

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه *Artemisia Annu* اطراف شهر بابل

دکتر محمود برادران^۱، دکتر منوچهر اشرف پور^{۱*}، حکیمه رضایی^۳، دکتر علی اصغر سفیدگر^۴، حمزه شریفی^۵

^۱ استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

^۲ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

^۳ کارشناس ارشد علوم گیاهی، آموزش و پرورش شهرستان بابل

^۴ دانشیار گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

^۵ مربی گروه زبان دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

نشانی نویسنده مسؤل: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دکتر منوچهر اشرف پور

E-mail: mnrashrafpour@yahoo.com

وصول: ۹۳/۲/۳، اصلاح: ۹۳/۴/۲۲، پذیرش: ۹۳/۵/۱

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان، منبع مهمی برای آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که استفاده‌ی از آن‌ها، می‌تواند به جلوگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد به متابولیسم طبیعی سلول‌ها کمک کرده و از بیماری‌های مربوط به استرس اکسیداتیو جلوگیری کند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر، با هدف تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف *Artemisia Annu* (A.A) انجام شده است.

مواد و روش‌ها: با شناسایی گیاه A.A که با نام محلی «گندواش» خوانده می‌شود، بخش‌های برگ و گل گیاه را به صورت پودر درآورده و عصاره‌گیری با حلال‌های آبی، اتانولی و متانولی صورت گرفت. تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP انجام شد. برای این منظور، محلول‌های ۲۰٪ عصاره به محلول FRAP اضافه شده و پس از انکوبه‌نمودن میزان جذب نوری اندازه‌گیری شد. محلول‌های سولفات آهن و ویتامین C به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: متوسط ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره‌ی متانولی برگ $4/18 \pm 72/18$ میکرومول فرس سولفات و $90/31 \pm 5/27$ میلی‌گرم ویتامین C به ازای هر گرم از وزن خشک بود که به طور قابل ملاحظه‌ای، بالاتر از سایر عصاره‌ها می‌باشد ($p < 0.001$). عصاره‌ی اتانولی برگ و نیز عصاره‌ی متانولی گل از نظر TAC از نظر اهمیت، در مرحله‌ی بعدی قرار داشتند. مقایسه‌ی TAC عصاره‌های آبی برگ و گل از نظر آماری معنادار نبود ($p > 0.05$) ولی عصاره‌های اتانولی برگ و گل تفاوت آماری معناداری نشان دادند ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: عصاره‌های مختلف A.A، دارای TAC متفاوتی هستند که این اختلاف می‌تواند به تفاوت در کارایی حلال‌های مختلف در استخراج مواد آنتی‌اکسیدان گیاه مربوط باشد. به نظر می‌رسد متانول حلال بهتری از اتانول و آب برای استخراج مواد آنتی‌اکسیدان این گیاه باشد و یافته‌های مربوط به TAC عصاره‌های متانولی برگ و گل نشان می‌دهند که احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدان در برگ‌های A.A بیشتر توزیع شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: *Artemisia Annu* آنتی‌اکسیدان، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، عصاره‌گیری.

مقدمه

اشکال متنوعی از رادیکال‌های آزاد که به طور مداوم در طی روندهای متابولیسمی تولید می‌شوند، توسط شبکه‌ی آنتی‌اکسیدانی بدن خنثی می‌گردند و چنانچه ایجاد این مواد از ظرفیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن فراتر برود، سبب آسیب اکسیداتیو بافت‌ها و مولکول‌های زیستی و در نهایت موجب بروز بیماری خواهد شد (۱). رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های واکنشی هستند که در بسیاری از روندهای فیزیولوژیکی و نیز بیماری‌های گوناگون درگیر هستند (۲). آسیب اکسیداتیو در ایجاد طیفی از اختلالات و بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی، کانسر، آرتریت، عوارض سالمندی، اختلالات نورودژنراتیو مثل پارکینسون، الکلیسم، واکنش‌های ناشی از سموم و آسیب کبدی نقش دارد (۳ و ۴). آنتی‌اکسیدان به ماده‌ای اطلاق می‌شود که در مقایسه با یک ماده‌ی اکسیدان، واکنش اکسیداسیون را به طور معناداری به تاخیر انداخته و یا مهار می‌نماید (۴). بنابراین ترکیبات آنتی‌اکسیدان به عنوان عوامل محافظت‌کننده، نقش مهمی در حفظ سلامت ایفا می‌کنند. شواهد نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدانها، خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن، سرطان و بیماری‌های قلبی را کاهش می‌دهند. گیاهان از جمله منابع اولیه‌ی آنتی‌اکسیدانها به‌شمار می‌روند. ویتامین‌های C و E، کاروتن‌ها، ترکیبات فنلی، فیتات‌ها و فیتواستروژن‌ها از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با منشأ گیاهی و غذایی هستند که همگی به‌طور بالقوه‌ای، خطر بروز بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. بخش عمده‌ی ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی مشتق می‌شوند که به لحاظ ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی متفاوت هستند. اگرچه مونوفنل‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ضعیف عمل می‌کنند، اما برخی از آنها مانند گالات‌ها، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی هستند (۳، ۴ و ۵). از میان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فنل‌ها توزیع گسترده‌ای در بسیاری از گیاهان دارند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار

شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس‌های یونی می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (۵).

گیاهان، منبع بالقوه‌ی مهمی برای آنتی‌اکسیدانها هستند. در همین رابطه گفته شده‌است که بخش‌های مختلف گیاه AA مثل برگ‌ها، گل، ساقه و ریشه‌های آن حاوی انواع مختلفی از مواد و متابولیت‌های با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه هستند (۶). *Artemisia Annu* (A.A) گیاهی است از خانواده‌ی Asteraceae که بیش از ۳۰۰ گونه از آن معرفی شده‌است (۷ و ۸). گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند A.A در طب سنتی کشورهای مختلف برای درمان طیفی از بیماری‌ها از جمله مالاریا (۹)، عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی (۸ و ۹)، زخم معده و کانسر (۱۰) به‌کار می‌رود (۱۱ و ۱۲). یافته‌های برخی مطالعات نشان داده‌اند که A.A حاوی غلظت بالای انواعی از مواد بیولوژیکی فعال مانند *Cineole*، *a-Comphor*، *Borneol*، *Comphene*، *Pinene* و *Germacrone-D* است (۸ و ۱۳). همچنین ترکیبات فنلی مختلفی در AA وجود دارند، ولی فلاونوئیدها و هیدروکسی سینامایت‌ها از ترکیبات فنلی اصلی هستند که در آن وجود دارند (۸). عوامل دارای فلاونوئیدهای بالا و نیز انواع زیادی از سایر ترکیبات، دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هستند (۶ و ۱۴).

ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در گیاهان، بسیار متنوع بوده و اثرات و قابلیت استخراج آنها، شدیداً به ساختار شیمیایی آنها وابسته است. به‌گونه‌ای که با تغییر شرایط استخراج مثل حلال‌های به‌کاررفته، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها نیز تغییر می‌یابد (۹ و ۱۵). روش استخراج و عصاره‌گیری و نیز نوع حلال‌های به‌کاررفته، نقش مهمی در تعیین محتوای پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدهای استخراجی از گیاهان ایفا می‌کند (۱۶). تداخل در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ممکن است توسط عوامل گوناگون از جمله

نمونه‌های اندام‌های هوایی گیاه A.A بعد از شناسایی و تایید گیاه توسط دو نفر از استادان سیستماتیک گیاهی دانشگاه مازندران، از زمین‌های زراعی اطراف شهرستان بابل جمع‌آوری شده‌است. جمع‌آوری گیاه موردنظر در ماه-های خرداد و مهر (مرحله‌ی گل‌دهی) صورت گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده، چندبار با آب تمیز شسته و سپس خشک شده و برای این‌که عصاره‌گیری راحت‌تر و بهتر انجام گیرد، توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمده‌است. عصاره‌گیری از پودر برگ و گل گیاه در سه مرحله‌ی مجزا و با سه حلال آبی، اتانولی و متانولی تهیه شده‌است.

برای تهیه‌ی عصاره‌ی آبی، ۲۵ گرم از پودر را در یک ارلن ریخته و حجم را با آب مقطر به ۱۰۰ سی‌سی رساندیم. خمیر حاصل شده را مجدداً با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و دهانه‌ی ارلن را با فویل آلومینیومی بسته و به مدت ۲۴ ساعت آن را روی شیکر قراردادیم. آنگاه، عصاره‌ی به‌دست‌آمده را ابتدا با گاز و سپس با کاغذ صافی صاف کرده‌ایم. بعد از صاف‌شدن، محلول را در پتری دیش ریخته و آن را برای تبخیر آب و خشک‌شدن کامل داخل انکوباتور ۳۷ درجه قراردادیم (۱۹ و ۲۰). بعد از خشک‌شدن عصاره، دهانه‌ی ظرف بسته و برای استفاده در شرایط دور از نور و دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه‌ی عصاره‌ی متانولی و اتانولی نیز به روش فوق عمل شد، ولی به جای آب از اتانول ۹۶٪ و متانول ۸۰٪ استفاده گردید.

در این تحقیق، برای تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی A.A، از روش FRAP استفاده شده‌است (۱۷). برای این منظور، معرف FRAP به صورت روزانه و از طریق حل نمودن ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول TPTZ ۱۰ میلی مولار (10 mM در 40 mM هیدروکلریک اسید)، ۲۵ میلی‌لیتر از بافر استات ۳۰۰ میلی مول برلیتر با PH ۳/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ میلی مولار فریک‌تری کلراید هگزاهیدرات (کلرورفریک) (نسبت ۱:۱۰) تهیه و

مواد غیر آنتی‌اکسیدان و قطبیت حلال‌هایی که در عصاره-گیری به کار می‌روند، به وجود آید (۹).

FRAP) Ferric Reducing Antioxidant (Power) روشی ساده و سریع برای تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی است که واکنش آن به صورت خطی و متناسب با غلظت مولی آنتی‌اکسیدان‌ها صورت می‌گیرد، ولی با بعضی از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند گلوکاتایون سریع واکنش نمی‌دهد (۲، ۱۷ و ۱۸). مطالعه پیرامون یافتن و تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به واسطه‌ی نقش بالقوه‌ی آنها، می‌تواند ارزشمند باشد. اگرچه یافته‌های تعدادی از مطالعات، وجود درجات متفاوتی از خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی برگ AA را نشان داده اند (۶، ۹، ۱۴ و ۱۶)، ولی یافته‌ها نشان می‌دهند که ترکیب شیمیایی و خواص بیولوژیک AA بسته به منشأ جغرافیایی و روش فرآوری و پردازش آنها شدیداً تفاوت دارند (۸). با توجه به تفاوت خواص گیاهان بسته به موقعیت جغرافیای محل رشد آنها و نیز روش عصاره‌گیری و همچنین تفاوت در خواص بخش‌های مختلف یک گیاه، مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی مختلف A.A و مقایسه‌ی تاثیر وابستگی خواص آنتی‌اکسیدانی احتمالی آن با نوع حلالی که در عصاره‌گیری به کار برده می‌شود و همچنین مقایسه‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های به‌دست‌آمده از برگ و گل AA طراحی و به اجرا درآمده‌است.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، از نوع بنیادی بوده و مواد شیمیایی مورد نیاز انجام آن، شامل TPTZ و HCl، اتانول و متانول از مرک و سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) بوده که از شرکت سیگما خریداری شده‌اند. مطالعه در طی چند مرحله، جمع‌آوری، شناسایی و خشک‌نمودن و تهیه‌ی پودر، عصاره‌گیری و تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی به اجرا درآمده‌است.

سپس انکوبه نمودن محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد آماده شد (۸ و ۱۷). غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول در لیتر از فریک سولفات هپتا هیدرات ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) و همچنین ویتامین C با غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر، به عنوان محلول استاندارد استفاده شدند و منحنی های استاندارد مربوط رسم گردید (۲ و ۸). منحنی های کالیبراسیون استاندارد به طور جداگانه، با استفاده از Excel رسم گردید. با توجه به معادله ی خطی ($r^2 = 0.99$) که بر خطی بودن ارتباط داده ها دلالت دارد، منحنی غلظت های نمونه های محلول استاندارد سولفات آهن و اسید آسکوربیک، مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) به صورت معادل سولفات آهن و ویتامین C بیان شده که در این معادله، y جذب در طول موج 593nm و x معادل غلظت است (۲۱). مقادیر حاصل شده، به صورت میکرومول در میلی لیتر از فروس سولفات و یا میلی گرم بر دسی لیتر اسید آسکوربیک به ازای هر گرم از نمونه ی خشک منجمد پودر برگ و یا گل گیاه بیان شد.

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها در هر مرحله به هر لوله ی آزمایش ۱/۸ میلی لیتر از معرف FRAP، ۴۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۱۰ میکرو لیتر از عصاره های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل اضافه شده و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط بدون نور و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در پایان، میزان جذب نوری لوله ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک با اسپکتروفتومتر Colman Junior 35 قرائت شد. قدرت آنتی اکسیدانی احیاء کننده ی فریک بر روی سه نمونه ی مجزا و برای هر نمونه سه مرتبه تکرار و میانگین عدد جذب پاسخ ها در مقایسه با منحنی استاندارد فریک سولفات هپتاهیدرات محاسبه و تعیین شد. به لوله های استاندارد ۵۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف محلول سولفات آهن و یا ویتامین C و به لوله ی بلانک ۵۰ میکرو لیتر از حلال (آب مقطر، اتانول و یا متانول) اضافه-

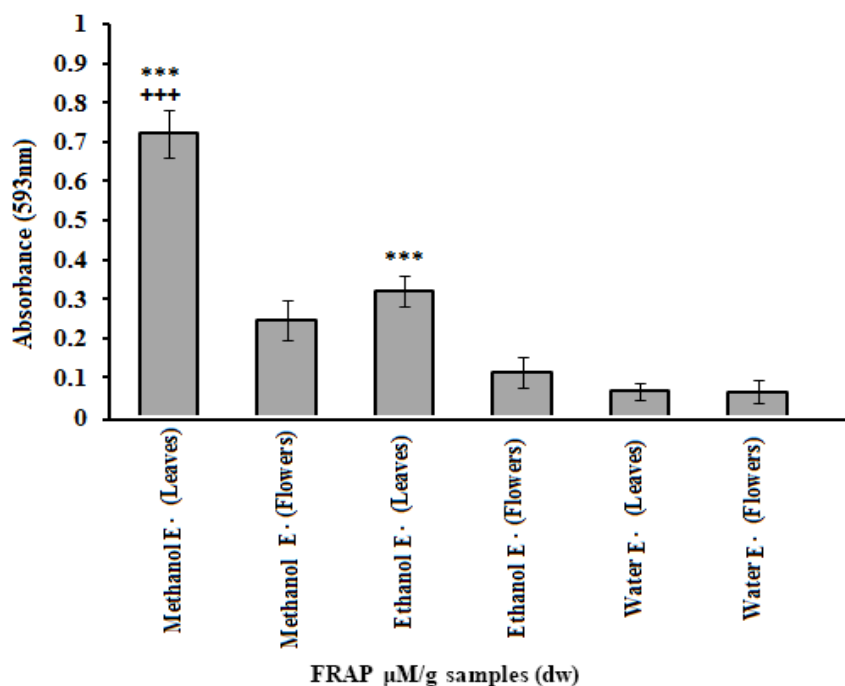
شد.

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در FRAP مبتنی- است بر انتقال الکترون و ظرفیت احیاء کنندگی هر نمونه را نشان می دهد. در این روش، یک پروب اکسیدان مثل یون فریک یک الکترون از مواد آنتی اکسیدان موجود در نمونه دریافت و به فروس تبدیل می شود. به این صورت که کمپلکس فریک تری پیریدیل تریازین (Fe^{III} -TPTZ) در حضور آنتی اکسیدان ها به فروس تری پیریدیل تریازین (Fe^{II} -TPTZ) احیاء شده و شلات حاصل از TPTZ ترکیب رنگی به وجود می آورد که حداکثر جذب را در طول موج ۵۹۳ نانومتر نشان می دهد و مقدار آن به قدرت آنتی اکسیدانی احیاء کننده فریک نمونه بستگی دارد (۱۷، ۲۲، ۲۳ و ۲۴).

آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ی ۱۶ انجام گرفت. میانگین و انحراف معیار برای هر عصاره بر اساس نتایج سه آزمایش مجزا محاسبه شده اند. برای تعیین رابطه ی پاسخ- دوز محلول های استاندارد سولفات آهن و ویتامین C از آنالیز رگرسیون خطی ساده استفاده شد. بعد از محاسبه ی میانگین و انحراف معیار، عدد جذب در آزمایش FRAP برای مقایسه مقادیر به دست آمده از آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شد و $p < 0.05$ مبنای سطح معناداری مقایسه داده ها قرار گرفت.

یافته ها

شکل ۱ میانگین مقدار OD اندازه گیری شده ی غلظت مساوی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره های مختلف گل و برگ A. Annuua را در طول موج ۵۹۳ نانومتر نشان می دهد. در این شکل، به وضوح مشخص است که عصاره های مختلف در محیط استاندارد محلول FRAP دارای عدد جذب متفاوتی هستند. برای همه حلال های اتانولی و متانولی برگ A. Annuua نسبت به گل آن عدد جذب بزرگتری نشان داد و نتایج آزمون ANOVA یک- طرفه نشان می دهد که این تفاوت از نظر آماری معنادار

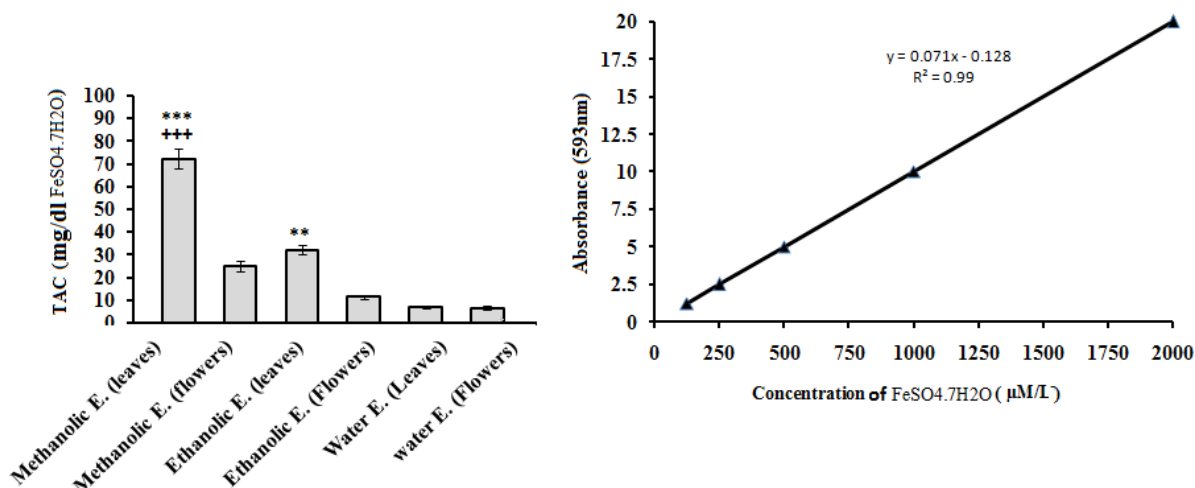


شکل ۱: نمودار مقایسه‌ی عدد جذب غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های مختلف در طول موج ۵۹۳ نانومتر. E=عصاره. *** معناداری تفاوت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ی متانولی برگ و گل را در سطح (p<0.001)، +++ نیز معناداری مقایسه‌ی عصاره متانولی برگ و عصاره‌ی اتانولی برگ را در سطح (p<0.001) و *** معناداری مقایسه‌ی اتانولی برگ نسبت به عصاره‌ی آبی برگ را در سطح (p<0.001) نشان می‌دهد.

آنتی‌اکسیدانی آن است. علاوه بر این، در سمت چپ شکل ۲، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف A. Annua منعکس شده است. براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌های متانولی و اتانولی برگ و گل A. Annua فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان داده‌اند و ترتیب قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها به صورت (عصاره‌ی آبی برگ و گل > عصاره‌ی اتانولی گل > عصاره‌ی متانولی گل > عصاره‌ی اتانولی برگ > عصاره‌ی متانولی برگ) بوده است ولی مقدار TAC عصاره‌های آبی برگ و گل، ناچیز و قابل نظر است (p>0.05). یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره‌ی متانولی برگ A.A از بیشترین مقدار FRAP برخوردار است و مقدار FRAP آن ۱۸/۴ ± ۷۲/۱۸ میکرومول فروس سولفات به ازای هر گرم از وزن عصاره‌ی خشک بود. عصاره‌های متانولی گل و اتانولی برگ نیز دارای مقادیر FRAP مناسبی بوده‌اند که این مقدار به ترتیب ۲۴/۳۷ ± ۲۴/۷۸ و ۳۲ ± ۲/۱ میکرومول فروس سولفات به ازای هر گرم از پودر عصاره‌ی خشک بوده است،

است (p<0.01). در مقایسه‌ی عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز عصاره‌ی متانولی برگ دارای OD بیشتری (۰/۷۲۱) نسبت به عصاره‌ی اتانولی برگ (۰/۳۲) بوده است (p<0.05). عصاره‌های آبی برگ و گل عدد جذب کوچکتری نسبت سایر عصاره‌ها داشتند، ولی اختلاف معناداری میان عصاره‌های آبی برگ (۰/۰۶۵) و گل (۰/۰۶۴) وجود نداشت (p>0.05).

نمودار استاندارد رابطه‌ی دوز- پاسخ محلول‌های سولفات آهن در سمت راست شکل ۲ نشان داده شده که در آن، هر نقطه معرف میانگین عدد جذب سه آزمایش جداگانه می‌باشد. محلول فروس سولفات هپتاهیدرات به عنوان استاندارد آزمایش FRAP در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر به کار برده شد. همانطور که در شکل ۲ (راست) دیده می‌شود، ضریب همبستگی منحنی کالیبراسیون رابطه‌ی غلظت- پاسخ فعالیت آنتی‌اکسیدانی فروس سولفات بسیار بالا بود (R² = 1) که خود، بیانگر رابطه‌ی کاملاً خطی منحنی فعالیت



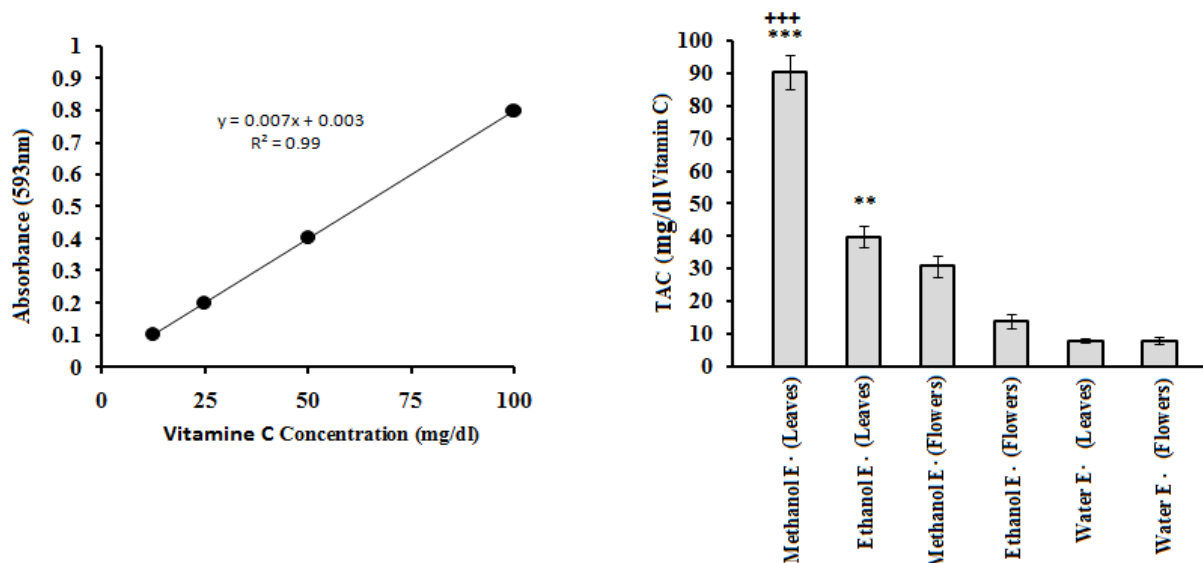
شکل ۲. میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) عصاره های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل *A. Annua* (راست) با توجه به منحنی استاندارد فروس سولفات هپتاهیدرات (چپ) = E. *** معناداری تفاوت ظرفیت آنتی اکسیدانی کل عصاره های متانولی برگ و گل را در سطح $(p < 0.001)$ ، +++ نیز معناداری مقایسه ای عصاره متانولی برگ و عصاره ای اتانولی برگ را در سطح $(p < 0.001)$ و ** معناداری مقایسه ای اتانولی برگ نسبت به عصاره ای برگ را در سطح $(p < 0.01)$ نشان می دهد.

مقدار TAC محاسبه شده از بررسی FRAP عصاره های مختلف برگ و گل تفاوت های زیادی با یکدیگر نشان می دهند. حداکثر خاصیت آنتی اکسیدانی به ترتیب برای عصاره ای متانولی برگ $(90/31 \pm 5/27)$ ، عصاره ای اتانولی برگ $(39/77 \pm 3/2)$ و عصاره ای متانولی گل $(30/68 \pm 3/4)$ میلی گرم ویتامین C در هر دسی لیتر برای هر گرم از وزن خشک پودر گیاه به دست آمد. همانطور که در شکل مربوط دیده می شود عصاره ای اتانولی گل و همچنین عصاره های آبی برگ و گل ظرفیت آنتی اکسیدانی بسیار پایینی نشان داده اند و مقدار TAC آنها به ترتیب $13/75 \pm 2/1$ ، $7/6 \pm 0/73$ و $7/75 \pm 0/66$ میلی گرم در دسی لیتر برای هر گرم از پودر گیاه بوده است که در مقایسه با عصاره های متانولی برگ و گل و نیز عصاره ای اتانولی برگ به طور معناداری کمتر بوده است. اگرچه قدرت آنتی اکسیدانی تام عصاره ای آبی برگ $(7/75 \pm 0/66)$ و گل $(7/6 \pm 0/73)$ تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت $(p > 0.05)$ ، ولی از نظر مقایسه ای عصاره های به دست آمده حداقل خاصیت آنتی اکسیدانی برای عصاره ای آبی برگ و گل به دست آمد.

در حالی که عصاره ای اتانولی گل و عصاره های آبی برگ و گل مقادیر FRAP بسیار پایینی به دست داده اند که مقدار آن به ترتیب $6/55 \pm 0/53$ ، $11/32 \pm 0/78$ و $6/43 \pm 0/77$ میکرومول فروس سولفات به ازای هر گرم از عصاره ای خشک بوده است.

نتایج حاصل از فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ای عصاره های مختلف برگ و گل A.A نسبت به استاندارد ویتامین C و با واحد mg/dl از اسید اسکوربیک در نمودار ۳ منعکس شده اند. در نمودار ۳ (سمت چپ) هر نقطه میانگین عدد جذب سه آزمایش جداگانه می باشد. ویتامین C به عنوان استاندارد آزمایش FRAP در این مطالعه با دوزهای به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر استفاده شد و عدد جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. خطی بودن منحنی کالیبراسیون رابطه ی غلظت و اثر آنتی اکسیدانی با به کارگیری غلظت های مختلف ویتامین C آزمایش شد که در بررسی FRAP انجام شده در مدت ۱۰ دقیقه از انکوبه نمودن ضریب همبستگی $r^2 > 0.99$ به دست آمد که از رابطه ی خطی خوب منحنی غلظت - پاسخ حکایت دارد.

از قسمت راست شکل ۳، می توان مشاهده نمود که



شکل ۳، میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل *A. Annua* (راست) براساس منحنی استاندارد ویتامین C (چپ). E. = عصاره. *** معناداری آماری مقایسه عصاره‌ی متانولی برگ و گل در سطح ($p < 0.001$) و +++ معناداری مقایسه‌ی عصاره‌ی متانولی برگ و عصاره‌ی اتانولی برگ را در سطح ($p < 0.001$) نشان می‌دهد.

بحث

اسیدآسکوربیک و سولفات آهن فاقد فعالیت آنتی-اکسیدانی معنادار بوده‌اند ($p > 0.05$). بنظر می‌رسد که از طریق مقایسه‌ی یافته‌های مربوط به TAC عصاره‌های متانولی برگ و گل می‌توان نتیجه‌گرفت که احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدان در برگ‌های A.A بیشتر توزیع شده‌اند. گزارش شده‌است که محتوای پروتئینی در برگ‌های A. *Annua* بالاتر است (۹) که این امر، احتمالاً ویژگی آنتی-اکسیدانی بیشتری به نمونه‌های عصاره‌ی برگ آن بخشیده‌است.

در مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی متانولی برگ‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری را نشان داد که مقدار آن ۹۰/۳۱ و ۷۲/۱۸ بوده‌است. مشابه یافته‌های این مطالعه، نتایج مطالعات مختلف نیز نشان داده‌اند که عصاره‌ی متانولی *A. Annua* در مقایسه با عصاره‌ی آبی موثرتر بود و به‌ازای هر گرم از نمونه‌ی خشک منجمد، مقدار FRAP بالاتری نسبت به عصاره‌ی آبی به‌دست داد (۲، ۸ و ۱۶). تفاوت در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را می‌توان به اثربخشی حلال‌ها در استخراج موثرتر محتوای آنتی-اکسیدانی نسبت‌داد و در این راستا، عوامل متعددی بر ترکیبات استخراج شده از گیاهان و در نتیجه فعالیت آنتی-

مطالعه‌ی حاضر، به بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی برگ و گل A.A که به‌طور وسیعی در مناطق مختلف اطراف شهرستان بابل رشد می‌کنند، اختصاص یافته‌است. از میان عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی برگ و گل A.A و نمونه‌های استاندارد سولفات آهن و ویتامین C که در شرایط خارج بدن برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP بررسی شده‌اند، عصاره‌ی متانولی آن نسبت به سایر عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نشان داد ($p < 0.01$). در مقایسه‌ی ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی برگ و گل نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل عصاره‌ی متانولی برگ به‌طور معناداری بیشتر از عصاره‌ی گل بوده‌است ($p < 0.001$). نتایج نشان می‌دهند که عصاره‌ی اتانولی برگ نیز از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتری نسبت به عصاره‌ی اتانولی گل برخوردار است ($p < 0.005$). براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی بیشتر از عصاره‌ی آبی بوده، ولی به‌طور کلی، عصاره‌های اتانولی و آبی گل و همچنین عصاره‌ی آبی برگ A.A در مقایسه با نمونه‌های استاندارد

داد که بازدهی استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره‌ی اتانولی ۴۹/۱۳٪، در عصاره‌ی متانولی ۴۶/۸۱٪ و عصاره‌ی آبی کمترین بازدهی استخراج (۲۶/۶۷٪) را داشته‌است (۲۸) که این مقادیر اگرچه با فعالیت آنتی-اکسیدانی به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر از جنبه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین عصاره‌ی آبی مطابقت می‌نماید، ولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر عصاره‌ی متانولی متفاوت است. اخیراً گزارش شده‌است که نتایج یافته‌های FRAP تحت تاثیر قطبیت حلال‌ها قرار می‌گیرد (۲۷). بنابراین تاثیر آنتی‌اکسیدانی ناچیز عصاره‌های آبی A. Annua ممکن است؛ نه به دلیل عدم کفایت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن، بل که به واسطه‌ی عدم کارآمدی FRAP در تعیین اثر آنتی‌اکسیدان‌های هیدروفیلک به دست آمده باشند.

به‌طور کلی، مطابق یافته‌های حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی گل‌ها و برگ‌های گیاه A. Annua دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل متفاوتی هستند. عصاره‌های هیدروالکلی دارای عمل آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی است که میزان آن بسته به نوع حلالی که در عصاره‌گیری استفاده‌شد، تفاوت دارد. به‌منظور مطالعه‌ی بیشتر، اندازه‌گیری ترکیبات و عناصر فعال موجود در هر یک از عصاره‌ها و نیز برگ و گل گیاه مزبور می‌تواند به درک تاثیر آنتی‌اکسیدانی آنها کمک قابل توجهی کند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله گروه نویسندگان از همکاری صمیمانه‌ی پرسنل آزمایشگاه سپید که در انجام این پژوهش کمال همکاری را داشتند، تشکر و قدردانی می‌کند.

اکسیدانی آنها تاثیر می‌گذارند. براساس یافته‌های Moure 2001 کیفیت عصاره‌های طبیعی و اثرات آنتی‌اکسیدانی آنها؛ نه تنها به مدت ذخیره‌سازی و نگهداری، منشأ جغرافیایی و زمان به‌عمل‌آوری آنها، بل که به محیط و عوامل تکنولوژیکی مورد استفاده در عصاره‌گیری نیز بستگی دارد. نوع حلال مورد استفاده نیز یکی از عوامل مهمی است که در ایجاد اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی حائز اهمیت است. چراکه عوامل آنتی‌اکسیدان مختلف قطبیت‌های متفاوتی دارند (۲۵).

در مطالعه‌ی دیگری که برای تعیین اثرات آنتی-اکسیدانی A.A انجام شده‌است، در روش‌های ABTS و DPPH عصاره‌ی متانولی برگ‌های A.A نسبت به عصاره‌های با حلال‌های آب، اتانول، کلروفرم و هگزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشت، ولی عصاره‌ی آبی آنتی-اکسیدان قوی‌تری از عصاره‌ی اتانولی بود (۹). طیفی از ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها و ویتامین‌ها در A. Annua گزارش شده‌اند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی شناخته شده است. چراکه فنل‌ها شلات‌کننده‌های قوی یون‌های فلزی فعال اکسیدکننده هستند و رادیکال‌های آزاد را غیرفعال می‌سازند. عصاره‌ی متانولی برگ A. Annua دارای غلظت بالایی از ترکیبات فنلی است و به‌نظر می‌رسد که مقدار خالص فنل استخراجی به قطبیت حلال‌های به‌کار رفته، وابسته‌است و حلال‌های با قطبیت بالا مانند متانول برای استخراج آن مناسب‌تر هستند. البته آب هم از این جهت قابل مقایسه با متانول است (۲۶). تاثیر قطبیت حلال بر نتایج FRAP اخیراً گزارش شده‌است (۲۷). در مطالعه‌ی اقبال و همکاران، مقدار FRAP عصاره‌ی متانولی A. Annua ۱۱/۸۲ بوده که این مقدار، کمتر از مقدار FRAP عصاره‌های اتانولی و کلروفرمی آن بیشتر بوده‌است (۹). در همین راستا، یافته‌های مطالعه‌ی قادری و همکاران نشان-

References

1. Patel Rajesh M, Patel Natvar J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research,

- 2011; 1: 52-68.
2. Rabeta MS, Nur Faraniza R. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal*, 2013; 20(4): 1691-6.
 3. 3-Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of *Morinda Citrifolia* Fruit Extracts from Various Extraction Processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2007, 2 (1): 70-80.
 4. Apak R., Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem*, 2013, 85(5): 957-98.
 5. Pokorny J. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components. *European Journal of Lipid science and Technology*. 2007, 109(6): 629-42.
 6. Brisibe EA, Umoren UE, Owai PU, Brisibe F. Dietary inclusion of dried *Artemisia annua* leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. *Afr J Biotechnol*. 2008; 7 (22): 4083-92.
 7. Yoon KD, Chin YW, Yang MH, Kim J. Separation of anti-ulcer flavonoids from *Artemisia* extracts by high-speed countercurrent chromatography. *Food Chem*, 2011; 129(2): 679-83.
 8. Gouveia SC, Castilho PC. *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*, 2013, 45 : 170-81.
 9. Iqbal S, Younas U, Wei Chan K, Zia-Ul-Haq M, Ismail M. Chemical Composition of *Artemisia annua* L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. *Molecules*, 2012, 17(5): 6020-32.
 10. Juteau F, Masotti V, Bessière JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, 2002; 73: 532-5.
 11. Carvalho IS, Cavaco T, Brodelius M. Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. *Ind Crops Prod*, 2011; 33(2): 382-8.
 12. Cavar S, Maksimovic M, Vidic D, Paric A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind Crops Prod*, 2012; 37: 479-85.
 13. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: A comprehensive review. *Pharm Biol*, 2011, 49(1): 101-9.
 14. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 2010; 15:3135-70.
 15. Jayaprakasha GK, Girenavar B, Patil BS. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT Food Sci Technol*, 2008; 41: 376-84.
 16. Skowrya M, Gallego MG, Segovia F, Almajano MP. Antioxidant Properties of *Artemisia annua* Extracts in Model Food Emulsions. *Antioxidants*, 2014, 3(1):116-28.
 17. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal. Biochem*, 1996, 239: 70-6.
 18. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp, and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 2003; 23 (12): 1719-26.
 19. Mahesh B, Satish S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J Agric Sci*, 2008; 4(S): 839-43.
 20. Massiha AR, Khoshkholgh Pahlaviani MR, Issazadeh K, Bidarigh S, Zarrabi S. Antibacterial Activity of Essential Oils and Plant Extracts of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.) In Vitro. *ZJRMS*, 2013; 15(6): 14-8.
 21. Philip Jacob P, Madhumitha G, Mary Saral A. Free radical scavenging and reducing power of *Lawsonia inermis* L. seeds. *Asian Pac J Trop Med*, 2011; 4(6):457-61.
 22. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim DO, Heo HJ. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chem*, 2011; 125(2): 417-22.
 23. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol

- content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin Ciocalteu methods. *Food Res Int*, 2011, 44(1): 217-24.
24. Seng Hong Lim C, Lin Lim S. Ferric Reducing Capacity Versus Ferric Reducing Antioxidant Power for Measuring Total Antioxidant Capacity. *Lab Medicine*, 2013; 44:51-5.
 25. Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*, 2001, 34(2):103-9.
 26. López A, Rico M, Rivero A, de Tangil MS. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem*, 2011; 125: 1104-9.
 27. Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int*, 2006, 39(7):791-800.
 28. Ghaderi Ghahfarokhi M, Mamashloo S, Sadeghi Mahoonak AR, Alami M. Evaluation of antioxidant activity, reducing power and free radical scavenging of different extract of *Artemisia annua* L. *Journal on Plant Science Researches*, 2011; 1(Serial 21): 46-57. [Persian]

Antioxidant activity of different extracts of the *Artemisia Annua* growing in an area of Babol city

Baradaran M., ph.D

Assistant professor, department of physiology and pharmacology, faculty medicine of Babol University of medical sciences.

Ashrafpour M., ph.D

Cellular & Molecular Biology Research Center

Rezaei H., MSc

MSc in Plant Sciences, Babol Education and development Organization.

Sefidgar A.A., ph.D

Associate professor, department of Fungology and Parasitology, faculty medicine, Babol University of medical sciences.

Sharifi H., MSc

Instructor in department of English language, faculty medicine of Babol University of medical sciences.

Received:23/04/2014, Revised:13/07/2014, Accepted:23/07/2014

Corresponding Author:

Cellular and molecular biology research Centre, Department of physiology and pharmacology. Babol Univ Med Sci, Babol, Iran.
E-mail: mnrashrafpour@yahoo.com

Abstract

Background: Plants are an important source of antioxidants that can help to cell's normal metabolism via preventing accumulation of free radicals and so, prevent developing diseases associated with oxidative stress. Thus, the present study was performed to determine the antioxidant properties of *Artemisia Annua* extracts (AA).

Methods and materials: at first, *Artemisia Annua* with a local name as Gandvash identified and then some parts of its leaves and flowers into powder. Extracting was done using water, ethanol and methanol solvent. FRAP assay was performed to determine the antioxidant properties. For this purpose, extract solutions with 20% concentration were added to FRAP solution and after incubation, the optical absorption values was measured. The ferrous sulfate and vitamin C were used as standard solutions.

Results: the Mean total antioxidant capacity (TAC) for methanolic leaves extract was 72.18 ± 4.18 micro mol ferrous sulfate and 90.31 ± 5.27 mg of vitamin C per gram of dry weight, which is considerably higher than other extracts ($p < 0.001$). TAC of Ethanolic extract of leaves and Methanolic extract of flowers ranked lower in terms of significance. There was no significant difference between aqueous extracts of leaves and flowers in TAC ($p > 0.05$) while, the ethanol extract of the leaves and flowers were different significantly ($p < 0.01$)

Conclusion: Various extracts of A.A showed different TAC values which may result from some differences in efficiency level of solvents used in extracting of plant's antioxidant substances. It seems that the methanol is better solvent in comparison to the ethanol and water for extracting of antioxidant materials. Besides, The TAC findings of methanolic extracts of leaves and flowers suggest this is likely that the A.A antioxidant compounds distributed more in the leaves.

Keywords: *Artemisia Annua*, antioxidant, total antioxidant capacities, extracting.