بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضداکسیدانی برگ گیاه عناب از خانواده راماسیائه از منطقه قم

مریم معصومی، غلامرضا نجفی*، سید مسعود کاظمی

گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

najafi@qom-iau.ac.ir

خلاصه

در سال‌های اخیر، اسانس‌ها و عصاره‌های استخراج شده از گیاهان به عنوان منبع تولید محصولات طبیعی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. در این تحقیق، مطالعه بر روی یک گیاه (Ziziphus Nummularia Linn.) از خانواده عناب از منطقه‌ی قم انجام شده است. در این مطالعه، برگ خشک شده گیاه با روش تقطیر با آب مورد عمل اسانس‌گیری قرار گرفته و اسانس‌های به‌دست آمده، با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی جفت شده با طیف سنج جرمی مورد آنالیز قرار گرفتند. آنگاه با استفاده از ضرایب بازداری کواتس و مقایسه طیف جرمی نمونه با طیف‌های جرمی موجود در منابع و بانک-های اطلاعاتی، اجزای تشکیل دهنده روغن‌های اسانسی مشخص گردیدند. بر اساس نتایج حاصل، در اسانس برگ گیاه(Ziziphus Nummularia Linn.)، تعداد ۴۴ ترکیب و در عصاره هگزانی تعداد ۲۰ ترکیب شناسایی شدند. در مرحله‌ی بعدی، استخراج عصاره از برگ توسط حلال های متانول، اتیل استات، دی کلرو متان و هگزان به روش خیساندن و سوکسله انجام شد و اثرات ضداکسیدانی عصاره‌های مذکور با استفاده از دو روش DPPH و بتا کاروتن– لینولئیک اسید سنجیده و با ضد اکسیدان استاندارد BHT مقایسه شد، که از این میان، عصاره برگ در حلال دی کلرومتان و هگزان بیش‌ترین فعالیت ضداکسیدانی نشان داد. فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌های گیاهی بر روی تعدادی از محیط‌های کشت باکتری به روش دیسک انجام پذیرفت که نتایج نشان داد که عصاره‌های حاصل از برگ این گیاه، عملکرد چندانی در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه ندارند.

کلمات کلیدی: عناب، اسانس، اثر ضداکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، راماسیائه (Rhammaceae)

مقدمه

مواد مؤثّره گیاهان دارویی دو نوع هستند: اول مواد حاصل از متابولیسم اولیه(اساسا ′ ساکارید ′) یا مواد مورد نیاز و حیاتی، که در همه گیاهان سبز با عمل فتوسنتز به وجود می‌آیند. نوع دوم مواد حاصل از متابولیسم ثانویه که در اثر جذب

نیتروژن توسط گیاه تولید می‌شوند. این تولیدات ظاهرا اغلب برای گیاه بدون فایده هستند، ولی برعکس اثرات درمانی آن‌ها قابل توجه است. منظور از این ترکیبات اسانس های روغنی(یا اسانس طبیعی)، رزین‌ها، آلکالوئیدهای مختلف است. به طور عمومی این مواد در حالت طبیعی به طور خالص یافت نمی‌شوند و به حالت ترکیب با عنصرهای دیگری که به صورت مکمل اثرات آن‌ها را تقویت می‌کنند، همراه هستند. با این حال حتی اگر گیاه دارویی فقط یک ماده فعال داشته باشد، باز اثر آن روی بدن انسان مفیدتر از همان ماده در حالت به دست آمده از سنتز شیمیایی است. این خاصیت، برتری گیاه درمانی با استفاده از داروهایی را که ریشه گیاهی دارند به ثبوت می‌رساند. در این جا ماده مؤثّره تنها یک ترکیب شیمیایی نیست، بلکه دارای تعادل فیزیولوژیک است که بدن آن را بهتر تحمل نموده و اثرات جانبی نیز برجای نمی‌گذارد، که دلیل خوبی بر ارجح بودن طب طبیعی است.

گیاهان تیره عناب (Ziziphus) به صورت درخت یا درختچه‌های غالباً خاردار و به‌ندرت علفی می‌باشند. در بین آن‌ها انواعی با ساقه بالا رونده نیز یافت می‌شود. در سال ۱۷۵۴ به عنوان جنس مستقل توسط فیلیپ میلر نام گذاری شد. «دان» در سال ۱۸۳۲ میلادی برای این جنس ۳۹ گونه، رندل (۱۹۵۰م) ۴۰ گونه، اورینف (۱۹۶۴م) ۸۰ گونه، جانستون (۱۹۷۲م) ۸۶ گونه، بنسالی (۱۹۷۵م) ۱۳۵ گونه که ۹۰ گونه از دنیای قدیم و ۴۵ گونه از دنیای جدید، چن و چو (۱۹۸۲م) ۱۰۰ گونه، لیو و چنگ (۱۹۹۵م) ۱۷۰ گونه و سرانجام سیمسون ۴۹ جنس و ۹۰۰ گونه را معرفی می کنند. از این مجموع ۱۴ گونه آن در چین و بقیه در اروپا و نواحی استوایی می‌رویند. در ایران ۵ جنس و ۱۱ گونه آن در مناطق خلیجی عمانی، زاگرسی و خزری می‌رویند. جنس تنگرس L.RHAMNUS با ۶ گونه گیاهی بیش‌ترین سهم گونه‌ای را در ایران به خود اختصاص داده و بعد از آن جنس Z.MILLER با ۳ گونه در مرتبه دوم قرار دارد. آلکالوییدهای سیکلوپپتیدی موجود در ریشه گونه Z.mauritiana دارای خواص آنتی پلاسمودیال بوده و خواص ضدمیکروبی خوبی را نشان داده‌اند. هم چنین، نتایج مطالعات زیستی روی نمونه‌های استخراجی برگ گونه Z.oenoplia (L) Mill بیانگر خواص دارویی در جهت درمان بیماری‌های ulcer, asthma, dysentery and fever دارد[۱].

جمع‌آوری مواد گیاهی و آماده‌سازی نمونه

برگ گیاه عناب به مقدار ۵۰۰ گرم از نواحی مرکزی ایران حوالی شهر قم که توسط واحد تحقیقات سازمان کشاورزی استان قم شناسایی و تایید شده بود، تهیه و مراحل لازم جهت ایجاد وزن ثابت بر روی آن عمل گردید. خشک کردن برگ-ها در سایه تا رسیدن به وزن ثابت انجام پذیرفت تا نتایج دو بار وزن کردن متوالی، اختلافی را به مقدار بیش تر از ۰/۵

میلی‌گرم نشان ندهد؛ توزین دوم نمونه وقتی انجام پذیرفت که عمل خشک کردن تحت شرایط معین در یک ساعت انجام گرفته بود. جهت بهینه کردن روند تحقیق، تمامی آلودگی‌های نمونه گیاهی نظیر پوسیدگی‌ها، تغییر رنگ یافتگی‌ها و چوب‌های اضافی و جوانه همراه، جدا و فقط برگ سالم گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. برای آن که در عمل استخراج بتوان به طور کامل مواد موثره برگ را خارج نمود؛ توسط آسیاب برقی برگ‌های خشک شده به صورت پودر با اندازه برش (نمره یا شماره مش) در حدود (60 mesh leaves) تهیه و آماده‌سازی شدند. در این تحقیق، برگ‌ها هم به صورت پودر نرم و ریز و هم به صورت کاملا سالم و درشت مورد بررسی قرار گرفتند و عصاره استخراجی از هر دو حالت مورد بررسی قرار گرفت که حلال آب در عمل استخراج توانست در هر مورد عمل استخراج را به خوبی انجام دهد. البته اندازه ذرات نباید آن قدر نرم و ریز گردد که از سطح کارتوش‌ها (Thimble) بتواند عبور نماید.

ابزار و مواد شیمیایی مورد نیاز

وسایل آزمایشگاهی مورد استفاده در این پروژه شامل دستگاه کلونجر، دستگاه سوکسله، قیف دکانتور، بالن‌های ۱ لیتری و ۲ لیتری، بالن ژوژه رنگی و روشن در حجم‌های مختلف، بشر در حجم‌های مختلف، پتری دیش، پیپت‌های مدرج۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی لیتری، پوآر، ویال برای نگهداری اسانس‌ها و ویال برای نگهداری عصاره‌ها می‌باشد. متانول، اتیل استات، دی کلرو متان، سود سوز آور، کلروفرم، نمک طعام مرک، بوتانول، سدیم سولفات بدون آب ، استون، هگزان نرمال، توئین ۴۰، لینولئیک اسید، BHT، DPPH، اتانول، آب مقطر، بتا کاروتن، برگ عناب.

عملیات آزمایشگاهی

استخراج

برای استخراج اسانس گیاه، از روش تقطیر و نیز روش خیساندن در تانک استفاده شد. برای عمل اسانس‌گیری نمونه‌های خشک برگ مورد استفاده قرار گرفت. ۲۱۶٫۶۵ گرم از برگ خشک گیاه به بالن تقطیر ۱ لیتری منتقل و بر روی آن آنقدر آب مقطر اضافه شد که ۲/۳ حجم بالن را اشغال نمود. مدت زمان اسانس‌گیری از زمان جوشیدن ۱/۵ الی ۲ ساعت بود که بلافاصله بعد از اتمام اسانس‌گیری، نمونه حاوی حلال جمع‌آوری شد و به آن مقداری سدیم سولفات برای جذب آب احتمالی موجود در آن اضافه شد و بعد از حدود ۴ ساعت بوسیله کاغذ صافی، صاف گردید. سپس حلال آن در دمای اتاق تبخیر شد و اسانس به درون ویال تیره برای جلوگیری از نفوذ نور انتقال یافت. سپس بوسیله عبور دادن جریان ملایم گاز

نیتروژن، اکسیژن موجود در آن تخلیه گردید و سپس ویال به درون یخچال منتقل شد. یک سیستم سوکسله(Soxhlet) را متصل نموده و دستگاه استخراج مکرر توسط حلال آماده سازی می شود. استفاده از سنگ جوش(جهت جلوگیری از تاخیر در نقطه جوش)، شستشوی کامل و کردادن با حلال یعنی متانول امری ضروری است. نمونه به مقدار کافی درون کارتوش‌های(انگشتانه کاغذی) تمیز و کرداده شده با آب ریخته و مقداری از حجم کارتوش(یک سانتی‌متر) خالی می‌ماند. سوکسله‌ها با سود ۵۰ درصد (حجم مصرفی ml۲۰۰) شستشو داده شده تا چربی‌های متصل به سیستم برای عملیات قبلی رفع گردد. در نهایت با متانول کرداده شدند. در هر کارتوش از شش کارتوش مورد استفاده با کاغذ صافی واتمن و نخ تمیز می‌بندیم و مخزن هر سوکسله یا متانول به حجم لازم پرمی‌گردد.

برای پرکردن سوکسله از آب باید دقت کرد که طول سیفون خارجی کاملا پر نشود تا نمونه موجود در کارتوش‌ها کاملا خیس بخورد و حلال را به طور کلی جذب نماید. سپس به اندازه قبلی (حدودml ۱۵۰) متانول افزودیم تا درون بالون‌ها ذخیره گردد. مقدارآب به اندازه‌ای بود که پس از تبخیر و میعان در مبرّد، بتواند به طور مجدد توسط سیفون‌های خروجی به بالون برگردد. دمای سیستم در حدود کم تر از $50^{\circ}C$ تنظیم گردید. تا زمانی که محلول درون ستون سوکسله بی رنگ نشده عمل استخراج ادامه یافت و هنگامی که آب یا محلول ستون سوکسله کاملا بیرنگ شد، استخراج کامل شده(۴۰ ساعت) و دیگر هیچ ماده موثره‌ای در نمونه کارتوش وجود نداشت. محلول متانولی درون بالون‌ها به رنگ سبز تیره در آمده و حاوی کلروفیل، چربی‌ها و ترکیبات فنولی و تاننی بود.

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های اسانس به وسیله دستگاه GC-MS

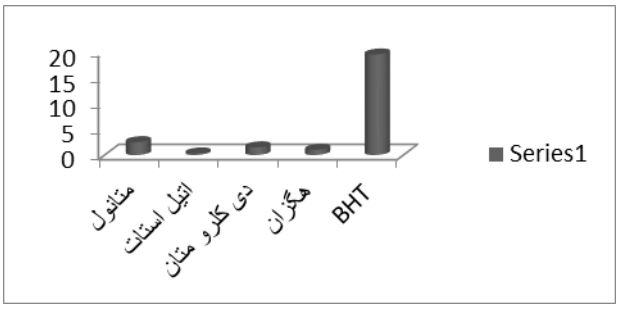
نمونه‌های اسانس به دست آمده، به وسیله دستگاه GC/MS حاوی ستون HP- 5MS (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر، ضخامت لایه ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) و گاز حامل هلیم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹۹ آنالیز شدند. در ضمن سرعت جریان گاز حامل۱ میلی لیتر بر دقیقه و انرژی یونش در طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت انتخاب گردید. برنامه دمایی دستگاه به این صورت تنظیم گردید: ابتدا دما به مدت ۲ دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد، سپس به دمای ۱۳۰ سانتیگراد با سرعت ۵ درجه بر دقیقه افزایش یافت، و به مدت ۲ دقیقه دراین دما باقی ماند، سپس با سرعت ۳ درجه بر دقیقه به دمای ۲۰۰ سانتیگراد افزایش یافته و به مدت ۲ دقیقه در این دما باقی ماند و در نهایت با سرعت ۲۰ درجه بر دقیقه به دمای ۲۸۰ سانتیگراد رسید [۳و۲].

ارزیابی اثر ضداکسیدانی

در این پژوهش در بررسی ظرفیت ضداکسیدانی نمونه‌ها، از بین موارد نام برده، از روش آزمایش بی‌رنگ شدن بتا کاروتن در حضور لینولئیک اسید، DPPH و اندازه‌گیری مقدار تام فنول استفاده شده است. رادیکال ۲و ۲- دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل یک رادیکال نیتروژنی آلی پایدار به رنگ بنفش تیره است که به صورت تجاری در دسترس است. تست DPPH ساده و سریع بوده و در آن کاهش ظرفیت ضداکسیدانی به رادیکال DPPH ارزیابی می‌شود. در طی افزایش مقادیر مختلف ضداکسیدان، رنگ DPPH زایل شده و به سمت زرد پیش می‌رود و این تغییر رنگ را می‌توان در طول موج nm ۵۱۷ با دستگاه UV-Vis بررسی کرد. مولکول‌های کوچکی که راحت‌تر به قسمت رادیکالی دسترسی دارند ظرفیت ضداکسیدانی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند [۱۳-۴] . برای رسم نمودار درصد مهار بر حسب غلظت، درصد مهار هر یک از محلول‌ها، با توجه به جذب محلول‌های تهیه شده و جذب محلول شاهد قابل محاسبه است [۴] .

جدول۱) نتایج کلی DPPH

عصاره	IC_{50} (µg/ml)
BHT	۱۹/۵۰
متانول	۲/۵۰
اتیل استات	۰/۳۱
دی کلرومتان	۱/۵۰
هگزان	۱/۰۰



شکل ۱) نمودار مربوط به نتایج کلی DPPH

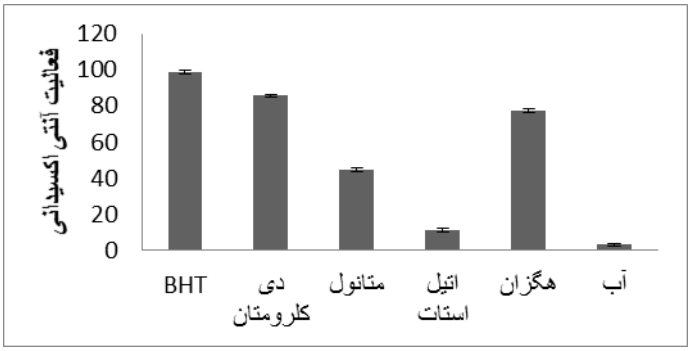
بر طبق نتایج موجود در جداول نمودارهای بالا، عصاره های این گیاه در حلال های دی کلرو متان، متانول، اتیل استات و هگزان به ترتیب دارای IC_{50} برابر ۱/۵۰، ۲/۵۰، ۰/۳۱، و µg/ml ۱ می‌باشند.

آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید

در این آزمایش لینولئیک اسید در محیط آبی اشباع از اکسیژن مولکولی (O_2) اکسید شده و به رادیکال آزاد مربوطه LOO. تبدیل می‌شود. این رادیکال آزاد در مرحله بعد با جذب هیدروژن اتمی (H.) از بتا- کاروتن موجب اکسید شدن آن و زایل شدن رنگ زرد نارنجی ناشی از آن می‌شود. وجود ماده ضداکسیدان در محیط می‌تواند با بتا- کاروتن در دادن هیدروژن اتمی رقابت نموده و از زایل شدن رنگ جلوگیری نماید. این آزمایش نمونه‌ای از سنجش به روش انتقال اتم هیدروژن است و در آن میزان زوال رنگ بتا- کاروتن با سنجش میزان جذب نور آن در طول موج ۴۹۰nm معین می‌شود [۱۳-۱۰]. نتایج درصد بازداری نمونه‌های گیاهی و استاندارد در جدول ۲ ارایه شده است.

جدول۲) درصد بازداری لینولئیک اسید

BHT	آب	هگزان	اتیل استات	متانول	دی کلرومتان	%AA
۹۷/۷۸	۳/۱۴۲۳	۷۳/۵۶۷۴	۱۰/۳۵۱۲	۴۶/۵۸۰۴	۸۲/۴۳۹۹	
۹۹/۰۷	۲/۰۳۳۲۷	۷۷/۴۴۹۱	۱۲/۵۶۹۳	۴۳/۹۹۲۶	۸۷/۰۶۰۹	
۹۹/۶۳	۳/۸۸۱۷۰	۸۱/۳۳۰۸	۱۰/۵۳۶۰	۴۳/۴۳۸۰	۸۷/۲۴۵۸	
۹۸/۸۲	۳/۰۱۹۱۰	۷۷/۴۴۹۱	۱۱/۱۵۲۱	۴۴/۶۷۰۳۶	۸۵/۵۸۲۲	میانگین
۰/۹۴	۰/۹۳۰۳۵	۳/۸۸۱۷۰	۱/۲۳۰۷۴	۱/۶۷۷۲۲۲	۲/۷۲۲۹۰	انحراف معیار



شکل ۲) نمودار درصد بازداری لینولئیک اسید

در این آزمایش همانطور که در نمودار و جدول بالا نشان داده شده است، عصاره دی‌کلرومتان(۸۵/۵۸٪) و سپس عصاره هگزان (۷۷/۴۴٪) برگ این گیاه، بیشترین درصد مهار و عصاره اتیل‌استات (۱۱/۱۵٪) کمترین درصد مهار را نشان دادند. البته شایان ذکر است، چون عصاره‌های دی‌کلرومتان و هگزان تهیه شده، درصد مهار بالای ۵۰ را دارند؛ در مجموع ترکیبات ناقطبی و کم قطبی این گیاه از فعالیت ضداکسیدانی قابل ملاحظه‌ای برخوردار است.

آزمون ضدمیکروبی

عصاره‌های متانولی گیاه به صورت جداگانه در برابر مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها قرار گرفت. سویه‌های میکروبی توسط سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) جهت استفاده در این تحقیق ارایه شد. تعیین فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های خشک توسط روش انتشار در آگار (Disc diffusion assay) (NCCLS،۱۹۹۷) انجام شد [۱۳و۱۲].

نتایج به دست آمده به صورت هاله ممانعت از رشد مشاهده گردید. حساسیت میکروب‌های آزمایش شده نسبت به عصاره‌های گیاهی با اندازه‌گیری هاله ایجاد شده، به وسیله خط کش آنتی بیوگرام اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل به صورت جدول۳-۱۴ گزارش گردید. پس از مشخص شدن نمونه‌های گیاهی حساس به میکروب‌های آزمایش شده در روش Disc-diffusion، با تهیه رقت‌های مختلفی از عصاره‌های گیاهی، حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری تعیین و در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج به دست آمده به صورت هاله ممانعت از رشد مورد بررسی گردید. حساسیت میکروب‌های آزمایش شده نسبت به عصاره‌های گیاهی با اندازه‌گیری هاله ایجاد شده، بوسیله خط کش آنتی بیوگرام اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل به صورت زیر گزارش می‌گردد.

جدول۳) کنترل مثبت دیسک دیفیوژن جهت باکتری ها

	Gentamycin	Ampicillin	Fluconazole
E.coli ATCC 25922	14	19	-
Bacillus subtilis PTCC1715	10	21	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	17	0	-
Candida albicans ATCC 10231	-	-	38

جدول ۴) نتایج حاصل از دیسک دیفیوژن عصاره ها

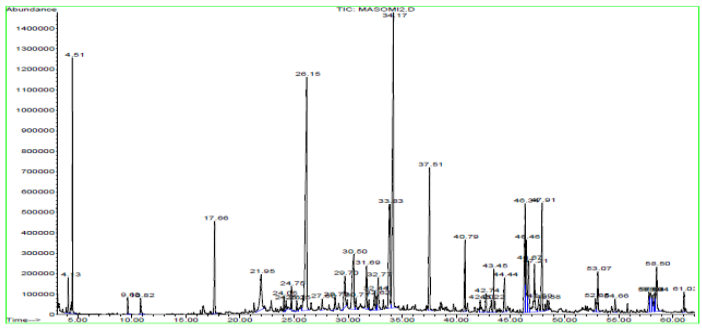
باکتری	عصاره اتیل استاتی(۱)	عصاره متانلی(۲)	عصاره هگزانی(۳)	عصاره دی کلرومتان(۴)
E.coli ATCC 25922	N	N	N	N
Bacillus subtilis PTCC1715	N	N	N	N
Staphylococcus ATCC 25923	N	N	N	N
Candida albicans ATCC 10231	N	N	N	N

N= No zone of inhibition

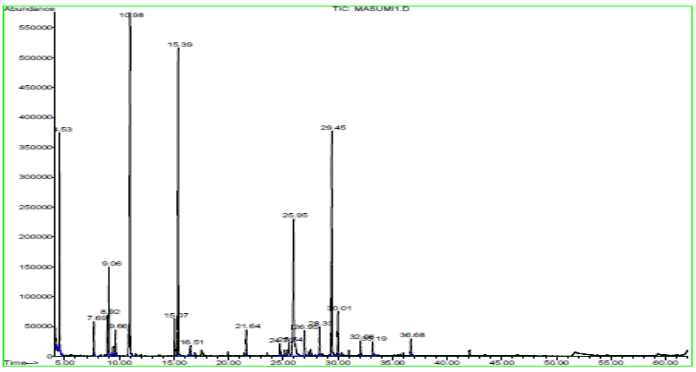
از بین سویه های مورد آزمایش، هیچ سویه‌ای به نمونه‌ها حساسیت نشان ندادند. به طوری که هیچ هاله ممانعت از رشدی، برای میکروب‌های مورد مطالعه مشاهده نشده و هیچ کدام از نمونه‌ها نتوانستند مانع رشد میکروب‌ها شوند. در بین نمونه‌ها، هیچ عصاره‌ای نتوانست مانع رشد هیچ کدام از باکتری‌های گرم مثبت شوند.

نتیجه‌گیری

در بین اجزای شناسایی شده در طیف اسانس برگ این گیاه، بیش‌ترین درصدها مربوط به: تترادکان (٪۱۴/۲۵)، ۴- هیدروکسی– ۶- متیل-۲- اچ- پیران-۲- اون (٪۴/۲۰)، هگزادکان(٪۶/۹۲)، ۲- اتیل هگزیل-۲- اتیل هگزانوآت (٪۱۵/۹۹) و ۲-هگزیل تیوفن (٪۵/۳۲) است. در عصاره هگزانی برگ های این گیاه بیش ترین درصدها مربوط به: اوکتان (٪۶/۱۴)، ۱و۸- سینئول (٪۱۹/۴۲)، جیرن (٪۱۸/۵۷)، ۴و۷- دی متیل-تتراهیدرو-۱- اون- سیکلوپنتا – سی- پیران (٪۱۴/۴۸) و جرماکرن(٪۱۵/۶۷) می باشد. در مجموع بیش‌ترین ترکیب‌های شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه عناب، جزو ترکیب‌های آلکانی، آلکنی، استری و کتونی هستند. با توجه به جدول نتایج اجزای تشکیل دهنده اسانس گیاه یاد شده، در بین ترکیب-های شناسایی شده در دو اسانس، ترکیب‌های اسانسی و سبک کم‌تر دیده می‌شود.



شکل۳) کروماتوگرام GC/MS حاصل از اسانس



شکل۴) کروماتوگرام GC/MS عصاره حاصل ازاستخراج با هگزان

با توجه به میزان اسانس و ترکیبات اسانسی این گیاه، به نظر می‌رسد که این گیاه را می‌توان یک گیاه اسانس‌دار به حساب آورد. این گیاه از لحاظ خاصیت ضداکسیدانی قوی می‌باشد و در نتیجه دارای مولکول های ضداکسیدانی قوی که می‌توانند رادیکال‌های DPPH را مهار کنند. پس می‌توان از آن در صنایع داروسازی و آرایشی بهداشتی استفاده کرد.این گیاه از لحاظ ضدمیکروبی غیرفعال می‌باشد و مانع از رشد باکتری‌ها نمی‌شود. پس نمی‌توان از آن در صنایع غذایی و داروسازی به عنوان ضدمیکروب استفاده کرد. پیرو نتایج ضداکسیدانی عصاره‌های این گیاه در حلال‌های دی کلرومتان، متانول، اتیل استات و هگزان که به ترتیب دارای IC_{50} برابر ۱/۵۰، ۲/۵۰، ۰/۳۱، و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد؛ خالص‌سازی، شناسایی و جداسازی ساختارهای مولکولی طبیعی با فعالیت ضداکسیدانی بالا در عصاره گیاه و استفاده از آن ها به عنوان جایگزین مناسب ضداکسیدان‌های سنتزی و نیز خالص‌سازی، شناسایی و جداسازی فیتومولکول‌های با خاصیت ضداکسیدانی و بیولوژیکی قوی از عصاره دارای خاصیت ضدمیکروبی و هم چنین بررسی فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبی گونه‌های دیگر عناب از کشور ایران در راستای فراهم کردن یک منبع غنی و مستعد عوامل ضداکسیدانی و حتی ضدمیکروبی فعال طبیعی پیشنهاد می‌شود.

مراجع

1. Flora Iranica.Lfg.125: Browicz, Kazimierz and Jerzy Zielinski. (1977) , Rhamnaceae. **16** Tafeln. 28 p. gr8vo. Broschiert.

2. Lalitha, P., D. Eswaran, M. Gnanasekar, K.V.N. Rao and R.B. Narayanan et al. Development of an antigen detection Elisa for the diagnosis of Brugian and Bancroftian filiariasis using antibodies to recombinant filarial antigens Bm-SXP-1 and Wb-SXP-1. (2002), Microbiol. Immunol., **46**, 327-332.

3. Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Asma Mazoochi, Fereshteh Jookar Kashi, Zahra Djafari-Bidgoli and Hossein Batooli. (2010), Food and Chemical Toxicology. **48**, 1371–1376.

4. Abdolhamid Bamoniri, Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Asma Mazoochi, Mohsen Behpour, Fereshteh Jookar Kashi and Hossein Batooli. (2010), Food Chemistry. **122**, 553–558.

5. Masaki Inoue, Kazuhiro Ohtani, Ryoji Kasai, Mayu Okukubo, Marta Andriantsiferana, Kazuo Yamasaki and Tohru Koike. (2010), Phytochemistry. **70**, 1195–1202.

6. Samejo MQ, Memon S, Bhanger MI and Khan KM, Nat Prod Res. (2010), 1478-6419.

7. B. Tepe, D. Dafera and M. Sokmen. (2010), Food Chemistry. **90**, 333-340.

8. V. L. Singleton, R. Orthorfer and R. M. Lamuela. Raventos, Meth Enzymol.(2010), 299, 152.

۹- زبردست، م. (۱۳۸۵)، " *بررسی فیتوشیمیایی گیاه سماق*"، پایان نامه کارشناسی ارشد فیتوشیمی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

10. Hanskell CM. Cancer Treatment. 4th ed. W. B. Saunders Company. (2010),USA, pp: 31 – 57.

11. M. G. Miguel. (2010),“ *Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants*”. A review, Flavour and Fragrance Journal, DOI 10.1002/ffj.

12. Rezaeipoor-Kardost R. Cytikines and therapy. Fatemieh University of Medical Sciences. (2010), Iran, pp: 61 – 95.

13. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE and McLaughlin JL. Brine Shrimp .(2010),“ *A convenient general bioassay for active plant constituents*”. Planta Medicine. **45**, 31 –34.