

## بررسی میزان فنول و فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی، متانولی، کلروفرمی و اتیل 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 آنتی‌اکسیدانهای طبیعی هستند و ترکیبات آنتی‌اکسیداتیو گوناگونی برای خنثی کردن گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر تولید می‌کنند. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری میزان فنول و فلاونوئید تام و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۴ نوع عصاره مختلف پوست تنه و شاخه درخت بید همدان بود. در این مطالعه تجربی، برای اندازه‌گیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آزمون فنول و فلاونوئید کل به کار رفت. جهت ارزیابی خاصیت آنتی‌رادیکالی از آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSSV:16 تجزیه و تحلیل شدند. بیشترین محتوای فنول کل مربوط به عصاره اتانولی پوست شاخه‌های جوان و پوست تنه به ترتیب به میزان  $69/98 \pm 1/41$  و  $60/87 \pm 1/19$  میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک و کمترین میزان فنول هم مربوط به عصاره‌های کلروفرمی بود. بیشترین محتوای فلاونوئید کل در پوست شاخه و تنه، مربوط به عصاره اتانولی به میزان  $71/20 \pm 4/08$  و  $60/87 \pm 1/19$  و نیز کمترین مقادیر مربوط به عصاره‌های کلروفرمی پوست تنه و شاخه به میزان  $12/56 \pm 0/29$  و  $13/80 \pm 0/57$  بود. همچنین بیشترین فعالیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH بعد از اسید آسکوربیک مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه به ترتیب  $0/129$  و  $0/130$  بودند. بین میانگینهای فلاونوئید کل و فنول کل عصاره پوست تنه و شاخه اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در نتیجه، بهترین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه بودند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدان، فنول کل، فلاونوئید کل، درخت بید

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

### مقدمه

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 می‌باشد به طوری که به آنها بعنوان عوامل کاهنده، دهنده‌های هیدروژن و اطفاء‌کننده‌های اکسیژن برای واکنش اجازه می‌دهد و دارای پتانسیلی برای کلات شدن با عناصر فلزی می‌باشد (۱۶). گیاهان منابع پتانسیلی از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی هستند و ترکیبات آنتی‌اکسیداتیو گوناگونی برای خنثی کردن گونه‌های اکسیژن

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

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان گزارش شده است. هریک از این روشها کاستیها و برتریهای خود را دارند.

سالیسیلات‌ها (سالیسیلیک اسید و استیل سالیسیلیک اسید) نوعی از ترکیبات هستند که در سرتاسر جهان برای قرن‌ها به عنوان کاهنده درد، تب‌بر و داروهای ضد اشتعالی استفاده شده‌اند. مطالعات نشان داد که بیماران تحت دوره درمان طولانی‌آسپرین تمایل کمتری به توسعه بیماری قلبی عروقی و سرطان از خود نشان داده‌اند. با توجه به اینکه اسید سالیسیلیک و سایر سالیسیلاتها به طور طبیعی در میوه‌های 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 سالی‌ژین به دست می‌آید. این گلوکزید اگر تحت اثر اسید نیتریک و با رعایت احتیاط اکسید گردد ماده‌ای به نام هلی‌سین از آن به دست می‌آید. هلی‌سین و اسپرین 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 سالی‌پورپوزید 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 قاعدگی‌های دردناک و سیلان منی می‌باشد.

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 آنتی‌اکسیدانهای قوی و رباینده‌های رادیکال آزاد می‌باشند که می‌توانند بعنوان دهنده‌های هیدروژن، عوامل کاهنده، کلات‌کننده‌های فلزی و خاموش‌کننده‌های 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 بوده‌اند (۲۱). رادیکالهای آزاد، اتمها یا مولکولهایی هستند که به دلیل داشتن الکترونهاي جفت نشده، در بدن بسیار واکنش‌پذیر بوده و آسیب بسیاری به ماکرومولکولهای پروتئینها، لیپیدها و کربوهیدراتها و DNA بدن وارد می‌سازند (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 آنتی‌اکسیدانی معروفند (۵). در یک فرد سالم، بین تولید رادیکال آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی توازن برقرار است. عدم تعادل در میزان تولید رادیکالهای آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، 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 آنتی‌اکسیدانی، به دام اندازی رادیکال آزاد، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهشی این ترکیبات صورت گرفته است. مهم‌ترین خصوصیت فلاونوئیدها نقش آنها در پیشگیری از بیماریهای قلبی عروقی است (۱۱). روشهای متفاوتی برای

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 اندازه‌گیری 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.

**اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل:** مقادیر فلاونوئیدها در نمونه عصاره‌های گیاهی به روش پورمراد و همکاران جلالی و همکاران اندازه‌گیری شدند (۱ و 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  $10^{-4}$  ۳× مولار DPPH مخلوط گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تحت شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از این

سالیسین، خاصیت آرام‌کننده عصبی و تب‌بر 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 اندازه‌گیری 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 جمع‌آوری 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 عصاره‌گیری 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 روئی 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.

**اندازه‌گیری میزان فنول کل:** جهت اندازه‌گیری 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  یک مولار مخلوط گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر

## نتایج

جدول ۱ مقادیر فنول کل (برحسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک) را برای عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، متانولی و کلروفومی نمونه‌های پوست تنه و شاخه درخت بید همدان را نشان می‌دهد. با توجه به جدول مشخص می‌شود که بیشترین محتوای فنول کل مربوط به عصاره اتانولی پوست شاخه‌های جوان و پوست تنه به ترتیب به میزان  $69/98 \pm 1/41$  و  $60/87 \pm 1/19$  میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک و کمترین میزان فنول هم مربوط به عصاره‌های کلروفومی می‌باشد با توجه به (جدول ۲) بین میانگین مقادیر فنول عصاره پوست تنه و شاخه اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

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

As: جذب نمونه تیمار، حاوی محلول عصاره و DPPH

Ac: جذب نمونه شاهد Ab: جذب نمونه blank

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

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

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

جدول ۱- مقادیر فنول کل پوست تنه و شاخه درخت بید

نوع اندام	نوع عصاره	مقادیر فنول کل (mg GAE/g dw)
پوست تنه	اتانولی	$60/87 \pm 1/19^c$
پوست تنه	اتیل استاتی	$46/41 \pm 1/20^c$
پوست تنه	متانولی	$35/24 \pm 0/47^b$
پوست تنه	کلروفومی	$10/31 \pm 0/52^a$
پوست شاخه	اتانولی	$69/98 \pm 1/41^f$
پوست شاخه	اتیل استاتی	$60 \pm 1/12^d$
پوست شاخه	متانولی	$43/56 \pm 0/32^c$
پوست شاخه	کلروفومی	$14/93 \pm 0/40^a$

جدول ۲- 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 احتمال ۰/۰۱

آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها آورده شده است. نمودار ۱ منحنی تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی و مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌های گیاهی در برابر اسید آسکوربیک را نشان می‌دهد. نمودار نشان می‌دهد که میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌ها با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی افزایش یافته است. براساس (جدول ۵) از نظر غلظت مؤثر بین میانگین داده‌های پوست تنه و شاخه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی بین میانگین عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بعد از اسید آسکوربیک ( $IC_{50} = 0/113 \text{ mg/ml}$ ) مربوط به عصاره اتانولی شاخه و تنه به ترتیب  $0/129$  و  $0/130$  و کمترین فعالیت نیز مربوط به عصاره‌های کلروفومی تنه و شاخه به ترتیب به میزان  $0/147$  و  $0/142$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند.

جدول ۳ مقادیر فلاونوئید کل (برحسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) را برای عصاره‌های اتانولی، اتیل استاتی، متانولی و کلروفومی 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  $71/20 \pm 4/08$  و  $60/87 \pm 1/19$  و نیز کمترین مقادیر مربوط به عصاره‌های کلروفومی پوست تنه و شاخه به میزان  $12/56 \pm 0/29$  و  $13/80 \pm 0/57$  می‌باشد. همچنین بین میانگین‌های فلاونوئید کل عصاره‌های پوست تنه و شاخه اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

ارزیابی فعالیت جاروکردن رادیکال آزاد توسط عصاره‌های 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

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	$68/53 \pm 0/85^d \#$
پوست تنه	اتیل استاتی	$42/50 \pm 1/21^c$
پوست تنه	متانولی	$30/66 \pm 0/85^b$
پوست تنه	کلروفومی	$12/56 \pm 0/29^a$
پوست شاخه	اتانولی	$71/02 \pm 4/08^d$
پوست شاخه	اتیل استاتی	$48/12 \pm 1/36^c$
پوست شاخه	متانولی	$45/10 \pm 2/75^c$
پوست شاخه	کلروفومی	$13/80 \pm 0/57^a$

#حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند.

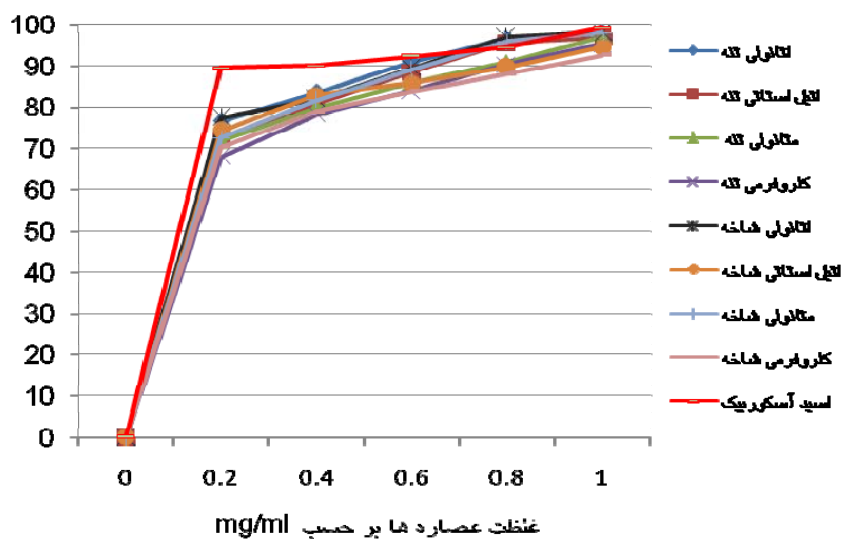
جدول ۴- تجزیه واریانس مقادیر فلاونوئید

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 احتمال ۰/۰۱

جدول ۵- اعداد جذب نمونه‌های عصاره‌ها در تست DPPH.  $Ac = 2/5317$

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



نمودار ۱- فعالیت ضد رادیکالی عصاره‌ها

## بحث

میزان فنل و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان هر منطقه بستگی به پارامترهای زیادی از جمله؛ آب و هوا، خاک و ارتفاع و گونه‌های مختلف گیاهان دارد (۱۲). با مقایسه  $IC_{50}$  مربوط به عصاره‌ها و اسید آسکوربیک مشخص می‌گردد، 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 اکسیداتیو شوند. در این میان فلاونوئیدها به عنوان بخش مهمی از ترکیبهای گیاهان دارویی بوده که دارای اثر ضد التهابی، ضد ویروس و ضد دیابت هستند (۱۷).

سنجش میزان  $IC_{50}$  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 آنتی‌اکسیدانی از پوست تنه سالیکس اس پی استفاده گردید، نتایج تست DPPH نشان داد که عصاره متانولی سالیکس اس پی با  $IC_{50}$  برابر با  $1/03$  میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با متا اسپیکاتا، سالویا هیدرانجه، زاتاریا مولتی فلورا و آچیلای تنوفولیا از  $IC_{50}$  کمتری برخوردار است و نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جارو کردن رادیکال آزاد برخی مواد گیاهی دیگر از قبیل متا اسپیکاتا و سالیکس کاپریا با نتایج پژوهش حاضر مطابقت 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) و سالیسین

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 به منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پوست درخت به واسطه عصاره‌های کلروفورم، اتیل استات، اتانولی و متانولی انجام گرفت، پوست درخت گردو دارای مقادیر فنول و فلاونوئید متفاوتی در هر یک از عصاره‌ها بود به طوری که عصاره اتیل استاتی مواد گیاهی محتوای فنولیک و فلاونوئید بالاتری از عصاره‌های کلروفورم، اتانول و متانول نشان دادند و محتوای فنول کل از  $20/32$  تا  $44/87$  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. پلی‌فنلها 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 آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود. ترکیبات فنولی با وزن مولکولی زیاد، توانایی زیادی برای پاک‌سازی رادیکالهای

## تقدیر و تشکر

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

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

## منابع

- ۱ - جلالی، م، اصغری، غ، عابدی، د، رضایی، ز. ۱۳۸۶. بررسی اثر ضد میکروبی چند عصاره مختلف میوه گیاه *Pycnocyclaspina*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ۷۶-۸۵: ۵۹
- ۲ - خانپور اردستانی، ن، شریفی، م، و بهمنش، م. ۱۳۹۳. اثر متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولی و
- ۳ - الماسی، ن، کرمان، ر. و کریمی، ف. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی سه گونه از جنس *Centaurea L.* (مرکبان) از ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۲۸(۲):۲۸
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. Cochran 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 vegetable 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 influence 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 Millefolium* and *Matricaria Recutita*. Journal of Armaghane Danesh. 15(1):243-252.
13. Mohamed SK, Sahar Y A, Mohamed SH. 2010. phytochemical study and evaluation of 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. 2<sup>nd</sup> 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 ethanolic, metanolic, hydroalcoholic 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 flavonoid 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  $60.87 \pm 1.19$  and  $69.98 \pm 1.41$  mg Gallic acid/g dw was measured, respectively and the lowest value of total phenol were determined to chloroformic extracts. The highest level of total flavonoid in branch and stem barks were relevant to ethanolic extract amount  $71.20 \pm 4.08$  and  $60.87 \pm 1.19$  respectively and also the lowest level were determined to chloroformic extracts of stem and branch barks amount  $12.56 \pm 0.29$  and  $13.80 \pm 0.57$  respectively. Furthermore the most activity of the free radical quenching capacity DPPH after Ascorbic Acid were determined to ethanolic extracts of branch and stem bark  $0.129$  and  $0.130$  mg/ml. There were significant differences between means of total flavonoid 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