فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ دوم/ پاییز و زمستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2018.9956.1565

ارزیابی محتوای ترکیبات فنلی، آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه گونه عسلک (تیره گاوزبان) از ایران

Evaluation of Total Phenolic Compounds, Alkaloids and Proanthocyanidins Contents and Antioxidant Activity in Three *Onosma* Species (Boraginaceae) From Iran

رویا کرمیان[۱*]، فاطمه آراوند[۲]، حسین جهانیان نجف‌آبادی[۳] و رامتین پاکزاد[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۶

چکیده

جنس عسلک (*Onosma* L.) یکی از جنس‌های مهم تیره گاوزبان (Boraginaceae) است. در فلور ایرانیکا برای این جنس ۵۵ گونه معرفی شده‌است که ۱۷ گونه آن انحصاری ایران هستند. گونه‌های این جنس حاوی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند. در این مطالعه محتوای فنل، فلاونوئید، پروآنتوسیانیدین و آلکالوئید کل و نیز پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی بخش‌های هوایی سه گونه از جنس *Onosma* شامل *Onosma pachypoda* L.، *Onosma sericea* L. و *Onasma microcarpa* DC. از فلور ایران ارزیابی شد. نتایج نشان داد که گونه *Onosma microcarpa* بیش‌ترین محتوای فنل کل و گونه‌های *Onosma sericea* و *Onosma pachypoda* بیش‌ترین محتوای فلاونوئید کل را دارا هستند. بیش‌ترین محتوای آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل به‌ترتیب در دو گونه *Onosma sericea* و *Onosma pachypoda* مشاهده شد. تمام گونه‌های موردمطالعه پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان دادند و در بین آن‌ها گونه *Onosma sericea* با کم‌ترین میزان IC_{50}، بیش‌ترین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد. به نظر می‌رسد که ترکیبات فنلی نقش قابل‌توجهی در ارائه فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های موردمطالعه دارند.

واژه‌های کلیدی: مهار رادیکال آزاد DPPH، بتاکاروتن- لینولئیک اسید، محتوای فیتوشیمیایی، فلور ایران

۱، ۲ و ۴. به‌ترتیب استاد و دانش‌آموختگان کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران
*: نویسنده مسئول Email: R_karamian@basu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده دوم می‌باشد که در دانشگاه بوعلی‌سینا انجام شده است.

مقدمه

تولید رادیکال‌های آزاد به علت پیشرفت تکنولوژی، تشعشع، آلاینده‌های شیمیایی، سموم، مواد نگهدارنده، تمایل شدید به استفاده از غذاهای آماده و نیز آسیب بسیاری از بافت‌ها، صدمه به سیستم عصبی مرکزی، ورم معده، سرطان و ایدز افزایش یافته‌است (*پورمراد*[1] و همکاران، 2006). به‌طور معمول گرایش فراوانی به استفاده از گیاهان دارویی و معطر به‌عنوان مواد آنتی‌اکسیدان وجود دارد. به‌علاوه این گیاهان به شکل طبیعی به‌عنوان عوامل ضدالتهاب[2] و ضدعفونی‌کننده[3] برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها به‌طور سنتی مورداستفاده قرار می‌گیرند. بنابراین مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد[4] ضروری است (*کای*[5] و همکاران، 2004). در گیاهان آوندی بیش از ۴۰۰۰ نوع ترکیب فنلی و پلی‌فنلی مانند اسیدهای فنلی، تانن‌ها، کومارین‌ها، آنتراکوئینون‌ها، فلاونوئیدها، دی‌تـرپن‌های فنلی و آنتوسیانین‌ها شناخته شده‌اند که مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند (*میدلتون و کانداسوامی*[6]، 2000؛ *تریز* و *ایوانز*[7]، 1989). این ترکیبات از طریق اهداء الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن و یا کلات کردن کاتیون‌های فلزی، توانایی جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند (*پیتا*[8] و همکاران، 1998).

فلاونوئیدها به‌عنوان گروه مهمی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهان دارند (*هاربورن*[9] و همکاران، 2000). به‌علاوه این ترکیبات در فتوسنتز، انتقال انرژی، عملکرد هورمون‌های رشد و تنظیم رشد گیاه، کنترل تنفس، ریخت‌زایی و تعیین جنسیت گیاهان دخیل هستند (*اسمیت و بانکز*[10]، 1986). گزارش‌ها نشان داده‌اند که فلاونوئیدهای گیاهی از طریق تغییر بیان ژن‌های دخیل در تثبیت نیتروژن، بر فعالیت باکتری‌های ریزوبیوم اثر می‌گذارند. هم‌چنین به نظرمی‌رسد که میان برخی فلاونوئیدها و بیان ژن‌های ویژه پستانداران ارتباط وجود دارد (*فرمین*[11] و همکاران، 1986). فلاونوئیدهای گلیکوزیدی در برگ‌ها و میوه‌های جوان و حتی در ریشه‌ها و احتمالاً در واکوئل‌ها تجمع می‌یابند. در حین تقسیم سلولی و بلوغ میوه و برگ، میزان بیوسنتز فلاونوئیدها و غلظت آن‌ها در اثر رقیق شدن به تدریج کاهش می‌یابد (امیدبیگی، ۱۳۸۴). فلاونوئیدهایی چون ایزوفلاونوئیدها نقش حیاتی در همزیستی و مقاومت به بیماری در گیاهان دارند. آلودگی‌های میکروبی منجر به افزایش تجمع ایزوفلاونوئیدهای مشخصی می‌گردند که به عنوان آنتی‌بیوتیک عمل نموده و تهاجم میکروارگانیسم‌ها را محدود می‌کنند (*مک کال*[12] و همکاران، 1999). بنابراین تکمیل فرآورده‌های غذایی با فنل‌های گیاهی، تأمین‌کننده سلامت آن فرآورده‌هاست. فلاونوئیدها با مهار نمودن آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو و عملکرد ضدالتهابی خود، گروه اصلی ترکیبات کنترل‌کننده رادیکال‌های آزاد به شمار می‌روند. ارتباط مهمی میان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاهان و محتوای فنل و فلاونوئید کل درآن‌ها گزارش شده‌است (*سیلوا*[13] و همکاران، 2007). علاوه بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی، طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی را بر عهده دارند (*بلاساندرام*[14] و همکاران، 2006). پروآنتوسیانیدین‌ها پلیمرهایی از فلاوان ۳-اول‌ها[15]هستند و به‌عنوان تانن‌های متراکم در نظر گرفته می‌شوند. توانایی مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد این ترکیبات، ممکن است خطر بیماری‌های قلبی- عروقی (*رید*[16]، 2002؛ *استینبرگ*[17] و همکاران، 2003)، سرطان (*بگچی*[18] و همکاران، 2000) و انعقاد خون (*مورفی*[19] و همکاران، 2003) را کاهش دهد و انواع ویژه‌ای از پروآنتوسیانیدین‌های تریمری، در برابر آلودگی‌ها، محافظت‌کننده مجاری ادراری هستند (*فو*[20] و همکاران، 2002). آلکالوئیدها گروه بزرگی از مواد مؤثره گیاهی ارزشمند را تشکیل می‌دهند، ولی در میان آن‌ها برخی از خطرناک‌ترین و سمی‌ترین مواد موجود در طبیعت نیز یافت می‌شوند. این مواد در بسیاری از گیاهان گل‌دار وجود دارند (*بل*[21]، 1980؛ *کان*[22]، 1981). برای نخستین بار، *مایسنر*[23] از آلکالوئیدها به‌عنوان مواد نیتروژن‌داری که خاصیت قلیایی دارند و در محیط اسیدی نمک تولید می‌کنند، نام برده است. آلکالوئیدها در انسان واکنش‌های فیزیولوژیکی قوی ایجاد می‌کنند و به‌ویژه بر روی

1. Antiinflimation
2. Antiinfection
3. Free radical scavinging
4. Cai
5. Middleton and Kandaswami
6. Trease and Evans
7. Pietta
8. Harborne
9. Smith and Banks
10. Firmin

11. MC Call
12. Silva
13. Balasundram
14. Flavan 3-ol
15. Reed
16. Steinberg
17. Bagchi
18. Murphy
19. Foo
20. Bell
21. Conn
22. Maisner

سیستم عصبی اثر می‌گذارند (*موتز*[1]، 1985). آلکالوئیدها بسیار متنوع بوده و شمار آلکالوئیدهای شناخته شده در گیاهان به چند هزار غالب می‌گردد.

ایران از لحاظ آب و هوا، موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی در زمینه گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین مناطق جهان محسوب می‌شود و از گذشته منبع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده‌است (صمصام شریعت، ۱۳۸۲). جنس عسلک یکی از جنس‌های مهم تیره گاوزبان (Boraginaceae) است. این جنس با ۲۳۰ گونه چوبی و علفی از اسپانیا و شمال آفریقا تا چین پراکنش دارد. ایران، ترکیه و غرب سوریه مراکز اصلی تنوع این جنس هستند. در فلور ایرانیکا این جنس دارای ۵۵ گونه در سه بخش است که ۱۷ گونه آن انحصاری هستند که بیشتر در مناطق شمال غرب و غرب کشور پراکنش دارند (*رنجبر* و *الماسی*، 2014). گیاهان این جنس علفی، کم و بیش پایا و دوساله، پوشیده از کرک‌های زبر یا نرم و در پایه غده‌ای هستند. کاسه گل دارای ۵ قسمت، جام لوله‌ای یا گرزی شکل با ۵ لبه کوتاه و گلویی برهنه است. خامه دراز و دارای کلاله‌ای دولبه‌ای است. فندقه‌ها راست، براق و صاف و به‌ندرت غده‌دار و در یک سطح مقعر هستند (*الشهباز*[2]، 1999). گونه‌های این جنس خواص دارویی متنوعی دارند. در مناطق روستایی ترکیه برخی از گونه‌های *Onosma* مانند *O. microcarpa* به‌منظور درمان زخم‌ها و سوختگی‌ها بکار می‌روند (*سزیک*[3] و همکاران، 1997). ریشه برخی از آن‌ها واجد موادی نظیر آلکانین، شیکونین و مشتقات آن‌ها با طیف وسیعی از خواص بیولوژیکی هستند. سطوح بالای ترکیبات فنلی در عصاره ریشه، معرف حضور مقادیر زیادی از کلروژنیک اسید، کوئرستین و رزماریک اسید و نیز ماده رنگینی است که در بافت‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (عطار و حمزه‌ای[4]، 2007). نظر به اهمیت دارویی اعضاء جنس *Onosma*، در این مطالعه محتوای فنل، فلاونوئید، پروآنتوسیانیدین و آلکالوئید کل و نیز پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش‌های هوایی سه گونه *O. pachypoda*، *O. sericea* و *O. microcarpa* از فلور ایران ارزیابی شد.

مواد گیاهی

سه گونه گیاهی از جنس *Onosma* شامل *Onosma pachypoda* L.، *Onosma sericea* L. و *Onasma microcarpa* DC. از رویشگاه‌های طبیعی آن‌ها در سه استان همدان، کرمانشاه و آذربایجان جمع‌آوری شدند (جدول ۱ و شکل ۱) و پس از انتقال به هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه بوعلی سینا با استفاده از منابعی مانند فلورا ایرانیکا شناسایی گردیدند. بخش‌های هوایی آن‌ها پس از جمع‌آوری، در دمای اتاق و سایه خشک شده و جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره‌های گیاهی

مواد گیاهی پس از خشک شدن در دمای اتاق توسط آسیاب پودر شدند. مقدار ۲۵ گرم از پودر گیاه تهیه شده توسط دستگاه Soxhlet با استفاده از ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شدند. عصاره‌ها توسط دستگاه روتاری Lab Tech مدل EV311 (ساخت ایتالیا) تحت فشار خلأ و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا حجم ۱۵ میلی‌لیتر تغلیظ شدند. عصاره غلیظ شده سپس در دمای اتاق تبخیرشده و به صورت یک ماده گریسی درآمد و تا زمان مصرف در ظروف با درب بسته در فریزر نگه‌داری (۲۰- درجه سانتی‌گراد) شدند.

سنجش محتوای فنل کل

محتوای فنل‌کل توسط شناساگر فولین- سیوکالتئو[5] ارزیابی گردید (*سینگلتون* و *روسی*[6]، 1965). ۱۰۰ میکرولیتر عصاره رقیق شده از هر گونه یا اسیدگالیک (ترکیب استاندارد فنل) با ۰/۷۵ میلی‌لیتر شناساگر فولین- سیوکالتئو مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم (w/v) ۶٪ به مخلوط اضافه شد و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. منحنی استاندارد بااستفاده از غلظت‌های مختلف ۰ (صفر)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر محلول اسیدگالیک در متانول ۵۰٪ تهیه گردید. محتوای فنل‌کل عصاره‌های موردمطالعه در سه تکرار به‌صورت معادل میلی‌گرم اسیدگالیک (GAE) بر گرم وزن خشک بیان شد.

1. Mothes
2. Al-Shahbaz
3. Sezik
4. Attar and Hamzehee
5. Folin-Ciocalteu
6. Singelton and Rossi

جدول ۱: مشخصات سه گونه موردمطالعه از جنس *Onosma*

Table 1: Characteristics of the three studied species from *Onosma* genus

گونه Species	شماره هرباریومی Herbarium number	محل جمع‌آوری Location of collection	ارتفاع (متر) Altitude (m)	مشخصات جغرافیایی Geographic characteristics	میانگین بارندگی سالیانه (میلی‌متر) Annual rainfall average (mm)
Onosma microcarpa	BASU 26135	Hamedan: Tuyserkan, 7 km after Saki	2685	43° 20′ N, 48° 3′ E	105
Onosma sericea	BASU 33003	Kermanshah: 5 km after Tazehabad to Javanrood	1906	34° 25′ N, 46° 25′ E	600
Onosma pachypoda	BASU 29802	East Azarbayejan: Salmas, Mamkan	1500	38° 11' N, 44° 47' E	401

شکل ۱: تصاویر سه گونه از جنس *Onosma* موردمطالعه در طبیعت. A) *O. pachypoda*، B) *O. microcarpa* و C) *O. sericea*

Fig. 1: Images of the three studied species from *Onosma* genus in the field: A) *O. pachypoda*, B) *O. microcarpa*, C) *O. sericea*

سنجش محتوای فلاونوئید کل

برای سنجش محتوای فلاونوئید کل از روش کلرید آلومینیوم استفاده شد (*کانگ*[1] و همکاران، 2002). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (w/v) ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط گردید. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. جذب مخلوط واکنش توسط اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید کل

1. Chang

نمونه‌ها در سه تکرار به‌صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بیان گردید.

سنجش محتوای آلکالوئید کل

سنجش محتوای آلکالوئید کل به روش وزنی انجام شد (*اونووکا*[1]، 2006). ۵ گرم از گیاه پودر شده در ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۰٪ در متانول مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰rpm قرار داده‌شد و پس از ۴ ساعت سکون، با استفاده از کاغذ صافی (شماره ۳۸۹ سارتوریوس) فیلتر شد. حجم محلول فیلتر شده با استفاده از هیتر تا ۱/۴ حجم اولیه تقلیل یافت. سپس به آن قطره قطره محلول هیدروکسید آمونیوم ۳۰٪ تا زمان رسوب آلکالوئیدها، اضافه شد. سپس مخلوط با استفاده از یک کاغذ صافی توزین شده، فیلتر گردید. برای اطمینان کاغذ با هیدروکسید آمونیوم ۱٪ شستشو داده‌شد. کاغذ صافی در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم‌ساعت خشک شد و بلافاصله به دسیکاتور منتقل گردید تا رطوبت جذب نکند و سپس توزین انجام شد. اختلاف وزن اولیه و ثانویه بیانگر میزان آلکالوئید است که به‌صورت درصد بیان گردید.

سنجش محتوای پروآنتوسیانیدین

سنجش محتوای پروآنتوسیانیدین به روش وانیلین-اسیدکلریدریک انجام شد (*سان*[2] و همکاران،1998). به ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد عصاره متانولی، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول وانیلین ۱٪ در متانول و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۹ مولار در متانول اضافه شد. مخلوط واکنش به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و جذب آن توسط اسپکتروفتومتر Perkin Elmer مدل UV/Visible Lambda 45 در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر قرائت شد. در این روش برای رسم منحنی استاندارد، از محلول کاتکین[3] در متانول در غلظت‌های ۰ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتراستفاده شد. جذب کل با استفاده از (رابطه ۱) محاسبه گردید:

$$A = (A_s - A_b) - (A_c - A_0) \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن:

A_s: جذب ۱ میلی‌لیتر نمونه (یا کاتکین) به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر وانیلین و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک.

A_b: جذب ۱ میلی‌لیتر متانول به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر وانیلین و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک.

A_c: جذب ۱ میلی‌لیتر نمونه (یا کاتکین) به همراه ۲/۵ میلی‌لیترمتانول و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک.

A_0 (کنترل): جذب ۳/۵ میلی‌لیتر متانول و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از چهارآزمون زیر استفاده شد:

۱) قدرت احیاءکنندگی کل

۲) پتانسیل مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

۳) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاءیون مس (CUPRAC Assay)

۴) مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم بتاکاروتن/ لینولئیک اسید

۱. سنجش قدرت احیاءکنندگی کل

قدرت احیاءکنندگی کل در عصاره‌های مورد بررسی براساس روش *عربشاهی- دلوئی* و *عروج*[4] (2007) سنجیده شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از پتاسیم‌فری‌سیانید[5] ۱۰ گرم در لیتر، یک میلی‌لیتر عصاره و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH= ۶/۶, ۰/۲ M) در لوله آزمایش ریخته شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از سرد شدن به هر لوله ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید[6] ۱۰٪ اضافه شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۵۰ g سانتریفوژ گردید. ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ گرم در لیتر $FeCl_3$ مخلوط گردید و جذب آن توسط اسپکتروفتومتردر طول‌موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

۲. سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH[7]

به‌منظور بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPHگونه‌ها (*استوجیسویک*[8] و همکاران، 2008)، محلول متانولی عصاره‌ها با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از این عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت $۳/۰ \times ۱۰^{-۴}$ مولار مخلوط و پس از این‌که به شدت بهم زده شد، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. جذب مخلوط واکنش توسط

1. Onwuka
2. Sun
3. Catechin
4. Arabshahi-Deloue and Urooj
5. Potassium Ferricyanide
6. Trichloroacetic acid
7. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
8. Stojicevic

اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد و جذب نمونه (A_S) به‌دست آمد. سپس جذب محلول DPPH با غلظت فوق در طول موج فوق به‌دست آمد (A_C). همین عمل در مورد محلول هر عصاره به‌طور جداگانه انجام شد و جذب آن‌ها به دست آمد (A_B). نمونه‌ها در سه تکرار بررسی شدند. سپس درصد فعالیت جاروب کردن رادیکال آزاد DPPH در هر عصاره با استفاده از رابطه زیر مشخص گردید (رابطه ۲):

$$\%DPPH = 100 \times [1- (A_S - A_B/A_C)]$$ رابطه (۲)

در این رابطه، A_S جذب مخلوط واکنش شامل رادیکال آزاد DPPH و عصاره گیاه است، A_B جذب مخلوط عصاره در غیاب DPPH و A_C جذب مخلوط DPPH در غیاب عصاره گیاه است. از اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل استاندارد استفاده شد و مقدار IC_{50} هر عصاره و اسیدآسکوربیک محاسبه گردید. IC_{50} بیانگر غلظتی از عصاره است که باعث مهار ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH می‌شود.

۳. سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاء یون مس

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاء یون مس با استفاده ازروش *آپاک*[1] و همکاران (2006) سنجیده شد. یک میلی‌لیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار $CuCl_2$، یک میلی‌لیتر محلول نئوکوپرین ۵/۷ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر بافر استات‌آمونیوم (pH= ۷, ۱ M) در لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به لوله آزمایش اضافه و حجم نهایی توسط آب دیونیزه به ۱/۴ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۳۰ دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق، جذب توسط اسپکتروفتومتردر طول‌موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اسید آسکوربیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شاهد استفاده شد. نتیجه آزمایش بر حسب EC_{50} (غلظت مؤثری که در آن جذب برابر ۰/۵ است) محاسبه و گزارش شد.

۴. سنجش مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم بتاکاروتن/لینولئیک اسید[2]

در این روش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان مهار اکسیداسیون لینولئیک‌اسید و جلوگیری از ایجاد ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای همیوغ مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (*باریر*[3] و همکاران، 2001). برای انجام آزمایش ابتدا محلول پایه بتاکاروتن/لینولئیک اسید به‌صورت زیر تهیه گردید:

۰/۵ میلی‌گرم بتاکاروتن (سیگما) در یک میلی‌لیتر کلروفرم (مرک) حل شد و سپس ۲۵ میکرولیتر لینولئیک اسید (سیگما-آلدریچ) و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ (مرک) به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس کلروفرم با تبخیر در خلأ تبخیر گردید و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع شده از اکسیژن (۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) همراه با تکان شدید به آن اضافه شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از عصاره (با غلظت ۲ گرم در لیتر در اتانول) اضافه گردید. تمام مراحل برای بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT) به‌عنوان شاهد مثبت و بلانک (۳۵۰ میکرولیتر اتانول به‌عنوان کنترل منفی) انجام شد. پس از ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای اتاق، میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی از مقایسه جذب نمونه‌ها در زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به‌صورت درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام سنجش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها (در سطح ۰/۰۵) با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 23.0 و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

سنجش محتوای فنل، فلاونوئید، آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل

نتایج حاصل از سنجش محتوای فنل کل (بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک)، فلاونوئیدکل (بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک)، پروآنتوسیانیدین کل (برحسب میلی‌گرم کاتکین بر گرم وزن خشک) و آلکالوئید کل (بر حسب درصد) در سه گونه *Onosma* در جدول ۲ ارائه شده‌است.

1. Apak
2. ß-carotene/linoleic acid
3. Barriere

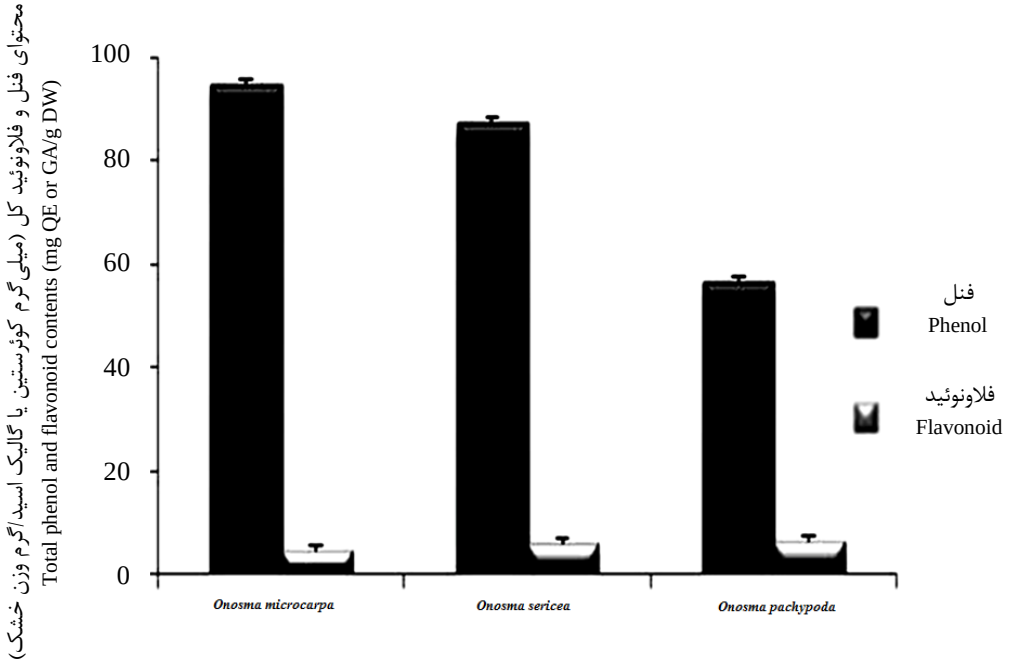
جدول ۲: محتوای فنل، فلاونوئید، آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل در سه گونه از جنس *Onosma*

Table 2: Total phenol, flavonoid, alkaloid and proanthocyanidin contents in the three species from *Onosma* genus

گونه Species	فنل (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم وزن خشک) Phenol (mg GA/g DW[1])	فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین / گرم وزن خشک) Flavonoid (mg QE/g DW)	آلکالوئید (درصد) Alkaloid (%)	پروآنتوسیانیدین (میلی‌گرم کاتکین/ گرم وزن خشک) Proanthocyanidin (mg CT/g DW)
Onosma microcarpa	$94.78^{a} \pm 4.77$	$4.74^{b} \pm 0.20$	2.12^{b}	$85.0^{b} \pm 1.1$
Onosma sericea	$87.47^{b} \pm 1.63$	$6.24^{a} \pm 0.36$	3.50^{a}	$73.5^{c} \pm 0.9$
Onosma pachypoda	$56.75^{c} \pm 2.85$	$6.61^{a} \pm 0.00$	1.50^{c}	$98.0^{a} \pm 1.5$

آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. تفاوت مقادیر در هر ستون با حروف متفاوت در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است. [1]DW: وزن خشک

Experiments were performed in triplicate and expressed as mean ± SD. Values in each column with different superscripts are significantly different ($P \geq 0.05$). DW: Dry weight



شکل ۲: محتوای فنل و فلاونوئید کل در سه گونه مورد مطالعه از جنس *Onosma*

Fig. 2: Total phenol and flavonoid contents in the three studied species from *Onosma* genus

سه گونه موردمطالعه از نظر محتوای فنل کل، اختلاف معنی‌داری دارند و بیش‌ترین مقدار مربوط به گونه *O. microcarpa* و کم‌ترین مقدار مربوط به گونه *O. pachypoda* بود. میان دو گونه *O. sericea* و *O. pachypoda*، ازنظر محتوای فلاونوئید کل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، لیکن تفاوت میان آن‌ها و گونه *O. microcarpa* که محتوای فلاونوئیدی کمتری داشت، معنی‌دار بود (شکل ۲). سه گونه موردمطالعه از نظر محتوای آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین کل نیز تفاوت معنی‌داری نشان دادند. گونه *O. sericea* بیش‌ترین محتوای آلکالوئید و گونه *O. pachypoda* بیش‌ترین محتوای پروآنتوسیانیدین را نشان داد. برعکس کمترین محتوای آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین به‌ترتیب در گونه *O. pachypoda* و گونه *O. sericea* مشاهده شد.

نتایج حاصل از مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۱. سنجش قدرت احیاءکنندگی کل

در آزمون قدرت احیاءکنندگی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره برای احیاء آهن (III) به آهن (II) موردسنجش قرار گرفت. افزایش جذب مخلوط واکنش بیانگر افزایش قدرت احیاءکنندگی است و بر این اساس رنگ محلول از سبز تا آبی تغییر می‌کند. نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالا (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، تفاوت معنی‌داری میان قدرت احیاءکنندگی BHT[1] و عصاره‌های گیاهی مشاهده می‌شود و قدرت کاهندگی آن‌ها نیز با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که گونه *O. pachypoda* با بیش‌ترین میزان EC_{50}، کم‌ترین قدرت احیاءکنندگی را نسبت به دو گونه دیگر داراست. لیکن در غلظت کم (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قدرت کاهندگی عصاره‌ها مشابه BHT است (جدول ۳). BHT

1. Butylated Hydroxytoluene

بیش‌ترین قدرت احیاءکنندگی را دارد و عصاره‌ها فعالیت ضعیف‌تری نشان می‌دهند (شکل ۳).

۲. سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه گونه *Onosma* با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH به روش اسپکتروفتومتری نشان داد که در هر سه‌گونه با افزایش غلظت عصاره، درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد (جدول ۳). در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی (اسید آسکوربیک)، عصاره گونه‌های *O. microcarpa* و *O. sericea* مقادیر IC_{50} کمتر و درنتیجه پتانسیل مهار رادیکال آزاد DPPH بیش‌تری نشان می‌دهند.

۳. سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاء یون مس

قدرت احیاءکنندگی ترکیبات با توانایی آن‌ها در انتقال الکترون در ارتباط است و این توانایی مکانیسمی در ارائه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیاء مس جهت ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی مواد گیاهی به‌کار می‌رود. این روش بر پایه تشکیل کمپلکس پایدار میان نئوکوپرین و مس (I) انجام می‌شود که مس (I) خود از مس (II) در حضور نئوکوپرین ایجاد می‌شود (*آپاک*[1] و همکاران، 2006). ارزش EC_{50} پائین‌تر و جذب بالاتر در ۴۵۰ نانومتر، نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بیش‌تر مس می‌باشد. گونه *O. microcarpa* به‌طور معنی‌داری فعالیت احیاءکنندگی بیش‌تری از گونه *O. sericea* داشته (جدول ۳ و شکل ۴) و گونه *O. pachypoda* کم‌ترین و اسید آسکوربیک‌بیش‌ترین قدرت احیاءکنندگی را در این آزمون نشان داد.

۴. سنجش مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید در سیستم بتاکاروتن- لینولئیک اسید

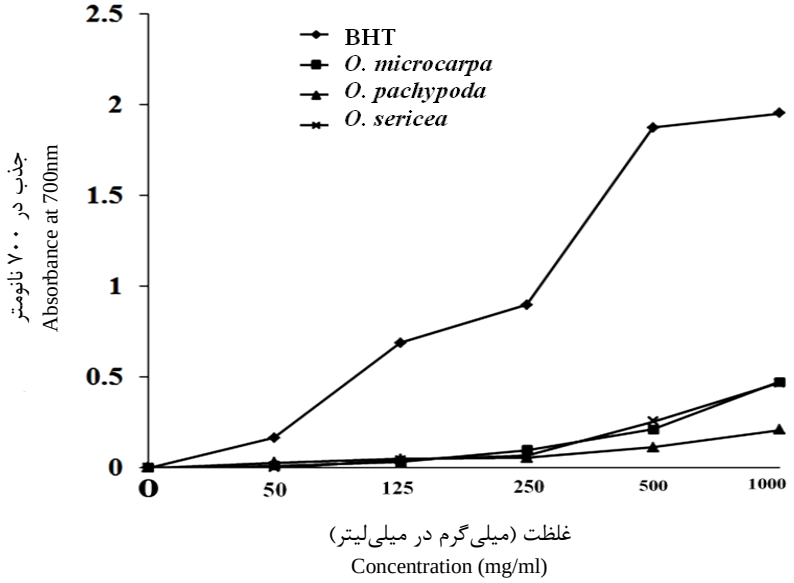
میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سه گونه *Onosma* با استفاده از بازدارندگی اکسیداسیون لینولئیک اسید به روش اسپکتروفتومتری مطالعه شد. گونه *O. microcarpa* نسبت به دو گونه دیگر فعالیت بازدارندگی کمتری نشان داد، لیکن میان دو گونه دیگر اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۵). هم‌چنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های موردبررسی به‌طور معنی‌داری از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT کمتر بود (جدول ۳).

بررسی میزان همبستگی پیرسون بین ترکیبات موردبررسی و آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده نشان داد که از بین ترکیبات موردبررسی در سه گونه، محتوای فنل کل همبستگی قابل‌توجهی با قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (R= 0.914) نشان داده و محتوای آلکالوئید کل نیز با قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH همبستگی نسبی (R= 0.658) دارد.

محتوای پروآنتوسیانیدین با قدرت مهار رادیکال DPPH (R= 0.867) رابطه‌ای منفی نشان می‌دهد به گونه‌ای که مقادیر کمتر پروآنتوسیانیدین، IC_{50} کمتری را به خود اختصاص می‌دهد. محتوای فلاونوئید با قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH رابطه‌ای نداشت و شاید بتوان پتانسیل مهار رادیکال آزاد DPPH را بیشتر به سه گروه ترکیبات دیگر مربوط دانست. از سوی دیگر میان محتوای فلاونوئید کل و قدرت مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید همبستگی بالایی (R= 0.99) وجود دارد، لیکن این توانایی با دیگر متابولیت‌های موردبررسی همبستگی قابل‌توجهی نشان نداد. میان قدرت احیاءکنندگی یون مس (EC_{50}) و محتوای فنل کل همبستگی بالایی مشاهده شد (R= 0.94) و بیش‌ترین قدرت احیاءکنندگی (کم‌ترین EC_{50}) در بالاترین محتوای فنل مشاهده شد.

هم‌چنین بررسی میزان همبستگی میان قدرت احیاءکنندگی یون مس و محتوای فلاونوئید کل قابل توجه بود (R= 0.825)، اگرچه مقادیر EC_{50} کمتر در مقادیر پایین‌تر فلاونوئید به‌دست آمد. به علاوه پروآنتوسیانیدین‌ها و آلکالوئیدها در احیاءکنندگی یون مس نقش قابل توجهی ندارند. بررسی میزان همبستگی میان محتوای فنل و پتانسیل احیاءکنندگی کل (EC_{50}) همبستگی قابل توجهی (R= 0.965) را نشان داد. همبستگی قابل‌توجهی میان محتوای پروآنتوسیانیدین و قدرت احیاءکنندگی کل همبستگی منفی (R= 0.783) مشاهده شد، به‌نحوی‌که بیش‌ترین قدرت احیاءکنندگی در مقادیر کمتر پروآنتوسیانیدین به‌دست آمد. همبستگی میان قدرت احیاءکنندگی کل و فلاونوئید و نیز آلکالوئید کل قابل توجه نبود.

1. Apak



شکل ۳: مقایسه قدرت احیاءکنندی عصاره سه گونه از جنس *Onosma* و BHT

Fig. 3: Comparsion of reducing power of the extracts in three species from *Onosma* genus and BHT

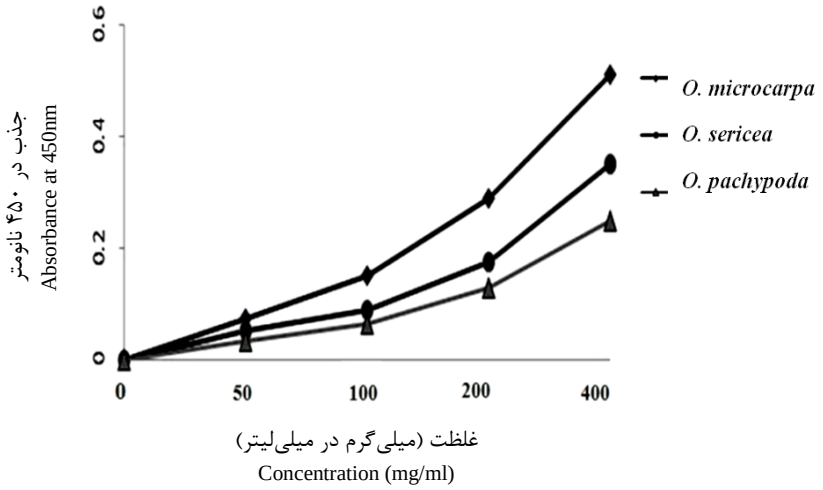
جدول ۳: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، بازدارندگی لینولئیک‌اسید، احیاءکنندگی یون مس و احیاءکنندگی کل در سه گونه مطالعه شده از جنس *Onosma*

Table 3: Free radicals scavenging, linoleic acid inhibition, cupric ion reducing and total reducing power activities in the three studied species from *Onosma* genus

گونه Species	IC_{50} (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)[۱] IC_{50} (mg/ml)	بازدارندگی[۲](درصد) Inhibition (%)	EC_{50} (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)[۳] EC_{50} (mg/ml)	EC_{50} (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)[۴] EC_{50} (mg/ml)
Onosma microcarpa	0.108^{a}	$34.18^{c} \pm 0.62$	392^{b}	1100^{b}
Onosma sericea	0.103^{a}	$51.85^{b} \pm 0.88$	570^{c}	1080^{b}
Onosma pachypoda	0.143^{c}	$53.77^{b} \pm 0.94$	819^{d}	4810^{c}
Ascorbic acid	0.125^{b}	-	65.55^{a}	-
BHT	-	$97^{a} \pm 1.07$	-	140^{a}
Control	-	$13^{e} \pm 0.22$	-	-

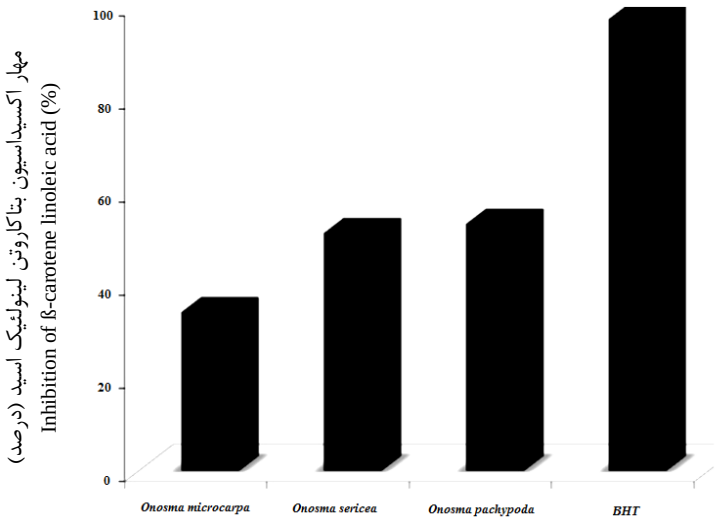
۱. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بر حسب IC_{50}، ۲. فعالیت مهارکنندگی بتاکاروتن/لینولئیک اسید، ۳. فعالیت احیاءکنندگی یون مس بر حسب EC_{50}، ۴. فعالیت احیاءکنندگی کل بر حسب EC_{50}

1. DPHH free radical scavenging activity as IC_{50}, 2. ß-Carotene/linoleic acid bleaching inhibition (%), 3. Cupric ion reducing power as EC_{50}, 4. Total reducing power as EC_{50}



شکل ۴: فعالیت احیاءکنندگی یون مس توسط عصاره سه گونه موردمطالعه از جنس *Onosma* در غلظت‌های مختلف

Fig. 4: Cupric ion reducing activity in the extracts of three studied species from *Onosma genus* at different concentrations



شکل ۵: مهار اکسیداسیون بتاکاروتن/لینولئیک اسید توسط عصاره سه گونه مورد مطالعه *Onosma*

Fig. 5: Inhibition of bleaching of ß-carotene/linoleic acid emulsion by the extract of the three studied species from *Onosma* genus

بحث

متابولیت‌های ثانویه گیاهی براساس نحوه بیوسنتز به ترپن‌ها، ترکیبات فنلی و ترکیبات ازت‌دار تقسیم می‌شوند (احمدی و همکاران، ۱۳۸۳). ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بالقوه (دهنده الکترون)، از طریق جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد و کلات‌کردن یون‌های فلزی عمل می‌کنند (*بالاساندرام*[1] و همکاران، 2005).

در این بررسی محتوای فنل کل در گونه‌های موردمطالعه در محدوده بین ۵۶/۷۵ تا ۹۴/۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در حلال متانول متغیر بود که با نتایج پژوهش‌های انجام شده قبلی تطابق دارد. در پژوهشی که توسط *مازندرانی*[2] و همکاران (2012) بر روی عصاره حاصل از حلال‌های مختلف در گونه *O. dichroanthum* انجام شد، مشخص گردید که محتوای فنل کل ریشه در سیستم‌های حلال مختلف تنوع بارزی داشته و در محدوده ۴/۵ تا ۱۲۵/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. در تجربه آنان این میزان در عصاره متانولی ۸/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بوده و بیش‌ترین محتوا با استفاده از حلال استون به میزان ۱۲۵/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک استخراج گردید. هم‌چنین محتوای فلاونوئید کل در محدوده ۹/۸ تا ۴۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک با بیش‌ترین مقدار (۴۱ میلی‌گرم) در استون و ۱۹/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در متانول گزارش شد. محتوای فلاونوئید کل در سه گونه موردمطالعه در پژوهش حاضر از ۴/۷۴ تا ۶/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در حلال متانول متغیر بود. به‌علاوه توانایی مهار رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت که با تحقیقات قبلی در توافق است. مطالعات انجام شده بر روی برخی گونه‌های Boraginaceae نشان داد که میان محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط زیادی وجود دارد (*کای*[3] و همکاران، 2000).

نتایج حاصل از مطالعه محتوای آلکالوئید کل نشان داد که در سه گونه *Onosma* محتوای آلکالوئید تفاوت معنی‌داری نشان داده و از ۱/۵ تا ۳/۵ درصد در میلی‌گرم وزن خشک متغیر بود. بیش‌ترین مقدار در عصاره گونه *O. sericea* مشاهده شد. نتایج حاصل از سنجش محتوای پروآنتوسیانیدین در سه گونه موردبررسی با تفاوتی معنی‌دار از ۷۳/۵ تا ۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود و گونه *O. pachypoda* بیش‌ترین مقدار را نشان داد. در تجربیات *مازندرانی* و همکاران (2011) محتوای آنتوسیانیدین کل در ریشه گونه *O .dichroanthum* در سیستم‌های حلال مختلف از ۱۱/۵ تا ۴۷/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بوده و بیش‌ترین مقدار در استون و کم‌ترین مقدار در متانول به‌دست آمد. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با چهار آزمون مختلف نتایج متنوعی حاصل نمود. نتایج حاصل از ارزیابی پتانسیل احیاءکنندگی کل که به‌صورت EC_{50} بیان شد نشان داد که گونه *O. pachypoda* با بیش‌ترین مقدار EC_{50}، کم‌ترین فعالیت احیاءکنندگی را داراست و دو گونه دیگر از این حیث تفاوت معنی‌داری ندارند. هرچند همه گونه‌ها قدرت احیاءکنندگی کمتری از BHT به‌عنوان کنترل مثبت ارائه نمودند. *ابراهیم‌زاده* و همکاران[4] (2010) گزارش کردند که

1. Balasanderam
2. Mazandarani

3. Cai
1. Ebrahimzade

عصاره بخش‌های هوایی گونه *O. demawendicum* قدرت احیاءکنندگی بالایی در غلظت‌های ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان می‌دهد که به‌طور معنی‌داری بالاتر از اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت است. در ارزیابی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در این پژوهش، گونه *O. pachypoda* بیش‌ترین میزان IC_{50} را نشان داد که معرف کم‌ترین میزان فعالیت مهارکنندگی است. دو گونه دیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند، لیکن دو گونه *O. microcarpa* و *O. Sericea* بدون تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نسبت به آسکوربیک اسید IC_{50} کمتر و در نتیجه فعالیت مهارکنندگی بیشتری نشان دادند. *مازندرانی* و همکاران (2012) نشان دادند که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در ریشه گونه *O. dichroanthum* در غلظت‌های بالا افزایش یافته و مقدار IC_{50} در عصاره این بخش حدود ۴/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک می‌باشد. در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش احیاءکنندگی یون مس که بر حسب EC_{50} بیان شد، گونه *O.microcarpa* نسبت به دو گونه دیگر فعالیت بیش‌تر و نسبت به اسید آسکوربیک فعالیت کمتری نشان داد. در بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی به روش بازدارندگی بتاکاروتن/لینولئیک اسید، گونه *O. microcarpa* کم‌ترین میزان فعالیت بازدارندگی را نسبت به دو گونه دیگر نشان داد. محتوای فنل و آلکالوئید کل در دو گونه *O. microcarpa* و O. *sericea* بیش‌تر از گونه *O. pachypoda* بود. هم‌چنین این دو گونه، قدرت احیاءکنندگی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری در آزمون‌های مهار رادیکال DPPH و احیاءکنندگی یون مس نشان دادند. اما محتوای فلاونوئید و پروآنتوسیانیدین کل در گونه *O. pachypoda* بیش‌تر از دو گونه دیگر بود.

درمجموع به نظر می‌رسد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گونه‌های موردبررسی را بیشتر می‌توان به حضور ترکیبات فنلی به‌جز فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها نسبت داد. پلی‌فنل‌ها وظایف فیزیولوژیکی مهمی در گیاهان دارند. از زیرمجموعه پلی‌فنل‌ها، اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها ازنظر جذب و اثرات بالقوه در انسان‌هابیشتر حائز اهمیت هستند (*براو*[1]، 1998). در این پژوهش توانایی مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید و نیز محتوای فلاونوئیدی در گونه‌های *O. Pachypoda* و *O. sericea* نسبت به گونه *O. microcarpa* بیش‌تر بود. میان سه ترکیب موردسنجش دیگر و خاصیت مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید همبستگی مشاهده نشد. به‌نحوی که میان محتوای فنل و مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید رابطه‌ای معکوس وجود داشت و میان محتوای آلکالوئید و پروآنتوسیانیدین و این توانایی ارتباطی وجود نداشت. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از بررسی مهار رادیکال‌های آزاد، عصاره گونه‌های *O. microcarpa* و *O. sericea* در مقایسه با آسکوربیک اسید پتانسیل بیشتری نشان دادند. لذا دو گونه فوق به‌عنوان منابع بالقوه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد می‌گردند و بررسی دقیق‌تر و جزء به جزء هر سه گروه متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان ضروری به‌نظر می‌رسد.

قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه بوعلی‌سینا انجام شده‌است.

منابع

احمدی، ع.، احسان زاده، پ. و جباری، ف. ۱۳۸۳. مقدمه‌ای بر فیزیولوژی گیاهی. جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران. ۶۵۳ صفحه.

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد. ۳۴۶ صفحه.

صمصام شریعت، ه. ۱۳۸۲. پرورش و تکثیر گیاهان داروئی. انتشارات مانی. ۱۶۵ صفحه.

Al-Shahbaz, I. 1999. The genera of Boraginaceae in the southeastern United States. Arnold Journal Arborist Supplies, 1: 1-169.

Apak, R., Gucla, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. and Ercag, E. 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International Journal of Food Science and Nutrition, 57: 292-304.

Arabshahi-Deloue, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102: 1233-1240.

Attar, F. and Hamzehee, B. 2007. *Onosma biostunensis* (Boraginaceae), a new species from western Iran. Novon, 17 (3): 279-281.

2. Bravo

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S. and Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology, 148 (2-3): 187-197.

Barriere, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Setrin, S., Berdague, J. L. and Talon, R. 2001. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 201: 181-185.

Bell, E. A. and Charlwood, B. V. 1980. Secondary Plant Products, Springer Verlag, Berlin. Pp. 123-125.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56: 317-333.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Science, 74: 2157-2184.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food Drug Analysis, 10: 178-182.

Conn, E. E. 1981. Secondary Plant Products. 7. The biochemistry of plants. Academic Press, New York.

Ebrahimzade, M. A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Eslami, B. and Asgarirad, H. 2010. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Leonurus cardiac* subsp. *persicus*, *Grammosciadium platycarpum* and *Onosma demawendicum*. African Journal of Biotechnology, 9 (51): 8865-8871.

Foo, Y., Lu Y., Howell A. B. and Vorsa, N. 2000. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. Journal of Natural Product, 63 (9): 1225-1228.

Firmin, J. L., Wilson, K. E., Rossen, L. and Johnston, A. W. B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature, 324: 90-92.

Harborne, J. and Williams, C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55 (6): 481-504.

Mazandarani, P. M., Zarghami Moghaddam, P., Zolfaghari, M. R., Badeleh, M. T. and Ghaemi, E. A. 2012. Antibacterial and antioxidant activities of root extract of *Onosma dichroanthum* Boiss. in north of Iran. African Journal of Microbiology Research, 6 (8): 1776-1781.

Mc Call, M. R. and Frei, B. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Radical Biology and Medicine, 26: 1034-1053.

Middleton, E. J. R., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological Reviews, 52 (4): 673-751.

Mothes, K., Schutte, H. R. and Luckner, M. 1985. Biochemistry of alkaloids. VEB. Deutscher Verlag, Berlin.

Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., Turner, A. H., Mann, N. J. and Sinclair, A. J. 2003. Flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. American Journal of Clinical Nutrition, 77: 1466-1473.

Onwuka, G. I. 2006. Soaking, boiling and antinutritional factors in pigeon peas (*Cajanus cajan*) and cowpeas (*Vigna unguiculata*). Journal of Food Processing and Preservation, 30(5): 616-630.

Pietta, P., Simonetti, P., Gardrna, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P. and Bombardelli, E. 1998. Relationship between rate and extent of catechin absorbtion and plasma antioxidant status. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 46 (5): 895-903.

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

Ranjbar, M. and Almasi, M. 2014. Taxonomic notes on *Onosma* sect. *Aponosma* from ran (Boraginaceae). Edinburgh Journal of Botany 71 (1): 1-8.

Reed, J. 2002. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42 (3): 301-316.

Sezik, E., Yesilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y. and Fujita, T. 1997. Economic Botany, 51: 195.

Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F. and Larondelle, Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food Chemistry, 101 (3): 1012-1018.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

Smith, D. A. and Banks, S. W. 1986. Formation and biologicalproperties of isoflavonoid phytoalexins. In: Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J. B. (eds). Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships. Liss. Inc. New York, 113-124.

Steinberg, F. M., Am J., Bearden, M. M. and Keen, C. L. 2003. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. Journal of the American Dietetic Association, 103 (2): 215-223.

Stojicevic, S. S., Stanisavljevic, I. T., Velickovic, D. T., Veljkovic, V. B. and Lazic, M. L. 2008. Comparative screening 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.

Sun, B., Ricardo-Da-Silva, J. M. and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46: 4267-4274.

Trease, G. E. and Evans, W. C. 1989. A textbook of Pharmacognosy. 13th ed, Bailliere Tinall Ltd, London. Pp. 45-46.

Evaluation of Total Phenolic Compounds, Alkaloids and Proanthocyanidins Contents and Antioxidant Activity in Three *Onosma* Species (Boraginaceae) From Iran

Karamian[1*], R., Aravand[2], F., Jahanian Najafabadi[3], H. and Pakzad[4], R.

Abstract

The genus *Onosma* L. is one of the important genera of the family Boraginaceae. In flora Iranica, the genus comprises 55 species, of which 17 are endemic to Iran. *Onosma* species contain secondary metabolits that represent antioxidant and antibiotic activities. Methanolic extracts of three *Onosma* species, namely *Onosma pachypoda* L., *Onosma sericea* L.and *Onasma microcarpa* DC. from flora of Iran were *in vitro* screened for their total phenol, flavonoid, proanthocynidin and alkaloid contents and also their possible antioxidant activities by different tests. Results showed that the methanolic extract of *Onasma microcarpa* contained the highest amount of total phenols. *Onosma pachypoda* and *Onosma sericea* represented the highest flavonoid content. Results also showed the highest amount of alkaloid and proanthocyanidin in *Onosma sericea* and *Onosma pachypoda*, respectively. In addition, methanolic extracts of the three *Onosma* species showed strong antioxidant activity and *Onosma microcarpa* represented the lowest IC_{50}. It seems that phenolic compounds are the substances that play an important role in antioxidant activity.

Keywords: DPPH free radical scavenging, β-carotene/linoleic acid, Phythochemical composition, Flora Iranica

1, 2 and 4. Professor and MSc Graduated Students, Respectively, Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

*: Corresponding author Email: R_karamian@basu.ac.ir