بررسی میزان فنول و فلاونوئید ها و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های اتانولی، متانولی، کلروفرمی واتیل استاتی پوست تنه و شاخه درخت بید (*Salix alba.* L.)

جعفر منتشلو، علی دلجو* و خسرو پیری

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۸

چکیده

گیاهان منابع پتانسیلی از آنتی اکسیدانهای طبیعی هستند و ترکیبات آنتی اکسیداتیو گوناگونی برای خنثی‌کردن گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر تولید می‌کنند. هدف از این مطالعه اندازه گیری میزان فنول و فلاونوئید تام و فعالیت آنتی اکسیدانی ۴ نوع عصاره مختلف پوست تنه و شاخه درخت بید همدان بود. دراین مطالعه تجربی، برای اندازه‌گیری ترکیبات آنتی اکسیدانی آزمون فنول و فلاونوئید کل به کار رفت . جهت ارزیابی خاصیت آنتی رادیکالی از آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSSV:16 تجزیه و تحلیل شدند. بیشترین محتوای فنول کل مربوط به عصاره اتانولی پوست شاخه های جوان و پوست تنه به ترتیب به میزان ۱/۴۱±۶۹/۹۸ و۱/۱۹±۶۰/۸۷ میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک و کمترین میزان فنول هم مربوط به عصاره های کلروفرمی بود. بیشترین محتوای فلاونوئید کل در پوست شاخه و تنه، مربوط به عصاره اتانولی به میزان ۴/۰۸±۷۱/۲۰ و ۱/۱۹±۶۰/۸۷ و نیز کمترین مقادیر مربوط به عصاره های کلروفرمی پوست تنه و شاخه به میزان ۰/۲۹±۱۲/۵۶ و۰/۵۷±۱۳/۸۰ بود. همچنین بیشترین فعالیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH بعد از اسید آسکوربیک مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه به ترتیب ۰/۱۲۹ و ۰/۱۳۰ بودند. بین میانگینهای فلاونوئید کل و فنول کل عصاره پوست تنه و شاخه اختلاف معنی داری وجود داشت. در نتیجه، بهترین فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه بودند.

واژه های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدان، فنول کل، فلاونوئید کل، درخت بید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۴۲۳۸۱۹۴ ، پست الکترونیکی: alideljou@yahoo.com

مقدمه

امروزه در راستای حذف و یا کاهش ترکیبات شیمیایی و سنتزی در مواد غذایی، تحقیقات زیادی برای جایگزینی مواد شیمیایی با طبیعی انجام شده است. در همین زمینه تلاشهای زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدانهای طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است. اکسیداسیون لیپیدها در حین نگهداری و فرآوری غذاها نه تنها باعث از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای و هضمی غذا می‌شود، بلکه محصولات اکسید شده‌ای مانند رادیکالهای آزاد تولید می‌کند و این رادیکالها باعث اکسیداسیون خود به خودی و تولید ترکیبات شیمیایی نامطلوب و در سامانه‌های زیستی باعث بروز بسیاری از بیماریها، به خصوص سرطان می‌شوند (۷).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اساساً به دلیل خصوصیات اکسایش-کاهش آنها می باشد به طوریکه به آنها بعنوان عوامل کاهنده، دهنده‌های هیدروژن و اطفاء کننده‌های اکسیژن برای واکنش اجازه می‌دهد و دارای پتانسیلی برای کلات شدن با عناصر فلزی می‌باشد (۱۶). گیاهان منابع پتانسیلی از آنتی اکسیدانهای طبیعی هستند و ترکیبات آنتی اکسیداتیو گوناگونی برای خنثی کردن گونه‌های اکسیژن

واکنش پذیر تولید می‌کنند. گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر که شامل رادیکالهای آزاد مانند رادیکالهای آنیون سوپر اکسید، رادیکالهای هیدروکسیل و گونه‌های رادیکال آزاد از قبیل پروکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد و شکلهای مختلفی از اکسیژن فعال شده می‌باشند. این مولکولها فاکتورهای تشدیدگر در آسیب سلولی و فرآیند پیرشدن هستند (۱۴). فنول یکی از گروههای بزرگ مواد شیمیایی گیاهی است که می‌تواند در گیاهان معینی پیدا شود. ترکیبات فنولی آنتی اکسیدانهای قوی و رباینده های رادیکال آزاد می‌باشند که می‌توانند بعنوان دهنده های هیدروژن، عوامل کاهنده، کلات کننده‌های فلزی و خاموش کننده‌های اکسیژن منفرد عمل کنند. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فنولی از قبیل کاتچین و کوئرستین در تثبیت فسفولیپید دولایه در مقابل پراکسیداسیون برانگیخته شده توسط گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر(ROS) مؤثر بوده اند (۲۱). رادیکالهای آزاد، اتمها یا مولکولهایی هستند که به دلیل داشتن الکترونهای جفت نشده، در بدن بسیار واکنش‌پذیر بوده و آسیب بسیاری به ماکرومولکولهای پروتئینها، لیپیدها و کربوهیدراتها و DNA بدن وارد می سازند (۹). افزایش رادیکالهای آزاد منجر به ایجاد حالت تنش اکسیداتیو می‌شود. در بدن سیستمهای خاصی برای مقابله با آسیبهای حاصل از رادیکالهای آزاد وجود دارد که به سیستمهای دفاعی آنتی اکسیدانی معروفند (۵). در یک فرد سالم، بین تولید رادیکال آزاد و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی توازن برقرار است. عدم تعادل در میزان تولید رادیکالهای آزاد و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی، تنش اکسیداتیو خوانده می‌شود (۸). فلاونوئیدها هر چند که ترکیباتی مغذی نیستند ولی تاثیر مثبتی بر حفظ سلامتی بدن دارند. پژوهشهای بسیار زیادی درباره فعالیت آنتی اکسیدانی، به دام اندازی رادیکال آزاد، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهشی این ترکیبات صورت گرفته است. مهم ترین خصوصیت فلاونوئیدها نقش آنها در پیشگیری از بیماریهای قلبی عروقی است (۱۱). روشهای متفاوتی برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاهان گزارش شده است. هریک از این روشها کاستیها و برتریهای خود را دارند.

سالیسیلات ها (سالیسیلیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید) نوعی از ترکیبات هستند که در سرتاسر جهان برای قرنها به عنوان کاهنده درد، تب بر و داروهای ضد اشتعالی استفاده شده‌اند. مطالعات نشان داد که بیماران تحت دوره درمان طولانی آسپرین تمایل کمتری به توسعه بیماری قلبی عروقی و سرطان از خود نشان داده اند. با توجه به اینکه اسید سالیسیلیک و سایر سالیسیلاتها به طور طبیعی در میوه های مختلف و سبزیجات وجود دارند مصرف این ترکیبات در رژیم غذایی روزانه می‌تواند به طور عمده خطر سرطان روده را کاهش دهد (۶). گیاهان خانواده بید، سالیکس، حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات سالیسیلات درونی می‌باشند. پوست درخت بید از زمانهای باستان به دلیل عملکردهای ضد اشتعالی و کاهنده درد استفاده می‌شده است. با کشف آسپرین توجه قابل ملاحظه‌ای به گونه‌های این گیاه شده است (۱۰). سالیسین، ماده‌ای است حاوی آلدئید سالیسیلیک(اسید سالیسیلیک از نام لاتین بید یعنی سالیکس مشتق می‌شود) که از هیدرولیز این گلوکزید (سالیکوزید) تحت اثر امولسین، گلوکز و سالی ژین به دست می‌آید. این گلوکزید اگر تحت اثر اسید نیتریک و با رعایت احتیاط اکسید گردد ماده‌ای به نام هلی سین از آن به دست می‌آید. هلی سین و اسپی رئین اگر تحت اثر امولسین، هیدرولیز شوند، آلدئید سالیسیلیک و دی-گلوکز از آنها حاصل می‌گردد. آلدئید سالیسیلیک در عطرسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از گونه سالیکس پورپورا در سال ۱۹۲۹ گلوکزیدی به نام سالی پورپوزید نیز به دست آمده است. در پوست درختان بید علاوه بر گلوکزیدهای مذکور، موادی نظیر موم، صمغ، رزین، اکسالات کلسیم و تانن نیز یافت می‌شود. پوست درختان بید دارای اثر مسکن دردهای دستگاه تناسلی و شاتونهای آن دارای اثر ضد تشنج، رفع قاعدگی های دردناک و سیلان منی می باشد.

سالیسین، خاصیت آرام کننده عصبی و تب بر دارد و مصرف آن هنوز هم در درمان بیماریهای مذکور معمول است(۲۲). هدف از این مطالعه بررسی فعالیت عصاره پوست درخت بید به روش واکنش رادیکال آزاد ۲و۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و اندازه گیری فنول و فلاونوئید بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش، پوست تنه سالخورده و پوست شاخه جوان درخت بید سالیکس آلبا بودند. نمونه‌های گیاهی از اطراف همدان با تأیید متخصصان گیاه‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان جمع آوری گردید. پوست تنه و شاخه در دمای اتاق و در شرایط سایه کاملاً خشک گردیده و با استفاده از آسیاب، به حالت پودر درآورده شدند. برای عصاره گیری مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاهی در داخل کیسه دستگاه سوکسله ریخته شده و مخزن حلال دستگاه نیز با ۵۰۰ میلی لیتر از محلولهای متانول، اتانول، اتیل استات و کلروفرم (مرک) پر شد. پس از گذشت چند ساعت عصاره استحصالی دستگاه با کاغذ صافی صاف نموده و با دور ۱۲۰۰۰ در مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی توسط دستگاه تبخیر کننده دوار تحت فشار خلاء تا حد امکان تغلیظ شد. این عصاره‌های تغلیظ شده، داخل پتریهای استریل ریخته شدند و جهت خشک شدن درون دستگاه انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عصاره خام خشک شده درون پتریها با استفاده از تیغ اسکالپل زیر هود تراشیده شده و به ظرفهای مجزا استریل منتقل و در دمای ۲۲- نگهداری گردید.

اندازه گیری میزان فنول کل: جهت اندازه گیری میزان فنول کل به روش پورمراد و همکاران از معرف فولین سیو کالتو (مرک) استفاده گردید(۱۵). ۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو با ۴ میلی لیتر از محلول Na_2CO_3 یک مولار مخلوط گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره گیاهی یا اسید گالیک به مخلوط اضافه شد. مخلوطها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از این مدت میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Lambda 45-UV/Visible در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند و منحنی استاندارد توسط غلظتهای ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ (میلی گرم بر لیتر) از محلول اسید گالیک تهیه گردید. مقدار فنول کل در گیاهان دارویی به صورت معادل میلی گرم اسید گالیک (GAE) بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

اندازه گیری میزان فلاونوئید کل: مقادیر فلاونوئیدها در نمونه عصاره‌های گیاهی به روش پورمراد و همکاران جلالی و همکاران اندازه گیری شدند(۱و ۱۵). ابتدا ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد را با ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط کرده و سپس به آنها ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه شد. در مرحله بعد ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره که با ۱/۵ میلی لیتر اتانول مخلوط گردیده بود، به مخلوط کلرید آلومینیوم، استات پتاسیم و آب اضافه گردید. مخلوط نهایی حاصل برای هر عصاره (با حجم ۵ میلی لیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل Lambda 45-UV/Visible اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید کل به صورت معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه و بیان شد. ارزیابی برای هر کدام از عصاره‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

ارزیابی خاصیت آنتی رادیکالی به روش DPPH: در این پژوهش تعیین فعالیت آنتی رادیکال (DPPH) بر اساس روش استوجیچویچ و همکاران انجام گرفت(۲۰). ۲/۵ میلی لیتر از محلول عصاره با یک میلی لیتر از محلول $۱۰^{-۴}$ ×۳ مولار DPPH مخلوط گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تحت شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از این

مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان فعالیت ضد رادیکالی، مقادیر جذب سه نمونه زیر اندازه گیری گردید:

As: جذب نمونه تیمار، حاوی محلول عصاره و DPPH

Ac: جذب نمونه شاهد Ab: جذب نمونه blank

پس از اندازه گیری مقادیر فوق میزان درصد فعالیت آنتی رادیکالی (RSA) از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\mathrm{DPPH-RSA(\%)} = 100\left(1-\frac{A_s-A_b}{A_c}\right)$$

جهت مقایسه نیز از ترکیب اسید آسکوربیک به عنوان ترکیب آنتی رادیکال پایدار استفاده شد و میزان فعالیت RSAآن تعیین گردید. ارزیابی برای هرکدام از عصاره‌ها با سه تکرار انجام گردید و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSSV:16 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

جدول ۱ مقادیر فنول کل (برحسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک) را برای عصاره های اتانولی، اتیل استاتی، متانولی و کلروفرمی نمونه های پوست تنه وشاخه درخت بید همدان را نشان می‌دهد. با توجه به جدول مشخص می‌شود که بیشترین محتوای فنول کل مربوط به عصاره اتانولی پوست شاخه های جوان و پوست تنه به ترتیب به میزان ۶۹/۹۸±۱/۴۱ و۶۰/۸۷±۱/۱۹ میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک و کمترین میزان فنول هم مربوط به عصاره‌های کلروفرمی می‌باشد با توجه به (جدول۲) بین میانگین مقادیر فنول عصاره پوست تنه و شاخه اختلاف معنی داری وجود دارد.

جدول۱- مقادیر فنول کل پوست تنه و شاخه درخت بید

نوع اندام	نوع عصاره	فنول کل برحسب(mg GAE/g dw)
پوست تنه	اتانولی	۶۰/۸۷±۱/۱۹[e]
پوست تنه	اتیل استاتی	۴۶/۴۱±۱/۲۰[c]
پوست تنه	متانولی	۳۵/۲۴±۰/۴۷[b]
پوست تنه	کلروفرمی	۱۰/۳۱±۰/۵۲[a]
پوست شاخه	اتانولی	۶۹/۹۸±۱/۴۱[f]
پوست شاخه	اتیل استاتی	۶۰±۱/۱۲[d]
پوست شاخه	متانولی	۴۳/۵۶±۰/۳۲[c]
پوست شاخه	کلروفرمی	۱۴/۹۳±۰/۴۰[a]

جدول۲- تجزیه واریانس مقادیر فنول کل

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اندام	۱	۴۷۶/۰۶۱	۱۸۴/۲۲۰**
عصاره	۳	۳۰۸۵/۴۴۷	۱۱۹۳/۹۶۸**
عصاره*اندام	۳	۲۰/۳۰۶	۷/۸۵۸**
خطا	۱۶	۲/۵۸۴	-
کل	۲۳	-	-

**معنی دار در سطح احتمال۰/۰۱

جدول ۳ مقادیر فلاونوئید کل (برحسب میلی‌گرم کوئرستین برگرم وزن خشک) را برای عصاره های اتانولی، اتیل استاتی، متانولی و کلروفرمی پوست تنه و شاخه درخت بید همدان نشان می‌دهد. با توجه به این جدول مشخص می‌شود که بیشترین محتوای فلاونوئید کل در پوست شاخه و تنه، مربوط به عصاره اتانولی به میزان ۷۱/۲۰±۴/۰۸ و ۶۰/۸۷±۱/۱۹ و نیز کمترین مقادیر مربوط به عصاره های کلروفرمی پوست تنه و شاخه به میزان ۱۲/۵۶±۰/۲۹ و۱۳/۸۰±۰/۵۷می باشد. همچنین بین میانگینهای فلاونوئید کل عصاره‌های پوست تنه و شاخه اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۴).

ارزیابی فعالیت جاروکردن رادیکال آزاد توسط عصاره های گیاهی با استفاده از رادیکال آزاد DPPH انجام شد. در این ارزیابی از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل استاندارد استفاده گردید. سپس IC_{50} هر نمونه عصاره و آسکوربیک اسید محاسبه گردید. در (جدول ۵) مقادیر مهار رادیکالهای آزاد DPPH توسط غلظتهای مختلف عصاره ها آورده شده است. نمودار۱ منحنی تغییرات درصد مهار رادیکالهای آزاد DPPH توسط غلظتهای مختلف عصاره های گیاهی و مقادیر IC_{50} عصاره های گیاهی در برابر اسید آسکوربیک را نشان می دهد. نمودار نشان می دهد که میزان مهار رادیکالهای آزاد DPPH توسط عصاره ها با افزایش غلظت عصاره های گیاهی افزایش یافته است. براساس (جدول۵) از نظر غلظت مؤثر بین میانگین داده‌های پوست تنه و شاخه اختلاف معنی داری وجود نداشت ولی بین میانگین عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH بعد از اسید آسکوربیک(IC_{50}= ۰/ ۱۱۳ mg/ml) مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه به ترتیب ۰/۱۲۹ و ۰/۱۳۰ و کمترین فعالیت نیز مربوط به عصاره های کلروفرمی تنه وشاخه به ترتیب به میزان ۰/۱۴۷ و۰/۱۴۲ میلی گرم بر میلی لیتر بودند.

جدول ۳- مقادیر فلاونوئید کل پوست تنه و شاخه درخت بید

نوع اندام	نوع عصاره	فلاونوئید کل بر حسب(mg Q /g dw)
پوست تنه	اتانولی	۶۸/۵۳±۰/۸۵[d #]
پوست تنه	اتیل استاتی	۴۲/۵۰±۱/۲۱[c]
پوست تنه	متانولی	۳۰/۶۶±۰/۸۵[b]
پوست تنه	کلروفرمی	۱۲/۵۶±۰/۲۹[a]
پوست شاخه	اتانولی	۷۱/۰۲±۴/۰۸[d]
پوست شاخه	اتیل استاتی	۴۸/۱۲±۱/۳۶[c]
پوست شاخه	متانولی	۴۵/۱۰±۲/۷۵[c]
پوست شاخه	کلروفرمی	۱۳/۸۰±۰/۵۷[a]

[#]حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند.

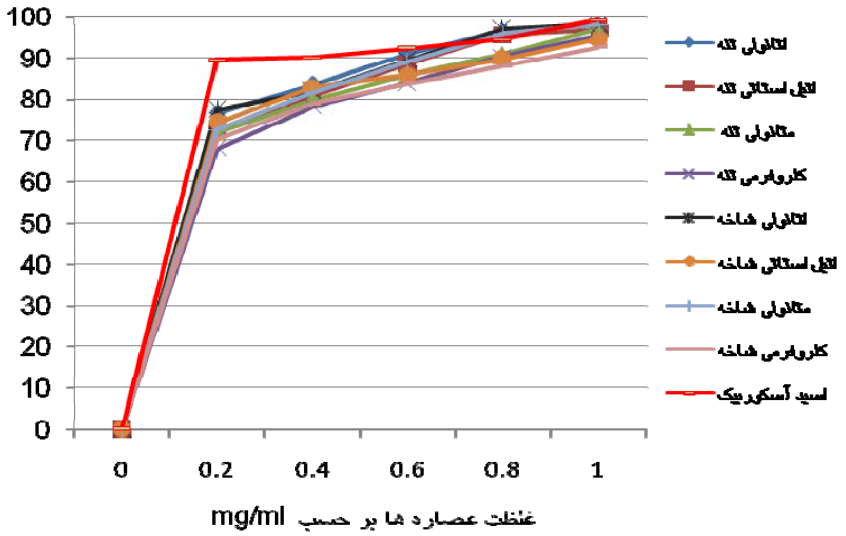
جدول۴- تجزیه واریانس مقادیر فلاونوئید

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
عصاره	۱	۳۲۵۷/۵۸	۲۹۴/۹۹[**]
اندام	۳	۲۱۲/۱۱	۱۹/۲۰[**]
عصاره* اندام	۳	۵۳/۱۵	۴/۸۱[**]
خطا	۱۶	۱۱/۰۴	-
کل	۲۳	-	-

[**]معنی دار در سطح احتمال۰/۰۱

جدول۵- اعداد جذب نمونه های عصاره ها در تست DPPH، Ac =۲/۵۳۱۷

اندام	عصاره	گروه	عدد جذبی و درصدDPPH برای هر غلظت(mg/ml)					IC_{50}
			۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱	
تنه	اتانولی	As	۰/۶۱۱۹	۰/۴۵۵۲	۰/۲۸۱۹	۰/۱۶۴۶	۰/۱۴۳۶	۰/۱۳۰[a]
		Ab	۰/۰۲۱۵	۰/۰۳۸۱	۰/۰۵۲۹	۰/۰۷۹۴	۰/۰۸۸۲	
		DPPH%	۷۶/۶۷	۸۳/۵۲	۹۰/۹۵	۹۶/۶۳	۹۷/۸۱	
تنه	اتیل استاتی	As	۰/۷۳۲۶	۰/۵۳۵۹	۰/۳۵۴۴	۰/۲۰۲۰	۰/۱۸۷۴	۰/۱۳۸[b]
		Ab	۰/۰۳۴۹	۰/۰۴۸۷	۰/۰۶۲۸	۰/۰۸۹۴	۰/۱۰۷۳	
		DPPH%	۷۲/۴۴	۸۰/۷۵	۸۸/۴۸	۹۵/۵۵	۹۶/۸۳	
تنه	متانولی	As	۰/۷۶۳۱	۰/۶۰۶۳	۰/۴۹۶۴	۰/۴۱۲۸	۰/۲۹۰۳	۰/۱۳۹[b]
		Ab	۰/۰۵۲۱	۰/۰۹۷۵	۰/۱۴۲۱	۰/۱۷۹۶	۰/۲۱۰۶	
		DPPH%	۷۱/۹۴	۷۹/۹۰	۸۶	۹۰/۷۸	۹۶/۸۵	
تنه	کلروفرمی	As	۰/۸۵۱۵	۰/۶۲۵۰	۰/۵۱۹۲	۰/۳۸۰۲	۰/۲۶۵۴	۰/۱۴۷[c]
		Ab	۰/۰۴۱۲	۰/۰۷۶۲	۰/۱۱۲۱	۰/۱۳۵۱	۰/۱۴۸۷	
		DPPH%	۶۷/۹۹	۷۸/۳۲	۸۳/۹۱	۹۰/۳۱	۹۵/۳۹	
شاخه	اتانولی	As	۰/۶۱۱۴	۰/۵۱۲۹	۰/۲۹۴۸	۰/۱۷۴۲	۰/۱۶۰۶	۰/۱۲۹[a]
		Ab	۰/۰۴۲۱	۰/۰۵۶۲	۰/۰۶۸۴	۰/۰۹۴۷	۰/۱۱۰۸	
		DPPH%	۷۷/۵۱	۸۱/۹۶	۸۹/۴۲	۹۶/۸۵	۹۸	
شاخه	اتیل استاتی	As	۰/۶۹۸۴	۰/۵۱۸۱	۰/۴۶۲۱	۰/۳۹۸۷	۰/۳۱۰۶	۰/۱۳۴[b]
		Ab	۰/۰۴۷۹	۰/۰۸۶۶	۰/۱۰۲۱	۰/۱۳۶۷	۰/۱۷۲۴	
		DPPH%	۷۴/۳۰	۸۲/۹۵	۸۵/۷۸	۸۹/۶۵	۹۴/۵۴	
شاخه	متانولی	As	۰/۷۲۱۴	۰/۵۰۲۱	۰/۳۲۵۴	۰/۱۷۴۲	۰/۱۳۶۹	۰/۱۳۷[b]
		Ab	۰/۰۲۶۹	۰/۰۳۹۴	۰/۰۴۹۸	۰/۰۶۹۲	۰/۰۸۴۰	
		DPPH%	۷۲/۵۶	۸۱/۷۲	۸۹/۱۱	۹۵/۸۵	۹۷/۹۱	
شاخه	کلروفرمی	As	۰/۸۰۱۴	۰/۵۹۱۹	۰/۵۰۲۱	۰/۴۱۱۲	۰/۳۱۱۱	۰/۱۴۲[c]
		Ab	۰/۰۴۸۹	۰/۰۵۹۳	۰/۰۹۱۴	۰/۱۰۴۸	۰/۱۲۴۰	
		DPPH%	۷۰/۲۷	۷۸/۹۶	۸۳/۷۷	۸۷/۸۹	۹۲/۶۰	



نمودار۱- فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌ها

بحث

میزان فنل و خواص آنتی اکسیدانی گیاهان هر منطقه بستگی به پارامترهای زیادی از جمله؛ آب و هوا، خاک و ارتفاع و گونه های مختلف گیاهان دارد (۱۲). با مقایسه IC_{50} مربوط به عصاره‌ها و اسید آسکوربیک مشخص می گردد، فعالیت عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی پوست شاخه بید همدان بسیار مشابه با اسید آسکوربیک می‌باشد. با در نظر گرفتن این مشابهت، شاید بتوان از عصاره‌های این گیاه به عنوان جایگزینی طبیعی برای برخی از ترکیبات ضد رادیکالی و ضد سرطانی سنتتیک استفاده کرد. گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان بوده می‌توانند باعث حفاظت سلولها از آسیبهای اکسیداتیوشوند. در این میان فلاونوئیدها به عنوان بخش مهمی ازترکیبهای گیاهان دارویی بوده که دارای اثرضد التهابی، ضد ویروس وضد دیابت هستند (۱۷).

سنجش میزانIC_{50} در تعداد دیگری از گیاهان خانواده سالیکاسه نیز بررسی شده است. در تحقیقی که توسط سوری و همکاران (۱۸) برای غربالگری عصاره‌های ۱۳ گیاه دارویی برای فعالیت آنتی اکسیدانی از پوست تنه سالیکس اس پی استفاده گردید، نتایج تست DPPH نشان داد که عصاره متانولی سالیکس اس پی با IC_{50} برابر با ۱/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با منتا اسپیکاتا، سالویا هیدرانجه، زاتاریا مولتی فلورا و آچیلا تنویفولیا از IC_{50}کمتری برخوردار است و نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جاروکردن رادیکال آزاد برخی مواد گیاهی دیگر از قبیل منتااسپیکاتا وسالیکس کاپریا با نتایج پژوهش حاضرمطابقت دارد.

درباره عصاره‌های بیواکتیو گونه‌های سالیکاسه، تعیین فیتوشیمیایی قبلی درباره عصاره‌های بیواکتیو، عصاره متانولی گونه‌های سالیکاسه حضور گلیکوزیدهای فنولی به خصوص سالیسین و همچنین فلاونوئیدهای لوتئولین، کوئرستین و روتین را اثبات کرده است (۱۹) وسالیسین گلیکوزید فنولی در عصاره‌های بیواکتیو گونه‌های سالیکس به عنوان واکنش‌گر فارماکولوژیکی عمده ، به دلیل ساختار مشابه به آسپرین در نظر گرفته شده است که اکثر فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی را می‌توان به آن ربط داد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانی پوست درخت به واسطه عصاره‌های کلروفرم، اتیل استات، اتانولی و متانولی انجام گرفت، پوست درخت گردو دارای مقادیر فنول و فلاونوئید متفاوتی در هریک از عصاره‌ها بود به طوری که عصاره اتیل استاتی مواد گیاهی محتوای فنولیک وفلاونوئید بالاتری از عصاره‌های کلروفرم، اتانول و متانول نشان دادند و محتوای فنول کل از ۲۰/۳۲ تا ۴۴/۸۷ میلی گرم بر گرم در پودر عصاره متنوع بود (۴). فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که همانند سایر ترکیبات فنولی توانایی جذب رادیکالهای آزاد را دارند. در تنشهای اکسیداتیو ترکیبات فنولی به ویژه فلاونوئیدها می‌توانند با فسفولیپیدهای غشاء از طریق پیوند هیدروژنی با سرهای قطبی فسفولیپیدها ارتباط برقرار کنند، در نتیجه این ترکیبات در سطح داخل و خارج غشاء جمع شده و به دلیل جلوگیری از دستیابی مولکولهای آسیب رسان به ناحیه هیدروفوبی دوقطبی به حفظ سیالیت و تمامیت غشا کمک می‌کنند (۲). اهمیت ترکیبات گیاهی در ارتقای سلامت بدن، حفظ و نگهداری از مواد درون سلولها، بافتها و یا کل بدن انسان شناخته شده است. ترکیبات گیاهی که اغلب با سلامت انسان در ارتباط هستند شامل پلی‌فنلها، کاروتنوئیدها و توکوفرولها می‌باشند. پلی فنلها گروه بزرگی از متابولیتهای ثانوی هستند که خاصیت مهار رادیکالهای آزاد توسط آنها در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (۳).

نتیجه گیری

مشخص شده است که با افزایش ترکیبات فنولی، خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتر می‌شود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد، توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکالهای

آزاد دارند و فعالیت آنتی اکسیدانی و جاروکردن رادیکال آزاد متفاوت ممکن است تا حدی مربوط به تنوع وسیع مواد آنتی اکسیدانی از قبیل فنولها، آسکوربات و کاروتنوئیدها باشد. همچنین آنتی اکسیدانها و بازدارنده های رادیکالهای آزاد که اکسیداسیون را شروع و واکنشهای گسترش زنجیره رادیکال آزاد را باز می دارند، شناخته شده اند که می‌توانند عکس‌العمل متفاوتی داشته باشند.

تقدیر و تشکر

از کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی سرکار خانم مهندس احمدی به خاطر همکاری و کمک بی دریغشان تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱ – جلالی، م، اصغری، غ، عابدی، د، رضایی، ز. ۱۳۸۶. بررسی اثر ضد میکروبی چند عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocyclaspinosa* . مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۵۹: ۸۵–۷۶.

۲ – خانپور اردستانی، ن ، شریفی، م. و بهمنش، م. ۱۳۹۳. اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سلول *Scrophularia straita Boiss* . مجله پژوهشهای گیاهی . ۲۷(۵):۸۵۰ .

۳ – الماسی، ن، کرمیان، ر. و کریمی، ف. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea L.* (مرکبان) از ایران . مجله پژوهشهای گیاهی. ۲۸(۲):۲۲۸.

4. Asha k, Sucheta G, Kavita M, Nirmala D , Jyoti S. 2010. Quantification of phenolics and flavonoids by spectrophotometer from -Juglans regia.International Journal of Pharma and Bio Sciences. (1)3:1-4.

5. Cochranc CG. 1997. Cellular injury by antioxidants. Am J Med. 32: 55-235.

6. Enayat S, Banerjee S. 2009. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of Salix aegyptiaca sp. Food Chemistry. 116 :23–28.

7. Espin JC, Soler- Rivas C and Wichers HJ. 2000. Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetabale oils and oil fractions using 2, 2- diphenyl- 1- picrylhydrazyl radical. J. of Agr. and Food Chem. 48: 648 - 656.

8. Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 280(1):1-8.

9. Halliwell B.1995. Antioxidant characterization methodology and mechanisms. Biochemical Pharmacological. 49(10): 84- 1341.

10. Jones, C. 2003. Practical COX-1 and COX-2. pharmacology: What’s it all about?.Pain. 1–5.

11. Meltzer HM, Malterud KE. 1997. Can dietary flavonoids infuence the development of coronary heart disease? Scand J Nutr. 41(2): 7-50.

12. Mirzaei A, Akbartabar M, Sadeghi H, Sharifi B. 2010.The Antioxidant Activities and Total Phenolic of Artemisia Martima, Achillea Millefoliumand Matricaria Recutica.Journal of Armaghan Danesh.15(1):243-252.

13. Mohamed SK, Sahar Y A, Mohamed SH. 2010. phytochemical study and evaluationof the anti-inflammatory activity of some medicinal plants growing in egypt. Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences. 18:(4) 139-150.

14. Mohammad K, Siddiqui H, Sheeba F. 2011. In-vitro Assessment of Antioxidant Activity of Dalbergia latifolia Barks Extract Against Free Radicals. American-Eurasian Journal of Scientific Research. 6 (3): 172-177.

15. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ,Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology.5(11):1142-1145.

16. Rice-Evans C, N J Miller and G Paganga.1996. Structure-antioxidant activity relationships of

flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol.Med. 20: 933-956.

17. Saeedi KA, Omidbaigi R. 2009. Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of *Kelussia odoratissima Mozaff. Seed*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 25(1):113 -119.

18. Souri E, Amin Gh, Farsam H. 2008. Screening of Thirteen Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Activity. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 7 (2): 149-154.

19. Stahl E. 1969. Thin layer chromatography. 2nd ed. Springe Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

20. Stojichevich SS, Stanisavljevich IV, Velichkovich DT, Veljkovich VB, Lazich ML.2008. Comparative of the anti-oxidant and antimicrobial activities of Sempervivum marmoreum L. extracts obtained by various extraction techniques. Journal of the Serbian Chemical Society. 73(6):597-607.

21. Yik LC, Elaine WLC, Pei LT, Yau YL, Johnson S, Joo KG, et al. 2011 .Assessment of phytochemical content,polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. Chew BMC Complementary and Alternative Medicine 11:12.

22. Zargari A. 1992. Medicinal plants. vol 3.Tehran University press. 300-916.

The study of flavonoids and antioxidant power of ِetanolic,metanolic,hydroalcholic and etylacetatic extracts of branch and stem bark of Salix alba

Mantashlo J., Deljoo A. and Piri Kh.

Biotechnology Dept., Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Plants are potential sources of natural antioxidants and produce various antioxidative compounds to counteract reactive oxygen species. The aim of the present study was to determine total phenol and flavonoid and antioxidant activity of four various extracts of stem and branch barks of *Salix alba* from Hamedan. In this study Phenol and flavnoid tests were done To determine antioxidant compounds. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assay was used to determine the free radical quenching capacity.The collected data was analyzed by SPSS software. The highest value of total phenol were relevant to ethanolic extracts of branch and stem barks that 60.87±1.19and 69.98±1.41mg Gallic acid/g dw was measured, respectively and the lowest value of total phenol were determined to chloroformic extracts. The highest level of total flavnoid in branch and stem barks were relevant to ethanolic extract amount71.20±4.08 and60.87±1.19 respectively and also the lowest level were determined to chloroformic extracts of stem and branch barks amount12.56±0.29 and13.80±0.57 respectively. Furthermore the most activity of the free radical quenching capacity DPPH after Ascorbic Acid were determined to ethanolic extracts of branch and stem bark0.129and 0.130mg/ml. There were significant differences between means of total flavnoid and total phenol of stem and branch barks. In conclusion**,** The best antioxidant activity were relevant to ethanolic extracts of branch and stem barks.

Key words*: Salix Alba* , Antioxidant, Reactive Oxygen Species