فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲٤، شمارهٔ ۳ صفحهٔ ۳۸٤-۳۷٤ (۱۳۸۷)

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی برگ و پوست شاخه گیاه *Pterocarya fraxinifolia* (Lam.) Spach

سید محمد نبوی[۱]، محمدعلی ابراهیم زاده[۲*] و سید فاضل نبوی[۱]

۱- محقق، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده داروسازی ساری و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران،

پست الکترونیک: zadeh20@yahoo.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۷

چکیده

Pterocarya fraxinifolia (Lam.) Spach از تیره Juglandaceae به‌صورت خودرو در استانهای شمالی ایران می‌روید. به‌رغم فراوانی، اطلاعات بسیار کمی در خصوص این گیاه گزارش شده است. این تحقیق به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی این گیاه انجام شد. برای این منظور، برگها و شاخه‌های این گیاه از منطقه دشت ناز ساری جمع‌آوری شده و عصاره متانولی آنها استخراج شد. سپس این عصاره‌ها در آزمونهای گوناگون بکار رفت. نتایج نشان داد که میزان فنل و فلاونوئیدها در برگ به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از پوست شاخه است. در آزمون به‌دام‌اندازی رادیکالهای آزاد DPPH غلظت مهار ۵۰٪ در عصاره متانولی برگ ۱۵/۵۹±۰/۱۱ و در پوست شاخه ۱٦٦/۲٤±۲/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های برگ تفاوتی با آسکوربیک اسید نداشت ($p>0.05$). اگرچه عصاره‌ها در آزمون به‌دام‌اندازی نیتریک اکساید اثر ضعیفی ا ز خود نشان دادند، اما به‌طور مؤثری قابلیت شلات کنندگی آهن را دارا بودند. تمامی عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی در تست لینولئیک اسید از خود نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت این عصاره‌ها وجود نداشته ($p>0.05$) و تمامی عصاره‌ها الگوی مهار پراکسیداسیون مشابه آسکوربیک اسید و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA از خود نشان دادند. در مجموع، عصاره متانولی این گیاه در تمامی مدلهای مورد مطالعه، سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. به‌ویژه، قابلیت احیاءکنندگی آهن III به آهن II را با اهداء الکترون، شلاته کنندگی آهن II و فعالیت ضد پراکسیده شدن چربی را از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: *Pterocarya fraxinifolia* (Lam.) Spach، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، DPPH، شلاته کننده.

مقدمه

نقش رادیکالهای آزاد در ایجاد بسیاری از بیماریها به‌خوبی به اثبات رسیده است (Kumaran & Karunakaran, 2006). واکنشهای بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید نموده که توانایی تخریب بیومولکولها را دارا می‌باشند. این اثر زیانبخش رادیکالهای آزاد می‌تواند توسط مواد آنتی‌اکسیدان بلوکه شود. این ترکیبها موجب به‌دام‌اندازی رادیکالهای آزاد شده و موجب سمیت‌زدایی می‌شوند. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدانها نقش مهمی در پیشگیری از بیماریهای

قلبی- عروقی، سرطان (Kris-Ethertonm *et al.*, 2002) و بیماریهای دژنراتیو (پارکینسون و الزایمر) (Di Matteo & Esposite, 2003) دارند. نظر به اینکه گیاهان منبع آنتی‌اکسیدانهای طبیعی می‌باشند (Yen & Duh, 1995) تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می‌باشد (Kumaran & Karunakaran, 2006). گیاهانی که غنی از ترکیبهای آنتی‌اکسیدان هستند می‌توانند سلولها را از استرسهای اکسیداتیو محافظت نمایند (Ielpo *et al.*, 2000). گیاه *Pterocarya fraxinifolia* از تیره Juglandaceae با نام فارسی لرگ درختی است قطور، خزان کننده با پوست تنه شیاردار، خاکستری تیره به ارتفاع تا ۳۵ متر. این گونه به صورت خودرو در استانهای گرگان، گیلان و مازندران می‌روید و در سالهای اخیر توده‌های کوچکی از آن در استانهای ایلام و لرستان نیز یافت شده و علاوه بر ایران در ترکیه و قفقاز نیز می‌روید (www.bedonemarz.iranblog.com). به‌رغم فراوانی این گونه، اطلاعات کمی در این خصوص گزارش شده است (Meurer *et al.*, 1988؛ Gungor *et al.*, 2007). تنها اثر درمانی گزارش شده از این گیاه اثر معرقی (عرق‌آور) می‌باشد (www.pfaf.org).

از آنجا که اثر آنتی‌اکسیدانی از برگ و پوست شاخه‌های این گیاه تاکنون گزارش نشده است، بر آن شدیم ضمن اندازه‌گیری فلاونوئیدها و محتوای تام فنلی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی این اندامها را با روشهای in vitro مورد بررسی قرار دهیم. به این وسیله شاید امکان بهره‌برداری اقتصادی از این گیاه مقدور شود. بدین منظور پنج روش استاندارد انتخاب شد.

اساس روش نخست، به‌دام‌اندازی رادیکالهای DPPH (رادیکالهای دی فنیل پیکریل هیدرازیل) بر مبنای توانایی هیدروژن دهی می‌باشد (Chung *et al.*, 2006). این روش به منظور ارزیابی فعالیت رادیکال آزاد بکار می رود. از مزایای آن، عدم وابستگی به قطبیت نمونه می‌باشد (Kartal *et al.*, 2007). از سویی تخریب اسیدهای چرب یکی از علل عمده فساد مواد غذایی بوده و مهار اکسیداسیون اسیدهای چرب بخش مهمی را در صنایع غذایی تشکیل می‌دهد. آنتی‌اکسیدانها عمدتاً در این مورد بکار می‌روند. لیپیدهای غشایی غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که بیشترین حساسیت را در فرایندهای اکسیداتیو دارند، به‌خصوص لینولئیک اسید و آراشیدونیک اسید، دستخوش اکسیداسیون می‌شوند (Ordon˜ez *et al.*, 2006). تست مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید بدین منظور بکار می‌رود. دو روش فوق در صنایع غذایی بسیار مطلوب می‌باشند (Hinneburg *et al.*, 2006). در روش سوم، قدرت احیاءکنندگی مواد موجود در نمونه با احیاءآهن III به آهن II با توانایی در دادن الکترون سنجیده می‌شود (Chung *et al.*, 2006). احیاء آهن III اغلب به عنوان شاخص فعالیت الکترون‌دهی بکار می‌رود که مکانیزم مهمی در عمل آنتی‌اکسیدانی مواد فنلی می‌باشد (Hinneburg *et al.*, 2006). روش چهارم توانایی شلاته کردن Fe^{2+} می‌باشد. آهن توانایی تولید رادیکالهای آزاد از پراکسیدها را دارا می‌باشد. از آنجا که Fe^{2+} می‌تواند اکسی رادیکالها را تولید نموده و موجب پراکسیده شدن چربیها شود، کم نمودن غلظت Fe^{2+} موجب محافظت در مقابل تخریب اکسیداتیو خواهد بود. بنابراین توانایی شلاته کردن Fe^{2+} به عنوان یک متد سنجش آنتی‌اکسیدانی مطرح می‌باشد (Chung *et al.*, 2006؛ Hinneburg *et al.*, 2006). در روش پنجم، به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید نیز موجب توقف واکنش‌های زنجیری می‌گردد که

با تولید زیاد از حد نیتریک اکساید آغاز می‌شود (Moncada *et al.*, 1991).

مواد و روشها

مواد شیمیایی

فروزین، لینولئیک اسید، تری‌کلرو استیک اسید، DPPH (دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل)، پتاسیم فری سیانید از کارخانه سیگما و BHA (بوتیل هیدروکسی آنیسول)، آسکوربیک اسید، سولفانیل آمید، نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌هیدرو کلراید، EDTA (اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید)، کوئرستین، گالیک اسید و فریک کلرید از کارخانه مرک تهیه شد. سایر ترکیبها و حلالها نیز با خلوص آزمایشگاهی خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

برگها و شاخه‌های گیاه پتروکاریا در پاییز ۱۳۸۵ از منطقه دشت ناز ساری جمع‌آوری شد و در سایه در مجاورت هوا خشک شده و سپس پودر شدند. به منظور عصاره‌گیری از متانول استفاده شد. ۱۰۰ گرم از پوست شاخه و برگ گیاه با متانول مخلوط شده و پس از ۲٤ ساعت صاف شد. عمل استخراج در هر مورد ۳ بار تکرار شد. حلالها در خلأ تبخیر شده و به کمک فریز درایر (Zirbus, Va Co 5) خشک شدند. بدین ترتیب عصاره متانولی پوست شاخه (۵٪) و عصاره متانولی برگ با بازده ۲۳٪ بدست آمد.

اندازه‌گیری محتوای تام فنلی و فلاونوئیدهای عصاره‌های پتروکاریا

محتوای تام فنلی با استفاده از واکنش‌گر فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. عصاره با واکنش‌گر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال مخلوط شده و پس از قلیایی نمودن، جذب آن ۲ ساعت بعد در طول موج ۷٦۰ نانومتر در مقابل بلانک توسط دستگاه اسپکتروفتومتر پرکین المر مدل EZ201 ساخت آمریکا ثبت شد. اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون بکار رفت. محتوای تام فنلی بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره» گزارش شد (Hinneburg *et al.*, 2006؛ Chung *et al.*, 2006). آزمایشها ۳ بار تکرار شد و میانگین آنها گزارش شد. برای سنجش میزان فلاونوئید از معرف آلومینیوم کلرید استفاده شد. به عصاره، متانل، محلول $AlCl_3$ ۱۰٪ در اتانل، محلول پتاسیم استات یک مولار و آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد در طول موج ٤۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید بر اساس میزان معادل «میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره» گزارش شد (Ordon˜ez *et al.*, 2006). آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد.

فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد

رادیکال پایدار دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل برای تعیین فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد بکار رفت. (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008a and 2008b). غلظتهای مختلف از هر عصاره با هم حجم خود از محلول متانولی DPPH (۱۰۰ میکرومولار) مخلوط شده و پس از هم‌زدن، به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. جذب مخلوط در ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. براساس اطلاعات حاصل، EC_{50} عصاره از منحنی

درصد مهار در مقابل غلظت عصاره بدست آمد. ویتامین ث، کوئرستین وBHA به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه بکار گرفته شد.

بررسی قدرت احیاءکنندگی

احیاء آهن (III) اغلب به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی بکار می‌رود. این مسئله مکانیسم مهمی را در فرایند اکسیداسیون ترکیبهای فنلی تشکیل می‌دهد (Nabavi *et al.*, 2008). اندازه‌گیری قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های پتروکاریا با روش Yen و Chen (۱۹۹۵)، انجام شد (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008b). مقادیر مختلفی از هر عصاره در آب با بافر فسفات ۰/۲ مولار و محلول پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. مجموعه در دمای ۵۰ درجه برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از افزایش ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱٪، مجموعه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز فوقانی با آب مقطر و محلول فریک کلرید ۰/۱ مخلوط شده و سپس جذب مجموعه در ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاءکنندگی (آنتی‌اکسیدانی) خواهد بود. آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه بکار گرفته شد.

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید در محلولهای آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتریت تولید می‌نماید. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنش‌گر گریس مورد سنجش قرار می‌گیرد. به‌دام‌اندازی نیتریک اکساید با رقابت نمودن با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید در بافر فسفات با غلظتهای مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱٪، نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلرید ۰/۱٪ در اسید فسفریک ۲٪) اضافه شد. جذب مخلوط در ٥٤٦ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. آزمایشها ۳ بار تکرار شده و میانگین آنها گزارش شد. کوئرستین به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه بکار گرفته شد (Sreejayan & Rao, 1997).

فعالیت شلاته کنندگی آهن II

به‌طور کلی مواد غذایی حاوی فلزات واسطه بوده و یا در طول زمان فرایند تولید به آن آلوده می‌شوند. عناصر واسطه دوظرفیتی نقش مهمی را به عنوان کاتالیزور در فرایندهای اکسیداتیو ایفا نموده و منجر به تشکیل رادیکالهای هیدروکسیل و واکنشهای تخریبی هیدروپراکساید از طریق پدیده فنتون می‌شوند (Halliwell, 1997). این مراحل می‌تواند با شلاته شدن یون آهن به تأخیر افتاده یا غیرفعال شود. اندازه‌گیری قدرت شلاته کنندگی آهن با روش دنیز انجام شد (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008c). به عصاره محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شده و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ٥٦٢ نانومتر اندازه‌گیری شد.

درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن- فروزین با کمک فرمول $[(A_0- A_s)/A_s]\times100$، A_0 جایی که جذب کنترل و A_s جذب عصاره یا استاندارد خواهد بود. EDTA به عنوان کنترل بکار رفت و فعالیت شلاته کنندگی آهن بر حسب اکی والان Na_2EDTA در گرم عصاره بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

چربیهای غشاء غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که آنها را مستعد شرکت در فرایندهای اکسیداتیو می‌نماید. در این مورد به‌ویژه می‌توان به لینولئیک اسید و آراشیدونیک اسید اشاره نمود که هدف پراکسیده شدن چربیها می‌باشند (Yu, 2001). مهار پراکسیده شدن چربیها به کمک آنتی‌اکسیدانها ممکن است به علت فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکالهای آزاد باشد. یون سوپر اکسید به‌طور غیرمستقیم موجب آغازگر پراکسیده شدن چربیها می‌باشد چرا که آنیون سوپر اکسی به عنوان پیش‌ساز اکسیژن نوزاد و رادیکال هیدروکسیل عمل می‌کند (Ordon˜ez *et al.*, 2006). رادیکالهای هیدروکسیل موجب کاهش اتمهای هیدروژن از غشاء چربی می‌شود. این اتمها منجر به پراکسیده شدن چربیها می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های پتروکاریا در مقابل اکسیداسیون لینولئیک اسید با روش FTC مورد بررسی قرار گرفت (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008b). به یک میلی‌لیتر از هر عصاره در ٤ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درجه، ٤/۱ میلی‌لیتر محلول اسید لینولئیک (۲/۵۱٪) در اتانول مطلق اضافه شد. سپس ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار و ۳/۹ آب مقطر به محلول اضافه شد. مجموعه در لوله درب‌دار ریخته شد و در تاریکی در دمای ٤۰ درجه نگهداری شد. به ۰/۱ میلی‌لیتر از این محلول ۹/۷ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درجه و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آمونیوم تیوسیانات ۳۰ درصد، اضافه شد. دقیقاً ۳ دقیقه پس از افزایش ۰/۱ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن II در اسید کلریدریک ۳/۵٪، جذب مجموعه در طول موج ۵۰۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شده و بر این اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی (به شکل درصد مهار) بر مبنای فرمول زیر محاسبه شد.

100-[(absorbance increase of the sample/absorbance increase of the control)×100]

عمل سنجش هر ٢٤ ساعت، تا روزی که جذب کنترل به حداکثر مقدار خود برسد انجام پذیرفت. براساس اطلاعات بدست آمده، IC_{50} عصاره‌ها محاسبه شد. آسکوربیک اسید و BHA به عنوان شاهد مثبت برای مقایسه بکار رفت.

آنالیز آماری

تمامی اندازه‌گیریها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت Mean±SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) برای مقایسه میانگینها بکار رفت. نتایج با احتمال $p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظتهای مربوطه بدست آمد.

نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید

محتوای تام فنلی با متد فولین سیوکالتیو به صورت اکی‌والان گالیک اسید در گرم عصاره براساس معادله خط منحنی استاندارد ($y=0.0063x$, $r^2=0.987$) محاسبه شد. محتوای تام فنلی برای عصاره متانولی برگ و پوست شاخه به‌ترتیب ۲/۲۰±۸۵/۹۳ و ۱/۳۲±۱۷/۷۸ اکی‌والان میلی‌گرم گالیک اسید در گرم پودر عصاره بدست آمد.

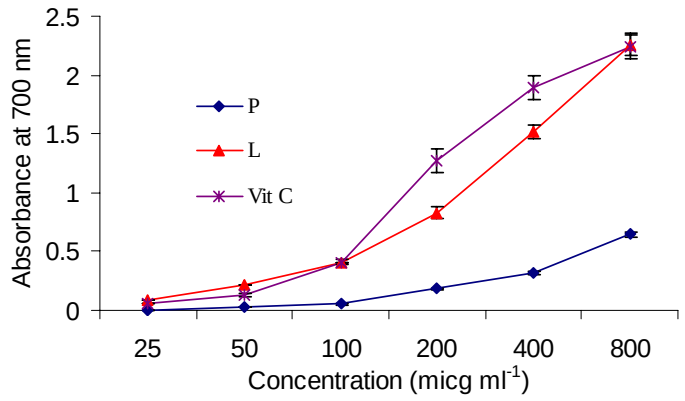
محتوای فلاونوئید نیز بر مبنای معادله خط منحنی استاندارد ($y=0.0067x+0.0132,\ r^2=0.999$) برای همین مجموعه به‌ترتیب ۲٤/۳۲±۰/۹۸ و ۱۱/۸۲±۰/۲۷ اکی‌والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر عصاره بدست آمد.

فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال DPPH

در این تحقیق مشخص شد که فعالیت به‌دام‌اندازی رادیکال در تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظت مهار ۵۰٪ (IC_{50}) در عصاره متانولی برگ ۱۵/۵۹±۰/۱۱ و در پوست شاخه ۱٦٦/۲٤±۲/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. IC_{50} برای آسکوربیک اسید، کوئرستین و BHA به‌ترتیب ۵/۰۵±۰/۱۲، ۵/۲۸±۰/٤۳ و ۵۳/۹٦±۲/۱۳ میکروگرم برمیلی‌لیتر بدست آمد.

قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های پتروکاریا

شکل ۱ منحنی غلظت- پاسخ را در عصاره متانولی پتروکاریا نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که قدرت احیاءکنندگی تمام عصاره‌ها با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های برگ و پوست شاخه در قدرت احیاءکنندگی وجود داشت ($P<0.05$).



شکل ۱- بررسی قدرت احیاءکنندگی عصاره متانولی پوست شاخه P و متانولی برگ L در غلظت ۲۵-۸۰۰ micg/ml

ویتامین ث به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفته است.

سنجش به‌دام‌اندازی نیتریک اکساید

عصاره‌ها اثر ضعیف به‌دام‌اندازی نیتریک اکساید در محدوده ۰/۲ تا ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به شکل وابسته به غلظت از خود نشان دادند. غلظت مهار ۵۰٪ (IC_{50}) در عصاره متانولی برگ ۰/۱۳±۰/۰۱ و در پوست شاخه ۲/۲۵±۲/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. با این حال، فعالیت کوئرستین با غلظت مهار ۵۰٪ معادل ۰/۰۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاتر از این عصاره بود ($p<0.01$).

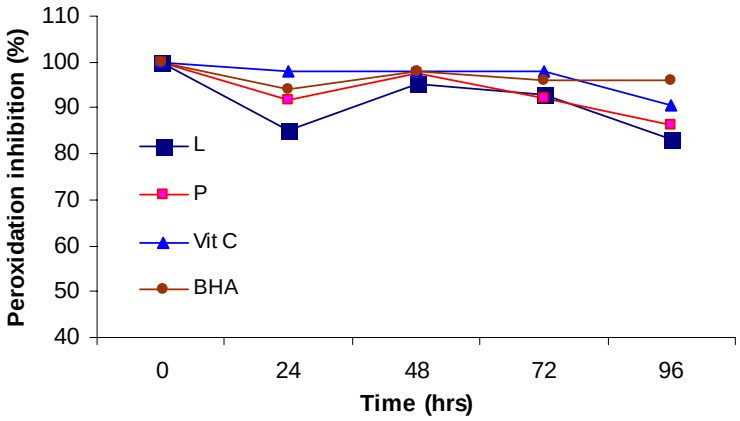
سنجش میزان فعالیت شلاته کنندگی آهن II

نتایج نشان داد که عصاره‌های پتروکاریا، به‌طور مؤثری قابلیت اتصال به آهن را دارا می‌باشد. غلظت مهار ۵۰

درصد برای شلاته کنندگی آهن II برای عصاره متانولی برگ و پوست شاخه به‌ترتیب ۰/۱٤±۲/۲٦ و ۰/۰۱±۰/۱۷ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بدست آمد. EDTA فعالیت بسیار خوبی از خود نشان داد (IC_{50}= ۱۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (لینولئیک اسید)

شکل ۲ فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی پوست شاخه و برگ پتروکاریا را در غلظت ۲۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نشان می‌دهد. در چهل و هشتمین ساعت واکنش مهار پراکسیداسیون از ۹۵/۱ تا ۹۷/۷٪ بدست آمد. این مقدار در هفتاد و دومین ساعت نیز از ۹۲ تا ۹۳، متغیر بود. تمامی عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی از خود نشان دادند. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت این عصاره‌ها وجود نداشت ($p>0.05$). تمامی عصاره‌ها الگوی مهار پراکسیداسیون مشابه کنترلها (آسکوربیک اسید و BHA) از خود نشان دادند.



شکل ۲- فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره متانولی پوست شاخهP و متانولی برگ L پتروکاریا در روش لینولئیک اسید در زمانهای مختلف انکوباسیون در غلظت ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر

ویتامین ث و BHA به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

بحث

محتوای تام فنلی با متد فولین سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد، برای عصاره متانولی برگ و پوست شاخه به‌ترتیب ۲/۲۰±۸۵/۹۳ و ۱/۳۲±۱۷/۷۸ اکی‌والان میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بدست آمد. محتوای فلاونوئید نیز بر مبنای معادله خط منحنی استاندارد برای همین مجموعه به‌ترتیب ۰/۹۸±۲٤/۳۲ و ۰/۲۷±۱۱/۸۲ اکی‌والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره بدست آمد. عصاره متانولی برگ به‌طور قابل ملاحظه‌ای دارای مقادیر بالاتری از فنل تام و فلاونوئید نسبت به عصاره متانولی پوست شاخه بود. فنلها و ترکیبهای پلی فنلی، مانند فلاونوئیدها به‌طور گسترده در محصولات غذایی یافت شده و نشان داده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارند (Van Acker *et al.*, 1996). مطالعات نشان داده که افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، می‌تواند منجر به کاهش برخی بیماریها در انسان شود (Hertog *et al.*, 1993). میزان فنل تام و فلاونوئید در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی

موجود درعصاره‌های تهیه شده از گیاه را توجیه نماید. مدل به‌دام‌اندازی رادیکال پایدار DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی توانایی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lee *et al.*, 2003). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرایندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می‌شود. ترکیبهایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند (Brand-Williams *et al.*, 1995). بر پایه IC_{50} بدست آمده مشخص شد که عصاره متانولی برگ حدوداً ۱۰ بار فعالیت بیشتری از عصاره پوست شاخه از خود نشان می‌دهد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی برگ با آسکوربیک اسید و کوئرستین کاملاً قابل ملاحظه بود. سنجش قدرت احیاءکنندگی (آنتی‌اکسیدان) در نمونه ناشی از احیاء آهن II به آهن III با اهداء الکترون می‌باشد. میزان کمپلکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل رنگ آبی پروس در ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش قابلیت احیاءکنندگی می‌باشد. عصاره‌های برگ قدرت احیاءکنندگی بهتری نسبت به عصاره پوست شاخه از خود نشان داد. اثر این عصاره کاملاً همانند تأثیر آسکوربیک اسید بود ($p>0.05$). این حاکی از آن است که برای رسیدن به یک قدرت احیاءکنندگی، غلظت مورد نیاز از عصاره متانولی برگ معادل همان غلظت از ویتامین ث می‌باشد. از آنجا که قابلیت احیاءکنندگی عصاره برگ بسیار بالا بود، می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها با کمک اهداء الکترون موجب ختم واکنشهای زنجیره‌ای می‌شود. علاوه بر اکسیژن نوزاد، نیتریک اکساید در حالات پاتولوژیک دیگر مانند التهاب و کانسر نیز نقش دارد (Lee *et al.*, 2003). گیاه یا محصولات گیاهی که بتوانند با تشکیل نیتریک اکساید مقابله کنند می‌توانند به عنوان یک جایگاه در مهار بیماری مورد توجه قرار گیرند. علاوه بر آن، فعالیت به‌دام‌اندازی این ترکیب می‌تواند برای توقف در واکنشهای زنجیره‌ای ناشی از تولید بیش از حد نیتریک اکساید در سیستم سلامت انسان بکار گرفته شود. عصاره‌ها اثر ضعیف به‌دام‌اندازی نیتریک اکساید را در محدوده ۰/۲ تا ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به شکل وابسته به غلظت از خود نشان دادند که با فعالیت کوئرستین قابل مقایسه نبود ($p<0.01$). از سویی عناصر واسطه، مانند آهن قابلیت تشکیل رادیکالهای آزاد از پراکسیدها را براساس واکنشهای فنتون دارا بوده که می‌تواند موجب بیماریهای قلبی عروقی در انسان شود (Halliwell & Gutteridge, 1990؛ Halliwell *et al.*, 1992). از آنجا که آهن II می‌تواند موجب تولید اکسی رادیکالها و پراکسیده شدن چربیها شود، کاهش غلظت آن در واکنشهای فنتون به نحوی ایجاد نوعی حفاظ در مقابل تخریب اکسیداتیو خواهد بود. در اندازه‌گیری قدرت شلاته کنندگی آهن II، از توانایی تشکیل کمپلکس با آهن II بهره می‌برند. در حضور سایر شلاته کننده‌ها، تشکیل کمپلکس فروزین- آهن II کاهش یافته که منجر به کاهش رنگ قرمز ناشی از تشکیل کمپلکس خواهد شد. در این روش هم EDTA و هم عصاره با تشکیل کمپلکس فروزین- آهن II تداخل کرده که نشان می‌دهد عصاره دارای اثر شلاته کنندگی بوده و آهن را قبل از تشکیل کمپلکس رنگی با فروزین شلاته می‌کند. جذب کمپلکس فروزین- آهن II در این تحقیق به شکل وابسته به دوز، کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که عصاره‌های پتروکاریا، به‌طور مؤثری قابلیت اتصال

به آهن را دارا می‌باشد. این نشان می‌دهد که توانایی شلاته کردن آهن II، می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسمهای اثر آنتی‌اکسیدانتی گیاه پتروکاریا مطرح شود. الگوی مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید در عصاره مورد بررسی، مشابه کنترلها (آسکوربیک اسید و BHA) بود.

نتیجه‌گیری

عصاره متانولی پتروکاریا در تمامی مدلهای مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. عصاره‌ها قابلیت احیاءکنندگی آهن III به آهن II را با اهداء الکترون، شلاته کنندگی آهن II و فعالیت ضد پراکسیده شدن چربی از خود نشان می‌دهند. اطلاعات بیشتر در مورد جداسازی ترکیبات موجود در گیاه، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات جدا شده به شکل مجزا و سنجش آنتی اکسیدانی به شکل invivo مستلزم تحقیقات بیشتر در این زمینه خواهد بود.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بدلیل حمایت مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.
- Chung, Y.C., Chien, C.T., Teng, K.Y. and Chou, S.T., 2006. Antioxidative and mutagenic properties of Zanthoxylum ailanthoides Sieb & zucc. Food Chemistry, 97: 418-425.
- Di Matteo, V. and Esposite, E., 2003. Biochemical and therapeutic effect of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Current Drug Target CNS Neurological Disorders, 2: 95-107.
- Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M. 2008a. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacologyonline, 1: 7-14.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Hafezi, S. 2008b. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology, 32: 43-49.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Bekhradnia, A.R., 2008c. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African Journal of Biotechnology, 7(18): 3188-3192.
- Gungor, N.M., Kartal, S.N. and Kantay, R., 2007. Technological properties of wingnut (*Pterocarya fraxinifolia*) wood and characteristics of plywood from wingnut wood. Building and Environment, 42(8): 3108-3111.
- Halliwell, B., 1997. Antioxidants: the basics, what they are and how to evaluate them. Advances in Pharmacology, 38: 3-20.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology, 186: 1–85.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. and Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119: 598–620.
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J., and Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of selected culinary herbs and spices. Food Chemistry, 97: 122-129.
- Hertog, M.L.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.H.C., Katan, M.B., and Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease: the zutphen elderly study. Lancet, 342: 1007–1011.
- Ielpo, M.T.L., Basile, A., Miranda, R., Moscatiello, V., Nappo, C., Sorbo, S., Laghi, E., Ricciardi., M.M., Ricciardi, L. and Vuotto M.L., 2000. Immunopharmacological properties of flavonoids. Fitoterapia, 71: S101-S109.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2): 584-589.
- Kris-Ethertonm P,M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E. and Hilpert, K.F., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the

- Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P. and Van der Vijgh, W.J.F., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavanoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3): 331-342.
- http://bedonemarz.iranblog.com/(S(tpoias45bnwwez55ewel23ml))/Default.aspx?Mode = ContinuedPost&id=73758 Accessed September 5, 2008.
- www.pfaf.org/index.html (Pterocarya fraxinifolia - Plants For A Future database report.htm9). Accessed September 5, 2008.
- Yen, G.C. and Duh, P.D., 1995. Antioxidant activity of methanolic extracts of *Peanut huls* from various cultivars. Journal of the American Oil Chemist Society, 72: 1065-1067.
- Yen, G.C. and Chen, H. Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1): 27-32.
- Yu, L.L., 2001. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(7): 3452-3456.

prevention of cardiovascular disease and cancer. American Journal of Medicine, 113 (Suppl. 9B): 71S-88S.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R.J., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chemistry, 97: 109-114.
- Lee, S.E., Hwang, H.J., Ha, J.S., Jeong, H.S. and Kim, J.H., 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Life Sciences, 73: 167–179.
- Meurer, B., Wray, V., Wiermann, R. and Strack, D., 1988. Hydroxycinnamic acid-spermidine amides from pollen of *Alnus glutinosa*, *Betula verrucosa* and *Pterocarya fraxinifolia*. Phytochemistry, 27(3): 839-843 .
- Moncada, A., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacological Reviews, 43: 109-142.
- Nabavi, S.M, Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Hamidinia, A. and Bekhradnia, A.R., 2008. Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoids content of *Parrotia persica* Mey. Pharmacologyonline, 2: 560-567.
- Ordon˜ez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., lsla, M.I., 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food Chemistry, 97: 452-458.
- Sreejayan, N., and Rao, M.N.A., 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 49: 105-107.

Antioxidant and free radical scavenging activity of methanolic extract of *Pterocarya fraxinifolia* (Lam.) Spach leaves and bark

S.M. Nabavi[1], M.A. Ebrahimzadeh[2*] and S.F. Nabavi[1]

1- Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Medical Sciences University of Mazandaran, Sari, Iran
2*- Corresponding Author, Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Medical Sciences University of Mazandaran, Sari, Iran, E-mail: zadeh20@yahoo.com

Received: April 2008 Revised: September 2008 Accepted: October 2008

Abstract

Pterocarya fraxinifolia (Lam.) Spach (Juglandaceae) is widely distributed in northern area of Iran. Little information is available about its chemical composition and biological activity. In this paper, the antioxidant activity of *Pterocarya fraxinifolia* was determined. Bark and fresh leaves of *Pterocarya fraxinifolia* were collected from Dasht-e-Naz, Sari, Iran. Methanolc extract was used in different experiments. There was higher total phenol and flavonoid contents in leaves. IC_{50} for DPPH radical-scavenging activity was 15.59±0.09 for leaves and 166.24±2.30 $\mu g\ ml^{-1}$ for bark, respectively.The leaves extract exhibited a good reducing power at 2.5 and 80 $\mu g\ ml^{-1}$ that was comparable with ascorbic acid ($p>0.05$). The extracts also showed weak nitric oxide-scavenging activity and Fe^{2+} chelating ability. All tested extracts exhibited high antioxidant activity in peroxidation inhibition test. There were no significant differences ($p>0.05$) among extracts in antioxidative activity. All of extracts manifested almost the same pattern of activity as ascorbic acid and BHA at different incubation times ($p>0.05$). The leaves and bark extracts of *Pterocarya fraxinifolia* exhibited good but different levels of antioxidant activity in all the models studied. The extracts had good reducing power, anti-lipid peroxidation activity and DPPH radical-scavenging activity.

Key words: *Pterocarya fraxinifolia* (Lam.) Spach, antioxidant activity, DPPH, chelatory activity.