Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

Identification of volatile compounds and investigation of antioxidant, antimicrobial and anticancer effects of Tribulus longipetalus Viv.[1]

Aliakbar Imani | Master of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran **(Corresponding author).**
aliakbar.imani67@gmail.com
Amin Moridzadeh | Master of Chemistry, Kashan University, Kashan, Iran.

Abstract

Objectives: The objective of the present study was to identify volatile compounds and investigate the antioxidant, antimicrobial and anticancer effects of Tribulus longipetalus Viv.

Materials and methods: In this research, the Tribulus longipetalus Viv, which is an annual herbaceous plant, has many branches, lies on the ground, and has stems with soft hairs. The geographical spread of this plant is in the long sand dunes of Aran and Bidgol deserts. Biological properties, including free radical scavenging activity, total amount of phenolic compounds, antimicrobial properties and cytotoxic properties were investigated. Since the whole plant extract showed a high level of inhibition in the saltwater shrimp cell toxicity test (nearly 70 µg/liter), in order to obtain the effective components, solvent extraction using a decanter funnel was on the agenda. The three obtained components of hexane, ethyl acetate and water were analyzed separately. Also, by using a polystyrene divinylbenzene chromatography column, the effective component with higher inhibition ability was isolated. Among the effective components, except ethyl acetate, it had a relatively high inhibitory power, which was identified with the help of Hplc device.

Findings: Comparing the antimicrobial power of Tribulus longipetalusViv with antibiotics, showed that this plant has good antimicrobial properties. Also, considering that LC50 was determined as 70 µg/ml. This value indicates the good cytotoxic power of Tribulus longipetalus Viv.

Keywords: Tribulus longipetalus Viv, Cellular toxicity, Brine shrimp, Ethyl acetate, Chromatography, Polystyrene divinylbenzene, Cancer.

1. **Received:** 2022/03/31 ; **Received in revised form:** 2022/05/05 ; **Accepted:** 2022/06/11 ; **Published online:** 2022/09/23
© the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۳۴۳۴-۲۵۳۸
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

شناسایی ترکیبات فرار و بررسی اثرات ضداکسیدان، ضد میکروب و ضد سرطانی گیاه *Tribulu longipetalus* Viv.[1]

علی اکبر ایمانی | کارشناسی ارشد شیمی و فناوری اسانس، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران (**نویسنده مسئول**). aliakbar.imani67@gmail.com
امین مریدزاده | کارشناسی ارشد شیمی و فناوری اسانس، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران.

چکیده

هدف: هدف پژوهش حاضر شناسایی ترکیبات فرّار و بررسی اثرات ضداکسیدان، ضد میکروب و ضد سرطانی گیاه خارخسک بیابانی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش گیاه خارخسک بیابانی که گیاهی علفی یک‌ساله، دارای انشعاب‌های متعدد، خوابیده روی سطح زمین، دارای ساقه‌هایی با کرک‌های موئی نرم است، مورد بررسی قرار گرفته است. محدوده انتشار جغرافیائی این گیاه در گستره ماسه‌زارهای ریگ بلند بیابان‌های آران و بیدگل می‌باشد. خواص زیستی ازجمله سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد، بررسی میزان کل ترکیبات فنلی، میزان خواص ضد میکروبی و همچنین میزان خواص سمیت سلولی آن بررسی شد. از آنجا که عصاره تام گیاه در تست سمّیت سلولی میگوی آب شور میزان مهار بالایی از خود نشان داد (نزدیک به ۷۰ میکروگرم بر لیتر)، به منظور دستیابی به اجزای مؤثر، استخراج با حلال به کمک قیف دکانتور در دستور کار قرار گرفت. سه جزء به دست آمده هگزانی، اتیل استاتی و آبی به طور جداگانه بررسی شد. همچنین با استفاده از ستون کروماتوگرافی پلی استایرن دی ونیل بنزن، به جداسازی جزء مؤثر که توانایی مهار بالاتری داشته باشد، اقدام گردید. از میان اجزای موثر جز اتیل استاتی دارای قدرت مهار نسبتاً بالایی بود که به کمک دستگاه Hplc شناسای اجزای مؤثر آن صورت گرفت.

یافته‌ها: مقایسه قدرت ضد میکروبی گیاه خارخاسک بیابانی با آنتی‌بیوتیک‌ها، نشان داد که این گیاه دارای خاصیت آنتی میکروبیال خوبی است. همچنین با در نظر گرفتن اینکه LC_{50} برابر با ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این مقدار نشان‌دهنده قدرت سمّیت سلولی خوب از گیاه خارخاسک بیابانی است.

کلیدواژه‌ها: گیاه خارخسک بیابانی، سمیّت سلولی، میگوی آب شور، اتیل استات، کروماتوگرافی، پلی استایرن دی ونیل بنزن، سرطان.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۱/۱۱؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۵؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۳/۲۱؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۷/۰۱
© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۱. مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان است، چراکه امراض با پیدایش بشر متولد شده‌اند و اسناد چند هزار ساله موجود در تاریخ طب داروسازی حاوی تجربیات ارزشمند گیاه‌درمانی می‌باشند (۱). تا چند دهه گذشته، داروها به طور عمده از گیاهان و منابع طبیعی به دست می‌آمد، با پیشرفت سریع در علوم جدید و داروهای سنتتیك، از مصرف گیاهان دارویی به تدریج کاسته شد و داروهای سنتتیك در بسیاری موارد جایگزین آنها شدند. گیاهان دارویی در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته و آثار دارویی و موارد استفاده آن بر هیچ‌کس پوشیده نیست، اگرچه مصرف گیاهان دارویی با توسعه صنایع شیمیایی محدود شده، اما چشم‌انداز میزان استفاده از گیاهان در آینده روبه افزایش است.

براساس بررسی فلور ایرانیکا و تیره‌های کاشته شده‌ای که در ایران می‌رویند، و نام آنها در فرهنگ نام‌های ایران آمده است، ۱۳۰ تیره از مجموع تیره‌های گیاهی ایران دربرگیرنده گیاهان دارویی و معطر است که به طور خاص ۱۹ تیره از آنها در ایران کاشته شده و به صورت خودرو نماینده‌ای ندارند (۲). این ۱۳۰ تیره دربرگیرنده ۷۰۰ جنس بوده که جنبه‌های دارویی و معطر بودن برخی از گونه‌های آنها مسجل است. در میان گیاهان دارویی رایج در ایران، ۱۳ گونه در ردیف ادویه‌جات است و جمعاً ۲۰ گونه گیاه دارویی وارداتی به چشم می‌خورد.

ایران با برخورداری از فرهنگ تاریخی در زمینه‌های طب گیاهی و همچنین استعداد بالقوه طبیعی و جغرافیایی جهت کاشت و تولید گیاهان دارویی می‌تواند به عنوان یکی از کشورهای پیشگام در زمینه تولید و مصرف داروهای گیاهی باشد، اما بررسی‌ها و برخی از تحقیقات، این موضوع را نشان نمی‌دهد.

در طب سنّتی ایران که گنجینه عظیمی به یادگار مانده از هزاران سال تجربه، اندیشه، پژوهش و رفتار مسئولانه پزشکی است، نقش گیاهان دارویی و داروهای برگرفته از آنها همچنان به عنوان بیشترین بخش داروها، بی‌مانند است؛ اما به هر حال واقعیت این است که دارو با همه ضرورت و اهمیت همچون سلاح دو لبه‌ای است که بهره‌گیری بهینه از آن در گروی کاربرد منطقی و علمی آن است (۳). از سویی، اگر به گیاهان به عنوان منبع غنی و منشاء اصلی ساخت داروهای شمیایی جدید نگاه شود، می‌توان بررسی خواص زیستی گیاهان دارویی را به عنوان گام نخست در ساخت داروهای جدید دانست.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. استخراج اسانس

به منظور اسانس‌گیری، مقدار ۱۰۰ گرم از سرشاخه و ساقه گیاه خارخاسک بیابانی خرد شده و در دستگاه کلونجر قرار داده شد و مدت ۲ الی ۳ ساعت برای استخراج اسانس به آنها زمان داده شد. پس از اتمام عمل استخراج، حدود ۲ گرم سدیم سولفات بدون آب به منظور جذب آب احتمالی موجود به آنها اضافه شد؛ اسانس حاصل مدت ۲۴ ساعت درون یخچال قرار گرفت، سپس داخل ویال سرریز شده و مدتی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا پنتان موجود در آن تبخیر شود. سپس در دمای ۴+ درجه به منظور تزریق به GC نگهداری شد.

۲-۲. میزان بازده اسانس

با استفاده از وزن گیاه خشک مورد استفاده در اسانس‌گیری و وزن اسانس بدست آمده، بازده اسانس به صورت نسبت وزنی/ وزنی (*w/w*) محاسبه شد که حاصل ضرب این نسبت در ۱۰۰ راندمان اسانس‌گیری را برحسب درصد مشخص می‌کند.

۲-۳. جداسازی و شناسایی اجزاء اسانس

شناسایی اجزاء موجود در اسانس به وسیله دستگاه GC-MS انجام شد. با توجه به پیشنهادهای کتابخانه دستگاه GC-MS و مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها و شاخص بازداری (I) آنها با ترکیب‌های استاندارد موجود در مراجع، ترکیب‌های موجود در اسانس شناسایی گردید. برای محاسبه شاخص بازداری ترکیب‌های اسانس، سری آلکان نرمال نیز طبق شرایط تزریق اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شد (۴).

۳. عصاره‌گیری به منظور انجام آزمون‌های زیستی

عصاره‌گیری بر روی گیاه با حلال متانول و با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. در این روش هر بار مقدار ۴۰ گرم از هر یک از اندام‌های خشک گیاه توزین و در یک کارتوش بزرگ ریخته شد و داخل محفظه مخصوص قرار گرفت، حلال مورد استفاده برای هر بار عصاره‌گیری ۶۰۰ میلی لیتر متانول ایرانی تقطیر شده بود. دو دلیل استفاده از متانول به عنوان حلال استخراج‌کننده عبارتند از:

۱) قابلیت نفوذ بالای متانول در بافت‌های گیاه،

۲) قابلیت بالای استخراج ترکیب‌های مختلف از بافت‌های گیاه.

سپس دستگاه سوکسله سوار و روی شوف بالن قرار گرفت. عمل عصاره‌گیری به مدت ۸ ساعت و در دمای حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت. عصاره بدست آمده با دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شده و به یک پتریدیش منتقل شد. پس از تبخیر کامل حلال، عصاره حاصل در آون خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و فشار Hg mm 20 به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا مقدار اندک حلال باقیمانده نیز تبخیر شود. عصاره‌های حاصل از گیاه، توسط اسپاتول تراشیده و به ظروف دربدار منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شد.

شکل ۱- عصاره‌گیری به روش سوکسیله

٤. بررسی فعالیت ضد اکسیدانی

٤-١. آزمون سنجش ظرفیت به دام انداختن رادیکال DPPH

ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی عصاره‌های متانولی گیاهان مورد نظر با روش DPPH انجام شد. در این روش توانایی عصاره‌های گیاهی (به عنوان ضد اکسیدان) در دادن الکترون به رادیکال ۲،۲- دی فنیل- پیکریل هیدرازیل (DPPH) با تغییر رنگ محلول متانولی DPPH (از بنفش به زرد) مورد ارزیابی قرار گرفت (۵). رادیکال DPPH در ۵۱۷ نانومتر میزان جذب دارد که از قانون بیر-لامبرت پیروی می‌کند و کاهش جذب آن با میزان ماده ضداکسیدان رابطه خطی دارد. در ازای

افزایش هرچه بیشتر ماده ضد اکسیدان، DPPH بیشتری استفاده می‌شود (۶). همچنین از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان شاهد استاندارد استفاده شد. آزمایش‌های مربوط به عصاره و نمونه استاندارد BHT برای به حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان یافتن از صحّت نتایج، سه بار تکرار و پس از میانگین‌گیری از داده‌ها، IC_{50} مربوط به هر یك از آزمایش‌ها گزارش شده است.

برای انجام این آزمایش محلول‌های زیر تهیه شدند:

محلول DPPH: میزان ۴/۷ میلی‌گرم از DPPH (خلوص ۱۰۰ درصد) با ترازوی چهار صفر توزین و در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری تیره رنگ (به منظور جلوگیری از تخریب DPPH توسط نور) ریخته و با متانول Merck به حجم رسانده شد. محلول حاصل رنگ ارغوانی دارد. از آنجا که این محلول به مرور زمان احیاء می‌گردد (به رنگ زرد تبدیل می‌شود)، بهتر است در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود (۷). از طرفی به دلیل از بین رفتن ماهیت این ماده، به مرور زمان و در حضور نور بهتر است بلافاصله مورد استفاده قرار گیرد. همچنین رعایت نکات ایمنی در هنگام کار کردن با DPPH که بسیار خورنده است، ضروری می‌باشد.

محلول استاندارد BHT: برای تهیه این محلول میزان ۲۵ میلی‌گرم از نمونه استاندارد BHT با ترازوی آنالیتیکی وزن شده و در بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری با متانول Merck رسانده و همگن شد، به این ترتیب محلول مادر BHT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ساخته شد. در مرحله بعدی غلظت‌های ۰/۸، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، 5×10^{-2}، 5×10^{-3}، 5×10^{-4} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول مادر و با استفاده از حلال متانول Merck به روش رقیق‌سازی متوالی در ۸ بالن‌ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری تهیه شد.

محلول شاهد: برای خواندن جذب نمونه‌های گیاهی و نمونه‌های BHT، میزان ۱ میلی‌لیتر از متانول Merck به ۱ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH در بالن ۵ میلی‌لیتری تیره افزوده و همگن شد که این محلول به عنوان شاهد استفاده گردید.

محلول‌های عصاره‌ها: در ابتدا برای تهیه محلول پایه از عصاره متانولی گیاه مقدار ۲۵ میلیگرم از عصاره به طور جداگانه با ترازوی آنالیتیکی توزین و با متانول Merck با درجه خلوص بالا در بالن‌ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری به حجم رسانده و همگن شد. به این ترتیب محلول مادر با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها تهیه گردید. سپس محلول‌هایی با غلظت‌های ۰/۸،

۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، ۵×۱۰^{-۲}، ۵×۱۰^{-۳}، ۵×۱۰^{-۴} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول مادر تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های فوق به طور جداگانه در بالن‌های تیره ریخته شد و پس از آن ۱ میلی‌لیتر از معرف DPPH به آن افزوده و همگن گردید. جذب محلول‌های شاهد و نمونه پس از ۳۰ دقیقه و در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis خوانده شد. در پایان با محاسبه درصد مهار و ترسیم منحنی درصد مهار برحسب غلظت، $IC_{۵۰}$ هر یک از نمونه‌های گیاهی از محل تلاقی نصف درصد مهار (۵۰%) با منفی لگاریتم غلظت به طور جداگانه محاسبه شد.

آزمایش‌های مربوط به عصاره و نمونه استاندارد BHT برای به حداقل رساندن خطاهای آزمایش و اطمینان یافتن از صحّت نتایج، سه مرتبه تکرار و پس از میانگین‌گیری از داده‌ها، $IC_{۵۰}$ مربوط به هر یك از آزمایش‌ها گزارش شد.

میزان درصد مهار با معادله زیر محاسبه شده است:

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

در فرمول بالا، A_{Blank} میزان جذب شاهد (نمونه حاوی تمام معرف‌ها به غیر از عصاره) و A_{Sample} میزان جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر است.

۵. اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی معادل با گالیک اسید

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فنلی از روش Folin-Ciocalteu استفاده شد. در این روش از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده گردید.

محلول‌های تهیه شده برای انجام آزمایش فولین سیوکالتیو به قرار زیر است:

الف) نمونه استاندارد گالیک اسید

۱) مقدارهای ۱/۱، ۲/۲، ۳/۳، ۴/۴، ۵/۵، ۶/۶، ۷/۷، ۸/۸، ۹/۹ و ۱۱ میلی‌گرم از استاندارد گالیک اسید یک آبه وزن شد و در ۱۰ عدد لوله آزمایش به طور جداگانه ریخته شد.

۲) به لوله‌های حاوی گالیک اسید میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد.

۳) تعداد ۱۱ عدد بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری آماده کرده و به هر کدام حدود ۳۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و سپس به ۱۰ عدد از بالن ژوژه‌ها، میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول موجود در لوله‌های آزمایش به طور جداگانه اضافه شد. به بالن ژوژه شماره ۱۱ که بالن ژوژه شاهد است، میزان ۰/۱

میلی‌لیتر اتانول اضافه شد.

۴) در مرحله بعدی، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتو به بالن ژوژه‌ها اضافه و بعد از مدت زمان ۳ دقیقه ۳ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲% اضافه و سپس بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده و همگن شد.

۵) بالن ژوژه‌های تهیه شده به مدت ۲ ساعت در دمای محیط گذاشته شدند.

۶) بعد از مدت زمان ۲ ساعت، طول موج دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۷۶۰ نانومتر تنظیم شد و ابتدا دستگاه با محلول شاهد صفر شده و سپس جذب هر یک از محلول‌ها سه بار خوانده شد و از سه جذب خوانده شده میانگین گرفته شد.

۷) از روی جذب‌های به دست آمده، نمودار خطی جذب برحسب غلظت (میکروگرم) در برنامه Excel رسم شده و معادله خط محاسبه شد.

معادله خط به دست آمده برای استاندارد گالیک اسید در منابع:

۰/۰۰۳۳ + غلظت گلیک اسید (میکروگرم) × ۰/۰۰۱۲ = جذب

٦. جداسازی با استفاده از ستون پلی استایرن دی ونیل بنزن

هدف: تهیه فرکشن‌های مختلف از عصاره تام از حالت قطبی به غیرقطبی، برای انجام تست میگو در غلظت هدف بوده است.

روش کار: ابتدا محلول مورد نیاز برای آزمون ساخته شد. غلظت‌ها در حجم ۵۰ cc بوده و در جدول شماره (۲) به صورت خلاصه آمده است.

جدول ۱- در صد ترکیب اجزاء

ردیف	درصد حلال		میزان حلال	
	درصد آب	درصد اتانول	میزان آب	میزان اتانول
۱	۱۰۰	۰	۵۰ cc	۰
۲	۸۰	۲۰	۴۰ cc	۱۰ cc
۳	۶۰	۴۰	۳۰ cc	۲۰ cc
۴	۴۰	۶۰	۲۰ cc	۳۰ cc
۵	۲۰	۸۰	۱۰ cc	۴۰ cc
۶	۰	۱۰۰	۰	۵۰ cc

شکل ۲- اجزای جدا شده با کمک ستون

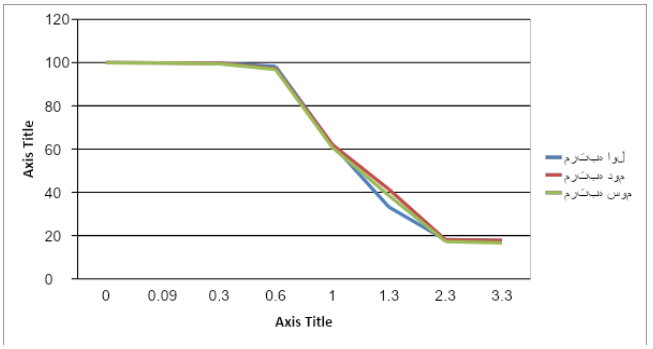
۷. آماده‌سازی ستون

ابتدا ۳ گرم عصاره متانولی را در ۳۰۰cc آب تا حد زیادی حل می‌کنیم، سپس پودر پلیمر پلی استایرن دی ونیل بنزن را به آن اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه روی هیتر قرار می‌دهیم تا عصاره بر روی پلیمر بنشیند یا به اصطلاح coat شود. بعد از آن محلول پلیمر و عصاره را درون ستون کروماتوگرافی به طول ۱/۵ متر و قطر ۳ سانتیمتر می‌ریزیم. باید کمی صبر کرد تا شرایط ثابت بماند و ذرات معلق نباشند؛ در این موقع شیر ستون را باز کرده تا محلول خارج شود و ستون آماده پذیرش محلول‌های ساخته شده می‌گردد.

۸. یافته‌ها

۸-۱. نتایج سنجش فعالیت ضد اکسیدانی به روش DPPH

با توجه به جذب‌های اندازه‌گیری شده در ۳ مرتبه از تکرار آزمون و محاسبه درصد مهار اکسیدان برای هر تکرار، نمودار منفی لگاریتم غلظت‌ها در برابر درصد مهار اکسیدان رسم شد.



نمودار ۱- درصد مهار در برابر منفی لگاریتم غلظت

با در نظر گرفتن نمودار درصد مهار در برابر منفی لگاریتم غلظت، IC۵۰ مربوط به هر مرتبه نیز تعیین شد که در جدول شماره ۲) آمده است.

جدول ۲ - میانگین IC۵۰ بدست آمده از روش DPPH

	IC50(mg/ml)			
میانگین	مرتبه سوم	مرتبه دوم	مرتبه اول	
263/0	630/0	079/0	081/0	

۸-۲. بررسی فعالیت ضد اکسیدانی به روش بی‌رنگ‌شدن بناکاروتن در حضور لینوئیک اسید

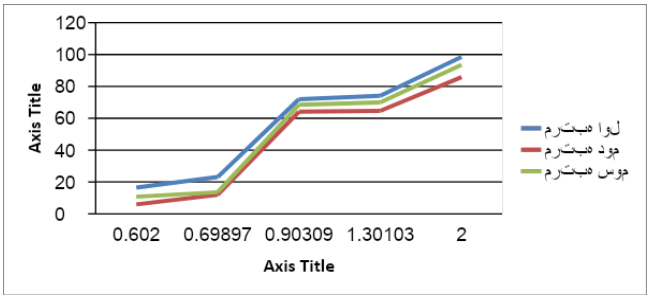
در این آزمایش، جذب نمونه گیاهی در مقایسه با جذب ماکزیمم (DMSO) محاسبه گردید. نتایج این آزمون پس از محاسبه درصد مهار عصاره در جدول (۳) آمده است. درصد مهار لینولئیک اسید عصاره گیاهی با استاندارد BHT مقایسه شدند. نتایج حاصل بیانگر اثر ضداکسیدانی بالای عصاره‌های گیاهی است.

جدول ۳ - درصد مهار در آزمون بتاکاروتن-لینولئیک اسید

ردیف	ترکیب	بازده
۱	عصاره	۵۴/۵۹
۲	شاهد مثبت (BHT)	۶۹/۶۶
۳	شاهد منفی	۱۱/۷۶

۸-۳. بررسی فعالیت ضد اکسیدانی به روش پراکسید هیدروژن

با توجه به جذب‌های اندازه‌گیری شده در ۳ مرتبه از تکرار آزمون و محاسبه درصد مهار اکسیدان برای هر تکرار، نمودار منفی لگاریتم غلظت‌ها در برابر درصد مهار اکسیدان رسم شد.



نمودار۲- درصد مهار در برابر منفی لگاریتم غلظت

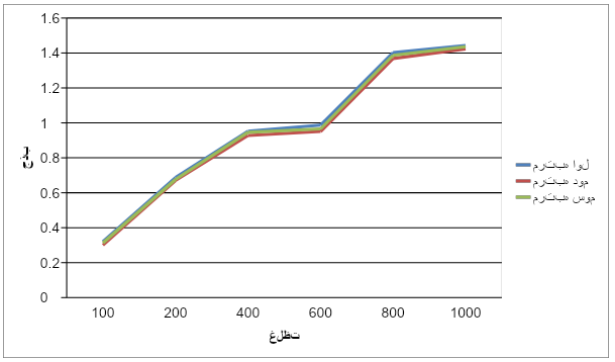
با در نظر گرفتن نمودار درصد مهار در برابر منفی لگاریتم غلظت، IC۵۰ مربوط به هر مرتبه نیز تعیین شد که در جدول (۴) آمده است.

جدول ٤- میانگین سه بار IC۵۰ به روش پراسید هیدروژن

	IC50(mg/ml)			
میانگین	مرتبه سوم	مرتبه دوم	مرتبه اول	
160/0	160/0	158/0	162/0	

۸-٤. بررسی آزمون قدرت کاهندگی آهن (III)

با توجه به جذب‌های اندازه‌گیری شده در سه مرتبه از تکرار آزمون، نمودار غلظت‌ها در برابر جذب رسم شد.



نمودار ۳- جذب مقابل غلظت

با توجه به این نمودار، EC۵۰ نیز تعیین گردید.

جدول۵- میانگین سه بار EC۵۰ به روش بررسی آزمون قدرت کاهندگی آهن (III)

	EC50(mg/ml)			
میانگین	مرتبه سوم	مرتبه دوم	مرتبه اول	
145/0	145/0	150/0	140/0	

۸-۵. اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی معادل با گالیک اسید

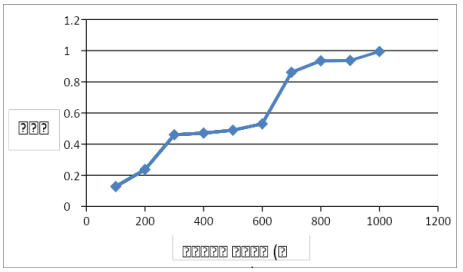
میزان جذب برای غلظت‌های مختلف از استاندارد گالیک اسید در جدول (۶) گزارش شده است.

جدول ٦ - جذب در برابر غلظت گالیک اسید

گالیک اسید µg	جذب
۱۰۰	۰/۱۲۷۶
۲۰۰	۰/۲۳۷۱
۳۰۰	۰/۴۵۹۹
۴۰۰	۰/۴۷۰۷
۵۰۰	۰/۴۸۹۶
۶۰۰	۰/۵۳۰۴
۷۰۰	۰/۸۶۱۳
۸۰۰	۰/۹۳۵۰
۹۰۰	۰/۹۳۷۰
۱۰۰۰	۰/۹۹۵۰

با توجه به این جذب‌ها، منحنی مربوط به غلظت‌های گالیك اسید در برابر جذب رسم گردید و معادله استاندارد جهت محاسبه مقدار کل ترکیب‌های فنلی در نمونه تعیین شد.

y = 001/0 x + 061/0



نمودار ٤ - منحنی استاندارد گالیک اسید

با در نظر گرفتن این معادله، مقدار کل ترکیب‌های فنلی معادل با گالیك اسید موجود در عصاره، با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو و استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شد که در جدول (۷) آمده است.

جدول ۷- میزان کل ترکیب‌های فنلی (برحسب میکروگرم)

	مرتبه اول	مرتبه دوم	مرتبه سوم	میانگین
عصاره	83/26	83/26	86/30	17/28

با توجه به نتایج این آزمون‌ها، عصاره گیاه خارخاسک بیابانی از قدرت ضد اکسیدانی متوسطی چه به لحاظ مکانیسم انتقال الکترون و چه به لحاظ مکانیسم انتقال هیدروژن، برخوردار است.

۹. نتایج

۹-۱. خواص ضد میکروبی

نتایج ارزیابی قدرت ضدمیکروبی عصاره گیاه خارخاسک بیابانی در جدول (۸) گزارش شده است.

جدول ۸- نتایج ضد میکروبی

میکرو ارگانیسم‌ها	DD قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر	MICحداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد برحسب mg/ml	MBC حداقل غلظت کشندگی باکتری mg/ml
Staphylococcus aureus	۹	>mg/ml 2	>mg/ml 2
Staphylococcus epidermidis	–	–	>mg/ml 2
Klebsiella pneumoniae	۹	۱	>mg/ml 2
Shigella dysenteriae	۹	۲	>mg/ml 2
Salmonella paratyphi-A serotype	۱۰	۲	>mg/ml 2
Pseudomonas aeruginosa	۹	۱	>mg/ml 2
Proteus vulgaris	۹	۲	>mg/ml 2
Escherichia coli	۹	۲	>mg/ml 2

نتایج حاصل از قدرت آنتی میکروبیال آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان شاهد مثبت، در جدول (۹) آمده است.

جدول ۹- نتایج حاصل از قدرت آنتی میکروبیال آنتی بیوتیک‌ها

	Rifampin		Gentamicin	
	DD (mm)	MIC (µg/ml)	DD (mm)	MIC (µg/ml)
باکتری‌های گرم منفی				
P. aeruginosa			۲۳	۵۰۰
E. coli	۱۱	۵۰۰	۲۰	۵۰۰
K. pneumoniae	۷	۲۵۰	۲۲	۵۰۰
P. vulgaris	۱۰	۱۲۵	۲۳	۵۰۰
S. paratyphi			۲۱	۵۰۰
S. dysenteriae	۸	۲۵۰	۱۸	۵۰۰
باکتری‌های گرم مثبت				
B. subtilis	۱۳	۱۵/۲۶	۲۱	۵۰۰
S. aureus	۱۰	۲۵۰	۲۱	۵۰۰
S. epidermidis	۴۰	۲۵۰	۳۵	۵۰۰

مقایسه قدرت ضد میکروبی گیاه خارخاسک بیابانی با آنتی بیوتیک‌ها، حاکی از آن است که این گیاه دارای خاصیت آنتی میکروبیال خوبی است (۸).

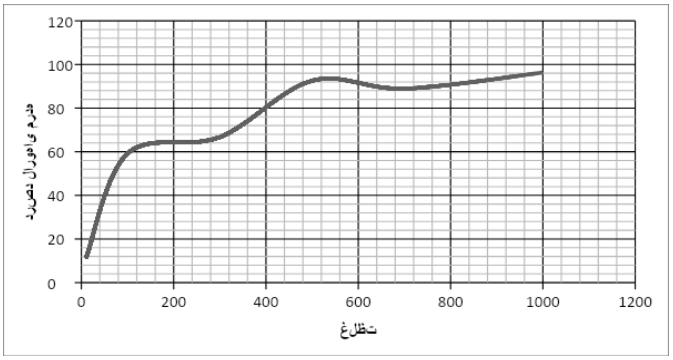
۹-۲. قدرت سمیت سلولی

نتایج بررسی فعالیت سمّیت سلولی عصاره گیاه خارخاسک بیابانی با تعیین میزان کشندگی میگوی آب شور در جدول (۱۰) آمده است.

جدول ۱۰- تعداد لاروهای کشته شده در غلظت معین

	تعداد لاروهای مرده		
غلظت (µg/ml)	مرتبه اول	مرتبه دوم	مرتبه سوم
شاهد	۲	۰	۱
۱۰	۱	۰	۵
۱۰۰	۶	۷	۶
۳۰۰	۳	۹	۹
۵۰۰	۱۰	۸	۱۰
۷۰۰	۱۰	۹	۸
۱۰۰۰	۱۰	۱۰	۹

با توجه به این داده‌ها، درصد مرده‌های محاسبه شده و نمودار درصد لاروهای مرده، در برابر غلظت رسم شد.



نمودار ۵ - درصد لاروهای مرده در برابر غلظت

با در نظر گرفتن این نمودار، LC۵۰ برابر با ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این مقدار نشان‌دهنده قدرت سمّیت سلولی خوب از گیاه خارخاسک بیابانی است.

۹-۳. جداسازی ترکیب‌های مؤثر

۹-۳-۱. جداسازی به روش جز به جز کردن دو حلال

با توجه به نتایج نسبتاً خوبی که در تست میگو بدست آمد، جداسازی به روش حلال با حلال و بدست آوردن اجزای جدید تست سمیت سلولی مجدد انجام شد (۹). جزء هگزانی برای شناسایی به روش GC-MS فرستاده شد، و جزء اتیل استاتی و آبی برای انجام تست سمّیت سلولی آماده‌سازی شد. قابل ذکر است که غلظت مورد استفاده در مرحله نزدیک به غلظتی که بهترین $LC_{۵۰}$ را در روش سمّیت سلولی داشت (۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) طی دوبار تکرار محاسبه شده است.

جدول ۱۱ - انجام تست میگو روی فرکشن اتیل استاتی و آبی جدا شده توسط قیف دکانتور برای مرتبه اول

نام عصاره	غلظت برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله اول	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله دوم	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله سوم
عصاره اتیل استاتی	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۵	۸	۶
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۵	۶	۷
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۵	۹	۶
عصاره آبی	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۹	۹
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۹	۸	۷
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۶	۶

جدول ۱۲- انجام تست میگو روی فرکشن اتیل استاتی و آبی جدا شده توسط قیف دکانتور برای مرتبه دوم

نام عصاره	غلظت برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله اول	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله دوم	تعداد میگوهای کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله سوم
عصاره اتیل استاتی	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۷	۹	۸
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۷	۸
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۷	۱۰	۸
عصاره آبی	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۸	۸
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۷	۷	۶
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۷	۸	۷

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش، در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر از جز آبی،

بیشترین تعداد لارو کشته مشاهده شد. این خود می‌تواند سرنخ و راهنمایی برای آزمایش‌های بعدی باشد.

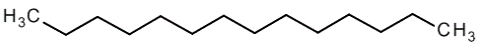
۹-٤. ترکیب‌های موجود در فرکشن هگزانی

ترکیب‌های شیمیایی موجود در عصاره هگزانی نیز به وسیله GC-MASS ردیابی شدند که نتایج آن در جدول شماره (۱۳) آمده است.

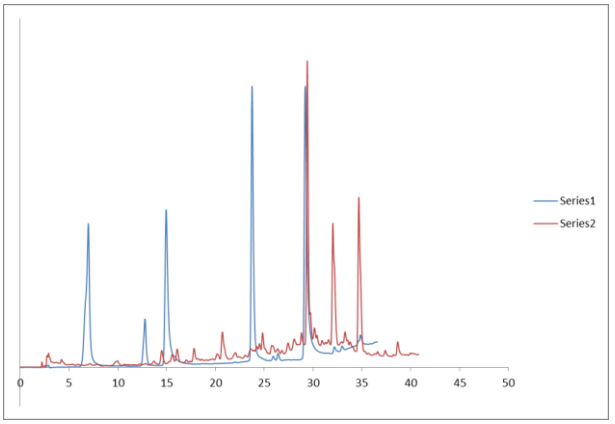
جدول ۱۳- ترکیب‌های عصاره هگزانی

#	نام ترکیبها	٪	RI	°RI
۱	n-Tetradecane	۶۱,۲۳	۱۳۹۳	۱۴۰۰
۲	n-Hexadecane	۱۶,۷۰	۱۵۹۸	۱۶۰۰
Σ		۷۷,۹۳		

عصاره هگزانی حاصل از گیاه خارخاسک بیابانی به طور عمده حاوی نرمال تترادکان (۶۱/۲۳%) و نرمال هگزادکان (۱۶/۷۰%) است.



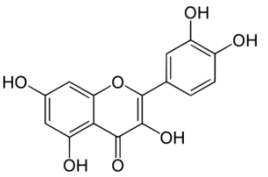
شکل ۱ - ملکول نرمال تترادکان



نمودار ٦- شناسایی ترکیب‌های فنلی به کمک دستگاهHPLC

طیف بدست آمده نشان می‌دهد که نمونه تزریقی از *T. longipetalus* Viv. تنها حاوی یک استاندارد فلاونوئیدی یعنی کوئرسیتین است، در حالی که چهار استاندارد تزریقی دیگر یعنی

کلروژنیک اسید، گالیک اسید، کاتچین و روتین در نمونه وجود ندارد.



شکل ۲- مولکول کوئرستین

۹-۵. جداسازی با استفاده از ستون پلی استایرن دی ونیل بنزن

با توجه به نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی و LC_{50} نسبتا خوب آن، برای تحقیقات بیشتر از ستون پر شده با رزین پلی استایرن دی ونیل بنزن استفاده شده است.

جدول۱۳- نتایج حاصل از تست سمّیت با کمک ستون پلی استایرن دی ونیل بنزن

نوع فرکشن	غلظت برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر	تعداد میگو های کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله اول	تعداد میگو های کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله دوم	تعداد میگو های کشته شده از ۱۰ عدد در مرحله سوم
فرکشن آبی۱۰۰٪ آب	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۳	۳
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۷	۳	۴
	۸۰میکرو گرم بر میلی لیتر	۵	۲	۳
فرکشن دوم ۲۰٪ اتانول و ۸۰٪ آب	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۴	۰
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۳	۵	۵
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۴	۳	۳
فرکشن سوم ۴۰٪ اتانول و ۶۰٪ آب	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۱	۵	۷
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۲	۶	۴
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۲	۳	۶
فرکشن چهارم ۶۰٪ اتانول و ۴۰٪ آب	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۶	۶
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۶	۶
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۳	۳	۵
فرکشن پنجم ۸۰٪ اتنول و ۲۰٪ آب	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۸	۸
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۶	۶
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۶	۵	۴
فرکشن ششم ۱۰۰ ٪ اتانولی	۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۶	۷
	۷۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۴	۶
	۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر	۸	۱۰	۸

با توجه به اطلاعات به دست آمده از این آزمون، دو جزء بیشترین تعداد لارو کشته را داشتند که عبارتند از فرکشن پنجم (۸۰% اتنول و ۲۰% آب) در غلظت ۶۰ میکرو گرم بر میلی لیتر با ۸۰% قدرت مهار و فرکشن ششم (۱۰۰% اتانولی) در غلظت ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر با ۹۳% قدرت مهار.

۱۰. نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش، عصاره گیاه خارخاسک بیابانی با توجه به درصد مهار لینولئیک اسید عصاره گیاهی با استاندارد BHT مقایسه شدند و دارای ضداکسیدانی بالای عصاره‌های گیاهی می‌باشند. با مقایسه قدرت ضد میکروبی گیاه خارخاسک بیابانی با آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان گفت که این گیاه دارای خاصیت آنتی میکروبیال خوبی است. همچنین با در نظر گرفتن اینکه LC_{50} برابر با ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این مقدار نشان‌دهنده قدرت سمّیت سلولی خوب از گیاه خارخاسک بیابانی است.

References

1. Mozaffarian V. *Knowledge of Iranian Medicinal and Aromatic Plants*. Farhang Masazer Publications, 2013: 345.
2. Kahraman A. *Basic Botany*. Vol.1, 15th Ed. Tehran University Publications Institute, 2013: 343-345.
3. Mozafarian V. *Dictionary of Iranian Plant Names*. Tehran: Farhang Masazer Publications, 1996: 750.
4. Betoli H. *Investigation of biodiversity and vegetative appearance of plants located in the habitats of Aran and Bidgol long sand dunes*. Plant and Ecology.
5. Jaimand K & Rezaei MB. *Essential oil-distillation devices, test methods and inhibition indices in essential oil analysis*. Medicinal Plants Association. 2016: 241-143, 97-111, 40-45.
6. Punchard NA & Kelly FJ. *Free Radical Approach*. New York: Oxford University Press Inc, 1996: 1-8, 101-105, 119-131.
7. Poli G, Albano E & Dianzani MV. *Free radicals: from basic science to medicine (Molecular and cell biology updates)*. Switzerland: Birkhauser Verlag Base, 1993: 65-79, 89-101, 124-143, 187-198.
8. Huang D, Ou B & Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53: 1841-1856.
9. Cao GH, Alessio HM & Cutler RG. Oxygen- radical absorbency capacity assay for antioxidant. *Free Radical Biol, J. Med*. 1993; 14(3): 303-311.
10. Handa SS & et al. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. ed. U.N.I.D. Organization. New York: ICS UNIDO, 2008.