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 ونیز در L. leontopetalum بیشتر از L. armeniaca بود. برگ و ریشه L. leontopetalum به ترتیب بیشترین (۱/۱۴۶±۰/۰۵) و کمترین (۰/۸۸۹±۰/۰۳) 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)

(DOI): 10.22051/jab.2016.2471

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 وقدرت احیاکنندگی با محتوای فنلی و فلاوونوئیدی یک رابطه‌ی قابل ملاحظه مشاهده شد. محتوای آلکالوئیدی با FRAP یک رابطه نسبتا 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، فلاوونوئید، لئونتیس، محتوای فنلی

مقدمه

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، فلاوونوئیدها، ترپن‌ها و انواع عصاره‌های گیاهی، فعالیت پاداکسایشی از خود نشان می‌دهند و برای حفظ 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

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، فلاوونوئیدها وپلی 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 .(Nickavar ۲۰۰۶ ,.et al) جنس ترب شیرحاوی آلکالوئیدهای quinolizidine(Gresse et al., 1993) و isoquinoline (Abu Safiehd et al., 1986) می‌باشد که این ترکیبات خواص درمانی متعددی دارند از جمله اسپارتئین 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 برعلیه علفخواران مفیدند. این ترکیبات اثرات مختلفی روی سیستم عصبی وگوارشی 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 می باشد. Iskandarov و Yunusov (۱۹۶۹) با کار روی L. darvasica مقدار آلکالوئید تام اندام‌های 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 درعصاره 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 . وهمکاران (۲۰۰۶) بیان کرده اند که عصاره خام ومونودسموزوئید 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 می توان پشتیبانی مکانیکی، جلب گرده افشان‌ها، جذب اشعه‌ی زیانبار فرابنفش وکاهش رشد گیاهان رقیب مجاور را نام برد

(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). فلاوونوئیدها یکی از بزرگترین گروه های فنلی گیاهان هستند. این ترکیبات به گروه‌های آنتوسیانین، فلاوون‌ها، فلاوونول‌ها و ایزوفلاوون‌ها تقسیم می‌شوند. انواع مختلف فلاوونوئیدها وظایف بسیار متفاوتی را در گیاهان بر عهده دارند از جمله دفاع و رنگیزه دار شدن (تایز و زایگر، ۲۰۰۲). تحقیقات دیگر وجود فلاوونها را در برگ‌ها و ساقه‌های L. leontopetalum نشان می‌دهد (Cubukeu andYazagan,1974)

در این تحقیق با توجه به اهمیت دارویی ترکیبات پاداکساینده به بررسی مقایسه ای محتوای آلکالوئید تام، فنل تام، فلاوونوئید تام وهمچنین فعالیت پاداکسایشی غددزیرزمینی و برگ‌های دوگونه ازاین جنس پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

غدد زیرزمینی و برگ های L. leontopetalum ازاطراف سد قشلاق، ارتفاع ۱۵۰۰متر و L. armeniaca از جاده قدیم ماموخ، ارتفاع ۲۰۰۰متر هردو واقع در شهرستان سنندج در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰جمع 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

عصاره گیری با تلفیقی ازروش‌های et al., Krenn 1998 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 وبه مدت ۱۸ ساعت به حال خود رها گردید. پس از گذراندن از صافی ۱۰میلی لیتر از عصاره صاف شده چندین بار با کلروفرم (هربار ۱۰میلی لیتر) عصاره گیری شد تا جایی که همه‌ی مواد رنگی حذف گردید و کلروفرم حاصل از شستشو رنگی نشد. درنهایت، 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 فراستات اضافه شد و سه بار با کلروفرم (۵، ۸ و ۱۰ میلی لیتر) عصاره گیری گردید. سپس فاز کلروفرمی به حجم ۲۵میلی لیتر رسانده شد. در این حالت وجود رنگ زرد در فاز پایینی نشاندهنده‌ی حضور آلکالوئید است. این فاز جدا گردید وبه وسیله

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 (۲۸میلی 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 g۳۰۰۰ 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 ازروش رنگ سنجی فولین- سیوکالتیو(Folin-Ciocalteu) اندازه گیری شد (Oki et al., 2002).طبق این روش، ۱ میلی لیتر از محلول فولین – سیوکالتئو به ۱میلی لیتر از محلول نمونه اضافه گردید. پس از سه دقیقه، ۱میلی 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 بر حسب میلی گرم گالیک اسید درگرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان گردید.

تعیین محتوای فلاوونوئیدی کل

محتوای فلاوونوئیدی 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 ۱۰میلی لیتری حاوی ۵ میلی لیتر آب دیونیزه منتقل شد. سپس ۰/۳میلی 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 ،۲میلی لیتر از هیدروکسید سدیم ۱مولار به آن اضافه شد و با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. جذب محلول فورا 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 براحیا کمپلکس تری پیریدیل تری آزین-فریک به فرم رنگی آن (ferrous) در حضور پاداکساینده ها می باشد. به طور خلاصه معرف FRAP محتوی ۵میلی لیتر از محلول

TPTZ (۲،۴،۶- تری پیریدیل – Sتری آزین) ۱۰میلی مول بر لیتر در اسیدکلریدریک ۴۰ میلی مول بر لیتر به اضافه ۵ میلی لیتر کلرید آهن (FeCl۳) ۲۰ میلی مول بر لیتر و ۵۰ میلی لیتر بافر استات (۰/۳ مول / لیتر با pH/۶=۳) است که به طور تازه آماده شده و تا ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد حرارت داده شده است. ۱۰۰ میکرولیتر ازنمونه متانولی با ۳ میلی لیتر معرف FRAP مخلوط گردید وجذب مخلوط واکنش بعد از انکوباسیون در ۳۷درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت پاداکسایشی بر حسب میکرو مول Feπ بر گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استانداردتهیه شده با غلظت های مختلف FeSO۴ بیان گردید (Benzie and Strain, 1999).

تعیین درصد جمع آوری رادیکال سو پر ا کسید

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. سپس ۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول (۴۵ میلی مول بر لیتر پیروگالول در اسید کلریدریک ۱۰ میلی مول بر لیتر)، که قبلا در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده بود، با استفاده از یک سرنگ میکرولیتری به قسمت بالایی لوله ی آزمایش تزریق شده و مخلوط شد. مخلوط برای سه دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس بلافاصله ۱ قطره اسیدآسکوربیک برای پایان واکنش به داخل مخلوط چکانده شد. جذب مخلوط در ۴۲۰ نانومتر به عنوان A۰ پس از ۵ دقیقه ثبت شد و این A۰ سرعت اتواکسیداسیون پیروگالول را نشان می دهد. سرعت اتواکسیداسیون A۱ از همان روش بالا گرفته شد فقط به بافر ۲۰میکرولیتر از عصاره افزوده شد. همزمان یک بلانک کنترل از مواد واکنشی به عنوان A۲ در نظر گرفته شد. درصد جمع آوری رادیکال با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

= درصد مهار رادیکال سوپراکسید

$A_0 - (A_2 - A_1) \times 100 / A_0$

سنجش قدرت احیا

توانایی عصاره ها برای احیای آهن با استفاده از روش Yildirim و همکاران (۲۰۰۱) سنجش شد. یک میلی لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH = ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فروسیانید پتاسیم (K۳Fe (CN۶ ۱۰ گرم

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 g۲۰۰۰ 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 آزمایش ها 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 فعالیت های پاداکسایشی آهن احیا شده قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال سوپر اکسید توسط نرم افزار Excel 2007 محاسبه گردید.

نتایج و بحث

یافته های حاصل از بررسی‌های فیتو شیمیا یی

جدول ۱ محتوای آلکالوئید تام، فنول کل و فلاوونوئید کل را نشان می‌دهد. با توجه به این جدول، مقدار آلکالوئید تام برای هردو گونه در برگ ها بیشتر از غدد زیرزمینی بود. مقایسه نتایج این ماده بین آنها نشان می‌دهد که بیشترین مقدار آلکالوئید برای هردو اندام در L. lenontopetalum دیده شد. بررسی های Gresse و همکاران (۱۹۹۳) روی اندام های 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 غددزیرزمینی این گونه تایید می‌کند. Kolak و همکاران (۲۰۱۱) برای اولین بار نشان دادند که آلکالوئید لوپانین موجود درغدد 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 کارشده پژوهشی صورت‌نگرفته‌است.

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

مشاهده شد. از ترکیبات موجود در L. leontopetalum می توان به ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی اشاره کرد (Kolak et al., 2011).

بسیاری از فنل ها به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر گیاهخواران و عوامل بیماری زا به کار می روند (تایز و زایگز ۲۰۰۲). یکی از ترکیبات موجود در جنس Leontice ترکیبات فلاوونوئیدی می باشد. تحقیقات Cubukeu و Yazagan (۱۹۷۴) وجود ترکیبات narcissin و glucside-3-quercetin را در ساقه و برگ *L. leontopetalum* نشان داده است. سایر تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات آلکالوئیدی، فنل و فلاوونوئیدی در این جنس وجود دارد(Kolak et al., 2011).

جدول ۱: محتوای تام آلکالوئیدی، فنلی و فلاوونوئیدی در برگ ها و غددزیرزمینی *L. armeniaca* و *L leontopetalum*

فلاوونوئید تام (میلی گرم کاتچین بر ۰ گرم وزن خشک)	فنل تام (میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک)	آلکالوئید تام (میلی گرم مرفین بر گرم وزن خشک)	اندام	گونه
۰/۴۲±۰/۰۰۶	۴۱/۵۶±۰/۵۸۹	۱۸/۵±۰/۶۴۶	غده زیرزمینی	*L. leontopetalum*
۰/۰۲۹±۲/۶	۱/۷۶۲±۱۷۱/۹۱	۰/۲۷± ۴۹۳/۷۷	برگ	*L. leontopetalum*
۰/۲۵۹±۰/۱۰۳	۲۹/۱۳±۰/۶	۸/۶±۰/۸۹	غده زیرزمینی	*L. armeniaca*
۱/۴۴±۰/۰۲۳	۸۸/۴±۲/۵۶	۱۱/۴۴±۰/۹۷۴	برگ	*L. armeniaca*

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

یافته های حاصل از بررسی فعالیت های پاداکسایشی

جدول ۲ فعالیت پاد اکسایشی کل، درصد جمع آوری رادیکالهای سوپراکسید و قدرت احیاکنندگی عصاره‌های متانولی غددزیرزمینی و برگ دو گونه *Leontice* را نشان می‌دهد. در این مطالعه اندازه گیری فعالیت پاداکسایشی عصاره ها به روش FRAP (فعالیت پاداکسایشی آهن احیا شده) انجام شد. این آزمون براساس توانایی احیا یون فریک (III) به یون فروس (II) توسط ترکیبات پاداکسایینده می‌باشد. در این آزمایش پاداکسایینده ها و یا احیاکننده های موجود در عصاره به طور مستقیم اندازه گرفته می‌شود (and Schaich, Prior 2005). فعالیت پاداکسایشی دربرگ

ها بیشتر از غددزیرزمینی است که این در مورد هردو 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 (۲۴/۵۱± ۶۰۱/۶) و نیز درغددزیرزمینی (۷/۱۰۷±۱۵۱/۴) میکرومول آهن فروس در گرم وزن خشک هردو متعلق به L. leontopetalum است. جدول ۳ رابطه‌ی بین فعالیت‌های پاداکسایشی و محتوای آلکالوئید، فنل و فلاونوئید کل را نشان می دهد. رابطه بین FRAP و محتوای فنل و فلاونوئید تام کاملا مستقیم و قوی (به ترتیب۰/۸۵۳ = R۲ و ۰/۹۱۵ =R۲) 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 می توان گفت نمونه هایی که از محتوای فنل و فلاوونوئیدی بالاتری برخوردارند، فعالیت پاداکسایشی بیشتری از خود نشان می‌دهند غذاهای گیاهی حاوی پاداکساینده‌های طبیعی مانند فنل ها ، فلاوونوئیدها 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)فلاوونوئیدها 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 آلکالوئیدی فنلی- فلاوونوئیدی (Kolak et al., 2011) و فلاوونها(Cubukeu and Yazagan, 1974) در آن باشد.

جدول۲: فعالیت پاد اکسایشی کل، درصد جمع آوری رادیکالهای سوپراکسید و قدرت احیاکنندگی عصاره های متانولی غددزیرزمینی و برگ *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*

گونه	اندام	فعالیت پاداکسایشی احیاآهن (میکرومول آهن فروس در گرم وزن خشک)	مهار رادیکال سوپراکسید (درصد)	قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)
L. leontopetalum	ریشه	۱۵۱a/٤±۷/۱۰۷	۲۱a/۸۹±۰/۱۰۵	۰a/۸۸۹±۰/۰۳۷
L. leontopetalum	برگ	٦۰۱b/٦±۲٤/۵۱	۵٤b/۵±۰/٤٤	۱b/۱٤٦±۰/۰۵۵
L. armeniaca	ریشه	۷۳c/۸±۵/۳۳	٦۰c/۱۸±۰/۵۹٦	۰a/۹۲±۰/۰۰٦
L. armeniaca	برگ	٤۹۸d/٤±٤۲/٦۸	٦٤d/۳٦±۰/۳٦	۰a/۹۱۵±۰/۰۰۳

حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال p<۵۰/۰، سه تکرار±DS

Kolak و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت پاداکسایشی چند عصاره ی مختلف از غدد زیرزمینی L. leontpetalum را بررسی کردند. طبق بررسی‌های آن ها 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 فلاوونوئیدی عصاره متانولی غددزیرزمینی این گیاه به ترتیب ۷۷/۱۳ میکروگرم پیروکاتکول و۱۲/۲۳ میکروگرم کوئرستین در میلی گرم عصاره است(Kolak et al., 2011).

Gulcin و همکاران (۲۰۰۶) گونه L. smirnowii را از نظر فعالیت پاداکسایشی مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که عصاره خام و مونودسموزوئیدهای موجود درغدد زیرزمینی این گیاه فعالیت پاداکسایشی وابسته به غلظت قابل توجهی از خود نشان می‌دهند . در این مطالعه ارتباطی مستقیم و نسبتا ضعیف (=۰R۲/۳۴۲) بین محتوای آلکالوئید تام و فعالیت پاداکسایشی مشاهده شد (جدول۳)، که می تواند پیشنهاد کند که ترکیبات آلکالوئیدی دارای خاصیت پاداکسایشی هستند. Kolak و همکاران (۲۰۱۱) مطالعه ای روی فعالیت پاداکسایشی غددزیرزمینی L. leontopetalum انجام دادند و نشان دادند که عصاره آلکالوئیدی و نیز آلکالوئید لوپانین موجود در این گیاه دارای فعالیت پاداکسایشی می‌باشد.

جدول۳: رابطه بین محتوای تام آلکالوئیدی فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت های پاداکسایشی آهن احیا شده قدرت احیاکنندگی و مهار رادیکال سوپر اکسید

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

* ضریب همبستگی قابل توجه

برای سنجش قدرت احیاکنندگی، از تبدیل ۳+eF به ۲+eF در حضور عصاره های متانولی استفاده شد سنجش پتانسیل احیا در عصاره های گیاهی یکی از روش‌های تعیین حوزه عملکرد پاداکسایندهها می‌باشد. 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 هابیشتر از غددزیرزمینی است ولی در L. acainemra. از نظر قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در این مطالعه برگ و ریشه L. mulatepotnoel به ترتیب بیشترین (۰/۵۵۰± ۱/۶۴۱) و کمترین (۰/۰۰± ۰/۹۸۸) قدرت احیا را نشان دادند. بین قدرت احیا و محتوای آلکالوئیدی (R^2=۰/۶۶۶) فنلی (R^2=۰/۴۸) و فلاوونوئیدی(R^2=۰/۲۷۷)رابطه مستقیم و مشخصی وجود دارد (جدول ۳). بنابراین می توان نتیجه گرفت آلکالوئیدها و ترکیبات فنولی از جمله فلاوونوئیدها میتوانند مسئول خصوصیات احیاکنندگی در گیاهان باشند. با افزایش میزان ترکیبات فنولی، قدرت احیاکنندگی افزایش می‌یابد. به عبارتی این ترکیبات با اهدا الکترون یا اتم های هیدروژن واکنش های زنجیری تشکیل رادیکال های آزاد را می‌شکنند و با پیش سازهای پراکسید واکنش داده، و از تشکیل پراکسید جلوگیری می‌کنند(Kumaran and Karunakaran, ۲۰۰۷). بنابر این برگ L. mulatepotnoel که بیشترین قدرت احیاکنندگی را دارد احتمالا بیشترین میزان ترکیبات احیاکننده و پلی فنلها را دارا می‌باشد. nicluG و همکاران (۶۰۰۲) با کار روی گونه L. smirnowii نشان دادند که عصاره خام و مونودسموزوئیدهای موجود در غدد زیرزمینی این گیاه قدرت احیاکنندگی بالایی دارند. kaloK و همکاران (۱۱۰۲) نشان

دادند که عصاره های آبی ،متانولی و آلکالوئیدی غدد زیرزمینی L. mulatepotnoel 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 پاد اکساینده ها می‌تواند در محتوای دگرگوهره های گیاهی ونیز 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 می شود که هردوی این رادیکال ها در تنش اکسایشی شرکت می کنند (Stief, ۲۰۰۳). همچنین سوپراکسید می تواند با نیتریک اکسید واکنش داده و تشکیل پراکسی نیتریت را بنماید .(Halliwell, 1997) در تمامی نمونه‌ها درصد مهار بیشتر از۷۲ 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 (۴۶/۶۳±۰/۶۳) و کمترین در غدد زیرزمینی L. mulatepotnoel (۷۲/۹۸±۰/۵۰۱ 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 جدول۳ بین فعالیت مهار رادیکال سوپراکسید و محتوای آلکالوئیدی تام(R^2=۰/۱۲۲) رابطه معکوس و بسیار ضعیفی مشاهده شد این نشان می دهد 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=۰/۷۰۰) و فلاوونوئید (R^2=۰/۶۰۱۰) رابطه مستقیم ضعیفی مشاهده شد.از آنجایی که ظرفیت پاداکسایشی تنها به محتوای آلکالوئیدی فنل و فلاوونوئیدی 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، گلوتاتیونها و... باشد (Pokorny, 2007). فعالیت پاداکسایشی غدد زیرزمینی L. iiwonrims توسط nicluG و همکاران (۶۰۰۲) بررسی شد. طبق مشاهدات آنها عصاره خام و مونودسموزوئیدهای این گیاه در غلظت۰۳ میکروگرم در میلی لیتر ظرفیت پاداکسایشی قابل توجهی (به ترتیب ۳۷/۴ و ۸۷ درصد) در برابر رادیکال سوپراکسید

از خود نشان می‌دهد. بررسی‌های انجام شده نشان داد که تا کنون گزارشی در رابطه با فعالیت پاداکسایشی acainemra .L ارائه نشده است.

زمانی که سازوکارهای پاد اکسایشی غیر موثر می‌شوند دریافت پاداکساینده ها از طریق رژیم غذایی داروهای مصنوعی یا داروهای گیاهی ضرورت پیدا می‌کند. 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 افق‌های تازه ای در استفاده از این منبع غذایی فراموش شده در صنایع غذایی و دارویی جهت افزایش سلامتی انسان بگشاید.

نتیجه گیری

محتوای فنلی، فلاوونوئیدی، آلکالوئیدی و نیز میزان فعالیت پاد اکسایشی در برگ ها از غدد زیرزمینی بیشتر است که این در مورد هردو گونه مشهود است. بیشترین محتوای این ترکیبات و فعالیت آنتی اکسیدانی در گونه mulatepotnoel .L مشاهده شده است. عصاره های ecitnoeL 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 می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله ازراهنمایی های سرکارخانم مهندس ندا فرناد و آقای یاسر بهرامی درکارهای آزمایشگاهی سپاسگزاری میشود.

منابع

تایز، ل. و زایگر، ای. (۲۰۰۲). فیزیولوژی گیاهی، انتشارات خانه زیست شناسی۳۴۲-۳۵۰.

معروفی، ح. (۱۳۸۶). فلورایران، شماره۵۶: تیره شیرپنجه: ص ۱۹، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها ومراتع 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 *Leontic 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*

lentopetalum. 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, aplicatins and ecological roles, 1nd 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 meth- ods 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 isorhamntin-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 *L.ewersmannii* (*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 antixidant 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 leontopetelum*. Tetrahedron. 26: 3805-3808.

Nickavar, B., Alinaghi, A. and Kamalinegad, M. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of five*Mentha* spicies. Iran. Pharmeutical 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 phenol ics 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. Pharmceutical 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.