استخراج و اندازه‌گیری بتاکاربولین‌ها و بررسی خاصیت‌های آنتی اکسیدانی عصاره برگ و دانه گیاه اسپند (P.harmala) زاهدان

فهیمی سعیده[۱]، عریان شهربانو[۲]، احمدی رامش*[۳]، عیدی اکرم[۴]

چکیده

«بتاکاربولین‌ها» نوعی آلکالوئید دارای ایندول هستند که به راحتی از سد خونی مغزی عبور کرده و غلظت نوروترانسمیترها را تغییر می‌دهند. همچنین طیفی از آثار نوروفیزیولوژیکی و سمی، از جمله اثر بر دمای بدن، تشنج، فعالیت‌های ضد افسردگی، اتساع عروقی، آثار ضد تجمعی پلاکت‌ها و اثر بر اشتها را اعمال می‌کنند. هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری بتاکاربولین‌ها و نیز ترکیبات فنولی اسپند جمع‌آوری شده از زاهدان می‌باشد. بدین منظور در فصل بهار، این گیاه از اطراف زاهدان جمع‌آوری و عصاره متانولی برگ و دانه به روش سوکسله استخراج شد و در ادامه، آنالیزهای فیتوشیمیایی مختلف بر روی عصاره‌ها صورت گرفت. این آنالیزهای کمی و کیفی، موارد ذیل را شامل می‌شوند:

شناسایی آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتراکینون‌ها، تست آنتی اکسیدانی عصاره، آنالیز FT-IR عصاره، آنالیز کمی و کیفی HPLCای عصاره و آلکالوئیدها. نتایج نشان می‌دهد که اگرچه خاصیت‌های آنتی اکسیدانی عصاره متانولی برگ (به علت حضور مقادیر بیش‌تر ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها) نسبت به عصاره متانولی دانه بالاتر است؛ میزان بتاکاربولین‌ها در عصاره دانه این گیاه (p.harmala) بیش‌تر است.

واژگان کلیدی: اسپند (p.harmala)، بتاکاربولین‌ها، ترکیبات فنولی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

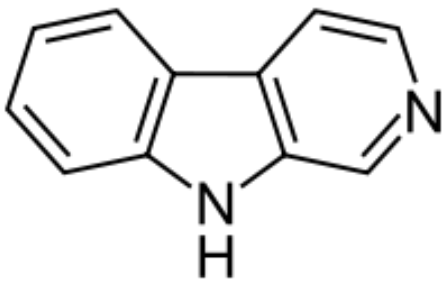
۳. * گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

نویسنده مسئول: ramahmd@yahoo.com ، همراه: ۰۹۱۲۲۰۲٤٦۱۹

۴. گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مقدمه

گیاه «اسپند» در مناطق نیمه خشک، از جمله در ایران، مناطق استپی و خاک‌های شنی می‌روید(۱). منشاء اسپند آسیای مرکزی است؛ اما امروزه این گیاه در استرالیا، شمال آفریقا و جنوب غرب آمریکا نیز رشد می‌کند(۲). این گیاه بوته‌ای دارای برگ‌های سبز با تقسیمات باریک و نامنظم است. گل‌های درشتی دارد و کاسبرگ‌ها نازک و گلبرگ‌های آن بزرگ هستند. میوه این گیاه، پوشینه و حاوی دانه‌های فراوان سیاه رنگ است. کاربردهای فراوانی از این گیاه گزارش شده است؛ از جمله این‌که دارای فعالیت‌های روانگردان است (۳). اثر ضدباکتریایی بر روی استافیلوکوکوس مقاوم و حساس به متی سیلین (٤)، درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو (٥)، فعالیت مهارکننده و کشنده بر روی مخمرهای کاندیدا (٦). همچنین دارای آثار ضد دیابتی (۷)، آثار ضد سرطانی (۸) و طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سیتوتوکسیتی در برابر خطوط سلولی سرطان ریوی در انسان‌ها (۹-۱۱). مطالعات کینتیکی نیز نوعی مهار رقابتی و برگشت‌پذیر در عصاره دانه را نشان می‌دهند که شش برابر از ریشه قوی‌تر است. این نتایج نشان می‌دهند که آثار سمی و دارویی عصاره‌های اسپند ناشی از حضور β –کاربولن‌ها وآثار مهاری مشهود آن‌ها بر روی MAO-A می‌باشد. در واقع، β –کاربولی‌ن‌ها با مهار MAO-A سطوح سروتونین مغز و سایر نوروترانسمیترها را افزایش می‌دهند و این، بدان معناست که عصاره دانه و ریشه این گیاه خاصیت ضد افسردگی دارد(۱۱). آلکالوئیدهای بتاکاربولینی (شکل۱)؛ از جمله هارمین، هارمالین از ترکیبات بارز این گیاه هستند و در بخش‌های مختلف گیاه به ویژه دانه و ریشه حضور دارند (۱۲ـ۱۳). هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه گیری ترکیبات بتاکاربولینی برگ و دانه اسپند جمع‌آوری شده از اطراف شهرستان زاهدان می‌باشد. با توجه به این‌که بسته به محل رویش این گیاه، درصد ترکیبات مؤثر آن تغییر می‌کند؛ همچنین با توجه به آثار فراوانی که گیاه مذکور بر درمان بیماری مختلف داشته است؛ بررسی میزان این ترکیبات در این گیاه اهمیت بالایی دارد.



شکل۱. فرمول ساختار شیمیایی بتاکاربولین

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های مورد آزمایش

جمع‌آوری گیاه اسپند

گیاه اسپند از مراتع اطراف شهر زاهدان(۵ کیلومتری زاهدان) در فصل بهار به میزان لازم جمع‌آوری و به تهران منتقل شد. گیاه به طور کامل در دمای محیط خشک و سپس برگ و دانه آن به طور جداگانه از شاخه‌ها جدا گردید. بعد از آن به منظور عصاره گیری به مرکز تحقیقاتی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج ارسال شد. از سوی دیگر، ماده شیمیایی هارمین که ماده مؤثر موجود در برگ و دانه اسپند است؛ به صورت لئوفیلیزه از شرکت سیگما الدریچ از آمریکا تهیه گردید.

عصاره گیری

روش تهیه عصاره متانولی دانه و برگ اسپند به روش سوکسله

در این روش، ابتدا نمونه گیاهی با استفاده از خردکن، خرد و سپس ۱۰۰ گرم از گیاه در درون انگشتانه ریخته و در قسمت میانی سوکسله قرار داده شد. ۵۰۰میلی‌لیتر متانول در درون بالن ریخته و تمام قطعات سوکسله به هم متصل گردید. سپس مدت ٤ ساعت عصاره‌گیری طی ۲۰ بار سیفون‌شدن ادامه یافت و در انتها حلال با تبخیر در خلأ از عصاره جدا و در یخچال نگهداری شد و پس از آن، به منظور انجام آنالیزهای فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج آلکالوئیدها

استخراج آلکالوئیدهای دانه و برگ اسپند

برای این کار، به ۱ گرم از پودر گیاهی خشک ،mL ۵ کربنات سدیم ۵% اضافه شده و ٢٤ ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه قرار داده شد. سپسmL ۱۰ اتانول ۸۵% به آن اضافه گردید و در حمام آب گرم c° ٦٠ قرار گرفت. در ادامه، محلول رویی را صاف کرده و به باقی‌مانده mL ۱۰ اتانول ۸۵% اضافه شد و مجددا min ۱۵ در حمام آب گرم c° ٦٠ قرار گرفت. عمل استخراج ۳ بار تکرار شد و سرانجام محلول‌ها با هم مخلوط شدند. با انجام سانتریفوژ به مدت۱۰ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه، رسوبات از محلول الکلی جدا شده و سپس محلول الکلی در بشر ریخته شد و در دمایc° ۵۰ تبخیر گردید. با استفاده ازmL ۱۰ اسید سولفوریک ۵% وmL ۱۰ دی اتیل اتر، دیواره ظرف شست‌وشو شد. عصاره حاصل از فاز اسیدی زیرین جدا می‌گردد. برای این کار، فاز اسیدی به کمک سود ۱۰ مولار به pH ۱۰رسانده شد. هم حجم محلول قلیایی کلرفرم اضافه کرده و فاز کلرفرمی زیرین جمع‌آوری

گردید. این عمل سه بار تکرار و مجموع فاز کلرفرمی زیرین جدا شد. برای اطمینان، یک بار دیگر، هم حجم مجموع فاز کلرفرمی زیرین، کلرفرم اضافه و فاز کلرفرمی زیرین جدا شد. سپس فاز کلرفرمی‌های جمع‌آوری شده در دمای پایین، تبخیر شدند. در نهایت با استفاده از mL ۵ متانول خالص دیواره ظرف شست‌وشو و آلکالوئیدهای استخراج شده، برای آنالیز کمی و کیفی توسط دستگاه HPLC آماده شدند.

غربال‌گری متابولیت‌های ثانویه

متابولیت‌های ثانویه، شامل آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتراکینون‌ها می‌باشند که هر کدام روش‌های شناسایی مربوط به خود را دارد. به منظور شناسایی این متابولیت‌ها، روش‌های آزمایشگاهی ذیل صورت گرفته است.

الف) شناسایی آلکالوئیدها

در یک بشر کوچک به ۰/۵ گرم عصاره متانولی خشک mL ۱۵ کلریدریک اسید ۲ مولار اضافه و سپس در داخل بن ماری به مدت ۵ دقیقه توسط همزن همزده و با فیلتر کاغذی صاف شد. محلول شفاف زیر صافی که حجمی در حدود mL ۱۵-۱۰ دارد، در سه لوله آزمایش تقسیم؛ به لوله اول چند قطره معرف مایر اضافه شد که در صورت مثبت‌بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه، رسوب سفید مایل به زرد ایجاد می‌کند.

به لوله دوم چند قطره معرف واگنر اضافه شد که در صورت مثبت‌بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه رسوب قرمز-قهوه‌ای سوخته ایجاد می‌شود. به لوله سوم آن‌قدر آمونیاک اضافه شد تا محیط به طور کامل بازی شود (کاغذ تورنسل آبی شود). سپس مخلوط مذکور با ۳ بار (هر بار mL ۱۰ کلروفرم) استخراج و فاز کلروفرمی روی هم اضافه و توسط تبخیر کننده دوار خشک شد. به باقی‌مانده حدود mL ۳ کلریدریک اسید ۲ نرمال افزوده و روی بن‌ماری خشک و محتوی به ۲ لوله آزمایش دیگر منتقل شد. به لوله اول چند قطره معرف مایر اضافه گردید که در صورت مثبت‌بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه ایجاد رسوب سفید مایل به زرد می‌کند. به لوله دوم نیز چند قطره معرف واگنر اضافه گردید که در صورت مثبت‌بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه، رسوب قرمز ـ قهوه‌ای سوخته ایجاد می‌کند.

ب) شناسایی آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها

روش استفاده شده برای شناسایی این متابولیت‌ها به "آزمون شینودا" معروف است. در این روش، حدود یک گرم از عصاره متانولی خشک، ابتدا ۳ بار توسط mL ٤ اتر دوپترول شست‌وشو داده شد تا رنگ و چربی عصاره گرفته شود. به عصاره mL ۲ مخلوط (۵۰:۵۰) آب متانول اضافه شد. در مرحله بعد، افزودن mL ۲ HCl غلیظ و ظهور

رنگ قرمز، گویای حضور آنتوسیانین است. با افـزودن مقـدار کمـی پـودر Mg و ایزوبوتـانول، محلـول دو فـازی می‌شود. اگر فاز رویی قرمز شود، نشانهٔ حضور فلاونوئید و اگر فاز زیرین قرمز باشد، علامـت حضـور آنتوسـیانین است، قرمزبودن هر دو فاز، دلیل بر این است که گیاه هم آنتوسیانین را داراست و هم فلاونوئیـد را. بـرای اطمینـان می‌توان از عصاره متانولی با حلال ٤ تایی کروماتوگرافی لایه نازک انجام داد. بعد از جداسازی، معرف آنیزآلدهیـد را روی کاغذ TLC اسپری کرد. ظهور رنگ زرد بر روی برخی لکه‌ها نشان‌دهنده وجود فلاونوئیدهاست.

ج) شناسایی تانن‌ها

برای اجرای این کار، ابتدا مقدار mL ۱۵ از آب مقطر در لوله آزمایش جوشید و حدود ۰/۵ گرم از عصاره در ایـن آب مقطر حل شد. بعد از رسیدن دمای آب مقطر به دمای آزمایشگاه، ۲ تا ٤ قطره محلول کلرید سـدیم ۱۰% بـه منظور رسوب‌دادن ترکیبات غیرتاننی اضافه شد. سپس عصاره حاصل صاف و در ٤ لوله آزمایش تقسیم شد. در گام بعدی به لوله اول، ٤ تا ٥ قطره محلول ژلاتـین افـزوده شـد. بـه لولـه دوم ٤ تـا ٥ قطـره محلـول ژلاتـین نمـک‌دار (اضافه‌شدن ۱% ژلاتین به نمک ۱۰%) و به لوله سوم ٤ تا ٥ قطره محلـول کلـرور فریـک ۰/۵ % اضـافه گردیـد. تانن‌ها با محلول ژلاتین رسوب تولید کردند و با محلول کلرورفریک ایجاد رنگ سبز یا آبی.

د) شناسایی آنتراکینون‌ها

روشی که برای غربالگری آنتراکینون‌ها مورد استفاده قرار گرفته، به روش "بورن ـ تراگر" معروف است. در این روش، حدود ۰/۵ گرم یا کم‌تر از عصاره در mL ۱۰ از هگزان حل و داخل یک لوله آزمایش جدا و سپس mL ٤ آمونیاک غلیظ با پیپت پاستور به زیر فاز هگزانی وارد شد. با نارنجی‌شدن فاز آبی، وجود آنتراکینون تأیید گردید.

تست آنتی اکسیدانی عصاره

DPPH[۱] با فرمول شیمیایی $C_{۱۸}H_{۱۲}N_۵O_۶$ ، نوعی ترکیب شیمیایی است. ترکیبـی اسـت بـنفش رنـگ کـه بـه دلیـل حضور گروه‌های فنیل در ساختار آن، به راحتی به صورت رادیکال درآمده و در واقـع منبـع رادیکـال آزاد می‌باشـد. زمانی که رادیکال در معرض یک احیاگر قرار می‌گیرد، جذب آن، متناسـب بـا تعـداد الکترون‌هـایی کـه می‌گیـرد؛ کاهش می‌یابد. بنابراین، کاهش جذب آن را به عنوان معیاری از خاصیت ضد اکسایشی (آنتی اکسـیدانی) عصـاره در نظر می‌گیرند. حل شدن این رادیکال در متانول رنگ ارغوانی تیره ایجاد می‌کنـد کـه تحـت تـأثیر حضـور ضـد اکساینده‌ها (آنتی اکسیدان‌ها)، رنگ زدایی در محلول DPPH صورت می‌گیرد و در نتیجه رنگ آن از ارغوانی تیره،

۱. diphenyl-۱-picrylhydrazyl

به زرد روشن تغییر و میزان جذب کاهش می‌یابد. هرچه ترکیبات ضد اکسایندە از قدرت بیش‌تری برای احیای DPPH برخوردار باشند؛ میزان جذب کم‌تر خواهد بود. بنابراین، از رادیکال مصنوعی DPPH به عنوان یک گزینه مناسب برای بررسی فعالیت ضداکسایشی ضداکسایندەهای طبیعی استفاده می‌شود.

روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

ابتدا ۲۵ میلی گرم (ترازوی آنالیتیکال) از نمونه عصاره متانولی، در بالن حجمی ۲۵ میلی لیتری با متانول به حجم رسانده شد (غلظت محلول استوک، در این مرحله ۱ میلی گرم / میلی لیتر است). سپس ۸ mL از محلول استوک در بالن ۱۰ mL میلی لیتری با متانول به حجم رسید (غلظت محلول در این مرحله ۰/۸ میلی گرم / میلی لیتر است) و در مرحله بعد ۵ mL از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم رسید (غلظت محلول در این مرحله ۰/۵ میلی گرم / میلی لیتر است). در این مرحله ۲/۵ mL از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۲۵ میلی گرم / میلی لیتر است). رقیق‌سازی همچنان ادامه می‌یابد؛ به طوری که ۱ mL از محلول استوک، در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۱ میلی گرم / میلی لیتر است). در مرحله بعد، ۱ mL از محلول ۰/۵ میلی گرم / میلی لیتر در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۵ میلی گرم / میلی لیتر است) و در گام، بعدی ۱ mL از محلول ۰/۰۵ میلی گرم / میلی لیتر در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۰۵ میلی گرم / میلی لیتر است). در پایان ۱ mL از محلول ۰/۰۰۵ میلی گرم / میلی لیتر در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم رسانیده می‌شود (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۰۰۵ میلی گرم / میلی لیتر است). اکنون می‌بایست محلول DPPH تهیه شود؛

تهیه محلول DPPH

به میزان ٦/٧ mg از DPPH در بالن ۵۰ میلی لیتری تیره با متانول به حجم می‌رسد. برای تست مقدماتی، ۱ mL از محلول ساخته شده را با ۱ mL متانول در لوله تیره رنگ مخلوط کرده و بعد از نیم ساعت در طول موج ۵۱۷ نانومتر در حضور شاهد متانول جذب خوانده می‌شود. اگر جذب در محدوده ۱/۷-۲/۰۸ باشد، مناسب است. در این مرحله در کنار ۷ بالن تیره، ۷ بالن روشن قرار می‌گیرد. ۱ mL از بالن روشن داخل بالن تیره ریخته شد و به هر کدام ۱ mL محلول DPPH اضافه گردید. یک لوله تیره شاهد، حاوی ۱ mL DPPH و ۱ mL متانول نیز تهیه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند.

بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد (با محلول بالن روشن جذب

دستگاه صفر شد و سپس جذب محلول تیره خوانده شد). جذب‌ها سه بار خوانده شد و میانگین و انحراف استاندارد طبق محاسبات زیر به دست آمد:

$$\text{درصد مهار} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد})}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

با رسم نمودار، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بر حسب غلظت برای نمونه‌ها و اعمال رگرسیون خطی و به کمک معادله خط حاصل از رگرسیون خطی، $IC_{۵۰}$ گزارش گردید.

آنالیز FT-IR عصاره

برای مقایسه کلی و کیفی گروه‌های عاملی موجود در عصاره متانولی برگ و دانه گیاه با دستگاه FTIR ۵۱۰-WQF، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه آنالیز شد و طیف‌های به دست آمده مقایسه و تفسیر گردید.

آنالیز HPLC

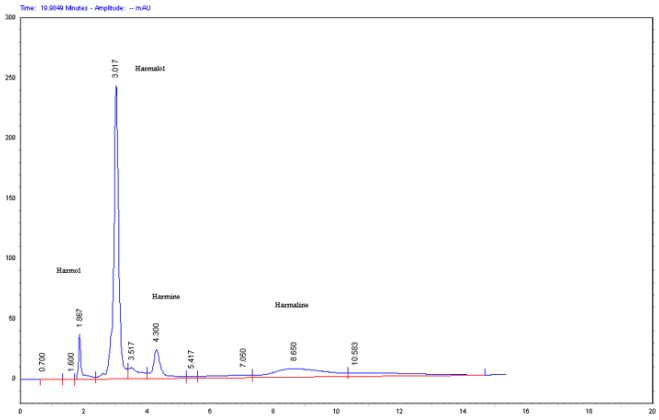
نمونه مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی KNAUER , HPLC با ستون $C_{۱۸}$ و فاز متحرک ایزوپروپیل الکل: استونیتریل: آب: فرمیک اسید (۳:۳۰۰:۱۰۰:۱۰۰) و سرعت جریان فاز متحرک ۱ mL/min و طول موج nm ۳۳۰ آنالیز شد و کروماتوگرام‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

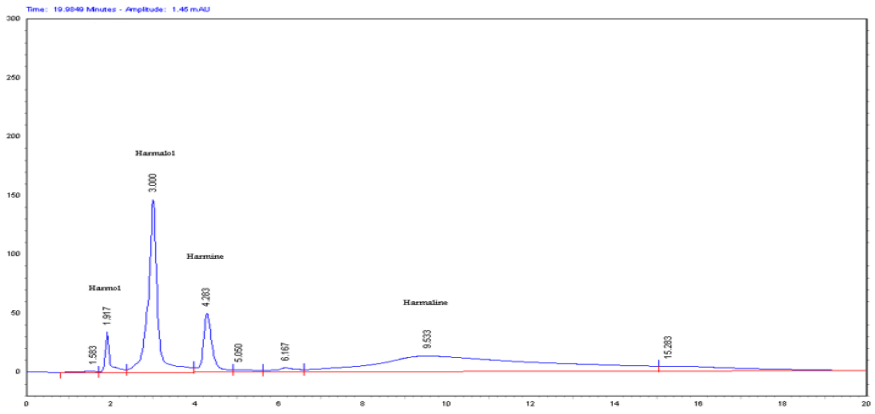
جدول ۱. ترکیبات زیست فعال عصاره‌های متانولی برگ و دانه اسپند زاهدان

ترکیبات زیست فعال عصاره:	درصد عصاره (%)	کل آلکالوئیدها					آنتی اکسیدانی		کل فنولی (mg GAE/mg extract) at ۲۰۰mg/mL	کل فلاونوئیدی (mg QE/mg extract)
		هارمین	هارمالین	هارمان	هارمول	هارمالول	$IC_{۵۰}$	%Scav		
دانه	/۷ ۲۹	/۹۳ ۲	۳٫۸	/۰۲۹ ۰	۰/۰	۱۲۰ /۰	/۱ ۱۲۲	/۹ ۶۸	۳۰/۴۶	۱۶/۶۳
برگ	۳۱/۷	۰/۰۵۵	۰/۰۵	۰/۰۱۱	---	۰/۰۲۶	۲۰۰	۳۴/۷	۳۲/۸۴	۲۵/۸۴

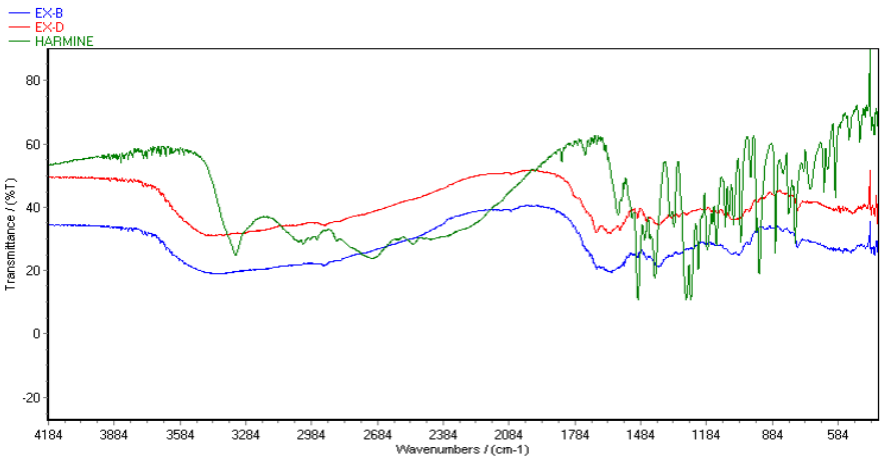
جدول۱- درصد آلکالوئیدها، فلاونوئید و ترکیبات فنلی عصاره برگ و دانه و همچنین توانایی آنها برای مهار رادیکال‌های آزاد در اینجا مقایسه شده است. Scav = scavenger، $IC_{۵۰}$ = نیمه حداکثر غلظت مهاری.



شکل شماره۲. نمودار ترکیبات بتاکاربولینی در عصاره متانولی برگHPLC

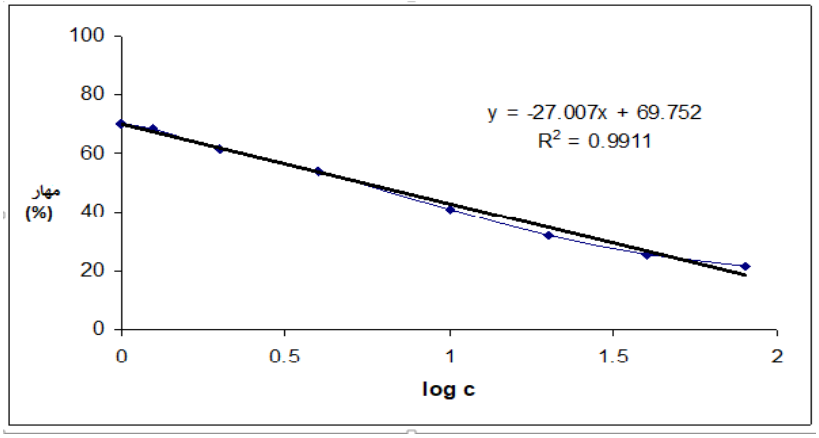


شکل شماره۳. نمودارHPLC ترکیبات بتاکاربولینی در عصاره متانولی دانه

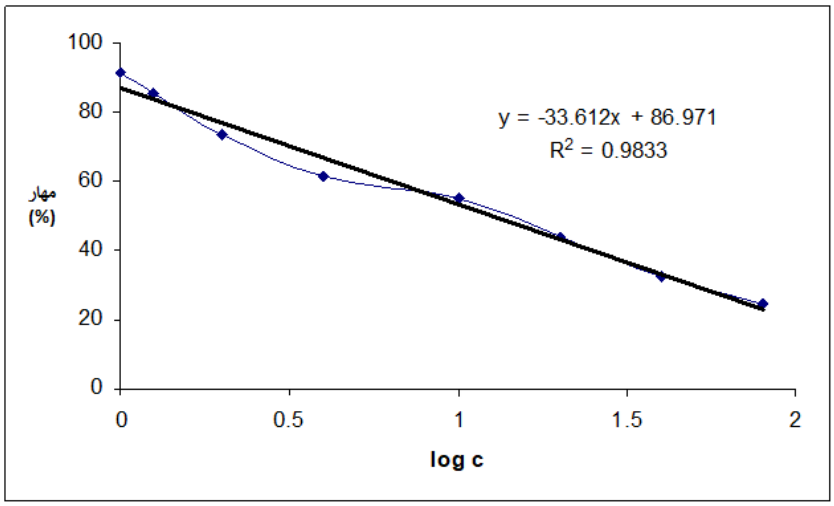


شکل شماره ٤. طیف FTIR عصاره برگ به رنگ آبی و عصاره دانه به رنگ قرمز

نتایج آنالیزهای آنتی اکسیدانی



شکل شماره۵. نمودار آنالیز آنتی اکسیدانی یا DPPH عصاره متانولی دانه



شکل شماره ٦. نمودار آنالیز آنتی اکسیدانی یا DPPH عصاره متانولی برگ

بحث

نتایج مطالعه Callaway و همکارانش (۲۰۰۵) نشان می‌دهد که β - کاربولین‌ها در تعدادی از گیاهان، از جمله اسپند از خانواده زیگوفیلاسه وجود دارند؛ به طوری که عصاره این گیاهان فعالیت‌های روانگردان را میانجیگری می‌کند و یا به طور بالقوه به وسیله این ترکیبات انجام می‌گیرد.(۳)

داراب‌پور و همکاران (۲۰۱۱)، با بررسی آثار آنتی باکتریال بخش‌های مختلف اسپند ایرانی، آن را به عنوان

منبعی از ترکیبات ضدباکتری برای درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو (MDR[1]) معرفی کرده‌اند(۵).

نتایج مطالعه فروزنده و همکارانش (۲۰۱٤) نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی گیاه اسپند دارای آثار ضدسرطانی است و به صورت وابسته به دوز و زمان می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند. این اثر مهاری، با دوز و زمان تیمار این عصاره رابطه مستقیمی دارد(۸).

نتایج بعضی مطالعات، حاکی از آن است که هارمین بر محیط‌های *in vitro* و *in vivo* آثار ضد توموری بالقوه‌ای دارد؛ به طور مثال: مهار قابل توجه تومور در موش‌های مبتلا به سرطان ریه Lewis، ۱۸۰sarcoma یا تومور Hep-A و طیف گسترده فعالیت‌های سیتوتوکسیتی در برابر خطوط سلولی سرطان ریوی در انسان‌ها را دارد (۹ـ۱۱).

نتایج مطالعه کرم سیچانی و همکارانش (۲۰۱۲) نشان مي‌دهد كه عصاره اتانولي اسپند از طريق افزايش معنادار آنزيم‌هاي آنتي اكسيدان و كاهش مالون دي آلدئيد، باعث از بين بردن راديكال‌هاي آزاد حاصل از نانو ذرات نقره مي شود. در واقع، با استفاده از عصاره اتانولي اسپند، مي‌توان يك نانو تركيب گياهي توليد كرد كه عوارض نانو ذرات نقره را كاهش می‌دهد(۱٤).

تجزیه و تحلیل داده‌ها در قسمت میزان مواد مؤثر موجود در عصاره‌ها، نشان می‌دهد که عصاره آبی - متانولی دانه ۲۹/۷% و برگ ۳۱/۷% می‌باشد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد و IC_{50} برای دانه (۲۰۰ mg/mL) ۶۸/۹ و ۱۲۲/۱ و برای برگ (۲۰۰ mg/mL) ۳٤/۷ و بیش‌تر از ۲۰۰ می‌باشد و ترکیبات کل فنولی برای دانه (mg GAE/mg) ۱٦/٦۳ و برای برگ (mg QE/mg)۲۵/۸۵ است. کل آلکالوئیدها برای دانه حدود ۷% که مقدار هارمین آن ۲/۹۳% و هارمالین آن ۳/۸%؛ و مقادیر هارمن و هارمول و هارمالول ناچیز (در حد ۰/۰۲%) می‌باشد و برای برگ کل آلکالوئیدها حدود ۰/۲ % که مقدار هارمین ۰/۰٦%، هارمالین ۰/۰۵% و مقادیر هارمن و هارمول و هارمالول هر کدام حدود ۰/۰۲% می‌باشد. همسو با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه Herraiz و همکارانش (۲۰۱۰) نشان می‌دهد که بتاکاربولین ها در دانه و ریشه تجمع می‌یابند؛ در حالی که مقادیر اندکی از آن‌ها در برگ و ساقه این گیاه وجود دارد و در گل‌ها اصلاً وجود ندارد. این غلظت‌های بتاکاربولین در دانه و ریشه بسیار بالا است؛ به طوری که غلظت هارمین و هارمالین بیش از ۱۰% w/w می‌باشد. پروفایل مولکولی آلکالوئیدها در گیاه بسیار متفاوت است؛ به طوری که هارمین (۲/۰ w/w%) و هارمول (۱/٤ w/w) به طور غالب در ریشه، و هارمین و هارمالین در دانه وجود دارند. به طرز جالب توجهی، هارمالین تقریباً به طور انحصاری در دانه؛ امّا هارمول به طور غالب در ریشه و در ساقه یافت می‌شود. هارمالول نیز در میوه‌ها و دانه‌ها وجود دارد.

۱. multi-drug resistant

مقادیر اندک تتراهیدروهارمین در دانه وجود دارد؛ اما نورهارمن (بتاکاربولین) و هارمن (۱- متیل- بتا کـاربولین) در دانه حضور ندارند. قابل ذکر است که مورد اخیر برخلاف بررسی حاضر است که نشان می‌دهد هارمن هر چند در مقادیر کم؛ در دانه نیز موجود می‌باشد(۱۲).

نتیجه‌گیری

در نتیجه آنچه گذشت، این‌که عصاره دانه (اسپند زاهدان) به علـت داشـتن مقـدار بیش‌تـر آلکالوئیـدها دارای اثـر تخدیری و روانگردانی بیش‌تری است و با توجه به مقادیر آنتی اکسیدانی، به علت پلـی فنل‌هـا و فلاوونوئیـدها بـر کاهش استرس و مهار رادیکال‌های آزاد دارای اثر نسبی است. در عصاره برگ (اسپند زاهدان) مقـادیر آلکالوئیـدها ناچیز است و به تبع آن، آثار تخدیری آن کم‌تر است و آثار آنتـی اکسـیدانی آن، بـه علـت حضـور مقـادیر بیش‌تـر ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها و نیز آثار آن در مهار رادیکال‌های آزاد، بیش‌تر می‌باشد.

منابع:

۱. Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari MH, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. Pharmacognosy reviews [Internet]. ۲۰۱۳;۷(۱۴):۱۹۹–۲۱۲. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/۲۴۳۴۷۹۲۸

۲. Bahmani M, Rafieian-kopaei M, Parsaei DP, Mohsenzadegan A. The anti-leech effect of Peganum harmala L. extract and some anti-parasite drugs on Limnatis Nilotica. Vol. ۶, African journal of microbiology research. ۲۰۱۲. ۲۵۸۶-۲۵۹۰ p.

۳. Callaway JC, Brito GS, Neves ES. Phytochemical analyses of Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis. Journal of psychoactive drugs. ۲۰۰۵;۳۷(۲):۱۴۵–۵۰.

۴. Alireza Safahani email ؛ Mehrdad Ataie؛ Mohammad Rabie۲؛ Tina Dadgar؛ Ezzatollah Ghaemi. comparison of antibacterial activity of some of the medical plants extracts of Golestan province against Staphylococcus aureus. journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). ۲۰۱۱;۱(۴):۴۱–۵۱.

۵. Darabpour E, Poshtkouhian Bavi A, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antibacterial activity of different parts of Peganum harmala L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. EXCLI Journal [Internet]. ۲۰۱۱ Nov ۲۵;۱۰:۲۵۲–۶۳. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC۵۶۱۱۶۲۰/

۶. K Diba, M Geramishoar, M Sharbatkhori LH. Antifungal activity of alcoholic extract of peganum harmala in vitro. Urmia Medical Journal. ۲۰۱۰;۲۰(۴):۲۷۱–۷.

۷. Hulya Ozdemir KDD. Investigation of anti-hyperglycemic effect of Peganum harmala seeds (Zygophyllaceae) on Streptozotocin diabetic rats. In Berlin, Germany: ۵th Annual European Pharma Congress July ۱۸-۲۰, ۲۰۱۶; ۲۰۱۶.

۸. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line TT. Shahrekord-University-of-Medical-Sciences [Internet]. ۲۰۱۴ Aug ۱;۱۶(۴):۱–۸.

Available from: http://journal.skums.ac.ir/article-۱-۱۵۵۰-fa.html

۹. Perez Martin JM, Labrador V, Fernandez Freire P, Molero ML, Hazen MJ. Ultrastructural changes induced in HeLa cells after phototoxic treatment with harmine. Journal of Applied Toxicology: An International Journal. ۲۰۰۴;۲۴(۳):۱۹۷–۲۰۱.

۱۰. Abe A, Yamada H. Harmol induces apoptosis by caspase-۸ activation independently on Fas/Fas ligand interaction in human lung carcinoma H۵۹۶ cells. Anti-cancer drugs. ۲۰۰۹;۲۰(۵):۳۷۳–۸۱.

۱۱. McKenna DJ. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. Pharmacology & therapeutics. ۲۰۰۴;۱۰۲(۲):۱۱۱–۲۹.

۱۲. Herraiz T, Gonzalez D, Ancin-Azpilicueta C, Aran VJ, Guillen H. beta-Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. ۲۰۱۰ Mar;۴۸(۳):۸۳۹–۴۵.

۱۳. Ishida J, Wang HK, Bastow KF, Hu CQ, Lee KH. Antitumor agents ۲۰۱. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. Bioorganic & medicinal chemistry letters. ۱۹۹۹ Dec;۹(۲۳):۳۳۱۹–۲۴.

۱۴. Karam Sichani Samira. Naghsh Nooshin RN. Effects of Alcoholic Extract of Peganumharmala L. on Malondialdehyde Concentration and Catalaseand Glutathione Peroxidase Activity in Mice Treated with Nanosilver Particles TT - [Internet]. Vol. ۲۲, J-Mazand-Univ-Med-Sci. ۲۰۱۲. p. ۱۰–۷. Available from: http://jmums.mazums.ac.ir/article-۱-۱۵۰۹-en.html