فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال اول، شماره ۴، بهار ۸۸ صفحات ۴۲- ۳۷

بررسی خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌های قطبی و غیر قطبی در چهار گونه از جنس *Marrubium* L. در شمال و شمال غرب ایران

لیلا شفیعی دستجردی*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، گروه شیمی، رودهن، ایران

علی مازوجی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، گروه زیست شناسی، رودهن، ایران

نیلوفر جباری مقدم

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،گروه زیست شناسی، تهران، ایران

محل انجام پژوهش: آزمایشگاه ریخت شناسی و سیستماتیک گیاهی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۱۰/۲۱

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثر آن‌ها به عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به صورت مؤثر و به طرق مختلف، از واکنش رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول‌ها نظیر پروتئین، آمینواسید، لیپید و DNA جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب و یا مرگ سلولی، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان‌ها می‌شوند. در تحقیق حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قطبی و غیرقطبی گونه‌های مختلف گیاه دارویی ماروبیوم بررسی گردید. در این پژوهش، اندام‌های هوایی گونه‌های مختلف گیاه ماروبیوم از نواحی کوهستانی استان‌های قزوین، تهران و اردبیل جمع‌آوری شد. در ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده در سایه و دمای اتاق خشک گردید. سپس عصاره‌گیری از تمام قسمت‌های گیاه با استفاده از حلال‌های متانول و کلروفرم به روش سوکسله انجام شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در سیستم مدل حاوی رادیکال ۲،۲- دی‌فنیل-۱- پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) ارزیابی گردید. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی چهار گونه متفاوت جنس ماروبیوم (*Marrubium propinquum* Fisch. & C.A.May ، *Marrubium astraconium* Jacq.، *Marrubium parviflorum* Fisch. & C.A.May، *Marrubium cuneatum* Russell.) با روش ۲،۲- دی‌فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) نشان داد که عصاره قطبی (متانولی) گونه *M. parviflorum* دارای فعالیت و میزان مهار رادیکال آزاد بالاتری است. مقدار IC_{50} عصاره متانولی *M. parviflorum* بعد از ۳۰ دقیقه معادل ۹۹/۴۶ ± ۰/۸۱ µg/mL بود که فعالیت

* مسئول مکاتبات: shafiee_l@yahoo.com

آنتی‌اکسیدانی آن در حدود ۵۷ درصد بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) به عنوان شاهد مثبت است (IC_{50} = ۵۶/۴۲ ± ۰/۱۹ μg/mL). در این تست، عصاره‌های غیرقطبی (کلروفرمی) گونه‌های مورد نظر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: نعناعیان، ماروبیوم، آنتی‌اکسیدان، DPPH

مقدمه

در سال‌های اخیر، طب گیاهی در عرصه دارو درمانی مورد توجه بسیار قرار گرفته و توانسته است در کنار داروهای سنتزی، توجه پژوهشگران علوم دارویی و پزشکی را به خود معطوف کند. مواد آنتی‌اکسیدان در بین ترکیبات موجود در گیاهان جایگاه خاصی دارند، چون رادیکال‌های آزاد در به وجود آمدن بیماری‌های بسیاری نقش عمده ایفا می‌کنند و بدن برای مقابله با آسیب اکسیداتیو ناشی از این رادیکال‌ها از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی استفاده می‌کند. امروزه با توجه به زندگی صنعتی، منابع تولید رادیکال‌های آزاد بسیار زیاد هستند و انسان‌ها هر روز در معرض این عوامل مخرب قرار دارند. نقش این رادیکال‌های آزاد در بسیاری از بیماری‌های انسان مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های قلب و عروق و بیماری‌های اعصاب و روان، مشخص شده است (۱). در واقع، واکنش‌های بیوشیمیایی متعددی در بدن، اکسیژن فعال تولید می‌کنند که توانایی تخریب بیومولکول‌ها را دارند. این اثر زیان‌بخش رادیکال‌های آزاد می‌تواند توسط مواد آنتی‌اکسیدان، بلوکه شود. این ترکیبات موجب به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و در نتیجه، موجب سمیت‌زدایی می‌گردند. آنتی‌اکسیدان‌ها علاوه بر ایفای نقش در سامانه‌های زیستی، در مواد غذایی سرشار از چربی‌های غیراشباع نیز از کاهش کیفیت تغذیه‌ای، ایمنی، بد طعمی و بی‌رنگ‌شدن به علت ایجاد ترکیبات سمی جلوگیری می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها به دو دسته شیمیایی و طبیعی تقسیم می‌شوند [۲]. آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی که بیشترین استفاده را در صنایع غذایی دارند، شامل BHT، BHA، TBHQ و پروپیل گالات بوده که سرطان‌زایی و اثرات منفی این ترکیبات بر سلامت انسان مشخص شده است (۴،۳). به همین دلیل، امروزه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند Vit C، Vit E، Vit A، اسید فولیک و انواع آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند (۵).

جنس ماروبیوم (تیره نعناعیان) در نقاط مختلف جهان حدود ۴۰ گونه دارد. تعداد گونه‌های موجود از این جنس در ایران ۹ گونه است. این گیاه در طب سنتی به عنوان ضدعفونی کننده، خلط آور، مدر، نیرو دهنده، تب‌بر و مقوی قلب و معده مصرف دارد. در طول دهه اخیر، گزارش‌های زیادی دال بر اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی گیاهان تیره نعناعیان به‌دست آمده است (۱۰-۶). در مورد گیاه دارویی ماروبیوم در مقالات موجود، خواص ضدمیکروبی و ضد التهابی اسانس دو گونه *M. cuneatum* و *M. globosum* subsp. *Libanoticum* (۱۱) و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی *M. vulgare* (۱۲) و *M. globosum* subsp. *globosum* (۱۳) مطالعه شده است. با توجه به این‌که گزارشی در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدان گونه‌های دیگر ماروبیوم وجود ندارد، لذا در این پژوهش قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قطبی (متانولی) و غیرقطبی (کلروفرمی) چهار گونه از جنس ماروبیوم (*Marrubium propinquum*، *Marrubium astracanium*، *Marrubium parviflorum*، *Marrubium cuneatum*) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بخش‌های هوایی گیاهان (ساقه، برگ، گل و میوه) در خرداد و تیرماه ۱۳۸۸ از نواحی کوهستانی استان‌های قزوین، تهران و اردبیل جمع‌آوری شد (جدول ۱). سپس به سرعت در اتاق با دمای ۲۲ °C و در سایه کامل پس از شستشو، غبار زدایی، پهن و خشک شدند و توسط قیچی مخصوص به تکه‌های کوچک خرد و حداقل ۲ نمونه از هر

گونه جهت تهیه نمونه هرباریومی جدا و کلکسیون گشته و آماده شناسایی شدند. پس از شناسایی نمونه‌ها در هرباریوم واحد علوم و تحقیقات (IAUH) نگهداری شدند (جدول ۱) و سپس تکه‌های خرد شده گیاهی در آسیاب برقی، پودر و آماده اسانس‌گیری شد. جهت تسهیل مطالعات، یک کد داخلی نیز به نمونه‌ها داده شد.

مواد شیمیایی

معرف ۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، از شرکت سیگما - آلدریچ و حلال‌های متانول و کلروفرم با خلوص آنالیتیکی، از شرکت شیمیایی مرک خریداری شدند. در تمامی آزمایش‌ها از آب مقطر استفاده گردید.

عصاره‌گیری

عصاره حدود ۲۰ گرم گیاه خشک پودر شده به روش سوکسله با ۲۸۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۶ ساعت استخراج شد. سپس عصاره حاصل صاف گردید و به‌وسیله تبخیر کننده دوار در فشار کاهش یافته تغلیظ شد. وزن عصاره متانولی (فاز قطبی) به‌دست آمده بعد از شستشو با کلروفرم (سه مرتبه، هر بار با ۲۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم) و جدا کردن فاز غیرقطبی و خشک شدن، ۲ گرم بود. همچنین وزن عصاره غیرقطبی (فاز کلروفرمی) ۰/۳ گرم برآورد گردید.

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون .DPPH

استفاده از رادیکال پایدار $DPPH^{\cdot}$ جهت بررسی خاصیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های گیاهی، کاربرد زیادی دارد. حرکت الکترون در سرتاسر مولکول سبب می‌شود که رادیکال آزاد پایدار ۲،۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل ($DPPH^{\cdot}$) نتواند به صورت دیمر درآید و ایجاد رنگ بنفش تیره در طول موج ۵۱۷ – ۵۱۵ نانومتر کند. این رادیکال، چربی دوست و دارای جذب بیشینه در طول موج ۵۱۷ نانومتر است. بررسی فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های قطبی و غیرقطبی با استفاده از رادیکال‌های پایدار $DPPH^{\cdot}$ مطابق با روش برند - ویلیامز و همکاران انجام شد (۱۴). نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف (در محدوده ۰/۴-۰/۰۲۵ mg/ml) به ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۰۴ mg/ml افزوده و ۳۰ دقیقه در دمای محیط، نگهداری شدند. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UNICO-S2100SUV) خوانده شد. از حلال متانول نیز برای صفر کردن دستگاه استفاده گردید. آزمایش، سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. میزان بازداری رادیکال آزاد DPPH برحسب درصد مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$I\% = [(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] \times 100$$

در این فرمول A_{blank} و A_{sample} به‌ترتیب میزان جذب شاهد و نمونه است. به منظور بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی، از فاکتور IC_{50} استفاده شد که بیانگر مقدار میلی‌گرم عصاره‌ای است که می‌تواند ۵۰ درصد رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ اولیه موجود در محیط را خنثی کند (۵). مقدار IC_{50} به وسیله همبستگی خطی بدست آمده از مقادیر بازداری در غلظت‌های مختلف نمونه تعیین شد. نتایج به‌دست آمده، با نتایج حاصل از افزودن BHA (به‌عنوان شاهد مثبت) بر روی DPPH مقایسه گردید.

نتایج

حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش $DPPH^{\cdot}$

در این آزمون، رادیکال‌های $DPPH^{\cdot}$ با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی که دهنده هیدروژن هستند واکنش داده و به شکل کاهش یافته درمی‌آید و رنگ آن از بنفش تیره، به زرد روشن تبدیل می شود و در نتیجه، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ nm کاهش می‌یابد[(۱۵،۱۶).

رادیکال‌های آزاد تولید شده از آنتی‌اکسیدان، می‌تواند استوکیومتری کلی واکنش (تعداد مولکول‌های $DPPH^{\cdot}$ کاهش یافته (بی رنگ شده) توسط یک مولکول عامل کاهش دهنده آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی) را تعیین کند (۱۷). در نهایت جذب که بیانگر مقدار $DPPH^{\cdot}$ باقی‌مانده است، بعد از ۳۰ دقیقه، اندازه‌گیری می‌شود. هر چه این مقدار بیشتر باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در حذف رادیکال آزاد کمتر بوده است. از این روش، برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گونه‌های مختلف ماروبیوم استفاده

شد. نتایج درصد مهارکنندگی برحسب غلظت عصاره‌های قطبی و غیرقطبی چهار گونه *Marrubium propinquum*، *Marrubium astraconium*، *Marrubium parviflorum*، *Marrubium cuneatum* در شکل‌های ۱و۲ نشان داده شده است. گستره غلظت‌های مورد استفاده در این آزمون از ۲۵ تا ۴۰۰μg/mL بود. همانطور که در شکل دیده می‌شود، تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش فعالیت مهارکنندگی نشان دادند. میزان IC_{50} عصاره متانولی و کلروفرمی چهار گونه ماروبیوم در مقابل DPPH در جدول‌های ۱و۲ آورده شده است. IC_{50} به طور معکوس با فعالیت آنتی‌رادیکالی ترکیب‌ها در ارتباط است. هرچه میزان IC_{50} کمتر باشد، فعالیت آنتی‌رادیکالی بیشتر است. فعالیت نسبی عصاره‌های متانولی چهار گونه بر مبنای IC_{50} به ترتیب عبارتند از:

M. propinquum (کد ۲) > *M.* (کد ۵۷) > *cuneatum* (کد ۷۳) > *M. astraconium* (کد ۶۸) > *M. parviflorum*.

بحث

همان‌گونه که مقادیر موجود در جدول ۲ نشان می‌دهد، عصاره قطبی (متانولی) گونه *M. parviflorum* دارای فعالیت و میزان مهار رادیکال آزاد بالاتری در مقایسه با عصاره متانولی سایر گونه‌های مطالعه شده ماروبیوم است. مقدار IC_{50} عصاره متانولی *M. parviflorum* بعد از ۳۰ دقیقه معادل ۰/۸۱ ± ۹۹/۴۶ μg/mL بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در حدود ۵۷ درصد بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) به عنوان شاهد مثبت است (IC_{50} = ۵۶/۴۲ ± ۰/۱۹ μg/mL). نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد عصاره‌های غیرقطبی (کلروفرمی) گونه‌های مورد نظر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای ندارند.

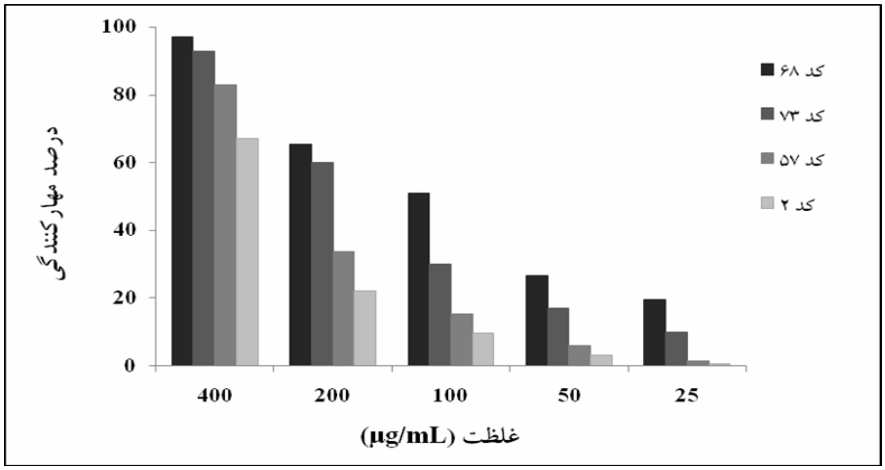
نتایج چندانی از ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد گونه‌های دیگر ماروبیوم در دست نیست. در تحقیق Matkowski و همکاران (۱۲)، عصاره متانولی *Marrubium vulgare* بررسی شده به روش DPPH، دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گیاهان دارویی دیگر مانند *Stachys officinalis, Lamium purpureum, Galeopsis speciosa* ست. در مطالعه دیگری توسط Sarikurkcu و همکاران (۱۳)، خواص آنتی‌اکسیدان عصاره متانولی *Marrubiu globosum* subsp. *globosum* به روش تست DPPH بررسی شده است که مقدار IC_{50} آن معادل ۱۵۷/۲۶ میکروگرم بر لیتر بوده که میزان مهار رادیکال کمتری را نسبت به BHT به‌عنوان شاهد مثبت با IC_{50} = ۵۵/۴۸ μg/mL نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

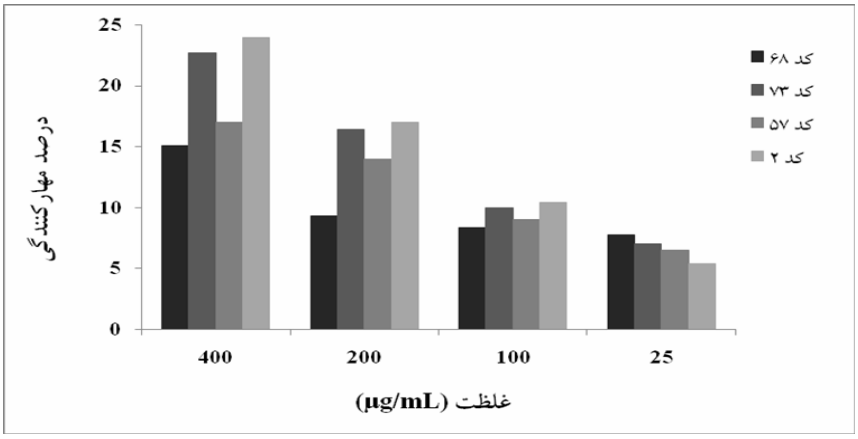
از آنجا که با توجه به نتایج بدست آمده عصاره متانولی *M. parviflorum* دارای فعالیت زیاد آنتی‌اکسیدانی می‌باشد لذا، لازم است بررسی‌های بیشتری در ارتباط با جداسازی و شناسایی مواد مؤثره و امکان استفاده از ترکیبات آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های محافظ و یا آنتی‌اکسیدان‌های پیشگیری کننده در بیماری‌های وابسته به رادیکال‌های آزاد انجام گیرد.

جدول ۱- مشخصات هرباریوم گونه های مورد مطالعه

تاریخ جمع آوری	هرباریوم محل نگهداری	کد هرباریومی	ارتفاع	محل جمع آوری	نام علمی گونه
۸۸/۳/۱۵	IAUH	۱۲۲۴۷	۱۵۰۰ متر	اردبیل- جاده سرعین	*Marrubium propinquum*
۸۸/۴/۱۲	IAUH	۱۲۲۴۵	۱۷۰۰ متر	قزوین- جاده قزوین به الموت نرسیده به رجائی شهر	*Marrubium astraconium*
۸۸/۴/۵	IAUH	۱۲۲۳۸	۲۰۵۰ متر	تهران- جاده فیروزکوه به پل سفید- گردنه گدوک	*Marrubium parviflorum*
۸۸/۴/۵	IAUH	۱۲۲۳۴	۱۹۵۰ متر	تهران- جاده دماوند به فیروزکوه نرسیده به سید آباد	*Marrubium cuneatum*



شکل ۱. میزان فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های متانولی گونه‌های مختلف *Marrubium*



شکل ۲. میزان فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌های کلروفرمی گونه‌های مختلف *Marrubium*

جدول ۲. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره‌های متانولی گونه‌های مختلف ماروبیوم

	Marrubium parviflorum	***Marrubium astraconium***	***Marrubium cuneatum***	***Marrubium propinquum***	**BHA**
IC_{50} (µg/mL)	۹۹/۴۶ ± ۰/۸۱	۱۴۹/۶۴ ± ۱/۰۱	۲۵۷/۱۸ ± ۱/۳۶	۳۲۷/۲۳ ± ۱/۲۳	۵۶/۴۲ ± ۰/۱۹

جدول ۳. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره‌های کلروفرمی گونه‌های مختلف ماروبیوم

	Marrubium parviflorum	***Marrubium astraconium***	***Marrubium cuneatum***	***Marrubium propinquum***	**BHA**
IC_{50} (µg/mL)	۲۱۸۴/۵۱ ± ۳/۸۱	۱۱۶۹/۱۹ ± ۱/۶۸	۱۵۴۲/۰۹ ± ۲/۳۵	۸۶۳/۴۲ ± ۱/۲۷	۴۰/۸۶ ± ۰/۱۰

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن انجام پذیرفته است.

محققین این مطالعه از مسئولین این معاونت قدردانی می‌نماید.

منابع

1- Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant of the essential oil and and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss*. *Food Control* 18: 800-5.

2- Singh G, Maurya S, Delampasona MP. 2007. A comparison of chemical antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1650-61.

3- Namiki M. 1990. Antioxidants, antimutagens in food, *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 6: 273-300.

4- Kahl R, Kappus H. 1993. Toxicity of synthetic antioxidants BHT and BHA in comparison with natural antioxidants vitamin E. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung and Forschung.* 196: 329-38.

5- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V. 2004. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. *Food Chem.* 85: 633-40.

6- Sanja C, Milka M, Marija E, Anesa J, Renata B. 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chem.* 111: 648-53.

7- Vundac VB, Brantner AH, Plazibat M. 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys taxa. Food Chem.* 104: 1277-81.

8- Conforti F, Menichini F, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Apostolides Arnold N. 2009. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chem.* 116: 898-905.

9- Bouayed J, Piri Kh, Rammal H, Dicko A, Desor F. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants *Food Chem.* 104: 364-68.

10- Armata M, Gabrieli M, Termentzi A, Zervou M, Kokkalou E. 2008. Constituents of *Sideritis syriaca. ssp. syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant activity *Food Chem.* 111: 179-86.

11- Rigano D, Grassia A, Borelli F, Aviello G. 2006. Phytochemical and pharmacological studies on the acetonic extract of *Marrubium globosum ssp libanoticum*. *Planta Medica* 72: 575-78.

12- Matkowski A, Piotrowska M. *2006*. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Phytoterapia* 77: 346-53.Sarikurkcu C, Tepe B, Daferera D, Polissiou M. 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum subsp. globosum* by three different chemical assays. *Bioresource Technology*. 99: 4239-46.

13- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung and Forschung*; 28: 25-30.

14- Dorderic S, Petrovic S. 2007 . Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109: 458-63.

15- Demirci B, Kosar M, Demirci F. 2007. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of

Chaerophyllum libanoticum Boiss. et kotschy. *Food Chem.* 105: 1512-7.

16- Molyneux PH. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26: 211-9.