

بررسی فیتوشیمیایی و فعالیتهای پاداکسایشی در غددزیرزمینی و برگهای *Leontice leontopetalum* و *L. armeniaca* از ایران

سمیرا شوکت یاری^۱، رشید جامعی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۰

تاریخ تصویب: ۹۳/۰۶/۰۳

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین محتوای تام آلکالوئیدی، فنلی، فلاوونوئیدی و نیز بررسی میزان فعالیت پاداکسایشی، به روش بررسی فعالیت پاداکسایشی آهن احیا شده (FRAP)، قدرت احیاکنندگی و جمع آوری رادیکال آزاد سوپراکسید در برگها و غددزیرزمینی گونه‌های *L. leontopetalum* و *L. armeniaca* بود. نتایج نشان داد که در هر دو گونه محتوای آلکالوئید، فنل و فلاوونوئید تام و FRAP در برگها از غددزیرزمینی بیشتر و نیز در *L. leontopetalum* بیشتر از *L. armeniaca* بود. برگ و ریشه *L. leontopetalum* به ترتیب بیشترین ($1/146 \pm 0/05$) و کمترین ($0/889 \pm 0/03$) قدرت احیا را

۱. کارشناس ارشد سیستماتیک - اکولوژی، گروه زیست، دانشگاه ارومیه

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول (r.jamei@urmia.ac.ir)

نشان دادند. در همه نمونه‌ها درصد مهار رادیکال سوپراکسید بیشتر از ۲۷ درصد بود. درصد مهار رادیکال سوپراکسید برای *L. armeniaca* در هر دو اندام بیشتر از گونه‌ی دیگر بود. بین *FRAP* و قدرت احیاکنندگی با محتوای فنلی و فلاونوئیدی یک رابطه‌ی قابل ملاحظه مشاهده شد. محتوای آلکالوئیدی با *FRAP* یک رابطه نسبتاً ضعیف ولی با قدرت احیا یک رابطه‌ی قوی داشت. با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که جنس *Leontice* می‌تواند یکی از منابع خوب پاداکساینده-های طبیعی باشد.

واژه های کلیدی: آلکالوئید، فعالیت پاداکسایشی، فلاونوئید، لئونتیس، محتوای فنلی

مقدمه

سلامتی و حفاظت در مقابل بسیاری از بیماریها مفید هستند (Jimoh et al., 2010) جنس *L. Leontice* با نام فارسی ترب شیر گیاهی علفی، چندساله، با غده‌های زیرزمینی متعلق به تیره شیرپنجه (*Podophyllaceae*) می‌باشد. این جنس در ایران دارای دو گونه‌ی *L. leontpetalum* و *L. armeniaca*

است (معروفی، ۱۳۸۶). از جوشانده غدد زیرزمینی این گیاه در طب سنتی برای درمان صرع (Abu Zarga et al., 1995) و هموروئید (Uysal et al., 2010) استفاده می‌شود. در جوردن از *Leontice* به عنوان یک گیاه دارویی مشهور برای درمان سرفه، نفخ، لاغری، ضعف جنسی و تشنج

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های ناپایدار و بسیار واکنش پذیری هستند که در طول فرایند اکسیداسیون در سیستم های زیستی تشکیل می‌شوند و باعث آسیب به مولکول‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و DNA می‌شوند. در این گونه موارد سیستم پاداکسایشی بدن که شامل سازوکارهای آنزیمی و ویتامین‌ها است نقش حفاظت‌کننده دارد (Farber, 1994). مطالعات اخیر نشان داده اند که تعدادی از محصولات گیاهی شامل: پلی فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپن‌ها و انواع عصاره‌های گیاهی، فعالیت پاداکسایشی از خود نشان می‌دهند و برای حفظ

هوایی این گونه را ۱/۱ درصد گزارش کردند. Kolak و همکاران (۲۰۱۱) روی فعالیت‌های پاداکسایشی جنس *Leontice* مطالعه ای انجام دادند که در نتایج آن‌ها قدرت جمع آوری رادیکال DPPH و ABTS و فعالیت آنتی بوتیریل کولین استراز در عصاره آلکالوئیدی و آلکالوئید لوپانین این گیاه گزارش شد. همچنین لوپانین ظرفیت مهار پراکسیداسیون چربی قابل توجهی از خود نشان داد. عصاره آلکالوئیدی این گیاه دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قابل توجهی می‌باشد *Gulcine* . و همکاران (۲۰۰۶) بیان کرده اند که عصاره خام و موندسموزوئید های این گیاه فعالیت پاداکسایشی وابسته به غلظت قابل توجهی از خود نشان می‌دهند.

آلکالوئیدها دارای فعالیت جاروب کنندگی رادیکال های آزاد هستند. این ترکیبات در واقع پاداکساینده هایی هستند که با رادیکال آزاد واکنش می دهند و موجب احیای آن می شوند. تفاوت در قدرت پاداکسایشی آلکالوئیدها ربطی به ارتباط بین ساختار شیمیایی آن‌ها و گونه های اکسیژن فعال ندارد (Ganiyat et al., 2010).

ترکیبات فنلی گروهی از دگرگوه‌ره های ثانویه هستند که نقش‌های گوناگونی را در گیاهان ایفا می‌کنند، از جمله می‌توان پشتیبانی مکانیکی، جلب کرده افشان‌ها، جذب اشعه‌ی زیانبار فرابنفش و کاهش رشد گیاهان رقیب مجاور را نام برد

استفاده می‌شود (AL- Quran, 2008). این جنس یک منبع غنی از انواع آلکالوئیدها می‌باشد. (Mollov and Ivanv, 1970)

امروزه تحقیقات انجام گرفته بر روی بسیاری از گونه‌های گیاهی نشان داده که دگرگوه‌ره‌های ثانویه‌ی گیاهی از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و پلی فنل‌ها به علت قدرت پاک کنندگی یا مهار واکنش‌های زنجیره ای رادیکال‌ها می‌توانند در آینده به عنوان پاد اکساینده های موثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند. (et al., ۲۰۰۶ Nickavar)

جنس ترب شیرحای آلکالوئیدهای *quinolizidine* (Gresse et al., 1993) و *isoquinoline* (Abu Safiehd et al., 1986) می‌باشد که این ترکیبات خواص درمانی متعددی دارند از جمله اسپارتین باکتریواستاتیک، سیتیزین ضد التهاب و ضد کرم و ماترین تقویت کننده قلب و ضد تب می‌باشد (Aniszewski, 2007).

کوئینولیزیدین‌ها ترکیبات دینامیکی هستند که در دفاع بر علیه علفخواران مفیدند. این ترکیبات اثرات مختلفی روی سیستم عصبی و گوارشی گیاهخواران دارند (تایز و زایگر، 2002. Iskandarov و همکاران (۱۹۶۷) اعلام کردند محتوای آلکالوئید تام اندام‌های هوایی *L. albertii* از ۱/۷۷ تا ۱/۸۴ درصد متغیر می‌باشد.

Yunusov و Iskandarov (۱۹۶۹) با کار روی *L. darvasica* مقدار آلکالوئید تام اندام‌های

قدیم ماموخ، ارتفاع ۲۰۰۰ متر هردو واقع در شهرستان سنندج در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ جمع آوری شدند. نمونه‌های جمع آوری شده توسط گیاه شناسان هرباریوم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع سنندج مورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی تحت شرایط سایه و در دمای اتاق خشک شدند.

تهیه‌ی عصاره‌ی تام آلکالوئیدی

عصاره‌گیری با تلفیقی از روش‌های *et al.*, 1998 Krenn و *Shamsa et al.*, 2008 انجام شد. یک گرم از ماده گیاهی خشک و پودر شده در ۸۰ میلی لیتر اسیداستیک ۵ درصد (v/v) تکان داده شد و به مدت ۱۸ ساعت به حال خود رها گردید. پس از گذراندن از صافی ۱۰ میلی لیتر از عصاره صاف شده چندین بار با کلروفرم (هر بار ۱۰ میلی لیتر) عصاره‌گیری شد تا جایی که همه‌ی مواد رنگی حذف گردید و کلروفرم حاصل از شستشو رنگی نشد. در نهایت، pH محلول باقیمانده به وسیله آمونیاک تا ۷ بالا برده شد و به آن ۵ میلی لیتر معرف برموکرزول سبز و ۵ میلی لیتر با فراسات‌ها اضافه شد و سه بار با کلروفرم (۵، ۸ و ۱۰ میلی لیتر) عصاره‌گیری گردید. سپس فاز کلروفرمی به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. در این حالت وجود رنگ زرد در فاز پایینی نشان‌دهنده‌ی حضور آلکالوئید است. این فاز جدا گردید و به وسیله

(تایز و زایگر، ۲۰۰۲). فعالیت پاداکسایشی ترکیبات فنولی به خاطر توانایی آن‌ها در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد، دادن اتم‌های هیدروژن یا الکترون و شلاته کردن کاتیون‌های فلزی است. (Lien et al., ۲۰۰۸). سایر مطالعات وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در غدد زیرزمینی این جنس را نشان می‌دهد (Kolak et al., 2011). فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه‌های فنلی گیاهان هستند. این ترکیبات به گروه‌های آنتوسیانین، فلاون‌ها، فلاونول‌ها و ایزوفلاون‌ها تقسیم می‌شوند. انواع مختلف فلاونوئیدها وظایف بسیار متفاوتی را در گیاهان بر عهده دارند از جمله دفاع و رنگیزه دار شدن (تایز و زایگر، ۲۰۰۲). تحقیقات دیگر وجود فلاون‌ها را در برگ‌ها و ساقه‌های *L. leontopetalum* نشان می‌دهد (Cubukeu and Yazagan, 1974). در این تحقیق با توجه به اهمیت دارویی ترکیبات پاداکساینده به بررسی مقایسه‌ای محتوای آلکالوئید تام، فنل تام، فلاونوئید تام و همچنین فعالیت پاداکسایشی غدد زیرزمینی و برگ‌های دوگونه از این جنس پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

غدد زیرزمینی و برگ‌های *L. leontopetalum* از اطراف سد قشلاق، ارتفاع ۱۵۰۰ متر و *L. armeniaca* از جاده

بر حسب میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان گردید.

تعیین محتوای فلاونوئیدی کل

محتوای فلاونوئیدی کل با استفاده از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم اندازه گیری شد (Sakanaka et al., 2005). یک میلی لیتر از عصاره گیاهی به داخل یک بالن ۱۰ میلی لیتری حاوی ۵ میلی لیتر آب دیونیزه منتقل شد. سپس ۰/۳ میلی لیتر نیترات سدیم ۰/۰۵ به محلول اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه، ۰/۳ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ نیز به مخلوط اضافه گردید. بعد از ۶ دقیقه، ۲ میلی لیتر از هیدروکسید سدیم ۱ مولار به آن اضافه شد و با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. جذب محلول فوراً در ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. محتوای فلاونوئیدی بر حسب میلی گرم کاتچین در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد کاتچین بیان گردید.

تعیین فعالیت پاداکسایشی کل

فعالیت پاداکسایشی کل به روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) اندازه گیری شد. اساس این روش بر احیا کمپلکس تری پیریدیل تری آزین-فریک به فرم رنگی آن (ferrous) در حضور پاداکساینده ها می باشد. به طور خلاصه معرف FRAP محتوی ۵ میلی لیتر از محلول

دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA, S2100, UK) جذب آن در ۴۱۵ نانومتر اندازه گرفته شد. میزان آلکالوئید نمونه ها با استفاده از معادله منحنی استاندارد تهیه شده توسط غلظت‌های مختلف مورفین محاسبه گردید.

عصاره گیری

نمونه‌های گیاهی (۷ گرم) با استفاده از متانول (۲۸ میلی لیتر) به مدت ۳ ساعت روی شیکر مغناطیسی عصاره گیری شدند. محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰g محلول رویی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام سنجش‌ها نگهداری گردید (Aysel and Munevver, 2004).

تعیین محتوای کل ترکیبات فنلی

محتوای فنلی کل با استفاده از روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu اندازه گیری شد (Ok et al., 2002). طبق این روش، ۱ میلی لیتر از محلول فولین-سیوکالتیو به ۱ میلی لیتر از محلول نمونه اضافه گردید. پس از سه دقیقه، ۱ میلی لیتر از محلول آبی کربنات سدیم ۱۰٪ به محلول اضافه شد. مخلوط نهایی به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید، سپس جذب در ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. محتوای فنولی

TPTZ (۲،۴،۶-تری پیریدیل - Sتری آزین) ۴۰ میلی مول بر لیتر در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مول بر لیتر به اضافه ۵ میلی لیتر کلرید آهن ($FeCl_3$) ۲۰ میلی مول بر لیتر و ۵۰ میلی لیتر بافر استات (0.3 مول / لیتر با $pH=3$) است که به طور تازه آماده شده و تا ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد حرارت داده شده است. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه متانولی با ۳ میلی لیتر معرف FRAP مخلوط گردید و جذب مخلوط واکنش بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت پاداکسایشی بر حسب میکرو مول Fe_{II} بر گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف $FeSO_4$ بیان گردید (Benzie and Strain, 1999).

تعیین درصد جمع آوری رادیکال سوپراکسید

برای سنجش درصد جمع آوری رادیکال آنیون سوپراکسید، رادیکال‌های آنیون سوپراکسید به وسیله یک سیستم اتواکسیداسیون پیروگالول ایجاد شدند (Jing and Zhao, 1995). در ابتدا ۹ میلی لیتر از محلول بافر تریس - اسید کلریدریک ($pH = 8/2$)، ۵۰ میلی مول بر لیتر) به لوله آزمایش اضافه شد و لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

زیر محاسبه گردید.

$$= درصد مهار رادیکال سوپراکسید = \frac{A_0 - (A_2 - A_1) \times 100}{A_0}$$

سنجش قدرت احیا

توانایی عصاره‌ها برای احیای آهن با استفاده از روش Yildirim و همکاران (۲۰۰۱) سنجش شد. یک میلی لیتر از عصاره با $2/5$ میلی لیتر بافر فسفات ($pH = 6/6$) و $2/5$ میلی لیتر فروسیانید پتاسیم ($K_2Fe(CN)_6$) ۱۰ گرم

فلاوونوئید کل را نشان می‌دهد. با توجه به این جدول، مقدار آلکالوئید تام برای هر دو گونه در برگ‌ها بیشتر از غدد زیرزمینی بود. مقایسه نتایج این ماده بین آنها نشان می‌دهد که بیشترین مقدار آلکالوئید برای هر دو اندام در *L. lenontopetalum* دیده شد. بررسی‌های Gresse و همکاران (۱۹۹۳) روی اندام‌های مختلف *L. leontopetalum* نشان داد که آلکالوئید عمده ی برگ و ریشه ی این گونه lupanine است. سایر تحقیقات وجود آلکالوئیدهای نوع Isoquinoline (Abu Safiehd et al., 1986) و Quetamine (Abu Zarga et al., 1995) را در غدد زیرزمینی این گونه تایید می‌کند. Kolak و همکاران (۲۰۱۱) برای اولین بار نشان دادند که آلکالوئید لوپانین موجود در غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* خاصیت پاداکسایشی و آنتی کولین استراز قابل توجهی دارد. در رابطه با استخراج و اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فیتوشیمیایی *L. armeniaca* به گونه‌ای که کار شده پژوهشی صورت‌نگرفته است.

سنجش محتوای فنل و فلاوونوئید کل در برگ‌ها و غدد زیرزمینی گونه‌های مورد مطالعه نشان داد که مقدار این دو ماده در برگ‌های هر دو گونه بیشتر از غدد زیرزمینی است. مقایسه ی این ترکیبات بین آنها نشان می‌دهد که بیشترین مقدار فنل و فلاوونوئید هم برای برگ و هم غدد زیرزمینی در *L. leontopetalum*

بر لیتر) مخلوط شد و سپس مخلوط در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰۰ گرم بر لیتر اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سرانجام ۲/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلرید فریک ($FeCl_3$) ۱ گرم بر لیتر مخلوط شد و جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. بالاترین جذب، بیشترین میزان قدرت احیا را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه‌ی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گردید. نتایج به صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار (SD) میانگین بیان شد. اختلاف بین نمونه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) در سطح آماری ۵ درصد ($P > 0.05$) آنالیز و معنی‌دار گردید. همبستگی بین محتوای تام آلکالوئیدی فنلی و فلاوونوئیدی و فعالیت‌های پاداکسایشی آهن احیا شده قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال سوپر اکسید توسط نرم افزار Excel 2007 محاسبه گردید.

نتایج و بحث

یافته‌های حاصل از بررسی‌های فیتوشیمیایی جدول ۱ محتوای آلکالوئید تام، فنول کل و

مشاهده شد. از ترکیبات موجود در *L. leontice* ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. تحقیقات *Yazagan* و *Cubukeu* و فنلی و فلاونوئیدی اشاره کرد (Kolak et al., 2011) وجود ترکیبات *narcissin* و *glucoside-3-quercetin* را در ساقه و بسیاری از فنل‌ها به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا به کار می‌روند (تایز و زایگز یکی از ترکیبات موجود در جنس *L. leontopetalum* نشان داده است. سایر تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات آکالوئیدی، فنل و فلاونوئیدی در این جنس وجود دارد (Kolak et al., 2011).

جدول ۱: محتوای تام آکالوئیدی، فنلی و فلاونوئیدی در برگ‌ها و غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*

گونه	اندام	آکالونید تام (میلی گرم مرفین بر گرم وزن خشک)	فنل تام (میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک)	فلاونونید تام (میلی گرم کاتچین بر گرم وزن خشک)
<i>L. leontopetalum</i>	غده زیرزمینی	۱۸/۵±۰/۶۴۶	۴۱/۵۶±۰/۵۸۹	۰/۴۲±۰/۰۰۶
<i>L. leontopetalum</i>	برگ	۰/۲۷±۰/۴۹۳/۸۷	۱/۷۶±۱/۱۷۱/۹۱	۰/۰۲۹±۰/۰۰۶
<i>L. armeniaca</i>	غده زیرزمینی	۸/۶±۰/۸۹	۲۹/۱۳±۰/۶	۰/۲۵۹±۰/۰۱۰۳
<i>L. armeniaca</i>	برگ	۱۱/۴۴±۰/۹۷۴	۸۸/۴±۲/۵۶	۱/۴۴±۰/۰۰۲۳

نتایج به صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار استاندارد (SD) میانگین بیان شده است.

یافته‌های حاصل از بررسی فعالیت های پاداکسایشی

روش FRAP (فعالیت پاداکسایشی آهن احیا شده) انجام شد. این آزمون براساس توانایی احیا یون فریک (III) به یون فروس (II) توسط ترکیبات پاداکساینده می‌باشد. در این آزمایش پاداکساینده‌ها و یا احیاکننده‌های موجود در عصاره به طور مستقیم اندازه گرفته می‌شود (and Schaich, 2005 Prior). فعالیت پاداکسایشی در برگ‌ها ۲ فعالیت پاداکسایشی کل، درصد جمع آوری رادیکال‌های سوپراکسید و قدرت احیاکنندگی عصاره‌های متانولی غدد زیرزمینی و برگ دو گونه *Leontice* را نشان می‌دهد. در این مطالعه اندازه‌گیری فعالیت پاداکسایشی عصاره‌ها به

گیاهی حاوی پاداکساینده‌های طبیعی مانند فنل ها ، فلاونوئیدها و... هستند که برای سلامت انسان مفید می‌باشند. این مواد بسیاری از بیماری های مرتبط با افزایش سن را به تاخیر انداخته و از بیماری های قلبی عروقی پیشگیری می کنند (Exarchou et al., 2002) فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی در بسیاری از زمینه ها از جمله مواد غذایی- شیمی و داروسازی به عنوان پاداکساینده عمل کنند (Cook and Samman 1996). مطالعات نشان داده است که پلی فنل هایی که دارای قدرت پاداکسایشی بالایی هستند مسئول قسمت اعظم فعالیت پاداکسایشی می‌باشند (Pourmorad et al., 2006). در این مطالعه گیاه *Leontice* دارای خاصیت پاداکسایشی بود که این با مطالعات قبلی همخوانی دارد (Kolak et al., 2011). خاصیت پاداکسایشی این گیاه می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات آکالوئیدی فنلی- فلاونوئیدی (Kolak et al., 2011) و فلاونونها (Cubukeu and Yazagan, 1974) در آن باشد.

ها بیشتر از غدد زیرزمینی است که این در مورد هر دو گونه مشهود است. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت پاداکسایشی تمام نمونه‌ها دیده شد. مقایسه نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت پاداکسایشی در برگ ($6.01/6 \pm 24/51$) و نیز در غدد زیرزمینی ($151/4 \pm 7/107$) میکرومول آهن فروس در گرم وزن خشک هر دو متعلق به *L. leontopetalum* است. جدول ۳ رابطه‌ی بین فعالیت‌های پاداکسایشی و محتوای آکالوئید، فنل و فلاونوئید کل را نشان می‌دهد. رابطه بین FRAP و محتوای فنل و فلاونوئید تام کاملاً مستقیم و قوی (به ترتیب $R^2 = 0/853$ و $0/915$) بود که می‌تواند بیانگر این باشد که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی خاصیت پاداکسایشی بالایی دارند و به خوبی عمل احیا را انجام می‌دهند. پس این ترکیبات نقش مستقیمی در فعالیت پاداکسایشی دارند. بنابراین می‌توان گفت نمونه هایی که از محتوای فنل و فلاونوئیدی بالاتری برخوردارند، فعالیت پاداکسایشی بیشتری از خود نشان می‌دهند غذاهای

جدول ۲: فعالیت پاد اکسایشی کل، درصد جمع آوری رادیکال‌های سوپراکسید و قدرت احیاکنندگی عصاره های متانولی غدد زیرزمینی و برگ *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*

گونه	اندام	فعالیت پاداکسایشی احیاءهن (میکرومول آهن فروس در گرم وزن خشک)	مهار رادیکال سوپراکسید (درصد)	قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)
<i>L. leontopetalum</i>	ریشه	۱۵۱ ^a /۴±۷/۱۰۷	۲۱ ^b /۸۹±۰/۱۰۵	۰ ^a /۸۸۹±۰/۰۳۷
<i>L. leontopetalum</i>	برگ	۶۰۱ ^b /۶±۲۴/۵۱	۵۴ ^b /۵±۰/۴۴	۱ ^b /۱۴۶±۰/۰۵۵
<i>L. armeniaca</i>	ریشه	۷۳ ^c /۸±۵/۳۳	۶۰ ^c /۱۸±۰/۵۹۶	۰ ^a /۹۲±۰/۰۰۶
<i>L. armeniaca</i>	برگ	۴۹۸ ^d /۴±۴۲/۶۸	۶۴ ^d /۳۶±۰/۳۶	۰ ^a /۹۱۵±۰/۰۰۳

حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال $p > 0.05$ ، سه تکرار $\pm DS$

مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که عصاره خام و موندسموزوئیدهای موجود در غدد زیرزمینی این گیاه فعالیت پاداکسایشی وابسته به غلظت قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. در این مطالعه ارتباطی مستقیم و نسبتاً ضعیف ($R^2 = 0.342$) بین محتوای آلکالوئید تام و فعالیت پاداکسایشی مشاهده شد (جدول ۳)، که می‌تواند پیشنهاد کند که ترکیبات آلکالوئیدی دارای خاصیت پاداکسایشی هستند. Kolak و همکاران (۲۰۱۱) مطالعه ای روی فعالیت پاداکسایشی غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* انجام دادند و نشان دادند که عصاره آلکالوئیدی و نیز آلکالوئید لوپانین موجود در این گیاه دارای فعالیت پاداکسایشی می‌باشد.

Kolak و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت پاداکسایشی چند عصاره ی مختلف از غدد زیرزمینی *L. leontpetalum* را بررسی کردند. طبق بررسی‌های آن‌ها عصاره‌ی آبی نسبت به عصاره‌های متانولی و آلکالوئیدی، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین فعالیت پاداکسایشی را داشت. همچنین مشخص شد محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره متانولی غدد زیرزمینی این گیاه به ترتیب ۷۷/۱۳ میکروگرم پیروکاتکول و ۱۲/۲۳ میکروگرم کوئرستین در میلی گرم عصاره است (Kolak et al., 2011).

Gulcin و همکاران (۲۰۰۶) گونه *L. smirnowii* را از نظر فعالیت پاداکسایشی

جدول ۳: رابطه بین محتوای تام آکالوئیدی فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت های پاداکسایشی آهن احیا شده قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال سوپراکسید

فعالیت مهار رادیکال سوپراکسید	قدرت احیاکنندگی	فعالیت پاداکسایشی آهن احیا شده	
$R^2 = 0/07$	$*R^2 = 0/84$	$*R^2 = 0/853$	محتوای تام فنلی
$R^2 = 0/01$	$*R^2 = 0/772$	$*R^2 = 0/915$	محتوای تام فلاونوئیدی
$R^2 = -0/122$	$*R^2 = 0/666$	$*R^2 = 0/341$	محتوای تام آکالوئیدی

* ضریب همبستگی قابل توجه

فلاونوئیدی ($R^2=0/277$) رابطه مستقیم و مشخصی وجود دارد (جدول ۳). بنابراین می توان نتیجه گرفت آکالوئیدها و ترکیبات فنولی از جمله فلاونوئیدها میتوانند مسئول خصوصیات احیاکنندگی در گیاهان باشند. با افزایش میزان ترکیبات فنولی، قدرت احیاکنندگی افزایش می یابد. به عبارتی این ترکیبات با اهدا الکترون یا اتم های هیدروژن واکنش های زنجیری تشکیل رادیکال های آزاد را می شکنند و با پیش سازهای پراکسید واکنش داده، و از تشکیل پراکسید جلوگیری می کنند (Kumaran and Karunakaran, 2007). بنابراین این برگ *L. mulatepotnoel* که بیشترین قدرت احیاکنندگی را دارد احتمالاً بیشترین میزان ترکیبات احیاکننده و پلی فنلها را دارا می باشد. *nicluG* و همکاران (۲۰۰۶) با کار روی گونه *L. smirnowii* نشان دادند که عصاره خام و موندسموزوئیدهای موجود در غدد زیرزمینی این گیاه قدرت احیاکنندگی بالایی دارند. *kaloK* و همکاران (۲۰۱۱) نشان

برای سنجش قدرت احیاکنندگی، از تبدیل $2+eF$ به $2+eF$ در حضور عصاره های متانولی استفاده شد سنجش پتانسیل احیا در عصاره های گیاهی یکی از روش های تعیین حوزه عملکرد پاداکساینده ها می باشد. در حضور این ترکیبات (احیا کننده ها) کمپلکس های فری سیانید به فرم فروس احیا می شوند که این فرایند بسته به ظرفیت احیاکنندگی عصاره ها با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از سبز و آبی همراه است (Soares et al., 2009). قدرت احیا در *L. mulatepotnoel* در برگ های بیشتر از غدد زیرزمینی است ولی در *L. acainemra* از نظر قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر) اختلاف معنی داری وجود ندارد. در این مطالعه برگ و ریشه *L. mulatepotnoel* به ترتیب بیشترین ($0/550 \pm$) و کمترین ($0/988 \pm 0/00$) قدرت احیا را نشان دادند. بین قدرت احیا و محتوای آکالوئیدی ($R^2=0/666$) فنلی ($R^2=0/48$) و

دادند که عصاره های آبی، متانولی و آلکالوئیدی *mulatepotnoel. L.* از نظر قدرت احیاکنندگی غیر فعال می‌باشند که این با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی ندارد. این می‌تواند به دلیل اختلاف در روش به کارگرفته شده باشد. اقلیم نوع خاک- ارتفاع محل رویش، روش استخراج و اندازه گیری پاداکساینده ها می‌تواند در محتوای دگرگوهره های گیاهی و نیز خواص پاداکسایشی موثر باشد (Cao and Prior, 1998). در این مطالعه، ظرفیت مهار رادیکال های سوپراکسید توسط عصاره های متانولی با استفاده از سیستم اتواکسیداسیون پیروگالول بررسی شد. اگرچه آنیون سوپراکسید یک اکسیدکننده ضعیف است، اما باعث تولید رادیکال های خطرناک و مضر هیدروکسیل و اکسیژن منفرد می‌شود که هر دو این رادیکال ها در تنش اکسایشی شرکت می‌کنند (Stief, 2003). همچنین سوپراکسید می‌تواند با نیتریک اکسید واکنش داده و تشکیل پراکسی نیتريت را بنماید (Halliwell, 1997) در تمامی نمونه‌ها درصد مهار بیشتر از ۷۲ درصد بود. در بین تمامی آنها اختلاف معنی دار دیده شد. درصد مهار رادیکال در هر دو گونه در برگ ها بیشتر از اندام زیرزمینی است و همچنین درصد مهار برای گونه *L. acainemra* در هر دو اندام بیشتر از گونه دیگر می‌باشد. بیشترین درصد در برگ *L. acainemra* ($46/63 \pm 0/63$) و کمترین در غدد

زیرزمینی *L. mulatepotnoel* ($72/98 \pm 0/501$) درصد) مشاهده شد. دگرگوهره های گیاهی مانند ترکیبات فنلی به عنوان دهنده الکترون پتانسیل قوی جهت پاک کردن رادیکال های آزاد دارند (Mathew and Abraham, 2006). طبق جدول ۳ بین فعالیت مهار رادیکال سوپراکسید و محتوای آلکالوئیدی تام ($R^2=0/122$) رابطه معکوس و بسیار ضعیفی مشاهده شد این نشان می‌دهد که با افزایش محتوای آلکالوئیدی درصد جمع آوری رادیکال سوپراکسید افزایش پیدا نکرده است. به علاوه بین درصد جمع آوری رادیکال سوپراکسید با محتوای فنل ($R^2=0/700$) و فلاونوئید ($R^2=0/6010$) رابطه مستقیم ضعیفی مشاهده شد. از آنجایی که ظرفیت پاداکسایشی تنها به محتوای آلکالوئیدی فنل و فلاونوئیدی موجود در گیاه بستگی ندارد، باید رابطه ی بین محتوای این ترکیبات با ظرفیت جمع آوری سایر رادیکالها نیز بررسی شود. میزان جمع آوری رادیکال می‌تواند علاوه بر این ترکیباتها، مربوط به سایر ترکیبات گیاهی مانند اسیداسکوربیک، کاروتنوئیدها، گلوکاتینونها و... باشد (Pokorny, 2007). فعالیت پاداکسایشی غدد زیرزمینی *L. iiwonrims* توسط *nicluG* و همکاران (2002) بررسی شد. طبق مشاهدات آنها عصاره خام و موندسموزوئیدهای این گیاه در غلظت ۰۳ میکروگرم در میلی لیتر ظرفیت پاداکسایشی قابل توجهی (به ترتیب ۳۷/۴ و ۸۷ درصد) در برابر رادیکال سوپراکسید

میزان فعالیت پاد اکسایشی در برگ ها از غدد زیرزمینی بیشتر است که این در مورد هر دو گونه مشهود است. بیشترین محتوای این ترکیبات و فعالیت آنتی اکسیدانی در گونه *L. mulatopotnoel* مشاهده شده است. عصاره های *L. ecitnoe* در تمامی آزمایشات مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت پاد اکسایشی از خود نشان دادند که این امر استفاده از آن را در طب سنتی توجیه می کند، بنابراین می تواند یکی از منابع پاد اکساینده های طبیعی باشد. جداسازی و خالص سازی ترکیبات فعال موجود در این گیاه و بررسی فعالیت پاد اکسایشی آن ها در آینده پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از راهنمایی های سرکارخانم مهندس ندا فرناد و آقای یاسر بهرامی در کارهای آزمایشگاهی سپاسگزاری میشود.

از خود نشان می دهد. بررسی های انجام شده نشان داد که تا کنون گزارشی در رابطه با فعالیت پاداکسایشی *L. acainemra* ارائه نشده است.

زمانی که سازوکارهای پاد اکسایشی غیر موثر می شوند دریافت پاداکساینده ها از طریق رژیم غذایی داروهای مصنوعی یا داروهای گیاهی ضرورت پیدا می کند. گزارشات اخیر دلالت بر وجود یک ارتباط معکوس بین رژیم غذایی غنی از پاداکساینده ها و بروز بیماری انسانی دارد (Prior and Cao, 2000). انجام مطالعات بیشتر می تواند افق های تازه ای در استفاده از این منبع غذایی فراموش شده در صنایع غذایی و دارویی جهت افزایش سلامتی انسان بگشاید.

نتیجه گیری

محتوای فنلی، فلاونوئیدی، آلکالوئیدی و نیز

منابع

تایز، ل. و زایگر، ای. (۲۰۰۲). فیزیولوژی گیاهی، انتشارات خانه زیست شناسی ۳۴۲-۳۵۰. معروفی، ح. (۱۳۸۶). فلورایران، شماره ۵۶: تیره شیرینجه: ص ۱۹، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور.

Abu Safiehd, K. A., AL-Eisawi, M., Abu Zarga, M. H. and Sabri, S. S. (1986). Chemical constituents of the flora of Jordan, 11.' alkaloids of *Leontice leontopetalum*. Natural Products. 49(4).

Abu Zarga, M. H., Al-Tel, T. H., Sabri, S. S., Shab, Z., Jamal, S. A., Chouhary, M. I. and Rahma, A. U. (1995). Queitamine-type alkaloids from *Leontice*

- leontopetalum*. Natural Products. 5: 315-322.
- AL-Quran, S. (2008). Taxonomical and pharmacological survey of therapeutic plants in Jordan. Natural Products.1: 10-26.
- Aniszewski, T. (2007). Alkaloids-secret of life alkaloid chemistry, biological. Significance, applications and ecological roles, 1st Ed, Elsevier. 140-190.
- Aysel, S. and Muaynevver, S. (2004). Seasonal change in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanine constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). Plant Growth Regulation. 44:251-256.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999). The ferric reducing ability of plasma as a power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239 (1): 70-76.
- Cao, G. and Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clinical Chemistry. 44:1309-1315.
- Cook, N. C. and Samman, S. (1996). Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional Biochemistry.7: 66-76.
- Cubukeu, B. and Yazagan, A. (1974). Isolation of isorhamnetin-3-rutinoside (narcissin) and quercetin-3-glucoside from leaves and stems of *Leontice leontopetalum*. Natural Production. 37: 537-538.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. and Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage summer savory. Agricultural and Food Chemistry. 50: 5294-5299.
- Farber, J.L. (1994). Mechanisms of cell injury by activated oxygen. Environmental Health Perspectives. 102: 17-24.
- Ganiyat Oloyede, K. James Oke, M. Yunus Raji and Tiwalade Olugbade, A. (2010). Antioxidant and anticonvulsant alkaloids in *Crinum orantumbulb* extract. World Journal of Chemistry. 5(1): 26-31.
- Gresse, G., Bachmann, P., Witte, L. and Czygan, F. C. (1993). Distribution and taxonomic significance of Quinolizidine alkaloid in *Leontice leontopet-*

- alum* and *Lewersmannii* (*Berberidaceae*). *Biochemical Systematic and Ecology*. 21(6/7):679-685.
- Gulcine, I., Mshvildadz, V., Gepdiremen, A. and Elias, R. (2006). Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine*. 13: 343–351.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: *Nutrition Reviews*. 55: 44–49.
- Iskandarov, S., Nuriddinov, N., Yunusov, S. YU. (1967). Alkaloids of *Leontice albertii*. *Chemistry of Natural Compounds*. 3(1): 21-24.
- Iskandarov, S., Yunusov, S. YU. (1969). Alkaloids of *Leontice darvasica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 5(2): 132.
- Jimoh, F. O, Adedapo, A. A., Afolayan, A. J. (2010). Assessing the polyphenolic, nutritive and biological activities of acetone, methanol and aqueous extracts of *Rumex sagittatus* Thunb. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4: 629-635.
- Jing, T. Y. and Zhao, X. Y. (1995). The improved pyrogallol method by using terminating agent for superoxide dismutase measurement. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 22: 84 – 86.
- Kolak, U., Habekirglu, I., Boga, M., Ozgokce, M., Unal, M., Choudhary, M.I. and Ulubelen, A. (2011). Phytochemical investigation of *Leontice leontopetalum* subsp. *ewersmannii* with antioxidant and anticholinestrase activities. *Natural Productions*. 5(4): 309-311.
- Krenn, L., Glantschig, S. and Sorgner, U. (1998). Determination of five major opium alkaloids by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a base- deactivated stationary phase. *Chromatographia*. 47 (1/2): 21-24.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*. 40: 344-352.
- Lien, A. i., Hua, H., Chuong, P. H. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Biomedical Science*. 4(2):89-96.
- Mathew, S. and Abraham, T. E. (2006). In vitro antioxidant activity and scav-

- enging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 44:198-206.
- Mollv, N. M and Ivanov, I. C. (1970). Leontiformine a new 3-Piperidyl-(2)-Quinolizidine, from *Leontice leontopetalum*. *Tetrahedron*. 26: 3805-3808.
- Nickavar, B., Alinaghi, A. and Kamalinegad, M. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran. Pharmaceutical Research*. 7(3): 203-209.
- Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S. and Suda, I. (2002). Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Agricultural Food and Chemistry*. 50: 7524-7529.
- Pokorny, J. (2007). Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant? *European Journal of Lipid Science Technology*. 109: 629-642.
- 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.
- Prior, R. L, Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables diet and health implications. *Horticultural Science* 35(4): 588-92.
- Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agricultural and Food Chemistry*. 53(8): 3101-3113.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., and Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*. 89: 569-575.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. and Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometer determination total alkaloid in some Iranian medicinal Plant. *Pharmaceutical Science*. 32: 17-20.
- Soares, A. A., Souza, C. G. M., Daniel, F. M, Ferrari, G. P., Costa, S. M. G. and Peralta, R. M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*. 112: 775-781.

- Stief, T. W. (2003). The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical Hypotheses*. 60: 567–572.
- Uysal, I., Onar, S., Karabacak, E., Çelik, S. (2010). Ethnobotanical aspects of Kapıdağ Peninsula (Turkey). *Biodiversity and Conservation*. 3(3): 15-22.
- Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Agricultural Food Chemistry*. 49: 4083– 4089.

