شد. نتایج درصد مهار نمونه‌های گیاهی و استاندارد BHT (شاهد مثبت) و DMSO (شاهد منفی) در جدول (۷) ارائه گردیده است [۱۶].

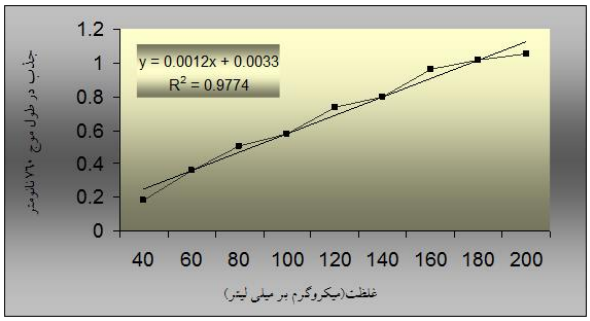
جدول ۷. آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید

عصاره	مهار در ۴۷۰ نانومتر (٪)	مهار در ۴۹۰ نانومتر (٪)
برگ	۵۷,۲۲	۵۳,۱۸
گل	۴۸,۷۴	۴۵,۶۶
BHT	۸۹,۴۳	۸۷,۴۵
DMSO	۵,۸۶	۵,۶۱

سنجش فنول تام: نتایج جذب غلظت‌های متفاوت گالیک اسید در طول موج ۷۶۰ نانومتر در جدول (۸) و نمودار خطی جذب در برابر غلظت مربوط به استاندارد گالیک اسید در نمودار (۴) ارائه و معادله خط و ضریب همبستگی R^2 محاسبه شده است. نتایج ارزیابی میزان ترکیب‌های فنولی تام موجود در عصاره‌های متانولی تغلیظ شده برگ و گل گیاه Echium *italicum* L. با نمودار کالیبراسیون گالیک اسید در جدول (۹) ارائه شده است [۱۶،۲۲].

جدول ۸. جذب غلظت‌های متفاوت گالیک اسید

غلظت نمونه µg/ml	جذب
۲۰۰	۰,۱۸۱۷
۳۰۰	۰,۳۵۷۶
۵۰۰	۰,۵۷۸۲
۶۰۰	۰,۷۳۷۴
۸۰۰	۰,۹۶۵۰
۹۰۰	۱,۰۱۹۳
۱۰۰۰	۱,۰۵۴۰



شکل ۷. جذب برحسب غلظت گالیک اسید

جدول ۹. فنول تام موجود در عصاره برگ و گل معادل گالیک اسید

عصاره	فنول تام عصاره معادل گالیک اسید (µg/mg)
برگ	۶۸٫۸۲
گل	۳۰٫۲۵

جدول ۱۰. مقایسه میزان ترکیبات فنولی (TPC) و خاصیت ضد اکسیدان با دیگر گونه‌های جنس (Echium)

گونه‌ها	TPC (mg GA/g)	DPPH IC_{50} (µg/ml)
amoenum[۱۹]	۱۸۰٫۹ ±۶٫۹	۵۷٫۸ ±۶٫۶
altissimum[۲۰]	۱۵۴٫۲۷	۱۰۵٫۴
vulgare [۲۱]	۹٫۷۱ ±۰٫۰۳	–
angustifolium[۲۱]	۱۲٫۶۲ ±۰٫۰۳	–
parviflorum[۲۱]	۹٫۶۹ ±۶٫۹	–

جدول ۱۱. میزان خاصیت ضد اکسیدان گونه‌های *vulgare, angustifolium, parviflorum* [۲۱]

غلظت نمونه mg/ml	vulgare	*angustifolium*	*parviflorum*
۱	۴۳٫۳۶±۰٫۳۷	۴۵٫۳۲±۰٫۰۳	۶۸٫۸۴±۰٫۰۳
۰٫۵	۱۵٫۷۱±۰٫۰۱	۲۰٫۴۱±۰٫۰۱	۴۳٫۹۳±۰٫۰۱
۰٫۱	–	۵٫۴۵±۰٫۰۲	۷٫۴۱±۰٫۰۱
۰٫۰۵	–	–	۲٫۶۱±۰٫۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از IC_{50} و مقایسه آن با IC_{50} نمونه استاندارد (BHT)، گویای آن است که عصاره اندام برگ گیاه دارای فعالیت ضد اکسیدان بالاتری نسبت به اندام گل است.

نتایج حاصل از بررسی میزان فنول تام نشان می‌دهد که برگ گیاه حاوی مقادیر بیشتری از ترکیب‌های فنولی نسبت به گل است، خاصیت ضد اکسیدان همیشه با مقدار ترکیب‌های فنولی رابطه مستقیم ندارد. ممکن است در بعضی از موارد منشأ خاصیت ضد اکسیدان تانن‌ها، دی ان-ها و یا ترکیب‌های غیر فنولی باشند که توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن را دارند.

نتایج در این تحقیق نشان می‌دهد که مقدار ترکیب‌های فنولی با خاصیت ضد اکسیدان نمونه‌ها هم‌راستا است.

همان‌طور که از بررسی درصد مهار لینولئیک اسید توسط عصاره‌ها و مقایسه آن‌ها با مقادیر شاهد مثبت و منفی استنباط شد، اندام برگ گیاه در دو طول موج ۴۷۰ و ۴۹۰ نانومتر درصد بالاتری در مهار لینولنیک اسید نسبت به گل دارد. ولی به‌طورکلی می‌توان گفت که هر دو عصاره

گیاه در این آزمون با توجه به نتایج نزدیک به یکدیگر، عملکرد خوبی داشته‌اند و می‌توان از این گیاه بعد از بررسی و تحقیقات بیشتر در این زمینه بهره گرفت.

ضد اکسیدان صناعی BHT از بهترین ضد اکسیدان‌های مورد استفاده در صنایع غذایی است و اگر ضد اکسیدان طبیعی وجود داشته باشد که بتواند در خاصیت ضد اکسیدان با این نمونه سنتزی رقابت کند، می‌تواند صنایع غذایی را یک‌قدم به سمت سلامت بیشتر نزدیک سازد.

با توجه به نتایج خوب این گیاه در فعالیت‌های ضد اکسیدان (در مقایسه با BHT) و نیز بالا بودن فنول تام این گیاه (خصوصاً اندام برگ) می‌توان بعد از تحقیقات و بررسی‌های بیشتر از این گیاه خودرو در صنایع دارویی و غذایی بهره گرفت.

از طرفی چون این گیاه بومی ایران است و به‌طور خودرو می‌روید، منطقی به نظر می‌رسد که کشور ما در عرصه بهره‌برداری در صنایع دارویی و غذایی از این گیاه پس از انجام تحقیقات و بررسی‌های بیشتر، نوآور و پیش رو باشد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام نور مرکز مشهد و پژوهشکده اسانس دانشگاه کاشان که در پیشبرد و انجام این تحقیق صمیمانه امکانات لازم را تأمین نمودند کمال تشکر و سپاس را دارد.

منابع

[۱] اعتمادی-م.، صادقی-ا.، حسینی-س.م.، مروری بر مهم‌ترین روش‌های عصاره‌گیری از گیاهان دارویی. انجمن مهندسی شیمی ایران. دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل. چهارمین همایش ملی علوم و مهندسی جداسازی؛ ۳-۴ خرداد ۱۳۹۶. ۱۰-۱

[۲] آزاد بخت-م.، حسینی-ا.س.، فخری- م.، مروری بر ضرورت استاندارد کردن عصاره گیاهان دارویی در تحقیقات و نحوه انجام آن. مجله علوم پزشکی رازی. دوره ۲۳. شماره ۱۵۲؛ بهمن ۱۳۹۵. ۸-۱۶

[۳] صمصام شریعت-ه. عصاره گیری و استخراج مواد مؤثرهٔ گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آن‌ها. اصفهان: انتشارات مانی؛ ۱۳۷۱. ۱۰۵-۱۲۶

[۴] شریعتی فر-ن.، کامکار-ا.، شمس اردکانی-م.ر.، میثاقی-ع.، جمشیدی-ا.ح.، جاهد خانیکی-غ.ر.، بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فعالیت ضد اکسیدان گیاه علف هیضه. افق دانش؛ فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد. دوره ۱۷؛ شماره ۴؛ زمستان ۱۳۹۰. ۴۰-۳۵

[5] Luis A. del Río., "*ROS and RNS in plant physiology: an overview*". Journal of Experimental Botany, oxford academic, Volume 66, Issue 10, May 2015, Pages 2827–2837.

[6] Luisa M.S, Christine H.F., *"Unravelling the reactive oxygen and reactive nitrogen signalling networks in plants"*. Journal of Experimental Botany, oxford academic, Volume 66, Issue 10, May 2015, Pages 2825–2826.

[7] Emad M. Atta, Nawal H. Mohamed and Ahmed A. M. Abdelgawad., "*ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES*". Eur. Chem. Bull. 2017, 6(8), 365-375,.

[8] Chika J Mbah, Ifeoma Orabueze, Ndiamaka H. Okorie,. *Antioxidants Properties of Natural and Synthetic Chemical Compounds: Therapeutic Effects on Biological System*. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences,*. Volume 3 Issue 6 28-42, June 2019.

[9] Deepshikha G., "*Methods for determination of antioxidant capacity: A review*". Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, *Vol. 6(2): 546-566.* February 2015

[10] Reşat A., Mustafa Ö., Kubilay G., Esra Ç., Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. Agric. Food Chem, 64, 5, 997-1027, 2016.

[11] Reşat A., Shela G., Volker B., Karen M. S., Mustafa Ö., Kubilay G., "*Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant", Pure Appl. Chem.*, Vol. 85, No. 5, pp. 957–998, 2013.

[۱۲] مظفریان، ولی‌الله. ۱۳۷۵، فرهنگ نام‌های گیاهان دارویی، انتشارات معاصر، ۱۸۴-۱۸۳، ۱۸۹-۱۸۶.

[۱۳] قهرمان، احمد. ۱۳۶۳، فلور ایران، وزارت کشاورزی، سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، انتشارات و مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، جلد پنجم، ۵۴۷.

[14] Kitima S., Souksanh N., Yupaporn S., *"Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis".,* The Japan Society for Analytical Chemistry., ANALYTICAL SCIENCES JULY 2018, VOL. 34., 795-800.

[15] Clináscia R. R. A., Thiago de M. S., Monica L. P. V., Antônio F. de C. A., Nísia A. V. D. P.. "*Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of Myrciaria cauliflora*", Brazillian journal of food technology, 301-309, 2013.

[۱۶] دشتی‌زاده-ز. شناسایی اجزای سازندهٔ اسانس و ارزیابی اثر ضد اکسیدان و ضد میکروبی عصارهٔ گیاه *Echium italicum L.* [پایان‌نامه]. [مشهد]: دانشگاه پیام نور مرکز مشهد؛ ۱۳۸۸.

[17] Dongmei Y., Qian Z., Guoping R., Tiejin Y., "*A comparative study on antioxidant activity of different parts of lotus (Nelumbo nuficera Gaertn) rhizome"*., Food Science and Technology., 37(1), 135-138, Jan.-Mar. 2017.

[18] Marcos A. M. G., Alice O. de A., Isabelle C. F. B., Magda R. A. F., Luiz A. L. S., *"Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from Libidibia ferrea (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz"., Braz. Arch. Biol. Technol. v.61: e18170586, 2018.*

[19] B. Asghari, S.Mafakheri, M.M. Zarrabi, S.A. Erdem, I.E. Orhan, M.B. Bahadori, *"Therapeutic target enzymes inhibitory potential, antioxidant activity, and rosmarinic acid content of Echium amoenum",* South African

and antioxidant activity of some Echium species wild growing in Turkey", Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences, 37, 3, 151-159, 2012.

[22] I. D. Bošković, D. A. Đukić, P. Z. Mašković, L. G. Mandić, *"Phytochemical composition and biological activity of Echium italicum L. plant extracts",* Bulgarian Chemical Communications, Volume 49, Number 4, pp. 836 – 845, 2017.

Journal of Botany, 120, 191–197, 2019.

[20] Mostafa Alamholo, *"Antiradical and antibacterial activity of Echium altissimum extracts on human infective bacteria and chemical composition analysis",* Advanced Research in Microbial Metabolites & Technology (ARMMT), 3, 19-27, 2020.

[21] Nuraniye ERUYGUR, Gülderen YILMAZ, Osman ÜSTÜN, "*Analgesic*

COPYRIGHTS

© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (http:/creativecommons.org/licenses/by/4.0)