مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
پاییز ۱۳۹۳؛۶(۳): ۶۲۷-۶۳۴

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Autumn2014;6(3): 627-634

مقاله پژوهشی

بررسی ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف اندام هوایی گیاه دارویی Dracocephalum kotschyi

منصوره کمالی[۱]، سوسن خسرویار[۲]، محمد رضا جلیلوند[۳]*

[۱] کارشناس ارشد مهندسی شیمی، بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، ایران
[۲] دکترای مهندسی شیمی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، ایران
[۳] کارشناس ارشد علوم تغذیه، مرکز تحقیقات سلامت فراورده های طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی
پست الکترونیک: susankhosroyar@yahoo.com

وصول: ۹۳/۱/۱۸ اصلاح: ۹۳/۳/۵ پذیرش:۹۳/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: *زرین گیاه یکی از گیاهان دارویی بومی ایران و از خانواده نعناعیان است که از لحاظ دارویی بسیار ارزشمند می باشد و در طب سنتی از این گیاه در کاهش تب، درد مفاصل و روماتیسم و به عنوان ضد التهاب و التیام دهنده زخم استفاده می شود و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزماریک اسید و مونوترپن می‌باشد ولی به دلیل برداشت بی رویه در معرض انقراض است.*

مواد و روش کار: *پس از تهیه عصاره‌های مختلف از جمله هگزانی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی زرین گیاه به روش ماسراسیون، ویژگی های آنتی اکسیدانی آنها توسط دو روش آنتی اکسیدانی: روش ۱) به دام اندازی رادیکالهای دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) بر مبنای توانایی هیدروژن دهی و روش ۲) بررسی قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) سنجش شد. بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و ویتامین C جهت مقایسه به عنوان کنترل مثبت به کار رفتند. در این مطالعه همچنین میزان فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین سنجیده شد.*

یافته ها: *نتایج نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت عصاره بود و همچنین بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره متانولی و پایین ترین فعالیت در عصاره هگزانی مشاهده شد و محتوای فنل و فلاونوئید کل در عصاره متانولی بالاتر از بقیه عصاره ها بود، از طرفی رابطه مستقیم بین خاصیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل و فلاونوئید به دست آمد(R^2= ۰/۹۱۷ ,۰/۸۸۵).*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که در غلظتهای بالاتر، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر عصاره ها حاصل شد و از طرفی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نقش عمده و مستقیمی بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی بر عهده دارند که این امر مطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص سازی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه می طلبد.*

واژه های کلیدی: *آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین، Dracocephalum kotschyi*

مقدمه

واکنشهای بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیومولکولها را دارا می-باشند که این اثر زیانبخش رادیکال‌های آزاد می‌تواند توسط مواد آنتی اکسیدان بلوکه شود [۱]. آنتی اکسیدان هایی که در بدن تولید می شوند با دو سیستم دفاع آنزیمی و غیرآنزیمی به مقابله با رادیکال آزاد می پردازند و این ترکیبات از یک طرف باعث کاهش خطر ابتدا به بیمار یهای قلبی عروقی و سکته می‌شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطانها که موجب آسیب به DNA می‌شوند جلوگیری می‌کنند [۲]. شواهد بسیار زیادی وجود دارد که سمی بودن و اثرات سوء تغذیه ای آنتی اکسیدانهای ساختگی اضافه شده به مواد غذایی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)و بتا هیدروکسی کینون را تایید می‌کند [۳]. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدانها بوده و

باعث حفاظت سلولها از آسیب‌های اکسیداتیو می‌شوند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می‌باشد [۴]. آنتی اکسیدانهای طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانهای پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماریها مانند سرطان، بیماریهای قلبی و سکته مغزی می‌شوند [۵]. دو روش عمده جهت اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی، روش به دام اندازی رادیکالهای دی فنیل پیکریل هیدرازیل (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl: DPPH) بر مبنای توانایی هیدروژن دهی و روش بررسی قدرت احیاکنندگی آهن (Ferric reducing antioxidant power: FRAP) می باشد [۶] که به طور گسترده به منظور ارزیابی فعالیت رادیکال آزاد بکار می‌روند که از مزایای آن ها، عدم وابستگی به قطبیت نمونه می‌باشد [۷]. جنس Dracocephalum از مهمترین جنس‌های تیره نعناعیان بوده که شامل ۱۸۶ گونه می‌باشد که ۸ گونه از آن در ایران می‌روید و یکی از گونه‌های مهم بومی این جنس Dracocephalum kotschyi می باشد که در قسمت‌هایی از شمال، غرب و مرکز ایران یافت می شود [۸]. گیاه Dracocephalum kotschyi با نام بادرنجبویه دنایی و زرین گیاه معرفی شده است و از مصارف دارویی این گیاه در مناطق مختلف می توان به تسکین درد و التهاب و نیز رفع ناراحتی های روماتیسمی اشاره نمود، این گیاه در بیشتر مناطق شناخته شده بوده و اهالی مناطق مختلف آن را بسیار ارزشمند می دانند و برای جمع آوری این گیاه با بقیه رقابت می کنند [۹]. برداشت بی رویه این گیاه در مرحله گلدهی توسط افراد بومی مانع از به بذر نشستن این گیاه شده و در نتیجه باعث کاهش جمعیت این گیاه در محل شده است به طوریکه گفته می‌شود بادرنجبویه دنایی یکی از گیاهان در معرض انقراض ایران می‌باشد [۱۰]. تحقیقات اخیر نشان داده که Dracocephalum kotschyi از لحاظ دارویی ارزشمند بوده و در طب سنتی از این گیاه در کاهش تب، درد مفاصل و روماتیسم و به عنوان ضد التهاب و التیام دهنده زخم استفاده می شود، این گیاه در تقویت سیستم ایمنی نیز نقش دارد و حاوی اسانس، فلاونوئید، رزماریک اسید و گلیکوزیدهای مونوترپن می باشد و از آن دو ترکیب جدید مونوترپنوئیدی جدا شد [۱۱] اسانس گیاهان موجود در جنس Dracocephalum دارای خاصیت دارویی بوده و فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی را دارا هستند و همچنین خاصیت آنتی باکتریال و ضد عفونی کننده را دارا هستند، و جهت درمان درد معده و نفخ به کار می‌روند [۱۲]. اسانس گیاه Dracocephalum kotschy*i* به عنوان یک داروی مردمی و عامل ضد انقباض به کار می‌رود [۱۳] و ترکیبات عمده اسانس این گیاه شامل ژرانیول و لیمونن می باشد [۱۴]. در برگهای گیاه Dracocephalum kotschyi ترکیبی به نام Spinal-z وجود دارد که از سالهای پیش در درمان سرطان مورد استفاده قرار می گرفته است و همچنین ترکیب فلاونی به نام xanthomicrol در این گیاه وجود دارد که از تکثیر سلولهای سرطانی بدخیم جلوگیری می‌کند [۱۵]. از اندام های این گیاه، ۷ ترپنوئید و فیتواسترول جدا شده است که به عنوان ضد درد در موش مورد آزمایش قرار گرفته است [۱۶]. در بررسی آنتی باکتریال اسانس گیاه Dracocephalum foetidum مشخص شد که اسانس این گیاه فعالیت آنتی باکتریال بالایی را بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد و ترکیبات عمده آن لیمونن، ژانیول و نرال می‌باشد [۱۷]. از عصاره اتیل استاتی اندام های هوایی گیاه Dracocephalum subcapitatum ۵ فلاونوئید calycopterin, xanthomicrol, isokaempferide luteolin , apigenin و ۵ ترپن oleanolic acid, ursolic acid, geranial, neral, limonene-10-al به دست آمد [۱۸]. یک دی ترپن جدید به نام komarovispirone از گیاه Dracocephalum komarovi به دست آمد [۱۹]. در بررسی دیگری مشخص شد که عصاره هیدروالکلی و فراکسیون پلی فنلی گیاه Dracocephalum kotschyi به میزان بالایی سطح کلسترول و تری گلیسرید خون را کاهش می دهد [۲۰]. در بررسی انجام شده بر روی گیاه Dracocephalum moldavica، هیدروکسی سینامیک اسید، کافئیک اسید و فرولیک اسید ،رزمارینیک اسید، لوتئولین و آپی ژنین به دست آمد و فعالیت آنتی اکسیدانی آن سنجیده شد و مشخص شد که خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی دارد [۱۲]. از فراکسیون اتیل استاتی Dracocephalum peregrinum ۳ فلاونوئید گلیکوزیله جدید جدا شد [۲۱]. تاکنون مطالعات بسیار

اندکی بر روی این گیاه انجام گرفته است و با توجه به عدم وجود مطالعات آنتی اکسیدانی بر روی این گیاه و اثرات سودمند این جنس از گیاهان، مطالعه خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه مورد توجه قرار گرفت. با توجه به اینکه استفاده از حلال های مختلف، طیف ترکیبات مختلف با غلظت های مختلف را استخراج می نماید در این مطالعه به منظور بررسی بهتر اثر این گیاه از سیستم حلال های مختلف استفاده گردید.

روش کار

تهیه نمونه گیاهی: اندام هوایی گیاه Dracocephalum kotschy*i* از رویشگاه های طبیعی آن واقع در استان خراسان شمالی و در فصل بهار جمع آوری گردید و بعد از خشک کردن در سایه از آنها جهت آزمایش‌ها استفاده شد.

تهیه عصاره: جهت تهیه عصاره ها ابتدا ۱۰۰گرم پودرگیاه تهیه و سپس از روش خیساندن در حلالهای مختلف و به ترتیب قطبیت از حلال های هگزان، دی کلرومتان، اتیل استات، متانول استفاده شد و عصاره های حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ شدند.

سنجش آنتوسیانین: برای سنجش میزان آنتوسیانین کل، مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱٪ در متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس، محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از محلول اسید کلریدریک ۱٪ در متانول به عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید [۲۲].

$$A = A_{۵۳۰} - (۰/۲۵ \times A_{۶۵۷})$$

A: جذب محلول (اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شده است).

تعیین محتوای ترکیبات فنلی: محتوای فنل کل در عصاره های مختلف اندام هوایی زرین گیاه بر اساس روش فولین سیوکالتیو انجام شد [۲۳]. طبق این روش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت-۱میلی گرم بر میلی لیتر به ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین اضافه گشته و و پس از گذشت ۱ دقیقه ، ۱/۵ میلی لیتر از سدیم بیکربنات ۲۰٪ به هر لوله اضافه گشته و سپس ورتکس گشته و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می شود. جذب نمونه در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده می شود. منحنی استاندارد توسط محلولهای ۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر از گالیک اسید در متانول تهیه شد. محتوای فنل کل به صورت معادل اکی والان گالیک اسید بیان شد (میلی گرم گالیک اسید/ گرم وزن عصاره) که این ترکیب یک ترکیب مرجع جهت تعیین محتوای فنل می باشد [۲۳].

تعیین محتوای فلاونوئید: محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد[۲۴]. طبق این روش ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره با ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظتهای مختلف کوئرستین ۱۲/۵- ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید به صورت اکی والانهای کوئرستین / گرم وزن عصاره خشک بیان شد.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی: روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH)diphenyl-1-picrylhydrazyl: در این روش ۳/۹ میلی لیتر از DPPH استوک ساخته شده (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول) را داخل لوله آزمایش ریخته و سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر عصاره را به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده و میزان جذب آن در ۵۱۷ nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله $I(\%)= 100\times (A_0 - A_s)/A_0$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) و A_s جذب نمونه بود. سپس نتایج بصورت IC_{50} (مقداری از آنتی اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید [۲۵].

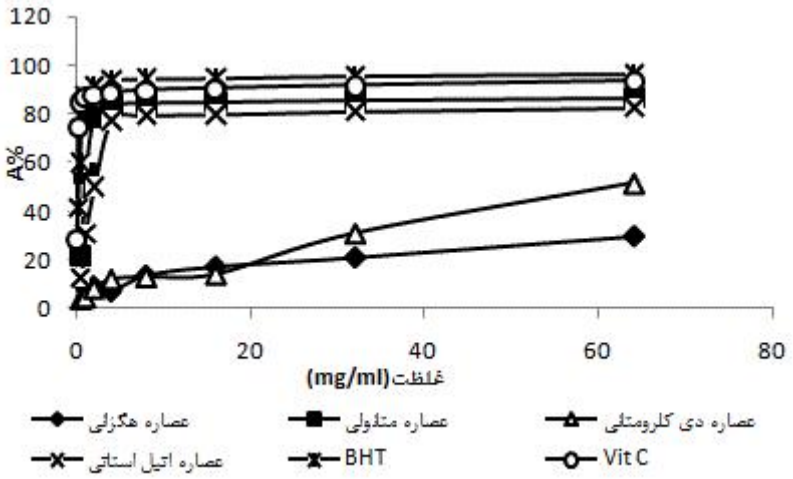
بررسی قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP): فعالیت آنتی اکسیدانی احیا کنندگی آهن بر اساس روش Benzie انجام شد [۲۶]، طبق این روش معرف FRAP شامل محلول ۲ و ۴ و ۶ تری پیریدیل تریازین ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و $FeCl_3.6H_2O$ ۲۰ میلی مولار و بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با PH ۳/۶ به نسبت (۱۰:۱:۱). در این روش ویژگی الکترون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان‌ها در pH پایین موجب احیاء کاتیون فریک به فروس می‌شود. بنابراین قادرند کمپلکس بی‌رنگ فریک-تری‌پیریدیل-تریازین را به کمپلکس آبی رنگ فروس-تری‌پیریدیل-تریازین تبدیل نمایند که در طول موج ۵۹۳ نانومتر جذب دارد. به منظور سنجش این ویژگی، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی بدست آمده ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه گردید. مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۳۷ انکوبه شد. جذب محلول‌ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به همراه ۳ میلی‌لیتر معرفFRAP)، خوانده شد. آمونیوم فروس سولفات به عنوان شاهد برای مقایسه بکار رفت [۲۷].

یافته ها

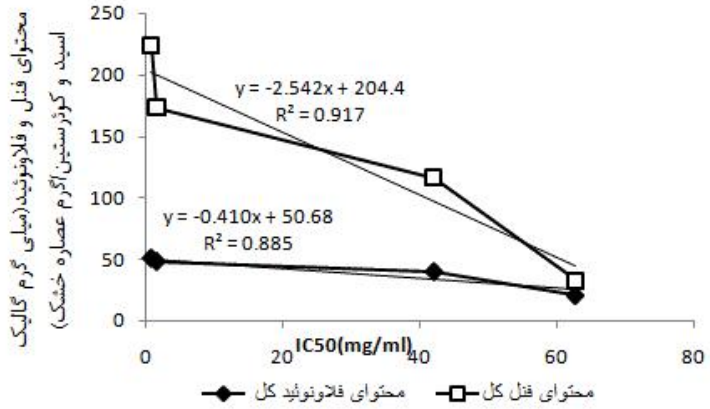
درصد عصاره خشک هگزانی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی در جدول ۱ آمده است به طوریکه مشخص می شود عصاره متانولی بالاترین درصد عصاره را دارد و در نتیجه با توجه به حضور ترکیبات قطبیتر در این فراکسیون، مشخص می شود که زرین گیاه بیشتر حاوی ترکیبات قطبی از جمله ترکیبات گلیکوزیله می باشد. میزان آنتوسیانین موجود در اندام هوایی زرین گیاهی بر اساس معادله (۱)، ۷/۹۵ میلی گرم بر گرم بافت خشک گیاه می باشد. معادله حاصل از منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه محتوای فنل کل به صورت $Y=0.003X+0.061(R^2=0.985)$است و براساس این معادله، محتوای فنل عصاره‌های مختلف اندازه گیری شد، که داده‌های آن‌ها در جدول ۱ داده شده است. معادله مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه محتوای فلاونوئید کل به صورت $Y=0.004X+0.006(R^2=0.996)$ است و محتوای فلاونوئید اندازه گیری شده عصاره های مختلف در جدول۱ آورده شده است.

جدول۱: بازده استخراج، محتوای فنل و فلاونوئید تام و میزان IC_{50} و محتوای FRAP جهت تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف زرین گیاه در مقایسه با کنترل های مثبت

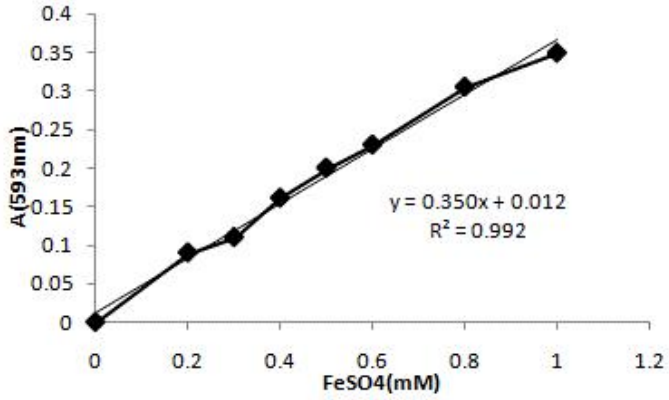
عصاره	بازده استخراج(%)	محتوای فنل کل (میلی گرم گالیک اسید/ گرم عصاره خشک)	محتوای فلاونوئید کل(میلی گرم کوئرستین/ گرم عصاره خشک)	IC_{50} (mg/mL)	محتوای FRAP (میلی مول Fe^{2+} \ گرم گیاه خشک)
هگزانی	۰/۸۱	۳۲/۹۱	۲۰/۷۸	۶۲/۷	۰/۰۶۰۷
دی کلرومتانی	۲/۴۲	۱۱۶/۲۵	۳۹/۷۲	۴۲/۰۸	۰
اتیل استاتی	۰/۷۰	۱۷۳/۳۳	۴۷/۸۴	۱/۶۰	۲/۵۱۵
متانولی	۱۱/۱۱	۲۲۲/۹۱	۵۰/۴۱	۰/۸۰	۳۲/۳۵۷
BHT				۰/۵۷	
ویتامین C				۰/۱۵	



شکل ۱: فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های زرین گیاه با روش DPPH



شکل ۲: رابطه بین مقدار فنل و فلاونوئید کل در عصاره های زرین گیاه و IC_{50}



شکل ۳: منحنی استاندارد $FeSO_4$ جهت تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP

ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی با تست DPPH: میزان مهار غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در دقایق مختلف در شکل ۱ و IC_{50} در جدول ۱ آورده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت تاثیر معنی داری بر مهار رادیکال آزاد دارد و با افزایش غلظت افزایش میزان مهار رادیکالهای آزاد مشاهده شد و آنتی اکسیدانهای سنتزی فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان دادند (شکل ۱). معمولا جهت مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره مختلف از فاکتوری تحت عنوان IC_{50} استفاده می شود که به غلظتی از عصاره گفته می‌شود که در آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار می شوند و هرچه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری دارد که در این مطالعه کمترین میزان IC_{50} را عصاره متانولی را دارا بود.

نتایج تست FRAP: منحنی استاندارد محلول آمونیوم فروس سولفات در شکل ۳ آورده شده است و نتایج مربوط به عصاره های مختلف بر حسب معادل میلی مول یون فروس تولید شده بر گرم وزن گیاه بیان شد که در جدول ۱ آورده شده است و هرچه این میزان احیاکنندگی بیشتر باشد خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر است.

بحث

استفاده صحیح از گیاهان دارویی مستلزم شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست زیرا وجود ترکیبات شیمیایی است که باعث اثر درمانی در گیاه می گردد. در این تحقیق نیز آزمایش ها وجود ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیک را تایید می نمایند. عصاره نعناع و رزماری ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بالایی دارند و فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی رانشان می دهند [۲۹،۲۸]. نتایج این آزمایش نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها رابطه مستقیم با مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل و آنتوسیانینی دارد، به طوریکه مشاهده می‌شود عصاره متانولی با بالاترین میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دارای بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی در هر دو روش FRAP و DPPH است. در این مطالعه همچنین فرضیه وجود رابطه مستقیم بین خاصیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل و فلاونوئید سنجیده شد و مشخص شد که رابطه موثر و مثبتی بین محتوای فنل وIC_{50} ($Y=-2.542X+204.4$, $R^2=0.917$) و محتوای فلاونوئید و IC_{50} ($Y=-0.410X+50.68$, $R^2=0.885$) وجود دارد، به طوریکه بسیاری از مطالعات دیگر نیز این رابطه مستقیم را نشان داده بودند ولی در تعدادی از مطالعات هیچ رابطه مستقیمی بین محتوای فلاونوئید و خاصیت آنتی اکسیدانی نشان داده نشد [۳۰-۳۲]. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره ها از جمله عصاره های قطبی باشد [۳۳]. با مراجعه به شکل ۲ مشاهده می شود که بین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف اختلاف معنی داری وجود داشته و به عبارت دیگر میزان اثر آنتی اکسیدانی در تست وابسته به غلظت می باشد و با افزایش غلظت خاصیت آنتی اکسیدانی نیز بالاتر می رود. در شکل ۱ مشاهده می شود که ترتیب افزایش IC_{50} با مقایسه ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها به صورت عصاره هگزانی، عصاره دی کلرومتانی، عصاره اتیل استاتی، عصاره متانولی می باشد و در نتیجه می توان گفت عصاره متانولی با وجود داشتن کمترین میزان IC_{50} بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را در این روش دارد و همچنین در روش FRAP با بالاترین میزان احیاکنندگی آهن، خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری را در این روش از خود نشان داد ولی عصاره دی کلرومتانی این گیاه هیچ خاصیت آنتی اکسیدانی را در روش FRAP از خود نشان نداد و هیچگونه کمپلکس آبی رنگی را از خود نشان نداد. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده لذا به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل می کنند [۳۴] و دانشمندان براین باورند که فعالیت آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها که ترکیبات فنلی ویژه ای هستند، به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آنها می باشد [۳۵] و در بررسی دیگری که محققین خاصیت آنتی اکسیدانی گونه دیگری از این جنس به نام Dracocephalum integrifolium را با روش DPPH انجام دادند، مشخص شد که عصاره این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی داشته ولی از BHT کمتر است [۳۶] در بررسی دیگری نیز بر روی گیاه Dracocephalum Integrifolium

.Bge محتوای فنل تام سنجیده شد و مشخص شد که میزان ترکیبات فلاونوئیدی گلیکوزیله از آگلیکون فلاونوئیدی بیشتر بود [۳۷] که در مطالعه حاضر نیز خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ها از BHT کمتر بود ولی عصاره متانولی با داشتن IC_{50} نزدیک به BHT می تواند جایگزین مناسبی برای آن باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره متانولی زرین گیاه با خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی که دارد، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان سنتزی BHT باشد و از طرفی ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی در گیاه Dracocephalum kotschyi نقش عمده ای در بالا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی و اتیل استاتی این گیاه دارند، که این امر مطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثره این گیاه به ویژه عصاره های اتیل استاتی و متانولی را می طلبد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج شده از طرح پژوهشی با کد ۹۲پ ۶۸۱ می باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی حمایت مالی شده است. بدین وسیله از ریاست و معاونت محترم مرکز تحقیقات سلامت فراورده های طبیعی خراسان شمالی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

References

1. Kris-Ethertonm PM, Hecker K.D, Bonanome A, Coval S.M, Binkoski A.E , Hilpert, K.F, Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, American Journal of Medicine 2002;113:71-88.
2. Noguchi N, Niki E, Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis, Free Rad Biol Med 2000;28(10):1538-1546.
3. Frankel E.N, Recent advances in lipid oxidation, J Sci Food Agric 1999;54:495-511.
4. Kumaran A, Karunakaran R.J, Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus, Food Chemistry 2006;97:109-114.
5. Mathew S, Abraham T.E, In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies, Food Chem Toxicol 2006;44:198-206.
6. Chung Y.C, Chien C.T, Teng K.Y, Chou S.T, Antioxidative and mutagenic properties of Zanthoxylum ailanthoides Sieb & zucc, Food Chem 2006;97:418-425.
7. Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L, using a suitable extraction procedure, Food Chemistry 2007;100(2): 584-589.
8. Rechinger K. H, Flora Iranica: Labiatae, Vol. 150, Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz, 1986:218-230.
9. Dostalek T, Munzbergova Z, Plackova I, Genetic diversity and its effect on fitness in an endangered plant species, Dracocephalum austriacum L, Conservation Genetics 2010;11(3):773-783.
10.Jalali A, Jamzad Z, Red Data Book of Iran, Research Institute of Forests and Rangelands, Iran, Tehran:1999,748[Persian]
11.Saeidnia S, Gohari A.R, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F, Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from Dracocephalum kotschyi, Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2004;52(10):1249-1250.
12.Dastmalchi K, Dorman H.J.D, Kosar M, Hiltunen R, Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extract. FOOD SCI. TECHNOL 2007;40: 239-248.
13.Omidbaigi R, Production and processing of medicinal plants,Vol. 3 (5th), 2005[Persian]
14.Saeidniaa S, Goharia A.R, Hadjiakhoondib A, Shafieec A, Bioactive Compounds of the Volatile Oil of Dracocephalum kotschyi. Z. Naturforsch 2007;62:793-796[Persian]
15.Jahanian F, Ebrahimi S.A, Rahbar Roshandel N, Mahmoudian M, Xanthomicrol is the main cytotoxic component of Dracocephalum and a potential anti-cancer agent, Phytochemistry 2005 ;66(13):1581-92.
16.Golshani S, Karamkhani F, monsef esfehani H.R, Abdollahi M, Antinociptive effects of the essential oil of Dracocephalum kotschyi in the mouse writhing test, Journal of Pharmaceutical Sciences 2004;7(1):76-79[Persian].
17.Lee S.B, Cha K.H, Kim S.N, Altantsetseg Sh, Shatar S, The Antimicrobial Activity of Essential Oil from Dracocephalum foetidum

against Pathogenic Microorganism, The Journal of Microbiology, 2007:53-57.
18.Saeidnia S, Gohari A. R, Ito M, Kiuchi F, Honda G, Bioactive constituents from Dracocephalum subcapitatum (O. Kuntze) Lipsky. Z. Naturforsch 2005**;** 60**:**22-24[Persian]
19.Uchiyama N, Ito M, Kiuchi F, Honda G, "et all", A trypanocidal diterpene with novel skeleton from Dracocephalum komarovi, Tetrahedron Letters 2004;45:531–533.
20.Sajjadi E , Atar M, Yektaian A, Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract and polyphenolic fraction from Dracocephalum kotschyi Boiss, Pharmaceutica Acta Helvetiae 1998;73: 167–170[Persian]
21.Peng F,Chun-Chao Z, Jian T,Yun-Heng S,Xi-ke X, Wei-Dong Z, New Flavonoid Glycosides and Cyanogenic Glycosides from Dracocephalum peregrinum, Chem. Pharm. Bull 2009; 57(2): 207-210.
22.Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K, Mutants of Arabidopsis thaliana with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars, Plant Journal 1997;11:841-851.
23.Hayouni E.A, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts, Food Chemistry 2007;105(3):1126-1134.
24.Chang C, Yang M, Wen H, Chern J, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, Journal of Food and Drug Analysis 2002; 10: 178-182.
25.Brand-Williams, W, Cuvelier M. E, Berset C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 1995**;**28:25-30.
26.Benzie I.F.F, Strain J.J, Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Methods Enzymol 1999;299:15-27.
27.Then M, Szentmihaly K, Sarkozi A, Varga I.S. Examination on antioxidant activity in greater celandine (Chelidonium majus L.) extracts by FRAP method, Acta Biologica Szegediensis 2003; 47(1-4) :115-117.
28.Swetie R, Raesh Ch, Arun S, Antioxidant potential of mint (Mentha Spicata L.) in radiation processed lamb meat, Food Chem 2007;100(2):451-458
29.Elmasta M, Drirtas I, Isildak O, Aboul-Enein HY, Antioxidant activity of S-Carone isolated from Spearmint (Mentha Spicata L.), Liquid Chromato Related Technol 2006; 29(10):1465-1475.
30.Tawaha K, Alali F, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T, Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species, Food Chem 2007;104:1372-1378.
31.Miliauskas G, Venskutonis P.R, Van Beek T.A, Screening of 520 radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, Food Chem 2004; 85:231-237.
32.Chan E, Wong C.Y.K, Wan C.W," et all", Evaluation of anti-oxidant capacity of root of Scutellaria Baicalensis Georgi, in comparison with roots of Polygonum multiflorum Thunb and Panax ginseng Ca Meyer. Am. J. Chin. Med 2010;38(4): 815–827.
33.Bahramikia S, Yazdanparast R, Antioxidant and free radical scavering activities of different fractions of anethum graveolens leaves using in vitro models, Pharmacol online 2008;2:233-219[Persian].
34.Golluce M, Sahin F, Sokmen M, "et all",Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia, Food Chem 2007;103:1449-1456.
35.Baumann J, Wurn G, Bruchlausen F.V, Prostaglandin synthetase inhibiting O-2 radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds, Arch Pharmacol 1979; 307:73-78.
36.Zhong Y, Li J.C, Liu Y.M, Su J.x, Study on Antioxidant Activity of Dracocephalum integrifolium, Food and Nutrition in China 2011:05.
37.Zhang F, Studies on Flavonoids Extraction Process of Dracocephalum Integrifolium Bge, Guangdong Chemical Industry;2011:10.

Original Article

Evaluation of phenolic, flavonoids, anthocyanin Contents and antioxidant Capacities of different extracts of aerial parts of Dracocephalum kotschyi

Kamali M[1], Khosroyar S[2], Jalilvand M.R[3]*

[1]MSc, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
[2]Department of chemical engineering, Quchan branch, Islamic Azad university, Quchan, Iran
[3]Department of Nutritional Sciences, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

***Corresponding Author:** Quchan branch, Islamic Azad university, Quchan, Iran
Email: susankhosroyar@yahoo.com

Abstract

***Background & Objectives** : Dracocephalum kotschyi is one of the medicinal plants in Lamiaceae family and native to Iran, In traditional medicine, this plant is used for treatment fever, joint pain , rheumatism and is used as an anti-inflammatory and contains essential oils, flavonoids, Rosmarinic acid and monoterpene but it is endangered due to indiscriminate harvesting.*

***Materials and Methods**: After preparation of different extracts such as Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate and Methanol of kotschyi, their antioxidant properties were measured by two methods, DPPH and FRAP. BHT and vitamin C were used as positive control for comparison. In this study, the amount of phenols, flavonoids and anthocyanins were also measured.*

***Results**: The results showed that the antioxidant activity was dependent on concentration and the highest antioxidant activity was observed in Methanolic extract and the lowest activity in the hexane extract .Total phenol and flavonoid content of the Methanolic extract was higher than other extracts. However, It was a direct relationship between flavonoid and phenolic content and antioxidant activity (R^2=0.917, 0.885).*

***Conclusion**: The more antioxidant activity of extracts was obtained in the higher concentration, Furthermore the results showed that flavonoids and phenolic compounds had a major role in the antioxidant activity and more studies are needed for the isolation and purification of specific active components of this plant.*

***Keywords**: antioxidant, phenols, flavonoids, Anthocyanin, Dracocephalum kotschyi*

Submitted:7 Apr 2014
Revised:26 May 2014
Accepted: 2 Aug 2014