اکوفیزیولوژی و فیتوشیمی گیاهان دارویی و معطر
EPPMAPs

استخراج ترکیبات زیست فعال و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گل گاو زبان (*Echium amoenum*)

سیمین عربی [۱*]، عسل فرخ اسلاملو[۲]، زهرا عزت پورقدیم[۲]، سروناز مقصودی[۲]

۱- استادیار گروه شیمی، واحد صفادشت، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول: simin.arabi@safaiau.ac.ir)

۲- گروه شیمی، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: مهر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: آبان ۱۴۰۱

نوع مقاله: علمی- پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

چکیده

گیاهان دارویی منابع پتانسیلی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و ترکیبات آنتی اکسیداتیو گوناگونی برای خنثی کردن گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر تولید می‌کنند. مصرف این ترکیبات سبب کاهش شیوع بسیاری از بیماری‌های مزمن می‌شود. گل گاو-زبان یکی از مهمترین گونه‌های خانواده بوراژیناسه است. این پژوهش، به‌منظور اندازه-گیری میزان فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گوناگون گل گاوزبان از منطقه کلاردشت در هرباریوم مؤسسه تحقیقاتی جنگلها و مراتع انجام شد. در پژوهش حاضر، استخراج ترکیبات فنولی بخش‌های هوایی گیاه با حلال‌های استون و اتانول در سه غلظت (خالص، ۵۰ و ۷۵ درصد) انجام شد. مقدار فنول کل عصاره‌ها با روش فولین-سیوکالتیو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها توسط آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی در مقایسه با BHT و اسکوربیک اسید سنجش شد. بیشترین میزان فنول کل در همه عصاره‌ها، در غلظت ۵۰ درصد بدست آمد، به طوری که میزان فنول کل عصاره‌های استونی و اتانولی به‌ترتیب ۸۲/۹ و ۷۷/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بود ($p \leq 0.05$). عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت نشان دادند. در بین عصاره‌های فنولی، عصاره استونی بالاترین فعالیت ضدرادیکالی و آنتی‌اکسیدانی را داشت. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گل گاوزبان را می‌توان به مقادیر بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت داد. بنابراین این گیاه به‌عنوان منبع بالقوه‌ای از ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی می‌گردد که می‌توان از عصاره آن در صنایع غذایی برای جلوگیری از فساد اکسیداتیو مواد غذایی بهره برد.

واژگان کلیدی: گل گاوزبان، استخراج، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

۱. مقدمه

واکنش‌های اکسیداسیون به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، اثرات مضر و جبران ناپذیری بر سلامت انسان به جای می‌گذارند و سبب ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی، تصلب شرائین، سرطان، دیابت، ضعف سیستم ایمنی بدن و پیری زودرس می‌گردند (Zhang et al., 2010). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و یا سبب حذف آنها می‌شوند و سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می‌دارند، از این رو با روند پیری و ابتلا به بیماری‌های مختلف مبارزه می‌کنند. این مواد می‌توانند از تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن جلوگیری کنند و در صورت تشکیل، تأثیر آنها را بر بدن کاهش دهند (Noguchi and Niki, 2000). علیرغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در پلاسما، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین جهت نیاز به تأمین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق منابع غذایی تأمین می‌شود (Young and Woodside, 2001). شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمّی بودن و اثرات سوء تغذیه‌ای آنتی‌اکسیدان‌های ساختگی اضافه شده به مواد غذایی را تأیید می‌کند. علاوه بر این خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های ساختگی است. بنابراین نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های قوی با سمیّت کمتر و اثربخشی بیشتر یک ضرورت اجتناب ناپذیر است (Aktumsek et al., 2013). امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های جدید و بدون خطر از منابع گیاهی، حیوانی، میکروبی و غذایی مورد استقبال محققان و پژوهشگران قرار گرفته است. از مهم‌ترین منابع آنتی‌اکسیدانی موجود در رژیم غذایی می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوتاتیون‌ها، اسید آسکوربیک و نمک‌های آسکوربات، کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی اشاره کرد (Pokorny, 2007). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی در جلوگیری از بیماری‌هایی نظیر دیابت شیرین (دیابت ملیتوس)، بیماری‌های پوستی، آلزایمر، پارکینسون، سرطان و آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ضروری و مؤثر می‌باشد. لذا مصرف فراورده‌های طبیعی به ویژه در سالهای اخیر رو به افزایش بوده و مهم‌ترین دلیل آن، اثبات اثرات مخرب و عوارض جانبی داروهای شیمیایی و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی است که خطری جدی برای کره زمین محسوب می‌شود (Bahadori et al., 2017). بسیاری از گیاهان دارویی حاوی مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان نظیر پلی‌فنول‌ها هستند که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. ترکیبات فنولی از طریق اهداء الکترون به رادیکال های آزاد واکنشهای اکسیداسیون چربی را مهار می کنند (Ahmadi et al., 2007).

گل گاوزبان (*Echium amoenum*) متعلق به خانواده بوراژیناسه (Boraginaceae) گیاهی دوساله و پایا است که پوشیده از کرک های نرم و نازک، یا بلند و ابریشمی و دارای گل های لوله ای شکل به رنگ آبی مایل به ارغوانی می باشد. میوه آن فندقه، نوک تیز و سطح آن دارای برجستگی های کوچک و متعدد است. از مناطق رویشی گیاه گل گاو زبان در ایران می توان به استان های شمال ایران (گیلان، مازندران، ارتفاعات کندوان، کلاردشت، چالوس)، ارتفاعات حیران و قزوین اشاره کرد. فصل گل‌دهی این گیاه اواسط بهار و تابستان می‌باشد. گل، برگ و سرشاخه های گلدار آن به مصرف دارویی می‌رسد (Sayyah et al., 2009). لازم به ذکر است که متاسفانه در منابع ایرانی کمتر به خواص آنتی‌اکسیدانی گاوزبان ایرانی پرداخته شده است و بیشتر گاو زبان اروپایی مورد توجه قرار گرفته است (Heidari et al., 2006). تحقیقات نشان داده است برخی داروهای گیاهی مانند گل‌گاوزبان می‌توانند از طریق برخی ترکیبات فعال آن (فلاونوئیدها) سبب مهار عوامل التهابی و کاهش فعالیت ماکروفاژها گردند (Naseri et al., 2018). مطالعات فیتوشیمیایی نشان دهنده وجود ترکیباتی نظیر رزمارینیک اسید، آنتوسیانیدین، فلاونوئیدها و لینولنیک اسید در عصاره گل‌گاوزبان می‌باشد (Delorme et al., 1977). گل‌گاوزبان که در ایران برای درمان اضطراب و افسردگی، سرفه، ذات-الریه و تشنج استفاده می‌شود، حاوی ترکیبات ساپونینی، فلاونوئیدی و فاقد ترکیبات آلکالوئیدی، تانن و گلیکوزیدهای سیانوژنیک

است و اگرچه اثر ضد اضطرابی آن از دیازپام کمتر است، اما با افزایش زمان مصرف از ۱۵ روز به ۳۰ روز تأثیر ضد-اضطرابی آن بیشتر می‌شود (Abed et al., 2014).

در سال‌های اخیر، تمایل به پژوهش و تحقیق در خصوص داروهایی با منشأ طبیعی به ویژه گیاهی افزایش چشمگیری یافته است. بطور مثال داروی ترانکی وال (Tranquival) که در درمان تنش‌های عصبی، اضطراب و بی‌خوابی استفاده می‌شود، حاوی عصاره‌های گیاهی ریشه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)، اندام‌هوایی گل‌ساعتی (*Passiflora incarnata*)، گل‌آذین رازک (*Humulus lupulus*) و برگ بادرنجبویه (*Melissa Officinalis*) و داروی دنتول (Dentol) حاوی اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja Khuzestanica*) که به‌عنوان تسکین دهنده درد دندان کاربرد دارد، نمونه‌هایی از سنتز داروهای با منشأ گیاهی است. بهره‌گیری از تکنیک‌های گوناگون استخراج و روش‌های علمی در مراحل مختلف تهیه داروهای گیاهی سبب شده که برخی از آن-ها همراه با دیگر داروهای سنتزی در بازار جهانی عرضه شده و مورد استفاده قرار گیرد. در همین راستا و با توجه به اهمیت ترکیبات مؤثره گیاه دارویی و ارزشمند گل گاوزبان (*Echium amoenum*)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات زیست فعال این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری نمونه گیاهی

گل گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*) در خرداد ماه ۱۴۰۰ از اراضی کشاورزی شهرستان کلاردشت جمع‌آوری گردید و در هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در تهران با استفاده از ویژگی‌های ظاهری و ارگانولپتیک شناسایی شد (شماره سند ۸۹۹۳۸). پس از انتقال نمونه گیاهی به آزمایشگاه، اندام گل از گیاه گل گاو زبان جدا گردید و در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک گردید. سپس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه با آسیاب برقی خرد و جهت استحصال ترکیبات مؤثره گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

- تهیه عصاره به روش ماسراسیون (خیساندن)

در این روش ۵۰ گرم از گیاه پودر شده به وسیله آسیاب برقی، توزین شد. از حلال‌های اتانول و استون با غلظت‌های خالص، ۵۰ و ۷۵ درصد (حجمی-حجمی) استفاده شد. سپس عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شدند و بخش جامد آن جدا گردید. عصاره اتانولی به وسیله تبخیر کننده چرخان تحت خلأ (Buchi R-300، ساخت سوئیس) و عصاره استونی توسط آون تحت خلأ (Memmert VO49، ساخت آلمان) در دمای ۳۵°C تغلیظ و سپس عصاره‌ها توسط خشک کن انجمادی (مدل UO11، ساخت ایران) در دمای ۴۰°C- خشک و به پودر تبدیل شدند (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007).

- اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی‌کل بر اساس روش فولین-سیوکالتیو انجام شد (Singleton et al., 1999). اساس این روش بر این اصل استوار است که واکنشگر فولین- سیوکالتیو یک ترکیب اکسنده است. فنول‌ها و پلی فنول‌ها با انتقال تک الکترون خود به آن در محیط قلیایی، این ترکیب را احیا کرده و ایجاد رنگ آبی در محیط می‌نمایند که در ۷۶۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را نشان می

دهد. برای کنترل دقیق این روش گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده می‌شود و نتیجه نهایی بصورت معادل گالیک اسید بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک ماده بیان می‌شود. غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو ۰/۲ نرمال مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماورابنفش در ۷٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمایشات در سه تکرار انجام و میانگین نتایج به‌عنوان محتوای فنولی کل عصاره به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد (Ordone et al., 2008).

- **اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کل**

سنجش میزان فلاونوئید کل هر عصاره از طریق روش‌های رنگ‌سنجی ارزیابی شد (Chang et al., 2002). غلظت یک میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد به آن افزوده شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از پتاسیم استات یک 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. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ٤۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-ماوراءبنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ها با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج بر حسب میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایشات در سه تکرار انجام و میانگین آن ها گزارش گردید (Ranjba et al., 2015).

- **قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)**

توانایی مهار رادیکال آزاد به روش شیمادا و همکاران انجام شد (Shimada et al., 1992). برای این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از (۱۰۰، ۲۰۰ ، ۳۰۰ ، ٤۰۰ و۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره تهیه شد. به ۱ میلی لیتر از هر نمونه عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH (دی فنیل- پیکریل- هیدرازیل) اضافه شد و مخلوط حاصل را بخوبی تکان داده و به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با DPPH در مقابل بلانک قرائت شد. با توجه به مکانیسم ذکر شده هر چه قدرت آنتی‌اکسیدان نمونه بیشتر باشد رنگ محلول حاصل زردتر است (Kulisic et al., 2004). درصد مهار رادیکال‌های آزاد یا احیای DPPH توسط ترکیب آنتی اکسیدان از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\% \text{ IP} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

که در آن $\% \text{ IP}$: درصد مهار رادیکال‌های آزاد (درصد بازداری آنتی‌اکسیدان در برابر رادیکال‌های آزاد)، A_C : جذب کنترل و A_S: جذب نمونه می‌باشد. در این تست از هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار شده (BHT) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و نمونه‌ها در سه تکرار انجام و میانگین آنها گزارش شد. سپس IC_{50} عصاره های اتانولی و استونی محاسبه گردید. بدیهی است که هر چه این عدد کوچکتر باشد قدرت آنتی اکسیدانی یا مهار رادیکال های آزاد، بیشتر است (Zarshenas et al., 2016).

- **تعیین قدرت احیاکنندگی**

میزان قدرت احیاکنندگی عصاره ها از طریق روش ین و چن ارزیابی شد (Yen and Chen, 1995). قدرت احیاکنندگی شاخصی جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه است. هر چه قدرت احیاکنندگی عصاره نمونه گیاهی بیشتر باشد، بیانگر فعالیت آنتی

اکسیدانی بالای آن است. غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار با pH= ٦/٦ 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 تری کلرو استیک اسید (۱۰٪) به نمونه‌ها افزوده شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ ۳۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلرید ($FeCl_3$) به آن اضافه شد و جذب بلافاصله در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش اسید آسکوربیک با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد. میزان جذب بالا نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی بالای عصاره می‌باشد (Yildirim et al., 2001).

۳. نتایج و بحث

- مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی

ترکیبات فنولی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت های ثانویه را تشکیل می‌دهند که در پاسخ به استرس‌های محیطی ایجاد می‌شوند. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به عنوان دهنده الکترون و یا هیدروژن عمل نمایند. با افزایش ترکیبات فنولی کل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود (Fukumoto et al., 2000). مقدار ترکیبات فنولی کل بر اساس روش فولین–سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد. این روش به‌طور مستقیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بررسی نمی‌کند بلکه همیشه مکمل روش‌های بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و در واقع تعیین‌کننده ترکیبات فنولی کل می‌باشد. معرف فولین–سیوکالتیو مخلوطی از فسفومولیبدات و فسفوتنگستیک اسید می‌باشد که بر مبنای رنگ سنجی عمل می‌کند و می‌تواند مقدار ترکیبات فنولی کل را اندازه‌گیری نماید (Lester et al., 2012).

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی حاصل از حلال‌های اتانولی و استونی در غلظت‌های مختلف در روش استخراج ماسراسیون ($p \leq 0.05$) در جدول ۱ آمده است. مطابق نتایج، اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین غلظت‌های خالص، ۵۰ درصد و ۷۵٪ حلال‌ها مشاهده شد و بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدی کل در غلظت ۵۰ درصد هر دو حلال به‌دست آمد (جدول ۱). هر دو حلال در حالت مخلوط با آب توانایی بیش‌تری را برای استخراج مواد مؤثره از اندام هوایی گیاه نسبت به حالت خالص داشتند که این امر نشان‌دهنده آن است که با افزایش میزان آب و قطبیت بیشتر، میزان استخراج ترکیبات فنولی کل افزایش می‌یابد. حلال‌های الکلی عموماً جهت استخراج فنول‌ها و فلاونوئیدها از منابع طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند و مخلوط‌های الکل–آب در مقایسه با حالت خالص حلال‌ها، میزان استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را چندین برابر افزایش می‌دهند (Sayyah et al., 2009). تحقیقات نشان داده است که حلال‌های آلی به صورت مخلوط با آب (٤۰–۸۰٪) توانایی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنولی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki et al., 2002). در پژوهش انجام گرفته بر روی گیاه mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz and Pavón) مشاهده شد که افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنولی در این شرایط میسّر می‌گردد (Chirinos et al., 2007).

جدول ۱. مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل موجود در عصاره‌های گل گاوزبان

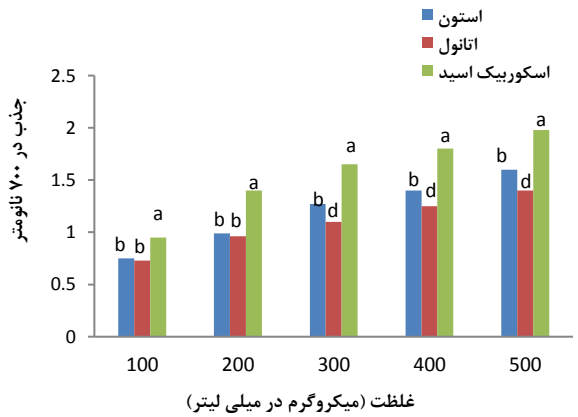
	غلظت اتانول			غلظت استون		
	خالص	۵۰٪	۷۵٪	خالص	۵۰٪	۷۵٪
ترکیبات فنولی کل	۱۹/۲۳ ± ۰/۲۷ d	۶۲/۳۱ ± ۲/۵۲ a	۵۲/۱۴ ± ۲/۷۷ b	۱۲/۴۱ ± ۰/۶۳ f	۳۸/۱۵ ± ۱/۶۴ c	۳۷/۹۶ ± ۱/۹۲ c
ترکیبات فلاونوئیدی کل	۲۴/۶۲ ± ۰/۳۵ d	۶۵/۷۲ ± ۱/۷۴ a	۵۸/۷۵ ± ۱/۲۳ b	۱۵/۵۳ ± ۱/۶۲ f	۳۶/۵۲ ± ۲/۲۳ c	۳۸/۴۸ ± ۲/۶۳ c

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

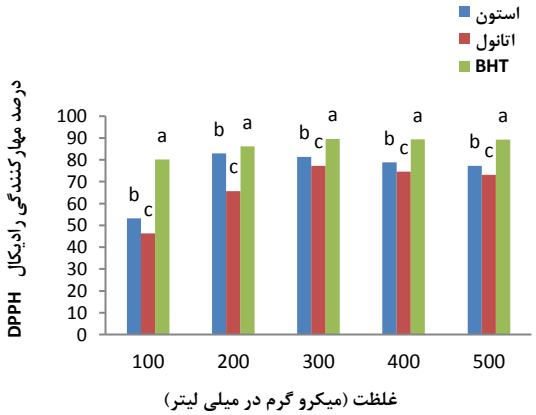
- **قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH**

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که دارای الکترون منفرد بر روی یکی از اتم های پل نیتروژنی می‌باشد و محلول متانولی آن دارای رنگ بنفش می‌باشد که جذب نوری خوبی را در ۵۱۷ نانومتر نشان می‌دهد. مهار رادیکال آزاد DPPH پایه و اساس ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است و به دلیل سهولت و سرعت این آزمون، معمولاً این روش برای بررسی مقدار آنتی‌اکسیدان موجود در ترکیبات گیاهی و یا برای دانه های روغنی استفاده می‌شود (Chen et al., 2013). اساس این روش بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل، باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف سنجی قابل اندازه‌گیری می‌باشد (Prevec et al., 2013). به عبارت دیگر رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهداکننده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و در نتیجه آن، DPPH به DPPH2 تبدیل می‌شود. در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود. بنابراین شدت جذب در ۵۱۷ نانومتر کاهش می‌یابد و از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن پی برد. معمولاً نتایج آزمون DPPH بر پایه IC_{50} بیان می‌شود (Mishra et al., 2012). آزمون DPPH به منظور بررسی فعالیت ضد رادیکالی عصاره فنولی گیاه انجام شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت عصاره ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHT) اثر معنی‌داری روی مهار رادیکال آزاد DPPH دارند ($p \leq 0.05$) به‌طوریکه با افزایش غلظت میزان فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد (شکل ۱). بیشترین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH برای عصاره‌های استونی و اتانولی به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر ۸۲/۹ و ۷۷/۳ درصد به‌دست آمد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی به غلظت میزان بالای فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود بستگی دارد و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال پروتون دهی به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن توانایی مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد. بر اساس محاسبات انجام گرفته، میزان IC_{50} (غلظتی از عصاره که می‌تواند ۵۰ درصد رادیکال های آزاد DPPH را مهار کند) برای عصاره‌های اتانولی و استونی گیاه مورد نظر به ترتیب برابر با ۰/۶۸۹ و ۰/۵۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج بدست آمده با نتایج پژوهش‌های دیگر محققان همخوانی و مطابقت دارد (Pilerood et al., 2014). در پژوهش انجام گرفته بر روی عصاره میوه ولیک نتایج آنالیز واریانس درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره میوه ولیک (Hawthorn (Crataegus Elbursensis و نیز آنتی اکسیدان سنتزی BHT نشان داد که نوع و غلظت نمونه‌ها اثر معنی‌داری بر مهار رادیکال آزاد DPPH دارند. فعالیت ضدرادیکالی در عصاره و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی وابسته به غلظت بود به‌طوری که با افزایش غلظت، عصاره میوه فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT نشان داد و از این نظر قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی ولیک نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT را می‌توان با افزایش مواد فنولی و فلاونوئیدی (ترکیبات فعال شناخته شده با خاصیت آنتی

اکسیدانی) مرتبط دانست (Salmanian et al., 2014). در تحقیقی دیگر بر روی دو گونه بلوط کوئرکوس کریس و کوئرکوس روبور میزان مهار رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های گوناگون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره متانولی از ۱۰۰–۱۲/۵ میکروگرم در لیتر، درصد مهار رادیکال‌های آزاد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت که علت این امر را می‌توان به افزایش غلظت ترکیبات فنولی و به‌دنبال آن افزایش قدرت مهارکنندگی عصاره نسبت داد (Rakic et al., 2007). در بررسی انجام گرفته بر روی گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum* Trautv.) نتایج بدست آمده نشان داد که فعالیت مهار–کنندگی عصاره متانولی بالاتر از عصاره اتانولی زولنگ بود. فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های زولنگ در غلظت‌های بالا قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود (Salmanian et al., 2013). نتایج پژوهش حاضر با نتایج دیگر محققان همخوانی داشت. این محققان گزارش کردند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت یافت (Sun et al., 2011; Mok et al., 2012).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در نمونه‌ها



شکل۲. مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی در نمونه‌ها

- قدرت احیاکنندگی

در آزمایش قدرت احیاکنندگی، توانایی عصاره‌ها برای احیاء آهن سه ظرفیتی (فریک) به آهن دو ظرفیتی (فرو) مورد سنجش قرار می گیرد. در این روش اندازه‌گیری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بر اساس جذب نوری صورت می‌گیرد و افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش بیانگر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش ترکیبات آنتی‌اکسیدان با پتاسیم فری–سیانید، تری کلرو استیک اسید و فریک کلرید ترکیب شده و کمپلکس آبی رنگی ایجاد می‌نمایند که در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. در روش قدرت احیاکنندگی جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با قدرت احیاکنندگی دارند، یعنی جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر خواهد بود (Jayaprakash et al., 2001). فعالیت احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی و استونی با غلظت ۵۰ درصد و استاندارد آسکوربیک اسید در شکل ۲ نشان داده شده است. افزایش در جذب مخلوط واکنش قدرت احیا–کنندگی نمونه‌ها را نشان می‌دهد. قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها با افزایش میزان غلظت عصاره، افزایش یافته و همه مقادیر فعالیت بالایی را نشان دادند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تأثیر نوع حلال و غلظت روی قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها معنی‌دار است ($p \leq 0.05$) و استاندارد اسکوربیک اسید دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی است. ویژگی احیاکنندگی به توانایی الکترون‌دهی ترکیبات بستگی دارد. به عبارتی با افزایش میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره، قدرت

احیاکنندگی آن‌ها افزایش می‌یابد. اختلاف مشاهده شده بین عصاره‌ها از نظر قدرت احیاکنندگی را می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات فنولی استخراج شده توسط حلال نسبت داد (Chaouche et al., 2014). علاوه بر این ترکیباتی نظیر اسکوربیک اسید، آمینو اسیدها و قندها که دهنده الکترون هستند سبب احیا درصد بیشتری از یونهای آهن سه ظرفیتی با جذب الکترون می‌شوند و بنابراین شدت جذب محلول افزایش می‌یابد. نتایج حاصل با نتایج سایر محققان مشابهت و همخوانی دارد (Valizadeh et al., 2015). در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی درختان اکالیپتوس کاملدولنسیس و کاج جنگلی نتایج نشان داد، میزان جذب نمونه اکالیپتوس در غلظت‌های بالای ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از نمونه استاندارد (ویتامین C) و گونه کاج بود و دو گونه مورد مطالعه همانند نمونه استاندارد در مقادیر غلظت بالا، بیشترین میزان جذب (قدرت احیاکنندگی) را داشتند (Nazari et al., 2013). در پژوهشی دیگر برای ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی بومادران، درمنه و بابونه از روش قدرت احیاکنندگی استفاده شد. نتایج نشان داد که قدرت احیاکنندگی از بیشترین به کمترین مقدار به‌ترتیب مربوط به درمنه، بابونه و بومادران بود. محدوده فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها از ۵۰۷ تا ۹۱۵ میکرومول آهن فرو (Fe^{2+}) در میلی‌گرم عصاره بود که این فعالیت با افزایش غلظت عصاره رابطه مستقیم داشت (Mirzaei et al., 2010). در مطالعه انجام گرفته بر روی گیاه زولنگ (*Eryngium caucasicum* Trautv.) نتایج نشان داد که عصاره‌ها از نظر قدرت احیاکنندگی اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با یکدیگر و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT داشتند. همچنین با افزایش غلظت، میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و در تمامی غلظت‌های مورد بررسی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی بود (Salmanian et al., 2013). در بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره متانولی E.caucasicum در مرحله گل‌دهی، آزمایشات نشان داد که با افزایش غلظت، میزان فعالیت احیا-کنندگی عصاره نیز افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیقات با پژوهش حاضر مطابقت دارد (Ebrahimzadeh et al., 2009).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان داد گیاه گل گاوزبان منبعی غنی از ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا است. عصاره‌های اتانولی و استونی با غلظت ۵۰ درصد به‌دست آمده از این گیاه با بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص دادند. نظر به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامت انسان، مطالعه و پژوهش بیشتر در زمینه کاربرد این عصاره در صنایع غذایی جهت جلوگیری از فساد اکسیداتیو اسیدهای چرب و شرکت‌های دارویی به‌منظور پیشگیری از بیماری‌های ناشی از اکسیداتیو محیط بیولوژیکی پیشنهاد می‌گردد.

۵. منابع

Abed, A., Vaseghi, G., Jafari, E., Fattahian, E., Babhadiashar, N. and Abed, M. 2014. Echium Amoenum Fisch et mey: A review on its pharmacological and medicinal properties. *Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches*, 4(4): 21-3.

Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*, 105:57-64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.056

Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. and Duran, A. 2013. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 290-296. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.018

Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 1233-40. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.034

Bahadori, M.B., Asghari, B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C. and Mohammadi, M. 2017. *Salvia nemorosa* L.: a novel source of bioactive agents with functional connections. *LWT- Food Science and Technology*, 75: 42-50.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis*, 10: 178-182. DOI: https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Ksouri, R. and Atik-Bekkara, F. 2014. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77: 302–307. DOI: 10.1016/j.jcma.2014.01.009

Chen, Z., Bertin, R. and Froldi, G. 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138: 414-420. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz and Pavon). *Separation and Purification Technology*, 55: 217-225. DOI: https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005

Delorme, P., Jay, M. and Ferry, S. 1977. Phytochemical inventory of indigenous Boraginaceae: study of alkaloids and polyphenolic compounds (anthocyanic and flavonic compounds). *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 11(1): 5-11.

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F. and Nabavi, S.M. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. *Pharmacognocy Research*, 1(6): 435-439.

Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Agricultural Food Chemistry*, 48(8): 3597-604. DOI: https://doi.org/10.1021/jf000220w

Jayaprakash, G.K., Singh, R.P. and Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (Vitis vinifera) extracts on peroxidation models invitro. *Agricultural Food Chemistry*, 73(3): 285-290. DOI: https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00298-3

Heidari, M.R., Mandegary, A., Hosseini, A. and Vahedian, M. 2006. Anticonvulsant effect of methanolic extract of *Echium amoenum* Fisch and C.A. Mey. against seizure induced by picrotoxin in mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 772-776. DOI: 10.3923/pjbs.2006.772.776

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milosa, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 85: 633-640. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024

Lester, G., Lewers, K., Medina, M.B. and Saftner, R.A. 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Food Composition and Analysis*, 27: 102-107. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.003

Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H. and Sharifi, B. 2010. The antioxidant activities and total phenolic of artemisia martima, Achillea Millefolium and Matricaria Recutica. *Armaghane-danesh*, 15(3): 243-252.

Mishra, K., Ojha, H. and Kumar Chaudhury, N. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130: 1036-1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127

Mok, S.Y., Choi, M.J., Kim, J., Cho, E.J. and Lee, S. 2012. Antioxidant activity of the methanolic extract of the newly generated vegetable, baemuchae (xBrassicoraphanus). *Food and Chemical Toxicology*, 50: 848-853. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.006

Naseri, N., Kalantar, K. and Amirghofran, Z. 2018. Anti-inflammatory activity of Echium amoenum extract on macrophages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(1): 73-81. DOI: 10.4103/1735-5362.220970

Nazari, S., Nazarnezhad, N.J. and Ebrahimzadeh, M.A. 2013. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of Eucalyptus camaldulensis and Pinus sylvestris bark. *Iranian Journal of Wood and Paper Science Research*, 28(3): 522-533.

Noguchi, N. and Niki, E. 2000. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10): 1538-1546. DOI: https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00256-2

Ordone, A.A.L., Gomez, J.D. and Vattuone, M.A. 2008. Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) swartz extracts. *Food Chemistry*, 97: 452-458. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.024

Pilerood, S.A. and Prakash, J. 2014. Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). *Food Science and Technology*, 51: 845-854. DOI: 10.1007/s13197-011-0573-z

Pokorny, J. 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 629-642. DOI: https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064

Prevec, T., Šegatin, N., PoklarUlrih, N. and Cigig, B. 2013. DPPH assay of vegetable oils & model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109: 13-19. DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.046

Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V. and Povrenovic, D. 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compouds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104: 830-834. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.025

Ranjbar, A., Khorami, S., Safarabadi, M., Shahmoradi, A., Malekirad, A.A. and Vakilian, K. 2006. Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & CA Mey flower decoction in humans: a cross-sectional before/after clinical trial. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3: 469-473. DOI: https:// doi.org/10.1093/ecam/nel031

Salmanian, S.H., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M. and Ghorbani, M. 2014. Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of Hawthorn (*Crataegus Elbursensis*) fruit acetonic extract. *Rafsanjan University of Medical Sciences*, 13(1): 53-66.

Salmanian, S., Sadeghi Mahoonak A., Jamson, M. and Tabatabaee Amid, B. 2013. Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of *Eryngium caucasicum* Trautv. ethanolic and methanolic extracts. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2(2): 193-204.

Sayyah, M., Boostani, H., Pakseresht, S. and Malaieri, A. 2009. Efficacy of aqueous extract of Echium amoenum in treatment of obsessive–compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33: 1513-1516. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.021

Sayyah, M., Sayyah, M. and Kamalinejad, M. 2006. A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of Echium amoenum in the treatment of mild to moderate major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30: 166-169. DOI: https://doi.org/10. 1016/j.pnpbp.2005.10.005

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthin on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948. DOI: https://doi.org/10.1021/jf00018a005

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178. DOI: https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L. and Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2689-2696. DOI: 10. 1016/j.fct.2011.07.042

Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y. and Tsuji, K. 2002. An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 49: 507-511. DOI: https://doi.org/10.1051/ocl/2020022

Valizadeh, H., Sonboli, A., Kordi, F.M., Dehghan, H. and Bahadori, M.B. 2015. Cytotoxicity, antioxidant activity and phenolic content of eight fern species from North of Iran. *Pharmaceutical Sciences*, 21: 18-24. DOI: 10.15171/PS.2015.12

Yen, G.C. and Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *agricultural and food chemistry*, 43(1): 27-32. DOI: https://doi.org/10.1021/jf00049a007

Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4083-4089. DOI: https://doi.org/10.1021/jf0103572

Young, I.S. and Woodside , J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Clinical Pathology*, 54(3): 176-186. DOI: 10.1136/jcp.54.3.176

Zarshenas, M., Dabaghian, F. and Moein, M. 2016. An overview on phytochemical and pharmacological aspects of *Echium amoenum*. *The Natural Products*, 6: 285-291. DOI: 10.2174/2210315506666160218232531

Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Che, X., Wang, F. and Liu, F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118: 656-662. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.038