مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طبّ مکمّل، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

مطالعه‌ی سنجش محتوای فنل و فلاونوئیدی تام و ارزیابی عملکرد ضدّ اکسایشی عصاره‌ی متانلی اندام هوایی گیاه گل گاوزبان در شرایط آزمایشگاهی

حامد فتحی[۱]، حمیدرضا محمدی[۲*]

۱. کارشناس ارشدزیست‌شناسی تکوینی،مرکزتحقیقات علوم داروئی،پژوهشکده‌ی هموگلوبینوپاتی،دانشگاه علوم پزشکی مازندران،ساری،ایران.
۲. استادیار،دکترای تخصصی سم‌شناسی،مرکز تحقیقات علوم دارویی،گروه سم‌شناسی– فارماکولوژی،دانشکده‌ی داروسازی ساری،دانشگاه علوم پزشکی مازندران،ساری،ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۳

چکیده

مقدمه: در طبّ سنّتی و نوین، گیاهان داروئی و عصاره‌ی آن‌ها دارای کاربردهایی در تغذیه، پزشکی و صنعت می‌باشند. ضدّ اکسایش‌ها شامل ترکیباتی هستند که با احیا کردن موجب جلوگیری از روند اکسیداسیون در سلول می‌شوند. گیاه گل گاوزبان (*Echium amoenum* L.) در مناطق کوهستانی مازندران می‌روید و در طبّ سنّتی، اثرات بیولوژیک متفاوتی چون آرام‌بخشی، ضدّ التهاب، ضدّ افسردگی و خواص پیشگیری‌کننده‌ی سرطانی را دارد. هدف از این مطالعه بررسی محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی و همچنین میزان فعّالیت ضدّ اکسایشی این گیاه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی – آزمایشگاهی، محتوای تام فنلی عصاره‌ی متانولی اندام هوایی گل گاوزبان با استفاده از واکنش‌گر فولین– سیوکالتیو در طول موج ۷۶۰ نانومتر و محتوای تام فلاونوئیدی این عصاره با استفاده از معرّف آلومینیوم کلراید در طول موج ۴۲۰ نانومتر سنجیده شد، سپس فعّالیت ضدّ اکسایشی عصاره در غلظت‌های متفاوت تهیه و ارزیابی شد؛ در نهایت، محتواها به همراه فعّالیت ضدّ اکسایشی عصاره مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد محتوای تام فنلی برای عصاره‌ی گل گاوزبان۴۲۹±۲ µg gallic acid equivalent/ml و محتوای فلاونوئید این عصاره ۱۴۸/۵۶±۱/۵۲µg quercetin equivalent/ml است. در بررسی فعّالیت به دام‌اندازی رادیکال با ۲-2, diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate(DPPH)، غلظت مهاری ۵۰٪ (IC50) ۱۷۸/۱۱µg/ml تعیین گردید. در ارزیابی فعّالیت احیاکنندگی مشخص شد عصاره‌ی گل گاوزبان اثرات قوی‌تری نسبت به ویتامین C داشت. در سنجش به دام‌اندازی نیتریک اکساید، درصد مهار در عصاره‌ی متانولی برابر ۵۷/۸۹٪ و قدرت شلاته‌کردن آهن برابر ۵۱/۷۴٪ تعیین گردید که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با ویتامین C و کوئرستین به ترتیب به میزان (P=۰/۰۴۷۳) و (P=۰/۰۰۹۶) از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: نظر به نتایج حاصل، عصاره‌ی *E.amoenum* از خاصیت ضدّ اکسایشی قابل توجهی برخوردار بوده که باید بیش از قبل، مورد توجه قرار گیرد. همچنین عصاره‌ی گیاه به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان با قابلیت رقابت با ویتامین C، می‌تواند در ساخت فرآورده‌های غذایی و داروئی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: گل گاوزبان، عصاره، ضدّ اکسایش، فنل‌ها، فلاونوئیدها.

*نویسنده‌یمسئول:E.mail:dr_hrm2000@yahoo.com

مقدمه

ضد اکسایش‌ها ترکیباتی مؤثرند که می‌توانند از اکسایش ماکرو مولکول‌هایی مانندپروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها جلوگیری کنند (۱). این عمل با مهار مرحله‌ی گسترش یا شروع واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایش یا تولید رادیکال‌های آزاد انجام می‌پذیرد. تولید مشتقات اکسیدهای نیتروژن و اشکال فعّال اکسیژن یکی از عوامل ایجاد آسیب و مرگ برنامه‌ریزی‌شده وسرطان‌ها وبیماری‌های قلبی - عروقی می‌باشد(۲). واکنش‌های بیوشیمیایی اکسیژن فعّال بسیاری را در بدن تولید می‌کنند که توانائی تخریب بیومولکول‌ها را دارند. نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد خیلی از امراض، به‌خوبی به اثبات رسیده است (۳). این اثر زیان‌بخش رادیکال‌های آزاد، می‌تواند با مواد آنتی‌اکسیدان بلوکه گردد. این ترکیبات موجب به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد شده باعث سمّیت‌زدایی می‌گردند (۴). برخی از این ترکیب ها با خواص آنتی‌اکسیدانی یا ضدّ اکسایشی به‌عنوان متابولیت‌های ثانوی به‌وسیله‌ی گیاهان موجود در طبیعت ساخته می‌شوند که ترکیباتی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها، استروئیدها و ترپنوئید از آن جمله می‌باشند. فلاونوئیدها به صورتی فراوان در مواد غذایی، میوه و سبزیجات وجود دارند که دارای اثرات ضدّ سرطان می‌باشند. ایزوفلاون‌ها، شامل ایزومر فلاونوئیدها هستند و متابولیسم و اثرات مشابهی نیز دارند. ترکیبات فلاونوئیدها در شیره‌ی گیاهان عالی و شیره‌ی سلولی بافت‌های جوان آن‌ها یافت می‌شوند و در اکثر خانواده‌های گیاهی وجود دارند. گروهی از فلاونوئیدها دارای اثرات ضدّ التهابی و ضدّ آلرژی، خصوصیات ضدّ لخته و محافظ عروقی، مهارکنندگی ایجاد تومور، اثر محافظتی مخاط روده و معده، اثرات مدر و ضدّ اسپاسم، ضدّ تومور، ضدّ باکتری و ضدّ قارچ و خاصیت ایجاد رنگ می‌باشند (۵ ، ۶). نظر به اینکه گیاهان، منبع آنتی‌اکسیدان های طبیعی بوده و دارای خواص داروئی هستند تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند می‌توانند سلول‌ها را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت نمایند که در زمینه‌های پزشکی، داروئی و درمانی مورد استفاده هستند (۷). گیاه گل گاوزبان با نام علمی *Echium amoenum* L از خانواده‌ی گاوزبان[1]، بومی فلات ایران و محدود به حاشیه‌ی شمالی ایران و قفقاز می‌باشد و در مناطق کوهستانی ایران (به‌خصوص مازندران و آذربایجان) نیز می‌روید. نوع گیاه گل گاوزبان بوته‌ای بوده و قسمت اندام هوایی آن، مورد استفاده است. مهم‌ترین مواد مؤثر داروئی آن موسیلاژ، روغن فرّار، صمغ، ویتامین C، تانن، الانتوئین، ساپونین، الکالوئیدهای نوع پیرولیزیدین، ترکیبات سیانوژیک و املاح معدنی می‌باشند. مصرف آن مورد مقبولیت عمومی بوده و در طبّ سنّتی ایران به جهت اثرات آرام‌بخشی، خلط‌آوری، تصفیه‌کننده‌ی خون، علاج‌کننده‌ی بیماری‌های سودایی، ضدّ سرفه و آسم، معرق، ملیّن، مدر، شیرافزا و برای معالجه‌ی روماتیسم، ذات‌الریه، مشکلات عصبی، سرماخوردگی و نارسایی مزمن کلیه مورد استفاده بوده و در پانکراتیت نیز مفید است. عصاره‌ی گیاه نیز دارای قند، فلاونوئیدهای متصل به قند، گلیسیرول و ویتامین E می‌باشد (۸ و ۹). از خواص درمانی آن می‌توان به ضدّ افسردگی و ضدّ دردی (۱۰) ضدّ اضطراب (۱۱)، اثرات ضدّ باکتریایی (۱۲) و اهمّیت در سیستم ایمنی (۱۳) اشاره نمود. مطالعات و پژوهش‌های گسترده‌ای بر روی گیاهان و عصاره‌های گیاهی با هدف دست‌یابی به گونه‌هایی با فعّالیت آنتی‌اکسیدانی بالا صورت گرفته است. ازآنجایی‌که چندین روش و حلّال برای تهیه‌ی عصاره‌ی گیاهی وجود دارد و هر روش در مقایسه با روش‌های دیگر از محدودیت‌ها، معایب و مزایای منحصربه‌فردی برخوردار است، در این پروژه به بررسی فعّالیت ضدّ اکسایشی پرداخته شده است. با توجه به موارد مصرف زیاد به علت خواص داروئی و درمانی فراوان (۱۴) و استفاده از این گیاه به‌عنوان دم‌کرده و چای ، این مطالعه با هدف اندازه‌گیری فلاونوئیدها، محتوای تام فنلی و همچنین بررسی خاصیت ضد اکسایشی عصاره‌ی متانلی این گیاه در غلظت‌های مختلف با چند روش تعیین قدرت احیاکنندگی،

[1] -Boraginaceae

قدرت شلاته‌کنندگی، قدرت به دام‌اندازی نیتریک اکساید و اندازه‌گیری قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH[1] انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، گیاه گل گاوزبان از کوه‌های استان مازندران با تایید فرد متخصص گیاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. بخش‌های هوایی گیاه در سایه و در مجاورت هوا خشک شد و سپس پودر گردید. به‌منظور عصاره‌گیری (روش پرکولاسیون)، از متانل استفاده شد. حلّال در خلأ تبخیر شد و مجموعه به کمک فریز درایر خشک شد. (۱۵) خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین ترکیبات فنلی عصاره‌های حاصل با روش‌های زیر مورد بررسی قرار گرفت:

ازمعرّف آلومینیوم کلراید به‌منظورسنجش میزان فلاونوئید استفاده شد. به عصاره *E.amoenum* ، متانل، محلول کلرید آلومینیوم ۳، ۱۰٪[2] در اتانل، محلول پتاسیم استات یک مولار و آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط، نیم ساعت بعد به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. از کوئرستین به‌عنوان استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید براساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد (۱۶).

محتوای تام فنلی با استفاده از واکنش‌گر فولین- سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گل گاوزبان(۱۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول واکنش‌گر فولین- سیوکالتیو و ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ کربنات سدیم مخلوط شد و سپس جذب آن در ۷۶۰ نانومتر پس از هم زدن به مدت یک ساعت در مقابل بلانک قرائت شد. از اسیدگالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و محتوای تام فنلی بر اساس اکی والان میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره آزمایش و گزارش شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد (۱۷،۱۸).

قدرت احیاکنندگی بدین‌صورت مورد بررسی قرار گرفت که غلظت‌های مختلفی از عصاره *E.amoenum* در آب با بافر فسفات ۰/۲ مولار و محلول پتاسیم فری سیانید مخلوط گردید. مجموعه در دمای۵۰ درجه برای۲۰ دقیقه انکوبه گشت. بعد از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۱٪، مجموعه به مدت۱۰ دقیقه با دور۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول فریک کلرید ۰/۱ مخلوط شد و سپس جذب مجموعه در۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) است. به‌منظور شاهد مثبت برای مقایسه، ازآسکوربیک اسید (ویتامینC) و بوتیل هیدروکسی آنیزول[3] استفاده شد (۱۹).

در ارزیابی فعّالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH، ۴ میلی‌لیتر از هر عصاره_گل گاوزبان_ با ۱ میلی‌لیتر محلول رادیکال DPPH، ۱۰ میکرومولار (غلظت پایانی ۰/۱ میلی مولار DPPH) مخلوط شد و پس از هم زدن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد؛ سپس جذب آن در ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت و بر این اساس، توانائی احیاکنندگی عصاره محاسبه شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. بر اساس اطلاعات حاصل، قدرت مهارکنندگی ۵۰٪[4] عصاره با استفاده از نرم‌افزار بر روی منحنی درصد مهار به دست آمد. ویتامین C و BHA به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه به کار گرفته شد (۱۵).

در بررسی فعّالیت شلاته‌کنندگی آهن II، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر عصاره *E.amoenum* (۱-۲۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) به ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II در ۰/۹ میلی‌لیتر متانل اضافه شد و پس از ۵ دقیقه انکوبه‌شدن، واکنش با ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول ۵ میلی‌مولار فروزین[5]

[1] -2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate
[2]- AlCl3
[3]-BHA
[4]- IC50
[5]-ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine p, P-disulfonic acid

آغاز و پس از ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. سنجش در حضور کنترل انجام شد و فعّالیت شلاته‌کنندگی آهن، بر اساس اکی والان Na2EDTA/ g extract بیان گردید (۲۰).

در ارزیابی به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید، سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی‌مولار) در بافر فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره – که جداگانه در آب حل شده بود مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره (اما مقادیر هم‌حجم آب مقطر) به‌عنوان کنترل به کار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱٪، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱٪ در اسید فسفریک ۲٪) اضافه شد و سپس جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. از کوئرستین به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه استفاده گردید (۱۵).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اندازه‌گیری‌های ضدّ اکسایشی و اعداد مربوط به سنجش میزان فنل و فلاونوئید ۳ بار تکرار و اطلاعات به‌صورت Mean + SD. گزارش شد. آنالیز واریانس یک‌سویه[1] برای مقایسه‌ی میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن اختلافات از آزمون نیومن کولز استفاده شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوط به دست آمد.

یافته‌ها

بازده عصاره: بعد از انجام فرآیند عصاره‌گیری مشخص گردید که بازده کار ۲۳٪ بوده است.

نتایج آزمون‌های ضدّ اکسایشیو محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی

محتوای تام فنلی با روش فولین سیوکالتیو به‌صورت اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد ($R^2=0.999, y=0/005x+0/062$) محاسبه شد. محتوای تام فنلی برای عصاره‌ی متانولی اندام هوایی و برگ گل گاوزبان ۲±۴۲۹ اکیوالان میلی‌گرم گالیک اسید[2] در گرم پودر عصاره به دست آمد.

محتوای فلاونوئید نیز بر مبنای معادله‌ی خط منحنی استاندارد ($y=0/807\ln(x)-2/628, R^2=0/894$) محاسبه و ۱/۵۲±۱۴۸/۵۶ (اکیوالان میلی‌گرم کوئرستین[3]) در گرم پودر عصاره به دست آمد.

نتایج این مطالعه نشان داد فعّالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH در عصاره ها با افزایش غلظت، زیاد می‌شود. رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل که برای تعیین فعّالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد به کار رفته بود. غلظت مهاری ۵۰٪ (IC50) درعصاره‌ی متانولی اندام هوایی و برگ ۱۷۸/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. IC50 برای آسکوربیک اسید برابر۵/۰۵ میکروگرم در میلی‌لیترو BHA برابر ۵۳/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. نمودار درصد مهار عصاره‌ی گیاه در غلظت‌های مختلف، در شکل ۱ مشخص شده است.

در شکل۲منحنی غلظت‌های مختلف عصاره و ویتامین C به‌عنوان شاهد مشخص شده است. دراین پروژه مشخص شد قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش پیدا می‌کند. اختلاف معنی‌داری بین عصاره و البته در غلظت‌های۴۰۰ µg /ml و ۸۰۰ µg /ml در قدرت احیاکنندگی وجود داشت ($p<0/05$) و اثر این عصاره همانند تأثیر آسکوربیک اسید و البته قوی‌تر بوده است.

یافته‌ها مشخص کرد عصاره‌ی گیاه، به‌صورت نسبتاً ضعیف قابلیت اتصال به آهن را دارد. غلظت مهار۵۰٪ برای شلاته‌کنندگی آهن II برای عصاره‌ی متانولی به دست آمد. قدرت شلاته‌کردن آهن در غلظت ۶۴۰۰ میکروگرم /

[1]- ANOVA

[2]- µg gallic acid equivalent/ ml
[3]-quercetin equivalent/ ml

میلی‌لیتر برابر ۵۱/۷۴٪ و در غلظت ۸۰۰ برابر ۱۷/۶۸٪ بود. جهت بررسیمیزان شلاته‌کنندگی آهن، EDTA به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت وIC_{50} برابر ۱۷/۳۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

عصاره‌های گیاه گل گاوزبان در ارزیابی سنجش به دام-اندازی نیتریک اکساید در محدوده‌ی مورد نظر (میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) به شکل وابسته به غلظت، اثرضعیفی از خود نشان دادند. درصدمهار عصاره در غلظت ۱۲۸۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر برابر ۵۷/۸۹٪ و در غلظت ۸۰۰ برابر ۱/۲۸٪ بود. فعّالیت کوئرستین با غلظت مهار۵۰٪معادل ۳۷/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاتر از عصاره‌ی گیاه بود و قدرت مهار نیتریک اکساید ضعیف بود ($p <$ ۰/۰۱).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد عصاره‌ی گیاه گل گاوزبان با داشتن قدرت احیاکنندگی بالا و ۱۴۸/۵۶±۱/۵۲ میلی‌گرم فلاونوئید و ۴۲۹±۲ میلی‌گرم ترکیبات فنلی از خاصیت ضدّ اکسایشی خوبی برخوردار است. در مطالعه‌ای که به‌وسیله‌ی محرابیان[1] و همکاران صورت پذیرفت سمّیت کبدی دوزهای معمول گل گاوزبان بر موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. از نظر آزمون‌های عملکرد کبدی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی عصاره و شاهد به دست نیامد. مطالعات هیستوپاتولوژی کبد نیز نشان داد عصاره در دوزهای مورد استفاده، سمّیتی ایجاد نکرد و مصرف دم‌کرده‌ی گیاه گل گاوزبان در دوزهای مصرفی مختلف به‌وسیله‌ی انسان فاقد سمّیت است (۲۱). در تحقیق دیگری که به‌وسیله‌ی تیس[2] و همکاران بر روی دو گروه ۲۰ نفره از مادران شیرده (که یک گروه آن‌ها مبتلا به اتوپی بودند) صورت پذیرفت، به‌صورت تصادفی به هر دو گروه عصاره‌ی خوراکی گل گاوزبان به مدت ۱ هفته تجویز شد. در نتیجه، کاهش مشخصی در سطح شیر مادران اتوپیک در مقایسه با گروهی که مبتلا به اتوپی نبودند، مشاهده شد (۲۲). در مطالعه‌ای که به‌وسیله‌ی پیلرود[3] و همکارشان انجام پذیرفت به کاربرد این گیاه اشاره و اعلام شد اثر آنتی‌اکسیدانی آن می‌تواند به پلی فنل‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها نسبت داده شود؛ ضمن اینکه گزارش شد این گیاه نسبت به گیاه سنبل‌الطیب[4] فعّالیت بیشتری از خود نشان داد (۲۳). در تحقیقی که به‌وسیله‌ی حسین‌پورآزاد و همکاران صورت گرفت اسیدهای چرب بذر گل گاوزبان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به ارزش غذایی اسید های چرب ضروری موجود در روغن دانه، گزارش شد گل گاوزبان ایرانی پتانسیل بالقوه جهت تولید مکمّل‌های غذایی غنی از اسیدهای چرب ضروری همچون امگا-۳- (آلفا- لینولنیک) وامگا -۶ (گاما - لینولنیک) را دارد (۲۴). عصاره‌ی متانولی گیاه گل گاوزبان به‌صورت قابل ملاحظه‌ای دارای مقادیر بالایی از فنل و فلاونوئید است. فنل‌ها و ترکیبات پلی فنلی ازجمله فلاونوئیدها به‌طوری گسترده در محصولات غذایی یافت شده ونشان داده شده است که فعّالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. تحقیقات نشان داده‌اند افزایش سطح فلاونوئیدها دررژیم غذایی انسان‌ها، می‌تواند منجر به کاهش برخی بیماری‌ها در انسان گردد (۲۵). میزان محتوای تام فنلی و فلاونوئید در این مطالعه می‌تواند فعّالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌ی تهیه‌شده از گیاه گل گاوزبان را توجیه کند. با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعه‌ی ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۱۰) پیرامون مقایسه‌ی این خواص در چند گیاه، می‌توان گفت محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی گیاه گل گاوزبان از گیاهان شویدکوهی[5] (با محتوای فنل ۶۶/۹±۳/۳۴ و محتوای فلاونوئیدی ۱/۶۴± ۳۲/۸)، فی جوآ[6] (با محتوای فنل ۴۴/۱۷±۰/۲۸ و فلاونوئید ۱/۲۹ ± ۵۵/۸۳)، ذرت[7] (با محتوای فنل ۲/۷۸± ۱۱۸/۹۴ و فلاونوئید ۱/۳۴ ±۵۸/۲۲)، خرمندی[8] (با محتوای فنل ۱۰/۲±۰/۹ و فلاونوئید ۰/۰۵± ۲/۱)، تلکا یا گلابی

[1]-Mehrabani
[2]-Thijs
[3]-Pilerood
[4]- *Valerian officinalis*
[5] - *Grammosciadium platycarpum*
[6] -*Feijoa sellowiana*
[7] - *Zea mays*
[8] -*Diospyros lotus*

جنگلی[1] (با محتوای فنل ۱۱/۳± ۱۸۷/۸ و فلاونوئید ۱/۲ ±۴۴/۶) و شبدر شیرین سفید[2](با محتوای فنل ۵±۲۸۹/۵ و فلاونوئید ۵/۴ ±۵۷)، بالاتر است (۲۶، ۲۷). مدل به دام-اندازی رادیکال پایدار DPPH به‌صورت گسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف استفاده می‌شود (۲۸). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیاء به‌وسیله‌ی فرایند های گرفتن هیدروژن یا الکترون، رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می‌گردد و ترکیبات با این قابلیت به عنوان آنتی‌اکسیدان تلقی می‌گردند (۲۳) براساس IC50 به‌دست‌آمده قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی گیاه گل گاوزبان با آسکوربیک اسید وکوئرستین و گیاهانی چون بومادران[3] (۱۵) و علف چای[4] (۲۵) ضعیف‌تر و از گیاه گزنه‌ی سفید[5] قوی‌تر بوده است. از توانایی تشکیل کمپلکس با آهنII در اندازه‌گیری قدرت شلاته‌کنندگی آهن II استفاده می‌شود. با توجه به اینکه آهن II می‌تواند سبب تولید اکسی رادیکال‌ها و پراکسیده شدن چربی‌ها گردد، کاهش غلظت آن در واکنش‌های فنتون به نحوی ایجاد نوعی حفاظ در مقابل تخریب اکسیداتیو خواهد بود. در حضور سایر شلاته‌کننده‌ها، تشکیل کمپلکس فروزین- آهن II کاهش یافته که منجر به کاهش رنگ قرمز تشکیل کمپلکس می‌شود. در این روش هم EDTA و هم عصاره با تشکیل کمپلکس فروزین- آهن II تداخل کرده که نشان‌دهنده‌ی این است که عصاره دارای اثر شلاته‌کنندگی است و قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین آهن را شلاته می‌کند. در این مطالعه جذب کمپلکس فروزین – آهن II به شکل وابسته به دوز، کاهش یافت. یافته‌ها مشخص نمود عصاره‌ی گل گاوزبان به‌طور نسبتاً ضعیفی قابلیت اتصال به آهن را دارد. از طرفی عناصر واسطه، مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکال‌های آزاد از پراکسیدها را بر اساس واکنش‌های فنتون دارا بوده که درانسان می‌تواند باعث بیماری‌های قلبی- عروقی گردد(۲۹). سنجش قدرت احیاکنندگی درنمونه‌ی ناشی ازاحیاءآهن II به آهن III با اهداء الکترون بوده و میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. دراین طول موج افزایش جذب نشان از افزایش قابلیت احیاکنندگی بود وعصاره‌ی گیاه گل گاوزبان قدرت احیاکنندگی خوبی را نشان داد. اثر عصاره قوی‌تر از تأثیر آسکوربیک اسید بود. این حاکی از آن بود که برای رسیدن به یک قدرت احیاکنندگی، غلظت مورد نیاز از عصاره‌ی گیاه معادل همان غلظت از ویتامین ث بوده و با توجه به اینکه قابلیت احیاکنندگی عصاره بالا بود، می‌توان گفت این عصاره‌ها با کمک اهداء الکترون باعث ختم واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌گردند. نیتریک اکساید بر اکسیژن نوزاد و حالات پاتولوژیک دیگر از جمله کانسر و التهاب دارای نقش است (۲۸). گیاه و فرآورده‌های طبیعی گیاهی با توان مقابله با تشکیل نیتریک اکساید به‌عنوان یک جایگاه در مهار بیماری دارای اهمّیت بوده و از فعّالیت به دام‌اندازی این ترکیب می‌توان برای توقف درواکنش‌های زنجیره‌ای ناشی از تولید بیش‌از حد نیتریک اکساید در سیستم سلامت انسان استفاده کرد. عصاره‌ی گیاه، تأثیر ضعیفی در به دام - اندازی نیتریک اکساید به شکل وابسته به غلظت از خود نمایان کرد که قابل مقایسه با فعّالیت کوئرستین نبود ($p<۰/۰۱$). مطالعه‌ی انجام‌شده نشان داد که عصاره‌ی اندام هوایی و برگ گل گاوزبان دارای محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی بالا و قابل توجه بوده و دارای فعّالیت ضدّ اکسایشی قابل توجهی است که با توجه به مطالعه‌ی نادری و همکاران (۱۳۸۳) – که بررسی فیتوشیمیایی گیاه گل گاوزبان را مورد ارزیابی قرار دادند و ترکیب‌های فلاونوئیدی، ساپونینی و فنولیکی در گیاه را تأیید کردند (۳۰) – هم‌خوانی دارد. مواردی نظیر تهیه‌ی گیاه در فصل خاص و برداشت آن و دسترسی به دیگر گونه‌ها نیز محدودیت‌هایی را در بر دارد.

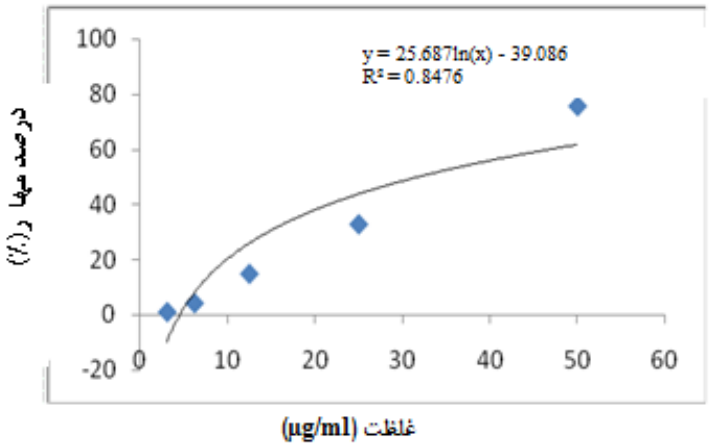
نتیجه‌گیری

[1] -*Pyrus boissieriana*
[2] -*Melilotus arvensis*
[3] -*Achilleawilhemsii*
[4] -*Hypericum perforatum* L
[5] -.*Lamium album* L

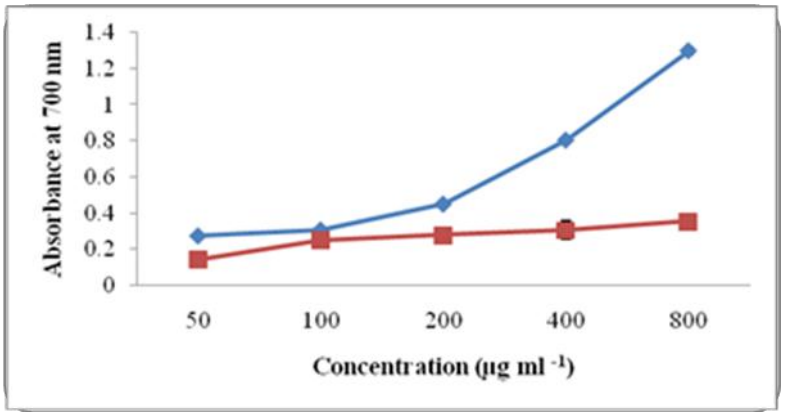
با توجه به مطالعه‌ی انجام شده و تحلیل و انجام آزمایش‌های مورد نظر بر روی عصاره‌ی گیاه گل گاوزبان و انجام آزمون ضدّ اکسایش و تعیین مقدار، و نظر به اهمّیت این گیاه و استفاده از آن در فرهنگ‌ها و بین اقوام مختلف و بومی بودن آن و استفاده از قسمتی از آن در ساخت دارو و شربت (۳۰)، پیشنهاد می‌گردد فعّالیت‌های دیگر و اختصاصی‌تری مانند جداسازی ترکیبات، ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی و دیگر اثرات بیولوژیک و درمانی به‌صورت درون‌بدنی و بالینی و ... نیز انجام شود تا از این گیاه در جهت نیل به اطلاعات بیشتر و جامع‌تر و محصولات بیشتر استفاده شود. در این پروژه مشخص شد گیاه گل گاوزبان دارای خواص ضدّ اکسایشی و البته محتوای تام فنلی قابل توجهی بوده و استفاده از آن در طبّ سنّتی و بین فرهنگ‌ها و اقوام مختلف حتی در حال حاضر توجیه علمی پیدا می‌کند.

تشکر و قدردانی

در پایان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران که در انجام این پروژه همکاری و حمایت داشته اند تشکر و قدردانی می گردد.



شکل شماره‌ی (۱) میزان به دام‌اندازی رادیکالDPPH به‌وسیله‌ی عصاره‌ی متانلی گل گاوزبان درغلظت‌های مختلف



- عصاره- ویتامین C

شکل شماره‌ی(۲) فعّالیت احیاکنندگی عصاره‌های اندام هوایی گیاه گل گاوزبان در غلظت 50-800 µg/ml ویتامین C به‌عنوان کنترل مثبتمورد استفاده قرار گرفته است. (در غلظت‌های ۴۰۰ و۸۰۰ اختلاف معناداری وجود داشت).

References:

1. Parker T D, Adams D A, Zhou K, Harris M, Yu. L. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. Journal of Food Science. 2003;68(4):1240–1243
2. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of agricultural and food chemistry. 2001;49(11):5165-5170.
3. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. The American journal of medicine. 2002;113(9):71-88.
4. Alinejad M, Motamedzadegan A , Rezaei M. Functional properties and antioxidant activities of protein hydrolysates from whitecheeck shark (*Carcharhinus dussumieri*) meat. JFST. 2016;50(13):159-169[Persian]
5. Saboora A, Dadmehr K, Ranjbar M. Total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts in six Iranian species of wild Dianthus L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2013;29(2) :281-295.[Persian]
6. Sathishkumar R, Lakshmi P T V, Annamalai. A. Effect of drying treatment on the content of antioxidants in *Enicostemma littorale* blume. Research Journal of Medicinal Plant. 2009;3(3): 93-101
7. Fathi H, Mohammad Shahi N, Shaki F. Evaluation of different extraction methods from *Albizia Julibrissin* Durazz Leaves in reducing nausea in chickens. Complementary Medicine Journal.2016;4(17):1224-1233.[Persian]
8. Abed A, Minaiyan M, Ghannadi A, Mahzouni P, Babavalian MR. Effect of *Echium amoenum* Fisch. etMey a traditional Iranian herbal remedy in an experimental model of acute pancreatitis. ISRN gastroenterology. 2012; 141548:54.
9. Abbaszadeh S, Radjabian T, Taghizadeh M. Identification and determination of phytosterols in oilseeds of some populations from two Iranian *Echium* species . IJMAPR.2013; 28(4):741-755. [Persian]
10. Heidari MR, Azad EM, Mehrabani M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch& CA Mey. extract in mice: possible mechanism involved. Journal of ethnopharmacology. 2006;103(3):345-349.
11. Rabbani M, Sajjadi S, Vaseghi G, Jafarian A. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. Fitoterapia. 2004;75(5):457-464.
12. Abolhassani M, Antibacterial effect of borage (*Echium amoenum*) on Staphylococcus aureus. Braz J Infect Dis , 2004; 8(5):382–385
13. Amirghofran Z, Azadbakht M, Keshavarzi F. *Echiuma moenum* stimulate of lymphocyte proliferation and inhibit of humoral antibody synthesis. Iranian Journal of Medical Sciences. 2000;25:119-124.
14. Fathi H, Ebrahimzadeh MA, Ziar A, Mohammadi H. Oxidative damage induced by retching; antiemetic and neuroprotective role of *Sambucus ebulus* L. Cell biology and toxicology. 2015;31(4-5):231-239.
15. Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh M. Antioxidant activity and phenolic contents of *Achillea wilhelmsii*. Pharmacologyonline. 2011;2:942-949.
16. Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate

lipid homeostasis in adipose tissue and liver. Experimental Biology and Medicine. 2006;231(8):1287-1299.
17. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chem.2005; 89(1):27–36
18. Ordonez A, Gomez J, Vattuone M. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food chemistry. 2006;97(3):452-458.
19. Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(13):3713-3717.
20. Ebrahimzadeh MA, Nabavi S, Nabavi S. Correlation between the in vitro iron chelating activity and poly phenol and flavonoid contents of some medicinal plants.Pakistan Journal of Biological Sciences. 2009;12(12):934.
21. Mehrabani M, Mehrabani M, Raftari S, Nabipour F, Heidary MR, Mahdavi Z, et al. Evaluation of Hepatotoxicity of Common Doses of Decoction of *Echium Amoenum* Fisch and CA Mey in Rats. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2007;14(1):44-54. [Persian]
22. Thijs C, Van Houwelingen A, Poorterman I, Mordant A, Van Den Brandt P. Essential fatty acids in breast milk of atopic mothers: comparison with non-atopic mothers, and effect of borage oil supplementation. European journal of clinical nutrition. 2000;54(3):234-238.
23. Pilerood SA, Prakash J. Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). Journal of food science and technology. 2014;51(5):845-54.
24. Hosseinpour AN, Nematzadeh GA, Azadbakht M, Kazemitabar S, Shokri E. Investigation on fatty acids profile in two ecotypes of Iranian *Echium amoenum* Fisch&Mey. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2012; 27(4):587-595. [Persian]
25. Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L.(st. John's wort). International Journal of Forest, Soil and Erosion (IJFSE). 2013;3(2):68-72.
26. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology. 2008;7(18); 3188-3192.
27. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Pourmorad F. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2010;9(32):5212-5217.
28. 28- Lee SE, Hwang HJ, Ha J-S, Jeong H-S, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life sciences. 2003;73(2):167-179.
29. Khalili M, Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 2016;29(3):773-777.
30. Naderi HBM, Rezaee M. Primory Phytochemical investigation of *Echium amoenium*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research.2004; 20 (3):377-383 . [Persian]

Original Article

Determination of in vitro total phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacity of the methanolic extract of *Echium amoenum* L.

Fathi H[1],MohammadiH[*2]

1. Researcher, M.Sc in Developmental Biology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
2. Assistant professor, PhD in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Received: 15February, 2016؛Accepted: 23May, 2016

Abstract

Introduction: In traditional and modern medicine, active ingredients of medicinal plants have many applications in food, pharmaceutical, medical and industry. Antioxidants are compounds that prevent the oxidation process in the cell. *Echium amoenum* L. is a plant which grows in the mountainous regions of Mazandaran. This plant has different biological effects such as sedation, anti-inflammation, antidepressant and cancer preventive properties in traditional medicine. The aim of this study was to determine the total phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacity of the methanolic extract of *E.amoenum* plant.

Methods: In this experimental laboratory study the content of total phenolic Using the folin-siokalatio reactive at 760 nm wavelength and flavonoid With the use of aluminum chloride reagent at 420nm of *E.amoenum* extract were measured and antioxidant capacities of different concentrations of the extract were evaluated.

Results: The results showed that total phenolic content of the extract was 429±2µg gallic acid equivalent/ml and flavonoid content was 148.56±1.52µg quercetin equivalent/ml, respectively. The radical scavenging activity by 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl hydrate (DPPH),inhibitory concentration of 50%(IC50),was determined 178.11 µg/ml. Assessment of the reducing ability of extract showed that the extract had more activity than vitamin C. The percent nitric oxide trap inhibition of the extract was 57.89% and power iron chelating properties was 51.74%,that showed statistically significant difference in comparison with vitamin C and Quercetin (P=0.0473) and (P=0.0096) respectively.

Conclusion: According to the results, *E.amoenum* extract had remarkable antioxidant capacity and can be proposed as an antioxidant compound used in the manufacture of food and pharmaceutical products.

Keywords: *Echium amoenumL*; Extract;Antioxidant;Phenols; flavonoids.

*Corresponding author: E.mail: dr_hrm2000@yahoo.com