مقاله
پژوهشی

بررسی کیفی و کمی آنتوسیانین ها، کاروتنوئیدها، پلی فنلها، فلاونوئیدها و عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره متانولی اندام هوایی گیاه دارویی Scutellaria pinnatifida A.Hamilt subsp alpina (Bornm) Rech.f

پیمان فیضی[1]، طوبی احمدزاده ثانی[2]، حسین کمالی[3]، پیمان آل شیخ[4]، پرستو ضرغامی مقدم[5]، آمنه محمدی[6*]

[1] کارشناس ارشد شیمی آلی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[2] دکترای حرفه ای داروسازی، دانشکده داروسازی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[3] کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[4] دکترای تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی ، بجنورد، ایران
[5] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی ، بجنورد، ایران
[6] کارشناسی ارشد فیتوشیمی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی ، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد
پست الکترونیک: Ameneh.mohamadi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *گیاه Scutellaria pinnatifida از خانواده نعناعیان، یکی از گیاهان دارویی بومی ایران بوده که در طب سنتی به عنوان ضد درد و ضدالتهاب مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی و انجام مطالعات فیتوشیمیایی اولیه بر روی این گیاه که بومی خراسان است، می باشد.*

مواد و روش کار: *در ابتدا عصاره متانولی اندام هوایی گیاه تهیه گردید، سپس حضور فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها و میزان آنها سنجش شد و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو شیوه مهارکنندگی رادیکال آزاد و قدرت کاهندگی آهن بررسی گردید.*

یافته ها: *نتایج، حضور فلاونوئیدها و آنتوسیانیها و عدم حضور تانن‌ها و ساپونین‌ها را نشان داد که محتوای آنتوسیانین ۰/۱۳±۷/۶۵ و محتوای فلاونوئید ۰/۰۱۱۵±۱۰/۸۶ میلی گرم بر گرم بافت خشک گیاه بود. درصد مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت افزایش یافته و بالاترین درصد مهار در غلظت ۳۲ mg/ml با قدرت ۸۵/۴٪، در مقایسه با BHT با قدرت ۹۵/۳۳ ٪ و ویتامین C با قدرت ۹۱/۵۸٪ بود که اختلاف چشمگیری نداشت. در بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی به روش کاهندگی آهن (FRAP)، عصاره متانولی با ۰/۰۵۲±۰/۸۱۶ میلی مول یون فروس نسبت به BHT از خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر و نسبت به ویتامین C از خاصیت آنتی اکسیدانی پایین تری برخوردار بود.*

نتیجه گیری: *عصاره متانولی سرشاخه Scutellaria pinnatifida دارای اثر آنتی اکسیدانی قابل توجهی می باشد. لذا توصیه می شود تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی ترکیبات اجزاء و ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف و خاصیت ضد سرطان گیاه انجام شود.*

واژه های کلیدی: *آنتی اکسیدان، فلاونوئید، آنتوسیانین، Scutellaria pinnatifida*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۴، دوره ۷ (۳): ۶۴۵-۶۵۵
Journal of North Khorasan University 2015;7(3):645-655

وصول: ۹۳/۱۲/۴
اصلاح: ۹۴/۲/۲۲
پذیرش: ۹۴/۵/۲۵

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

مقدمه

یکی از مشکلات بشر امروز، رویارویی با برخی بیماریهای مزمن و خطرناک مانند سرطان، بیماری های قلبی-عروقی و دستگاه تنفسی می باشد [۱]. رادیکال های آزاد و بطور کلی مواد اکسیدکننده در بدن موجودات زنده، در اثر واکنش های متابولیک گوناگون بطور مداوم تولید می شوند و با توجه به شناخت نقش رادیکالهای آزاد و مواد اکسیدان در ایجاد و پیشرفت این بیماری ها، اهمیت آنتی اکسیدان ها در رژیم غذایی به عنوان خنثی کننده اثرات تخریبی رادیکالهای آزاد احساس می گردد [۱]. مکانیسم های دفاعی مختلفی علیه رادیکال های آزاد در بدن وجود دارد که شامل مواد جمع کننده رادیکال های آزاد و مواد آنتی اکسیدان می باشند که به این واسطه تعادل مهم بین تولید و خنثی سازی رادیکال های آزاد را به وجود می آورند [۲]. عوارض جانبی داروهای شیمیایی و ناسازگاری آنها با طبیعت انسان، اهمیت ویژه ای برای شناخت و بررسی دقیق ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان دارویی و از جمله آنتی اکسیدان های طبیعی ایجاد نموده است [۴،۳]. جنس اسکوتلاریا، دارای ۳۵۰ گونه در جهان است [۵]. بسیاری از گونه‌های اسکوتلاریا دارای مقادیر بالایی فلاونوئید هستند، علاوه بر فلاونوئیدها، ترکیبات دی ترپنوئیدی و آلکالوئیدی نیز از این خانواده جداسازی شده است و تاکنون تعداد زیادی ترکیبات فلاونوئیدی و مشتقات آن‌ها با اثرات بیولوژیک قابل توجه شامل اثر آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک از گونه‌های متعلق به جنس مذکور استخراج شده‌اند [۶]. تاکنون گزارشات بسیاری راجع به اثرات ضد باکتری، ضد ویروس، ضد تومور، ضدتشنج و ضد اضطراب از گیاهان این گونه گزارش شده است [۶-۸]. یکی از اعضای این جنس، گونه اسکوتلاریا بایکالنسیس می‌باشد که حاوی ترکیباتی چون وگونین، بایکالئین، اسکوتلارین، بایکالین است که ریشه این گیاه یک داروی متداول مورد استفاده در طب سنتی چین بوده و به عنوان ضد درد و ضدالتهاب مصرف می شود [۷]. عصاره آبی اسکوتلاریا باربانا، فعالیت بازدارندگی رشد بر روی هشت خط سلولی سرطانی دارد [۸]. فلاونوئیدهای بایکالئین، بایکالین و وگونین استخراج شده از جنس اسکوتلاریا باعث تحلیل محتوای GSH در سلول‌های هپاتومای انسان شده و فعالیت ضد سرطان دارند [۹]. در سال ۲۰۰۹، مین، خواص ضد سرطان از اسکوتلاریا را گزارش کرد که ترکیبات اصلی اش بایکالئین، بایکالین، وگونین می‌باشد و فعالیت ضد سرطان این فلاون‌ها وابسته به توانایی شان در محافظت از رادیکال‌ها و ممانعت از عفونت‌های ویروسی می‌باشد [۱۰]. در مطالعات دیگر از دو گونه اسکوتلاریا ریوولاریس و اسکوتلاریا بایکالنسس فلاونوئیدهایی جدا شدند که شامل آپی‌ژنین، ۵،۷،۳′،۲′ تتراهیدروکسی فلاون، لوتئولین، وگونین، بایکالین و بایکالئین بودند که از تکثیر سلول‌های سرطان پروستات جلوگیری می‌کردند [۱۱]. عصاره متانولی اسکوتلاریا بایکالنسیس دارای اثرات بازدارندگی رشد بر روی تکثیر مونوسیت‌ها می‌باشد. بایکالئین، بایکالین، وگونین از فلاونوئیدهای مهم این گیاه بودند که وگونین بیشترین اثر را دارا بود [۱۲]. مطالعه بر روی اثر بازدارندگی رشد سلول‌های سرطانی سینه نشان داد که وگونین و بایکالئین، مانع رشد سلول‌های MCF-7 می‌شوند [۱۳]. در سال ۲۰۰۹ طیارانی نشان داد که عصاره اسکوتلاریا لیتوینوئی دارای اثرات ضد تکثیر بر روی رده های سلولی سرطانی می‌باشد که همچنین مشخص شد عصاره دی کلرومتانی آن در مقایسه با دیگر عصاره‌ها بیشترین خاصیت را دارا بود [۱۴]. در سال ۲۰۱۰ طیارانی نشان داد که عصاره دی کلرومتانی اسکوتلاریا لیندبرگی، دارای فعالیت ضد تکثیر بر روی سلول های سرطانی می‌باشد که این خاصیت به وجود ۳ فلاونوئید بایکالین، بایکالئین، وگونین مربوط می-شود [۱۵]. در مطالعه ای که بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف سرشاخه های گیاه Scutellaria pinnatifida از ترکیه انجام شد، فراکسیون ۵۰٪ متانولی با آب بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارا بود [۱۶]. در مطالعات انجام شده بر روی عصاره و فلاونوئید ها و هم چنین دی ترپنوئید های جدا شده از گونه های متداول Scutellaria در طب سنتی چین و کره جنوبی، اثرات ضد سرطانی این عصاره ها و ترکیبات جداسازی شده و هم چنین مکانیسم های ضد سرطانی آن ها مورد بررسی و تایید قرار گرفته است [۱۷،۱۱]. بررسی بر روی فعالیت آنتی اکسیدانت اسکوتلاریا رهدریانا نشان داد که این فعالیت به واسطه وجود ۵ فلاونوئید مهم در

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

این گیاه است که شامل بایکالئین، بایکالین، وگونین، اروکسیلین ، گانهیوآنجنین می‌باشد که در میان آن‌ها گانهیوآنجنین، بایکالئین، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانت را دارا بودند که بر این اساس مشخص شد تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در حلقه A ,C نقش مهمی را در ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانت بازی می‌کنند [۱۸]. این جنس دارای ۲۰ گونه در ایران است که ۱۰ گونه آن بومی ایران است. یکی از گونه های ایرانی Scutellaria pinnatifida A.Hamilt subsp alpina (Bornm) Rech.f است که بومی خراسان است [۵]. به علت شرایط اقلیمی کشورمان، در بیشتر مناطق گونه های گیاهی متنوع با خواص درمانی مهم یافت می شوند که انجام مطالعات گیاهی و شناخت مکانیسم عمل آنها ضروری به نظر می رسد و لزوم جستجو برای یافتن داروهای آنتی اکسیدان های جدید احساس می شود، لذا هدف مطالعه ی حاضر اندازه گیری خاصیت فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهScutellaria pinnatifida گونه ای بومی خراسان می باشد که در مطالعات قبلی، از ریشه آن دو فلاونوئید مهم وگونین و نئوبایکالئین جدا شده بود [۱۹]، لذا این گونه تصور می شود که به سبب احتمال وجود این فلاونوئیدهای آنتی اکسیدان، سرشاخه گیاه نیز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی باشد، در نتیجه این گیاه جهت سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی انتخاب گردید. بنابراین هدف از این پژوهش تعیین کیفی حضور فلاونوئیدها، تانن‌ها و ساپونین‌ها و همچنین تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل(DPPH) و قدرت کاهندگی آهن (FRAP) و تعیین میزان برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان اندام هوایی گیاه Scutellaria pinnatifida نظیر فلاونوئید، آنتوسیانین و کاروتنوئید کل می‌باشد.

روش کار

حلال متانول، فولین - سیوکالچو، استات پتاسیم، بوتیل هیدروکسی تولوئن، ویتامینC، آلومینیوم کلراید محصول شرکت مرک آلمان و گالیک اسید و دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت Sigma آمریکا تهیه شدند. در تیر ماه سال ۱۳۹۳ گیاه Scutellaria pinnatifida از ارتفاعات کوه تیغ بل واقع در استان خراسان شمالی جمع آوری شد، گیاه مذکور در هرباریوم مرکز تحقیقات فراورده های طبیعی و گیاهان دارویی خراسان شمالی بایگانی شد. اندام هوایی گیاه از ریشه آن جدا گردیده و بعد از خشک کردن در سایه، جهت آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه عصاره، ابتدا ۱۰۰گرم از پودرگیاه تهیه و سپس از روش خیساندن در حلال متانول استفاده شد و عصاره حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ شد. عصاره متانولی گیاه جهت تعیین کیفی حضور فلاونوئیدها، ساپونینها و تاننها مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین حضور فلاونوئیدها، یک گرم از عصاره متانولی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد، سپس ۱۰۰ میلی گرم پودر منیزیم به دو تا سه میلی لیتر از آن، افزوده شد. آنگاه به مخلوط حاصل، حدود ۰/۵ml اسید کلریدریک غلیظ اضافه گردید. وجود فلاونوئید ها طی دو دقیقه با ظهور رنگ صورتی کم رنگ تا قرمز آلبالوئی مشخص می گردد و بر حسب شدت رنگ لایه آمیل الکل میزان فلاونوئید موجود در عصاره از – تا ++++ برآورد می شود. آزمون مذکور به نام تست Shinoda مشهور است [۲۰]. جهت تعیین حضور آنتوسیانینها، به محلول درون لوله آزمایش در بالا، حدود ۲ میلی لیتر آمیل الکل افزوده شد. هرگاه رنگ ایجاد شده مربوط به فلاونوئید باشد به درون لایه ی بالایی (آمیل الکل) نفوذ نموده و بدین وسیله فلاونوئید از آنتوسیانین ها جدا می شود [۲۰]. روش دیگرجهت تشخیص آنتوسیانینها، ۰/۲۵ گرم عصاره را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل و محلول حاصل را به وسیله ی اسید کلریدریک یک درصد اسیدی شد. حضور رنگ قرمز در PH=۳-۴ و تغییر رنگ با تغییرات PH نشان دهنده حضور آنتوسیانین می باشد [۲۱]. جهت تشخیص حضور تاننها، ۱ گرم از عصاره متانولی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و محلول حاصل در دو لوله ی جداگانه ریخته شد. به محتویات اولین لوله چند قطره محلول نمک طعام ۱۰ درصد و به دومین لوله چند قطره محلول ژلاتین ۱ ٪ در آب افزوده شد. وجود تانن ها با ایجاد رسوب در لوله ی حاوی ژلاتین و یا ایجاد رسوب در هر دو لوله مشخص گردید. بر اساس میزان و غلظت رسوب حاصل، میزان تانن موجود در عصاره بین – تا ++++ برآورد شد. آزمایش دیگر جهت تعیین حضور تانن ها به این صورت

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

است که ابتدا یک قطره از عصاره بر روی تکه ای کاغذ صاف قرار داده شد. آنگاه به آن محلول ۵٪ فریک کلراید پاشیده شد. ایجاد لکه هایی به رنگ آبی یا سبز تیره حاکی از وجود تانن در عصاره بود [۲۲]. جهت تشخیص حضور ساپونینها، یک گرم از عصاره متانولی در یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱۰میلی لیتر آب مقطر افزوده گردید و به مدت ۲ دقیقه شدیدا تکان داده شد. وجود ساپونین ها با ایجاد کف ثابت و پایداربه مدت حداقل نیم ساعت تایید می شود. مقدار ساپونین های موجود در عصاره با توجه به ارتفاع کف ثابت از + (برای کفی به ارتفاع ۱ تا ۲/۵ سانتی متر) تا ++++ (برای کفی به ارتفاع بیش از ۴ سانتی متر) برآورد شد. لازم به ذکر است کف حاصل از ساپونینها با افزودن ۱ تا ۲ قطره اسید کلریدریک غلیظ از بین نمی رود [۲۳]. برای سنجش میزان آنتوسیانین کل مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۱٪ 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٪ متانول به عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید [۲۴].

$$A = A_{۵۳۰} - ۰/۲۵ \times A_{۶۵۷}$$

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

برای سنجش میزان کاروتنوئید کل، مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهی با ۵ میلی‌لیتر استون در یک هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. سپس به هموژنات حاصل ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب افزوده و با استفاده از کاغذ صافی، صاف گردید. محلول صاف شده با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۲۶۰۰ دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی برداشته و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از استون به عنوان شاهد استفاده شد. میزان کاروتنوئید برای هر عصاره با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید [۲۵].

$$C_a = ۱۱/۲۴\ A_{۶۶۲} - ۲/۰۴\ A_{۶۴۵}$$
$$C_b = ۲۰/۱۳\ A_{۶۴۵} - ۴/۱۹\ A_{۶۶۲}$$
$$C_t = ۱۰۰۰\ A_{۴۷۰} - ۱/۹\ A\ C_a - ۶۳/۱۴ C_b / ۲۱۴$$

C_a: میزان کلروفیل a، C_b: میزان کلروفیل b، C_t: میزان کاروتنوئید کل می‌باشد.

برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲٪)، ۲/۸ میلی-لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین‌سیوکالچو (۵۰٪) اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت جذب آن در طول موج ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد ثبت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد بکار رفت. محتوای فنل کل عصاره بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد [۲۶].

مقدار فلاونوئیدها بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد. به ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی، ۱/۵ میلی لیتر متانول و ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ده درصد و ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر از آب مقطر اضافه شد و پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، 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 [۲۷].

جهت تعیین عملکرد آنتی اکسیدانی به روش مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، ۰/۱ میلی لیتر از غلظت-های مختلف عصاره از ۶۴-۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۰۰۴٪ مخلوط گردید. محلول کنترل شامل ۳/۹ میلی‌لیتر DPPH و ۰/۱ میلی‌لیتر متانول است. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد (I%) هر عصاره به کمک فرمول محاسبه شد [۲۸].

$$AI\% = 100 \times \frac{A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{کنترل}}}$$

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

بر اساس اطلاعات حاصل، IC_{50} عصاره (غلظتی از سوبسترا بر حسب میلی‌گرم است بر میلی‌لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان ۵۰٪ اولیه نیاز است)، از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره و نرم افزار آنلاین Biodatafit بدست آمد [۲۹]. جهت تعیین عملکرد آنتی اکسیدانی به روش قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) 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. معرف FRAP شامل محلول ۲و ۴و 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). مخلوط حاصل ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C 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 [۳۰].

یافته ها

بازده عصاره متانولی در این پژوهش ۹/۳٪ بوده و در ادامه در این تحقیق آزمایش های فیتوشیمیایی وجود آنتوسیانین، تانن، فلاونوئید و ساپونین در عصاره ی متانولی گیاه بررسی شد که نتایج آن در جدول ۱ آمده است که نتایج حضور فلاونوئیدها و آنتوسیانیها را به اثبات رساند و لذا در این پژوهش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانینها سنجیده شد. محتوای فنل در عصاره متانولی با توجه به روش ذکر شده ۲۰۶/۲۲±۰/۱۲۴ میلی گرم گالیک اسید در یک گرم عصاره می باشد. با قرار دادن جذب عصاره متانولی در معادله مربوط به کوئرستین y= 0.004x+0.006، محتوای فلاونوئید در عصاره متانولی سنجیده شد و از طرفی محتوای آنتوسیانین و کاروتنوئید که ترکیبات آنتی اکسیدان هستند در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آنها در جدول ۲ آورده شده است. قدرت مهار رادیکال های آزاد به روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت که اثر غلظت بر درصد مهار رادیکال آزاد در شکل ۱ و مقایسه خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره در برابر کنترلهای مثبت ویتامین C و BHT در شکل ۲ و نتایج IC_{50} در جدول ۳ آمده است. و اثر مربوط به قدرت احیای آهن با توجه به معادله منحنی استاندارد آمونیوم فروس سولفات y=0.435+0.075 در

جدول ۱: تعیین کیفی فلاونوئیدها، تاننها و ساپونینها در عصاره متانولی سرشاخه های گیاه Scutellaria pinnatifida

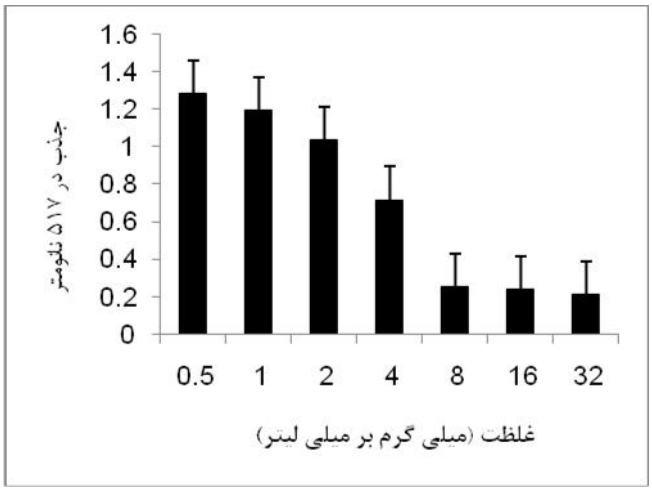
فلاونوئید	ساپونین	تانن	آنتوسیانین
+++*	-	-	++

*مقدار متوسط از – تا ++++.+: فاقد ماده مزبور (-)، کمی مثبت(++)، مثبت خوب(+++)، مثبت بسیار زیاد (++++)

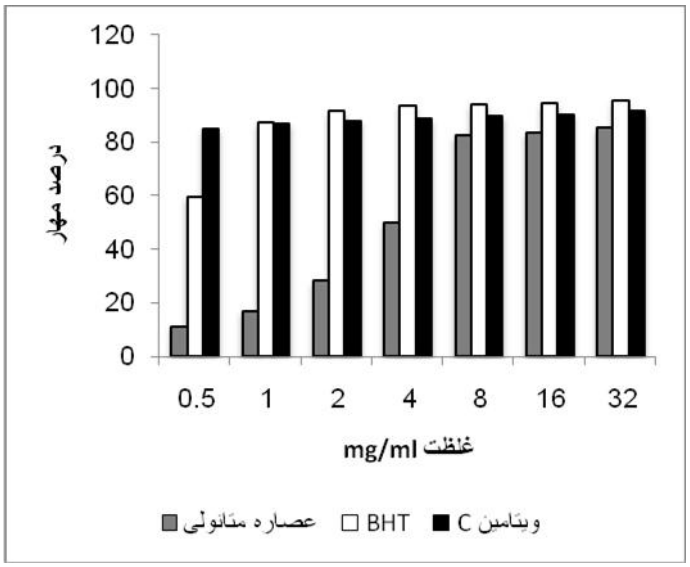
جدول۲: محتوای آنتوسیانین و کاروتنوئید در سرشاخه های گیاه Scutellaria pinnatifida

آنتوسیانین(میلی گرم/ بافت گیاه)	کاروتنوئید(میلی گرم/ بافت گیاه)	فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین/ گرم گیاه خشک)
۷/۶۵±۰/۱۳	۳/۵۲±۰/۵۶	۱۰/۸۶±۰/۰۱۱۵

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

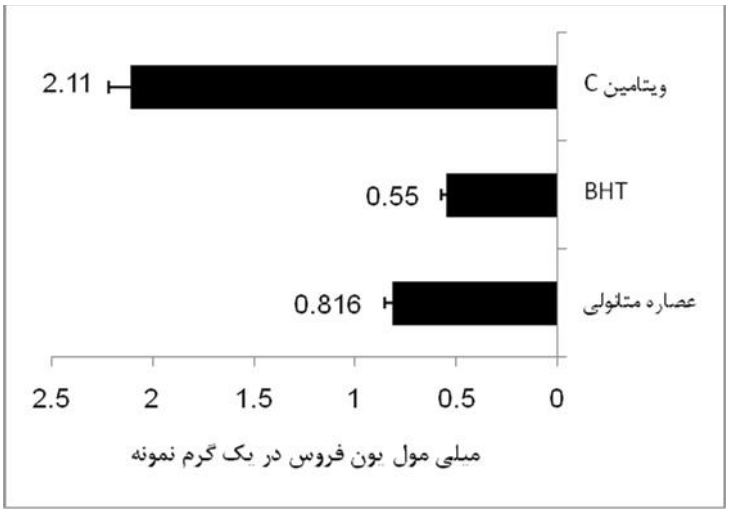


شکل ۱: نمودار جذب عصاره متانولی گیاه Scutellaria pinnatifida در غلظت های مختلف در ۵۱۷ نانومتر



شکل۲: مقایسه درصد مهار رادیکال آزاد عصاره متانولی و کنترل مثبتهای ویتامین C و BHT با افزایش غلظت

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]



شکل ۳: مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه در مقابل استانداردهایVit C و BHT با استفاده از آزمون FRAP

جدول۳: فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی اندام هوایی گیاه در روش DPPH

		درصد مهار در غلظتهای متفاوت						
نمونه	IC_{50}	۳۲ mg/ml	۱۶mg/ml	۸mg/ml	۴ mg/ml	۲ mg/ml	۱ mg/ml	۵ mg/ml
عصاره متانولی	۲/۹۸	۰/۲ ± ۸۵/۴	۸۳/۳۹±۰/۸	۸۲/۳۹±۱/۹۱	۵۰/۱۶±۰/۶	۲۸/۲±۰/۲	۱۷/۱۱±۲	۱۱/۰۹±۰/۴
BHT	۰/۳۱	۹۵/۲±۰/۸	۹۴/۴۵±۰/۴	۹۴/۱۵±۰/۸	۹۳/۶۲±۱/۵	۹۱/۵±۰/۹	۸۷/۲۶±۱	۵۹/۷۶±۰/۶
ویتامین C	۰/۱۵	۹۱/۵±۰/۹	۹۰/۳۸±۰/۸	۸۹/۶۶±۱/۲	۸۸/۶۶±۱/۶	۸۸/۷±۰/۲	۸۷/۶±۱/۲	۸۴/۸۷±۰/۵

جدول ۴: محتوای یون فروس احیا شده در روش FRAP توسط عصاره متانولی گیاه در مقایسه با استانداردها

نمونه	میلی مول یون فروس در گرم نمونه
عصاره متانولی	۰/۸۱۶ ±۰/۰۵۲
BHT	۰/۵۵ ±۰/۰۲۶
ویتامین C	۲/۱۱±۰/۰۱۱

جدول ۴ آمده است، به طوری که نتایج بر حسب معادل میلی مول یون فروس تولید شده بر گرم وزن عصاره بیان شد و هرچه این میزان احیاکنندگی بیشتر باشد خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر است.

بحث

عصاره ها و ترکیبات طبیعی حاصل از گیاهان دارای اثرات آنتی اکسیدان هستند. این اثرات به دلیل مقادیر زیادی از ترکیبات آنتی اکسیدان در گیاه می باشد. در گیاهان ترکیبات پلی فنلی، فلاوونوئیدی و آنتوسیانین ها نقش

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

زیادی در فعالیت آنتی اکسیدانی دارند که این فعالیت مربوط به خاصیت اکسایش و کاهش آنها می باشد [۳۱]. بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه روی گونه های مختلف Scutellaria مشخص شده است که گیاهان مذبور دارای اثرات آنتی اکسیدان می باشند [۳۳،۳۲]. در اثر مقایسه خاصیت مهار رادیکال آزاد و محتوای فلاونوئید این گونه در این پژوهش با مطالعات قبلی بر روی گونه Scutellaria litwinowii می توان گفت که عصاره متانولی این گونه به دلیل داشتن فلاونوئید بیشتر، خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری را نیز دارا است، به طوری که عصاره متانولی Scutellaria litwinowii با داشتن (۷/۲)mg فلاونوئید دارای IC_{50} =3.0 بوده و لی عصاره متانولی Scutellaria pinnatifida با داشتن ۱۰/۸۶ میلی گرم فلاونوئید دارای IC50=2.98 می باشد که نشانگر خاصیت آنتی اکسیدانی این گونه نسبت به گونه دیگر است و بدین ترتیب از این مقایسه تاثیر فلاونوئید بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی می تواند مشاهده شود [۳۴]. به دلیل اینکه عصاره متانولی محتوی طیف وسیعی از ترکیبات قطبی و نسبتا قطبی می باشد و این حلال ترکیباتی همچون آنتوسیانین ها، ترپنوئیدها، ساپونین ها، تانن ها، لاکتونها، فلاون ها و پلی فنول ها را استخراج می کند، لذا در مطالعه حاضر از عصاره متانولی جهت بررسی فیتوشیمیایی و خاصیت آنتی اکسیدانی استفاده گردید [۳۵]. در بین ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی پلی فنل ها، فلاونوئید ها و ترکیبات فنولی که پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند بسیار مورد توجه هستند [۳۵] که در این پژوهش محتوای ترکیبات فلاونوئیدی سنجیده شد و مشخص شد که عصاره متانولی سرشاخه گیاه حاوی مقادیر بالایی از فلاونوئید می باشد . ویتامین C و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدان سنتزی قوی و کنترل مثبت در تمام غلظت های بکار رفته جهت این بررسی، دارای اثرات بالایی می باشند که در این آزمون بکار رفتند. نتایج بدست آمده از بررسی این ترکیب (جدول ۳) نشان می دهد که قدرت آنتی اکسیدان آن از ویتامینC کمتر بوده ولی نسبت به عصاره متانولی بالاتر است. در این آزمایش با افزایش غلظت عصاره، مهار رادیکالی با قدرت بیشتری صورت گرفت . غلظتی از عصاره که 50 در صد مهار رادیکالی را سبب می شوند (IC_{50}) در مقایسه با بوتیل هیدروکسی تولوئن و ویتامین C آورده شده است. در این تست قدرت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHT و ویتامین C ضعیف تر بود، ولی همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، در روش FRAP عصاره متانولی قدرت احیاء آهن بالاتری از BHT دارد. از طرفی می توان گفت عصاره متانولی سرشاخه های گیاه حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدان فلاونوئید، آنتوسیانین و کاروتنوئیدها می باشد. طبق مطالعات قبلی و در اثر مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی سرشاخه های گیاه مذکور در این پژوهش با عصاره متانولی در ترکیه، مشخص شد که خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی سرشاخه های گیاه رویش یافته در ایران بیشتر ازعصاره متانولی گیاه رویش یافته در ترکیه است [۱۶].

نتیجه گیری

عصاره متانولی سرشاخه های گیاه دارای میزان فلاونوئید و آنتوسیانین بالا است. به همین دلیل دارای اثر آنتی اکسیدانی خوبی می باشد. لذا توصیه می شود تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی ترکیبات اجزاء و ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره های مختلف گیاه انجام شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج شده از طرح پژوهشی با کد ۵۷۳پ۹۲ می باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی حمایت مالی شده است. بدین وسیله از ریاست و معاونت محترم مرکز تحقیقات فراورده های طبیعی و گیاهان دارویی خراسان شمالی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

References

1. Bergendi L, Benes L., Durackova Z, Ferencik M, Chemistry, physiology and pathology of free radical, Life Sci 1999; 65:1865-1874.
2. Haraguchi H, Biochemistry, New York: W.H. Freeman,1995; pp. 263-290.
3. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma O.I. The characterization of antioxidants, Food Chem, Toxicol, 1995; 33: 601-617.
4. Maxwell S.R,Prospects for the use of antioxidant therapies, Drugs 1995; 49: 345-361.
5. Rechinger K.H, Hedge I.C,Ietswaart J.H, Jalas J, Mennema J, Seybold S. Labiatae, In: Flora Iranica, Austria: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz. 1982; pp. 62-63
6. Tomimori T, Miyaichi Y, ImotoY, Kizu H, Namba T, Studies on the Nepalese crude drugs. V. On the flavonoid constituents of the root of Scutellaria discolor Colebr (1), Chemical & Pharmaceutical Bulletin 1985; 33:4457–4463.
7. Martin J, ek J, The scullcap plant (Scutellaria baicalensis Georgi) - A potential resource of new drugs, Ceska Slov Farm 2002; 51(6):27
8. Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee S.H, Cohen I, Campbell M.J,In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs, Phytotherapy Research 2005; 19: 649–651.
9. Micaela R.M, Caroline S, Nessim K, Teresa T, Ernest G, Ademir F, Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from Scutellaria racemosa Pers, Fitoterapia 2010; 81:552–556.
10.Min L.W, New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin Baicalein and Baicalin, Cancer Treatment Reviews 2009; 35:57–68.
11.Sonoda M, Nishiyama T, Matsukawa Y, Moriyasu M, Cytotoxic activities of flavonoids from two Scutellaria plants in Chinese medicine, Journal of Ethnopharmacology 2004; 91:65–68.
12.Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A, Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell, Can.Lett 2006; 245:269-274.
13.Chong Z, Wang X.L, Qian F.W, Sangeeta R.M, Chun S.Y,Selective fraction of Scutellaria baicalensis and its chemo preventive effects on MCF-7 human breast cance rcells, Phytomedicine 2010; 17:63–68.
14.Tayarani-Najaran Z, Emami S.A, Asili J, Mirzaei A, Mousavi S.H, Analyzing Cytotoxic and Apoptogenic Properties of Scutellaria litwinowii Root Extract on Cancer Cell Lines. eCAM 2009; 1-9[Persian].
15.Tayarani-Najaran Z, Mousavi S.H, Asili J, Emami S.A.,Growth-inhibitory effect of Scutellaria lindbergii in human cancer cell lines, Food and Chemical Toxicology 2010; 48: 599–604[Persian].
16.Sauvage S, Samson E, Granger Me, Majumdar A, Nigam P, Nahar L, Celik S, Sarker S.D, Assessment of free-radical-scavenging and antibacterial activities and brine shrimp toxicity of Scutellaria pinnatifida (Lamiaceae), Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 2010; 10(4): 304-309,
17. Yance J, Sagar SM, Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies, Integr Cancer Ther 2006; 5(1): 9-29
18.Su Y.L, Huang L, Chen Z.Y, Isolation and elucidation of antioxidant constituents from acetone extract in root of Scutellaria rehderiana, China Jounal of Chinese Material Medicine 2004; 29: 863.
19.Mohammadi A, Asili J, Emami S.A, Mighani H, Bibak B, Phytochemical investigation on Scutellaria pinnatifida roots, Journal of North Khorasan University of Medical Sciences (Natural Products & Medicinal Plants Suplemntry) 2012; 4: 93-101[Persian].
20.Markham R.K, Techniques of Flavonoid Identification, London: Academic Press 1982; pp. 15-45.
21.Chhabra SC, Uiso FC, Mshiu EN, Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants, Part1. Ethnopharmacol 1984; 11: 157-179 .
22.Evans E ,Trease and Evans Pharmacognosy, 16th edn, Saunders, Edinburgh 2009.
23.Hostetman K, Martson A, Saponin, Cambridge: university press, 1995 pp: 233.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

24.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.
25.Lichtenthaler H. K,Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic membranes, Methode Enzaym 1987; 148: 350-382.
26.Meda A, Lamien C. E, Romito M, Millogo J, Nacoulma O. G, 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.
27.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.
28.Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S, Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of Acacia auriculiformis A Cunn, Food Chem Toxicol, 2007; 45: 1216–23.
29.Chen Z, Bertin R, Froldi G, EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs, Food Chem 2013; 138: 414–420.
30.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.
31.Riddle J.M., Contraception and Abortion from the Ancient World to the Renaissance, 1992; Harvard University Press, Cambridge, MA.
32.Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H, Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi, Biochim. Biophys. Acta., 1999; 1472: 643-650.
33.Shao Z.H, Li C.Q, Vanden Hoek T.L, Becker L.B, Schumacker P.T, Wu J.A, Attele A.S, Yuan C.S. Extract from Scutellaria baicalensis Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol., 1999; 31: 1885-1895.
34.Fazly Bazzaz B.S, Hassanzadeh Khayat M, Emami S.A, Asili J, Sahebkar A, Javadi Neishabo E. Antioxidant and antimicrobial activity of methanol, dichloromethane and ethyl acetate extracts of Scutellaria litwinowii, ScienceAsia 2011; 37: 327–334[Persian].
35.Leite S.P, Raphael J, Vieira C, Medeiros P.L, Leite R.M.P, Menezes Lima V.L, Xavier H.S, Lima O, Antimicrobial activity of Indigofera suffruticosa. Oxf. J. 2006; 3: 261-265.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]

Original Article

Evaluation of qualitative and quantitative of antocyanines, carotenoids, flavonoids and antioxidant activity of methanol extract from aerial parts of Scutellaria pinnatifida A.Hamilt subsp alpina (Bornm) Rech.f

*Feyzi P [1], Ahmadzadeh Sani T [2], Kamali H[3], Alesheikh P [4], Zarghami moghaddam P [5], Mohammadi A[6]**

[1]MS of Organic chemistry, Research center of natural products & medicinal plants, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran.
[2] Doctor of pharmacy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3]MS of chemistry engeneering, Research center of natural products & medicinal plants , North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran.
[4]MD, Ph.D OF Chinese medicine, Research center of natural products & medicinal plants, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran
[5]MS of microbiology, Research center of natural products & medicinal plants, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran.
[6]MS of phytochemistry, Research center of natural products & medicinal plants, North Khorasan University of medical sciences, Bojnurd, Iran.
***Corresponding Author:** Research center of natural products & medicinal plants
Email: Ameneh.mohamadi@yahoo.com

Journal of North Khorasan University 2015;7(3): 645-655

Abstract

Background & Objectives: *Scutellaria pinnatifida from Labiatae family is one of the endemic medicinal plants in Iran and is used as anti analgesic and anti-inflammatory remedy. The aim of this study was evaluation of antioxidant activity and phytochemical assessment of Scutellaria pinnatifida A.Hamilt subsp alpina (Bornm) Rech.f that is endemic in Khorasan.*

Material and Method: *the methanol extract from aerial parts of plant was provided with maceration method at first. The presence and amount of Flavonoids, Tannins, Saponins, Antocyanins and Carotenoids was studied. Antioxidant activity of extract was evaluated with Free radical scavenging and Ferric reducing antioxidant power methods.*

Results: *the result of this study showed the presence of antocyanin and flavonoids and absence of saponin and tannins. The amounts of antocyanin and flavonoid were 7.65 ±0.13 and 10.86 ± 0.0115 mg/per g dry plant respectively.Free radical scavenging was increased with high concentration of extracts and highest scavenging was in 32 mg/ml with 85.4% scavenging, BHT and Vit C were 91.58% and 95.33% in this concentration and there wasn't more different between them. In evaluation of antioxidant activity in FRAP method, methanol extract with 0.816±0.052 mmol ferrous was stronger than BHT and it is weaker than Vit C.*

Conclusion: *the methanol extract from aerial parts of Scutellaria pinnatifida had good antioxidant activity and more studies are needed for recognize of it's chemical compositions and evaluation of anticancer activity from this plant.*

Key Words: *antioxidant, Flavonoid, Antocyanin, Scutellaria pinnatifida.*

Recivied: 23 Feb 2015
Revised: 12 May 2015
Accepted: 16 Aug 2015

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-11-22]