مقاله
پژوهشی

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و سنجش میزان فنول تام و فلاونوئید عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی اندام هوایی گیاه روناس صخره زی Rubia florida

سمیه صالح آبادی[1]، معصومه مهربان سنگ آتش[2*]

[1]کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
[2]استادیار گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری موادغذایی جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری موادغذایی جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران
پست الکترونیک : mehraban@acecr.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *فرآیند اکسیداسیون, امری ضروری جهت بقای موجودات زنده جهت تولید انرژی برای فرآیندهای بیولوژیکی می باشد. نکته حائز اهمیت آن است که در بین عوامل اکسید کننده و آنتی اکسیدان تعادل وجود داشته باشد تا شرایط بهینه فیزیولوژیکی در بدن حفظ گردد. ذخایر آنتی اکسیدانی نقش موثری در کاهش اختلالات ناشی از افزایش تولید رادیکال های آزاد ایفا می کنند. این پژوهش فنل تام و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف اندام های هوایی روناس صخره زی Rubia florida را مورد بررسی قرار می دهد.*

مواد و روش کار: *پس از تهیه و جمع آوری روناس صخره زی و خشک نمودن آن ها در سایه در مجاورت هوا پودر گردیدند و عصاره‌های، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و متانولی به روش ماسراسیون تهیه شد. در این مطالعه برای ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی از آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و ویتامین C جهت مقایسه به عنوان کنترل مثبت به کار رفتند. در ادامه برای اندازه گیری ترکیبآت آنتی اکسیدانی آزمون فنل تام و فلاونوئید به کار رفت.*

یافته ها: *راندمان عصاره گیری به ترتیب بیشترین به کمترین متانولی>دی کلرومتانی> اتیل استاتی بدست آمد. بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظتهای بالاتر، عصاره ها حاصل شد و در میان حلال ها،عصاره متانولی پیشتاز بود و بیشترین مقدار ترکیبات فنل و فلاونوئید برای حلال متانول بدست آمد.*

نتیجه گیری: *با توجه به اینکه بیشترین مقدار فنول و فلاونوئیدها در عصاره متانولی وجود دارد بنابراین می توان اثر آنتی اکسیدانی عصاره ها را به فنل ها و فلاونوئیدهای آن ها نسبت داد که بررسی این امر نیازمندمطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص سازی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه می باشد.*

واژه های کلیدی: *Rubia florida، فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول تام، فلاونوئید، DPPH*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۴، دوره ۷ (۱): ۱۱۲-۱۰۱
Journal of North Khorasan University 2015;7(1):101-112

وصول: ۹۳/۱۲/۱۲
اصلاح: ۹۴/۲/۱۵
پذیرش: ۹۴/۲/۳۰

مقدمه

امروزه بسیاری از متخصصین تغذیه برای تأمین آنتی اکسیدان های مورد نیاز بدن، مصرف گیاهان، میوه جات و سبزیجات را توصیه می نمایند، زیرا معمولاً مصرف آنتی اکسیدان های گیاهی عوارض جانبی کمتر و درمان بهتری ایجاد می نمایند [۱]. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می باشد. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان بوده می توانند باعث حفاظت سلول ها از آسیب های اکسیداتیو شوند [۲]. آنتی اکسیدانهای طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی آکسیدانهای پلاسما و کاهش ابتلا به بعضی بیماریها مانند سرطان، بیمارهای قلبی و سکته مغزی می شوند. متابولیت های ثانویه مشتق از گیاهان مانند فنول و فلاونوئید تام مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکال های آزاد می باشند که در تمام قسمت های مختلف گیاهی مانند برگ، میوه، دانه، ریشه و پوست وجود دارند [۳]. بنابراین با توجه به شیوع بالای بیماریهای مزمن و فرسایشی منطقی است که برای تأمین آنتی اکسیدانهای مورد نیاز بدن از گیاهان استفاده شود و به خصوص گیاهانی که فنول و فلاونوئید تام بالایی داشته باشند.

آنتی اکسیدان ها موادی هستند که در غلظت های کم قادر به پیشگیری و یا به تاخیر انداختن اکسیداسیون ناشی از گونه های فعال اکسیژن می باشند [۴]. امروزه استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار رواج یافته است. اما مطالعات متعددی حاکی از سمیت این آنتی اکسیدان ها می باشد [۵]. به همین دلیل یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی به ویژه از منابع گیاهی و استفاده از آن ها در پزشکی، کشاورزی و صنایع دارویی بسیار مطلوب است تا علاوه بر داشتن اثرات بیولوژیک وسیع، احتمال ایجاد اثرات جانبی و مسمومیت با آن ها به خصوص در دوزهای کنترل شده کاهش یابد [۶]. در سال های اخیر مطالعات وسیعی بر روی گیاهان عالی و اسانس ها و عصاره های حاصل از آن ها برای یافتن ترکیبات آنتی اکسیدان انجام شده است. به طوری که گزارش شده است رابطه معکوسی بین سطح مواد آنتی اکسیدان موجود در بدن و بیماری های انسان وجود دارد [۷]. ویتامینC، ویتامین E، سلنیوم، کاروتنوئید ها (بتاکاروتن، آلفاکاروتن، لیکوپن) فلزاتی مانند مس، منگنز، روی و فلاونوئید هایی مانند کوئرستین (quercetin)، لوتئولین (Luteolin) و کاتچین (Catchin) از مهم ترین آنتی اکسیدان های طبیعی هستند [۸]. در بین ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی پلی فنول ها، فلاونوئید ها و ترکیبات فنولی که پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند بسیار مورد توجه هستند [۱۰،۳۱]. فنول‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان نقش‌های مختلفی بر عهده دارند؛ برای مثال آنتوسیانین‌ها در گلبرگ مسئول ایجاد رنگ‌های مختلف هستند، که این امر در جلب گرده افشان‌ها و بقای گیاهان اهمیت زیادی دارد و فلاون‌دی‌ال‌ها در برگ نقش حفاظتی در برابر اشعه ماورا بنفش دارند. بر همین اساس گل و برگ دو اندام اصلی ذخیره کننده این ترکیبات به شمار می‌روند. از طرف دیگر در برگ‌ها به علت انجام فتوسنتز، پیش ماده‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها (مسیر شیکمیک اسید) نسبت به دیگر اندام‌ها فراوان‌تر هستند. این مسئله نیز از دیگر عوامل بیشتر بودن ترکیبات فلاونوئیدی برگ نسبت به گل و دیگر اندام‌ها است [۱۱،۹]. گیاه چند ساله روناس با نام فارسی روناس، و نام علمی Rubia tinctorum از خانواده روناس می باشد. مطالعات بسیاری بر روی گونه های مختلف جنس Rubia صورت گرفته است [۱۲]. گیاه روناس عمدتاً صنعتی است که در صنعت رنگرزی از ایام پیش مورد استفاده قرار می گرفته است. افزون بر این، این گیاه دارای ویژگی های دارویی (ضد سرطان و نقرس) است. روناس گیاهی است بسیار مقاوم در برابر شوری و گرما که در این مناطق بسیار خوب رشد می کند، بیشتر جنس ها و گونه ها در مناطق استوایی و نیمه استوایی و معدودی در مناطق معتدله سرد یافت می شوند [۱۳]. تیره روبیاسه که روناس به آن تعلق دارد نزدیک به ۴۶۰ جنس و ۷۰۰ گونه است که ۱۶ جنس و حدود۱۰۰ گونه از اعضاء این خانواده در ایران انتشار دارند که ازجنس های مهم این خانواده می توان روبیا (با ۱۳ گونه)، آسپرولا (با ۱۴ گونه)، گالیوم (با ۴۰ گونه)، کورکانیلا (با ۷ گونه)، نگالونیا (با ۶ گونه) را نام برد. حدود ۱۱۲ جنس و ۱۳۴۷ گونه در برزیل می روید. پراکنش این گیاه در ایران شامل

نواحی غربی کشور، اراک، تبریز، دیلمان، خوی، ارومیه، آذربایجان، کرمان، بلوچستان، یزد، اردکان و همچنین اطراف دماوند است [۱۴]. هدف از این تحقیق سنجش میزان خاصیت آنتی اکسیدانی، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئید روناس صخره زی، به منظور شناساندن این گیاه به جامعه داروسازان می باشد.

روش کار

تهیه نمونه گیاهی: اندام هوایی گیاه Rubia florida از رویشگاه های طبیعی آن واقع در استان خراسان شمالی و در اواخر اردیبهشت سال ۱۳۹۳ جمع آوری و توسط متخصص گیاه شناس شناسایی و در آزمایشگاه تحت شماره هرباریوم ۱-۲-۶۰ نگهداری شدند و بعد از خشک کردن در سایه، از آنها جهت آزمایش ها استفاده شد.

تهیه عصاره های مختلف: برای تهیه عصاره متانولی ، دی کلرو متانی و اتیل استاتی ۱۵۰ گرم از پودر برگهای گیاه بطور جداگانه توزین و در سه بشر ریخته شد و حلال ها اضافه شد. به هر ۱۵۰ گرم از پودر، ۲ سی سی حلال استفاده شده است. سپس با یک فویل آلومینیوم در بشر را بسته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و بر روی دستگاه شیکر به دور نور خورشید قرار داده شد تا حلال به درون آن نفوذ کند و عصاره گیاه خارج شود. پس از گذشت این زمان، عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی صاف گردید. مجدداً روی پودر گیاه حلال تازه ریخته و مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای اتاق روی دستگاه شیکر قرار داده شد. عصاره استخراج شده مجددا صاف گردید. سپس عصاره استخراج شده توسط دستگاه روتاری و در فشار کاهش یافته، در دمای ۴۰°C تغلیظ شد. عصاره ها باقیمانده تا حلال آن کاملاً تبخیر و نمونه خشک شده تهیه گردد [۱۵]. بدین ترتیب ۳ نوع عصاره متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی بدست آمد. عصاره های باقیمانده،تا زمان آزمون، در ظرف های در بسته و تیره، در یخچال نگهداری شدند.

تعیین میزان ترکیبات فنلی: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی، با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر (۲۵۰ میلی گرم عصاره برداشته و با آب مقطر به حجم ۲۵میلی لیتر رسید) در لوله‌های آزمایش ریخته شد. پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده، مقدار جذب نمونه‌ها نسبت به شاهد در ۷۲۰ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فنول‌کل موجود در عصاره‌ها محاسبه شد. در نهایت، داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن خشک گیاه بیان گردید [۱۶].

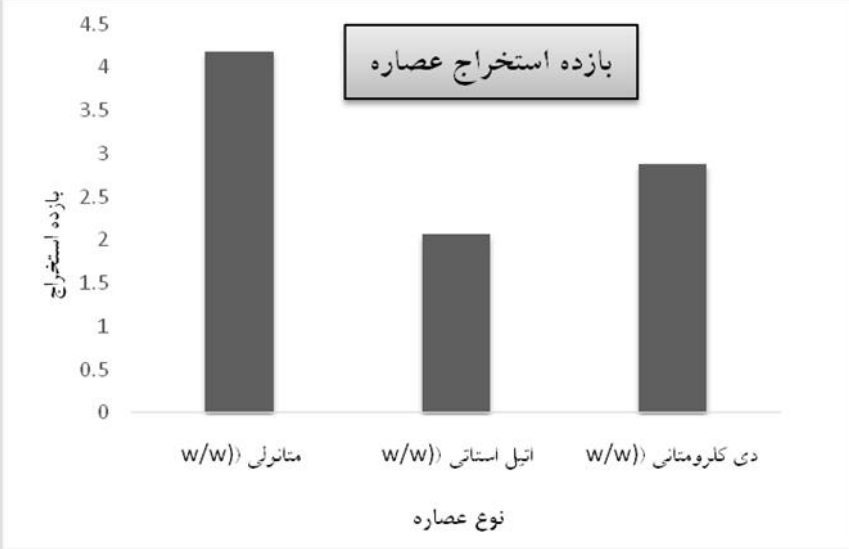
تعیین میزان فلاونوئید: محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد [۱۷]. طبق این روش ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ با ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره و ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظتهای مختلف کوئرستین ۱۲/۵- ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید به صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم وزن عصاره خشک بیان شد.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی: ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد (DPPH)diphenyl-1-picrylhydrazyl: ابتدا ۲/۵mL از محلول متانولی نمونه مورد نظر در یک لوله ی آزمایش ریخته شد. سپس به آن ۱mL محلول متانولی DPPH اضافه شد. محتویات هر لوله با ورتکس کاملاً مخلوط شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۵۱۸nm با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/Vis در برابر بلانک حاوی متانول خوانده شد. در این روش از ویتامینC و BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به مکانیسم ذکر شده هرچه قدرت آنتی اکسیدان نمونه بیشتر باشد رنگ محلول حاصل زردتر است. 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 در صد مقدار اولیه برسد) بیان گردید [۱۹].

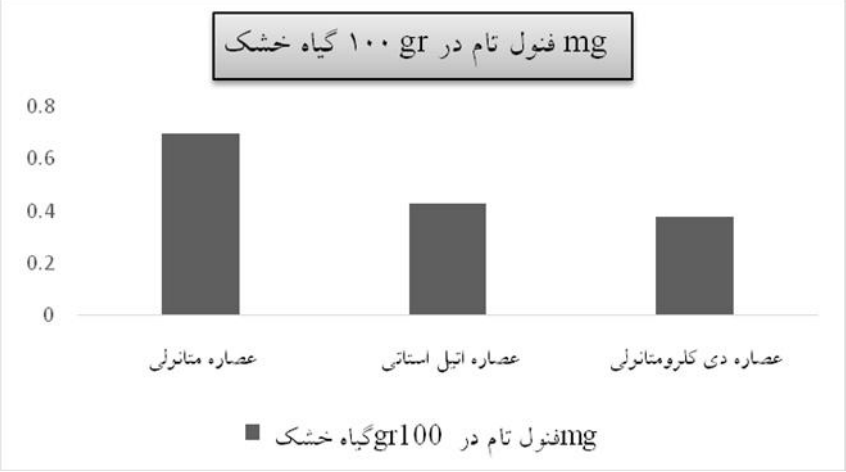
یافته ها

نتایج میانگین بازده استخراج عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی گیاه مورد بررسی، در شکل ۱

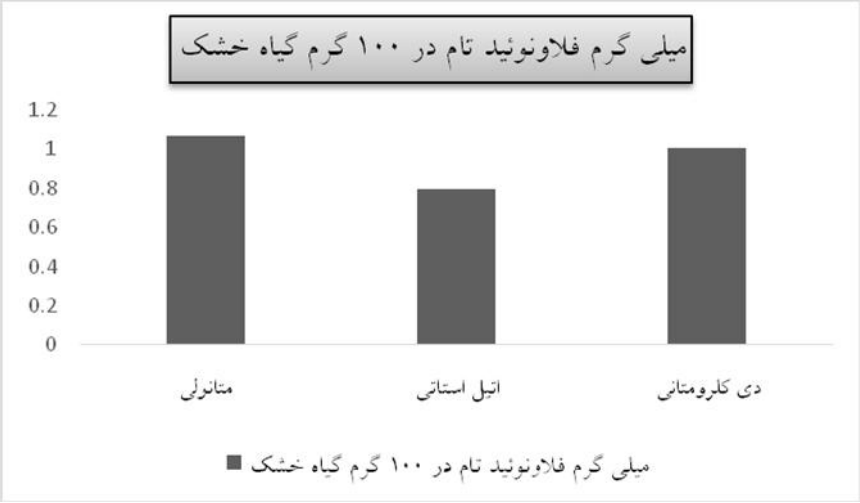
آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود عصاره متانولی، بیشترین بازده (۴/۷۲٪) و عصاره اتیل استاتی، کمترین بازده (۲/۰۶٪) را به خود اختصاص دادند. مقدار فنول تام موجود در هر عصاره متفاوت بوده و برحسب گالیک اسید که یک ترکیب فنولی خالص می باشد و از روی منحنی استاندارد آن به روش فولین سیوکالچو محاسبه شد. معادله حاصل از منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه محتوای فنل کل به صورت(R^2=0.9968) Y=0.0096X- 0.0108 است. در شکل ۲ میزان فنول تام موجود در یک گرم از عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی مقایسه شده است. در شکل ۳ میزان فلاونوئید تام موجود در یک گرم از عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی در یک گرم گیاه خشک مقایسه شده است. معادله حاصل از منحنی استاندارد کوئرستین به صورت Y=0.0046X+0.0067(R^2=0.9966) است. بیش ترین مقدار فنول تام و فلاونوئیدها در عصاره ی متانولی وجود دارد.



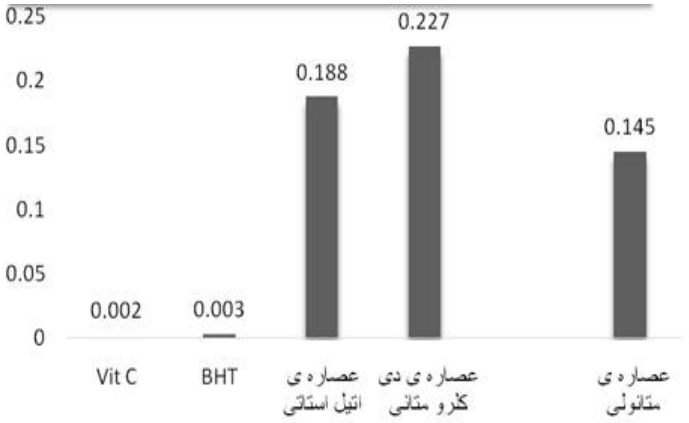
شکل ۱: نمودار درصد بازده عصاره ها



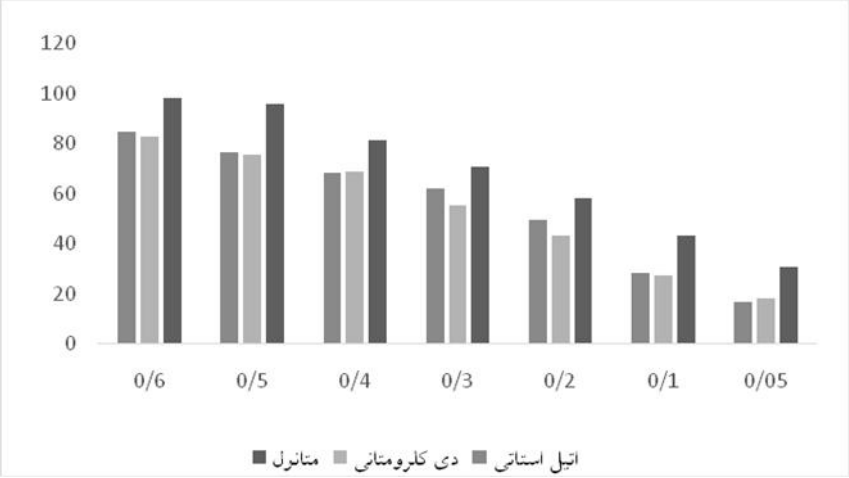
شکل ۲ : میزان فنول های تام موجود در عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی Rubia florida بر حسب گالیک اسید



شکل ۳: میزان فلاونوئیدهای تام موجود در عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی Rubia florida بر حسب کوئرستین



شکل ۴: اثر به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره متانولی،دی کلرومتانی و اتیل استاتی



شکل ۵: اثر به دام اندازی رادیکال DPHH در غلظتهای مختلف عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی

جدول ۱: میزان IC50 موجود در عصاره های مختلف

IC_{50}	نمونه ی مورد بررسی
۰/۱۴۵	عصاره ی متانولی روناس صخره زی
۰/۲۲۷	عصاره ی دی کلرو متانی روناس صخره زی
۰/۱۸۸	عصاره ی اتیل استاتی روناس صخره زی
۰/۰۰۳	BHT
۰/۰۰۲	Vit C

روش ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد با تست DPPH: مقادیر IC50 بدست آمده در عصاره های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. برای محاسبه ی IC_{50} عصاره های متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی گیاه روناس صخره زی و استاندارد BHT و ویتامینC از نرم افزار BioDataFit 1.02: Data Fit For Biologists استفاده شد و نمودارها به کمک EXELL2010 رسم گردید. 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 نیز، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان دادند (شکل ۴).

بحث

عوامل مختلفی از جمله قطبیت حلال بر بازده استخراج عصاره اثر می گذارند از سویی باید خصوصیات حلال را نیز در نظر داشت. مثلاً حلالیت ترکیبات قندی در الکل هایی چون متانول کم است. با افزایش مراحل استخراج نیز کارایی به نحو مؤثری افزایش می یابد. همچنین از لحاظ تجاری، در بررسی کارایی روش یا حلال استخراج، بازده استخراج و هم پارامترهای اقتصادی (مثل قیمت حلال) اهمیت دارند. متانول از لحاظ قطبیت بین حلال های کاملا قطبی و غیر قطبی قرار دارد [۲]. که در این مطالعه عصاره متانولی بیشترین بازده را به خود اختصاص داد.در شکل ۲ پس از عصاره ی متانولی، عصاره ی اتیل استاتی مقدار ترکیبات فنولی بیش تری نسبت به عصاره ی دی کلرومتانی دارد، لازم به ذکر است ترکیبات فنلی توانایی زیادی برای پاک سازی رادیکال های آزاد را دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه های آروماتیک و ماهیت گروه های هیدروکسیل دارد [۵]. بنابراین می توان انتظار داشت که اثر آنتی اکسیدانی عصاره متانولی از عصاره ی دی کلرومتانی بیش تر باشد. نقش ترکیبات پلی‌فنولی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH اساسی است و به علت شرکت داشتن در بو، رنگ و مزه در گیاهان نیز اهمیت دارندکه این اثرات به علت وجود مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی اکسیدان در گیاه می باشد [۲۰]. همانطور که در شکل ۳، مشاهده می شود؛ پس از عصاره ی متانولی، عصاره ی دی کلرومتانی و سپس عصاره ی اتیل استاتی بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را دارا می باشند.که احتمالا می تواند دلیل افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره دی کلرو متانی نسبت به عصاره اتیل استاتی (در غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۴میلی گرم بر میلی لیتر) باشد. با توجه به این که عصاره متانولی از توانایی بالاتری در مهار رادیکال آزاد داراست، بنابراین می توان اثر آنتی اکسیدانی عصاره ها را به فلاونوئیدهای آن ها نیز نسبت داد. ضرورت برخی از فلاونوئیدها که نقش دفاعی در گیاهان دارند نیز تاکید شده است [۳۲،۲۷]. سوروسواران و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، ۱۳۳ گونه گیاه دارویی هند از ۶۴ خانواده به روش ABTS، DPPH و FRAP، و کل محتویات فنولی نیزبه این نتیجه دست یافتند که روابط مستقیم بین فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنولی کل وجود دارد [۲۱]. آدمولا[1] و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه ای با هدف بررسی آزمایشگاهی پتانسیل آنتی اکسیدانی برگ و میوه درختچه Nauclea latifolia، از خانواده (Rubiaceae) که بومی آفریقای استوایی و آسیا است، انجام دادند. برای پلی فنولی کل، فلاونون، و محتوای فلاونول آنها وتوانایی مهار ۱ دی فنیل-۲-picrylhydrazyl (DPPH)، کاهش قدرت اکسیدانی آهن (FRAP)، Trolox ظرفیت هم ارزی آنتی اکسیدان عصاره آبی از برگ و میوه Nauclea latifolia (TEAC)، و سنجش ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (ORAC) مورد بررسی قرار گرفت. عصاره آبی برگ شامل سطح بالاتر از کل پلی فنول (۰/۰۲۳ ± ۱۱/۶۳ GAE mg / گرم)، فلاونون (۰/۱۰ ± ۱/۴۵ میلی گرم CE / گرم)، و فلاونول (گرم / ۰/۳۷mg QE ± ۲/۲۲) نسبت به عصاره میوه با ارزش ۰/۰۲± ۱/۷۵ میلی گرم GAE / گرم (پلی فنول کل)، ۰/۰۱ ±۰/۱۵ CE mg / گرم (فلاونون) و (فلاونول) گرم/ QE mg ۰/۱۳ ± ۱/۰۰ بود. به طور مشابه، عصاره آبی برگ نیز به نمایش بالاتر DPPH (میلی لیتر/ IC50 ۲۰/۶۴mg)، FRAP (3/46 μmol AAE/g)، TEAC (۸۶/۱۰± گرم / میکرو مول TE ۹۴/۸۳ ± ۳/۵۷)، و ORAC (۱۹۶/۵۵ ± ۰/۰۷۳ میکرو مول TE /

1 -Ademola

گرم) از عصاره میوه با DPPH (میلی لیتر / mg ۱۲۰/۳۳ IC50)، FRAP (گرم /میکرو مول AAE ۰/۴۰±۱۲/۲۳)، TEAC (گرم / میکرو مول TE ۰/۲۱ ±۱۲/۴۸) و ORAC (گرم/ میکرو مول TE ۰/۰۷۳ ±۵۸/۸۸). مطالعه آزمایشگاهی حاضر نشان داد که برگ latifolia Nauclea پتانسیل آنتی اکسیدانی قوی با نشان فعالیت بالاتر از آنتی اکسیدان میوه ها دارد [۳۵]. از آنجا که آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئیدها تحت تاثیر بلوغ قرار می‌گیرند بنابراین کاهش میزان فلاونوئیدها در طی بلوغ می‌تواند به علت کاهش سنتز آنها و یا تجزیه و تبدیل آنها به دیگر متابولیت‌های گیاهی باشد که فلاونوئیدها به سرعت در بافت‌ها طی تقسیم سلولی سنتز می‌شوند و سپس سنتز آنها در فاز طویل شدن سلول کند می‌شود [۲۴] بررسی عصاره‌های متانولی مناطق مختلف نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنولی بر حسب گالیگ اسید (۱/۵ ±۴۲/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و آنتوسیانینی بر حسب سیانیدین ۳- گلوکوزید (۰/۰۷ ± ۱/۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به میوه‌های قره قاط منطقه کلاردشت بوده است و همچنین میوه‌های این منطقه نیز از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر۰/۰۷ ±IC_{50}:۰/۱) در مقایسه با سایر مناطق برخوردار هستند. بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بر حسب کوئرستین (۰/۰۷ ± ۲/۹ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به برگ منطقه ماسوله می‌باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده از جوهرپورکار و همکاران (۲۰۰۳) که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره الکلی ریشه های Rubia cordifulia linn را در شرایط درون بدن بررسی و اثر آن بر اختلالات ناشی از افزایش پاسخ های ایمنی اتانول را مطالعه نمودند و مشاهده کردند که با تجویز اتانول ،پاسخ ایمنی هومورال و نوعی سلول واسطه، اگوسیتوز، شاخص فاگوسیتوز و فعالیت های TLC، GSH، CAT و SOD کاهش یافت و LPO را افزایش داد و همزمان تجویز روزانه (RC) از اثرات اتانول جلوگیری کرد و قابل مقایسه با ترکیب ویتامین E و C بود، بتوان به نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و درمانی گیاه روناس صخره زی (Rubia florida) در شرایط بدن امیدوار بود، ضمن اینکه هردو گونه از لحاظ جنس مشابه می باشند [۲۹]. در این تحقیق برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان .Rubia florida L از روش DPPH استفاده شد. آزمون DPPH می تواند در ارزیابی آنتی اکسیدان های جدید برای تخمین سریع و به دست آوردن اطلاعات اولیه از توانایی. این آزمون در روبشگری رادیکال توسط ترکیبات، کمک کند. این روش حساس بوده و به مقادیر کمی از نمونه نیاز داردو در آن توانایی ترکیبات به عنوان دهنده ی اتم هیدروژن یا الکترون به رادیکال DPPH و احیای آن با روش اسپکتروفتومتری بررسی می شود. توانایی ترکیبات در تغییر رنگ محلول متانولی DPPHاز بنفش به زرد، نشان دهنده ی میزان اثر آنتی اکسیدانی آن ها می باشد [۳۰].

از آن جایی که روش DPPH یک روش آبی است، بنابراین عصاره های قطبی تر اثر بیش تری از خود نشان می دهند که این مطلب نیز با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که روش DPPH برای تعیین اثر آنتی اکسیدان ترکیبات هیدروفیل مناسب تر است. شکل ۴ اثر به دام اندازی رادیکال DPPHتوسط عصاره ها را در مقایسه با ویتامین C و BHT نشان می دهد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود، با افزایش غلظت، درصد مهاراکسیداسیون درعصاره ها افزایش یافت و در تمامی غلظت ها درصد مهار اکسیداسیون عصاره های متانولی بیش تر می باشد، با توجه به اینکه در غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۴(شکل ۵) درصد مهار آنتی اکسیدانی عصاره دی کلرومتانی بالاست و در بقیه غلظت ها، درصد مهار آنتی اکسیدانی عصاره اتیل استاتی بالاتراست در نتیجه، عصاره حاصل از برگ های خشک این گیاه می تواند به عنوان منابع بالقوه آنتی اکسیدان های جدید باشد. همانطور که مشاهده می شود، در روش DPPH، عصاره متانولی در تمام غلظت ها دارای بالاترین درصد مهار اکسیداسیون و کم ترین IC_{50}(۰/۱۴۵ میکروگرم در میلی لیتر) بود، و عصاره دی کلرومتانی نیز بیشترین میزان IC_{50} (۰/۲۲۷ میکروگرم در میلی لیتر) را نشان داد. بین عصاره اتیل استاتی و متانولی تفاوت معنی دار وجود نداشت اما اختلاف بین عصاره متانولی (۰/۱۴۵ میکروگرم در میلی لیتر)، دی کلرو متانی (۰/۲۲۷ میکروگرم در میلی لیتر) و اتیل استاتی

(۰/۱۸۸ میکروگرم در میلی لیتر) قابل ملاحظه بود. این نتایج حاکی از آن است که علاوه بر روش انتخاب شده جهت بررسی قدرت آنتی اکسیدان عصاره ها، نوع و قطبیت حلال مورد استفاده [۳۳]، غلظت های بکار رفته و خصوصیات طبیعی و فیزیکوشیمیایی ترکیبات مورد مطالعه نیز موثر می باشد [۳۰]. همچنین هر سه عصاره ی متانولی، دی کلرومتانی و اتیل استاتی این گیاه نسبت به ویتامین C و BHT (کنترل مثبت) در تمام سطوح به طور معنی دار اثر کمتری داشتند. نتایج مشابه برای ازگن و همکاران سال ۲۰۰۷ در ارزیابی فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره هگزان، دی کلرومتان و عصاره متانولی ریشه Onosma argentatum و بخش های زیر زمینی (ریشه و ریزوم) Rubia peregrine بدست آمد، بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۹۸٪) در غلظت ۰/۱٪ برای عصاره متانولی ریشه O. argentatum و در عصاره اتیل استات در غلظت ۰/۲۵٪ از peregrina .R فعالیت آنتی اکسیدانی(۹۶٪) مشاهده شد [۳۴] هر چه میزان IC_{50} کمتر باشد اثر آنتی اکسیدان بیشتر است زیرا قدرت مهار اکسیداسیون را با غلظت کمتری انجام می دهد، ویتامین سی (۰۰۲/ ۰میلی گرم در میلی لیتر) نسبت به سایر آنتی اکسیدان ها حلایت بیشتری در آب دارد، لذا منطقی به نظر می رسد که نسبت به BHT (۰/۰۰۳ میلی گرم در میلی لیتر) اثرات بیشتری داشته باشد [۳۵].

نتیجه گیری

در این مطالعه میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره متانولی نسبت به دیگر عصاره ها بیشتر بود . با توجه به این که عصاره متانولی از توانایی بالاتری در مهار رادیکال آزاد دارا بود، بنابراین می توان اثر آنتی اکسیدانی عصاره ها را به فنول ها و فلاونوئیدهای آن ها نسبت داد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد اخذ شده ۲۰۶۵۰۴۰۳۹۲۲۰۱۱ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان می باشد. در پایان از همکاری بیدریغ استادان فرزانه خانم دکتر آریان فر و آقای دکتر احمد پور کمال تشکر را داریم.

References

1. Frankel E N, Recent advances in lipid oxidation, J Sci Food Agric 1999; 54:495-511.
2. Kumaran A, Karunakaran R J, Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus, Food Chemistry 2006; 97:109-114.
3. 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.
4. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma O I, The characterization of antioxidants, Food Chem, Toxicol 1995; 33: 601-617.
5. Aruoma OI, Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions, J Am Oil Chem, Soc 1996; 73: 1617-1625.
6. Milos Hauskrecht, Value-Function Approximations for Partially Observable Markov Decision Processes, Journal of Artificial Intelligence 2000; 33–94.
7. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N, Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extract containing phenolic compounds, Food Chem 2006; 97: 654-660.
8. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H, Oxidative stress induced in pathologies, the role of antioxidant, Biomed. Pharmacother 1999, 53: 169-180.
9. Haraguchi H, Antioxidative plant constituents, In Bioactive Compounds from Natural Sources, Ed. Taylor & Francis 2001; 337-378.
10. Lee DS, Training, Wages and Sample Selection: Estimating Sharp Bounds on Treatment Effects, Review of Economic Studies 2009; 76: 1071–1102.
11. Davis MH, Meunier F, Marslen WD, Neural responses to morphological, syntactic and semantic properties of single words: an fMRI study, Brain and Language 2004; 89: 439-449.
12. Zargari A, Herbs, published by Tehran University, Tehran 1987; 4(5), 277-274[Persian].
13. Karodi R, Jadhav M, Rub R, Bafna A, Evaluation of the wound healing activity of acrude extract of Rubia cordifolia L. (Indianmadder) in mice, International Journal of Applied Research in Natural Products 2009; 2(2): 12-18.
14. Khorsandi F, Banakar MH, Salt Tolerance of Rubia tinctorum at Germination Stage, American-Eurasian J Agric & Environ, Sci 2011, 11 (4): 547-550.
15. Rojas G, Levaro J, Tortoriello J, Navarro V, Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory disease, J Ethnopharmacol 2001; 74: 97-101.
16. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG, Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity, Food Chemistry 2005; 91: 571-577.
17. 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.
18. 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.
19. Suhanya P, Juzaili B, Azizi R, Ismail S, Sasidharan S, Mahsufi M, Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from Mitragyna Speciosa (Rubiaceae Family) Leaves, Molecules 2009; 14: 3964-3974.
20. Deepa N, Kaura CH, Georgea B, Singhb B, Kapoor HC, Antioxidant constituents in some sweet pepper (Capsicum annuum L.) genotyps during maturity, LWT, Food Science and Technology 2007; 40: 121-129.

21. Siddharthan, S, Yi-Zhong C, Harold C, Mei S, Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants, Food Chemistry 2007; 102: 938–953.
22. Ranju P, Kundlik G, Ashutosh U, Thirumoorthy N, Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of Morinda citrifolia (Rubiaceae), African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2012; 6(5): 278-282.
23. Castillo D, Martine C, Stéphane B, Georges L, Christine P, Structure of the X−linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome, Nature Genetics 1992; 305 - 310
24. Ahmad R, Mahbob EN, Noor, ZM, Ismail NH, Lajis, NH, Shaari K, Evaluation of antioxidant potential of medicinal plants from Malaysian Rubiaceae (subfamily Rubioideae), African Journal of Biotechnology 2010; 9(46): 7948-7954
25. Mackerras D, Antioxidant health, Fruits and vegetables of supplements, Food Chemistry Australia 1995; 47: 3-23.
26. Lindley MG. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetable, Tren Food Sci 1998; 9: 336-340.
27. Ajayi F A, Lale NE. Susceptibility of unprotected seeds of local bambara groundnut cultivars protected with insecticidal essential oils to infestation by Callosobruchus maculates (Coleoptera: Bruchidae), J Stored Prod Res 2001; 37: 47-62.
28. Longo L, Scardino A, Vasapollo G, Identification and quantification of anthocyanins in the berries of Pistacia lentiscus L, Phillyrea latifolia L and Rubia peregrina L, Innovative Food Science & Emerging Technologies 2007; 8(3): 360-364.
29. Joharapurkar AA, Zambad SP, Wanjari MM, Umathe SN, In vivo evaluation of antioxidant activity of alcoholic extract of rubia cordifolia linn and its influence on ethanol-induced immunosuppression, Indian Journal of Pharmacology 2003; 35: 232-236
30. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milosa M, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, Food Chem 2004; 85:633-640.
31. Saha **A**, Moorthy K, Impact of precipitation on aerosol spectral optical depth and retrieved size distributions: A case study, Journal of Applied Meteorology 2004; 43: 902-914.
32. Singh R P, Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50: 81-86.
33. 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.
34. Ozkan G, Simsek B, Kuleasan H, Antioxidant activities of Saturejacilicica essential oil in butter and in vitro. Journal of Food Engineering 2007; 79: 1391- 1396.
35. Ademola O, Ayeleso O, Oguntibeju O, Nicole L, In Vitro Study on the Antioxidant Potentials of the Leaves and Fruits of Nauclea latifolia, Hindawi Publishing Corporation Scientific World Journal 2014; 69: 167-174.

Evaluation of the antioxidant activity and total phenols, flavonoids in methanolic, dichloromethane and ethyl acetate extracts of aerial parts of Rubia florida

*Salhe Abadi S[1], Mehraban Sang Atash M[2]**

[1] Msc of Department of Food Science and Thechnology,Quchan Branch,Islamic Azad University , Quchan, ,Iran
[2] Assistant Professor, Food Science and Technology Research Institute, ACECR Mashhad Branch , Mashhad, Iran
***Corresponding Author**: Assistant Professor, Food Science and Technology Research Institute, ACECR Mashhad Branch, Mashhad, Iran
E-mail: mehraban@acecr.ac.ir

Orginal Article

Journal of North Khorasan University 2015;7(1):101-112

Abstract

Background and objective: *Oxidation process, essential for the survival of living beings is to produce energy for biological processes. It is important to note that there is a balance between oxidizing agents and antioxidants to protect the body's physiological condition. Reserves antioxidant play effective role in reducing the disorders increased production of free radicals. This research evaluates the antioxidant activity and total phenols of extracts of aerial parts of saxicoline madder plant Rubia florida.*

Materials and Methods: *After preparing and collecting madder saxicoline and drying them in the shade, were dried in air and dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts was prepared by Masrasyvn. In this study, to evaluate the antioxidant DiPhenyl Pykryl Hydrazyl (DPPH) test was used. Hydroxy toluene (BHT) and vitamin C were used as positive control to compare. Then, to measure antioxidant compounds total phenols and flavonoid test was used.*

Result: *Extraction efficiency of the highest to the lowest methanol > dichloromethane > ethyl acetate was obtained. The best antioxidant activity in higher concentrations of the extracts was obtained and among solvents, methanol extract led and highest phenol and flavonoid compounds for methanol was obtained.*

Conclusions: *As regards phenols and flavonoids are highest in the methanol extract therefore, impute the effect of antioxidant extract to its phenols and flavonoids that further studies are needed to isolation and purification of this planet's phenolic and flavonoids compounds.*

Key words: *Rubia florida ,antioxidant, phenols, flavonoids, DPPH*

Recivied:8 June 2015
Revised:5 May 2015
Accepted:20 May 2015